

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

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

**Einfluss einer hypoosmotisch-induzierten
Zellschwellung auf die intrazelluläre Zinkhomöostase in
kultivierten Astrozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von
Carolin Grünig
2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Philipp Lang

Das schönste Glück des denkenden Menschen ist, das
Erforschliche erforscht zu haben und das Unerforschliche zu
verehhren.

Johann Wolfgang von Goethe

Für meine geliebte Familie

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Als Publikation:

Kruczek, C., Görg, B., Keitel, V., Pirev, E., Kröncke, K.D.,
Schliess, F., Häussinger, D. 2009. Hypoosmotic swelling affects zinc
homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia* 57: 79-92

I Zusammenfassung

Eine Astrozytenschwellung tritt im Verlauf verschiedener neurologischer Erkrankungen und bei Verletzungen des Gehirns auf. Bei der hepatischen Enzephalopathie (HE) nimmt die Astrozytenschwellung eine Schlüsselrolle in der Pathogenese ein. Die Schwellung von Astrozyten ist mit der Bildung von oxidativem/nitrosativem Stress assoziiert. Reaktive Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) können in unterschiedlichen Zelltypen eine Freisetzung proteingebundener Zinkionen (Zn^{2+}) bewirken und darüber die Funktionen verschiedener Proteine, wie z.B. von Transkriptionsfaktoren, beeinflussen. Da die Bindung einiger Transkriptionsfaktoren an die DNA durch Zinkfingerdomänen vermittelt wird, kann eine Störung der Zinkhomöostase durch oxidativen/nitrosativen Stress die Gentranskription modulieren.

In der vorliegenden Dissertation wurden Effekte einer Astrozytenschwellung auf die Zinkhomöostase unter Verwendung verschiedener zinksensitiver Fluoreszenzindikatoren (*Newport Green*, *Zinquin* und *RhodZin-3-AM*) untersucht und zugrundeliegende Mechanismen charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine durch Hypoosmolarität (205 mosmol/L) induzierte Astrozytenschwellung bereits nach 15 Minuten eine anhaltende, aber durch Einstellung von normoosmotischen Bedingungen (305 mosmol/L) wieder reversible Steigerung der intrazellulären Konzentration „freier“ Zinkionen ($[\text{Zn}^{2+}]_i$) induziert.

Die hypoosmotisch-vermittelte Steigerung von $[\text{Zn}^{2+}]_i$ war sensitiv gegenüber dem Zn^{2+} -Chelator TPEN, den NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK801 und AP5, dem Antioxidans Epigallocatechingallat (EGCG) sowie den Stickoxid-Synthase-Inhibitoren L-NMMA und TRIM.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine hypoosmotisch-induzierte Zellschwellung mit einer nukleären Akkumulation der zinksensitiven Transkriptionsfaktoren metallresponsiver Transkriptionsfaktor 1 (MTF-1) und Spezifitätsprotein 1 (SP1) assoziiert ist. Während die Hochregulation von MTF-1 mit einer verstärkten Transkription der Metallothionein-(MT)-1/2 mRNA einhergeht, war die nukleäre Akkumulation von SP1 mit einer Expressionssteigerung der mRNA des peripheren Benzodiazepinrezeptors (PBR) vergesellschaftet. Sowohl die nukleäre Akkumulation von MTF-1 und SP1, wie auch die mRNA-Expressionssteigerung von MT-1/2 und PBR werden durch den Zn^{2+} -Chelator TPEN gehemmt.

Auch die für die Pathogenese der HE relevanten Faktoren Ammoniak, Diazepam und das *pro*-inflammatorische Zytokin $\text{TNF}\alpha$, die ebenfalls eine Astrozytenschwellung und die Bildung von oxidativem/nitrosativem Stress auslösen, bewirkten eine Freisetzung von Zinkionen aus Proteinen und eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen.

Die Daten zeigen, dass eine durch hypoosmotisches Medium vermittelte Astrozytenschwellung über eine gesteigerte Stickstoffmonoxid-Synthese die Freisetzung von Zinkionen aus Proteinen bewirkt und über zinkabhängige Transkriptionsfaktoren die Gentranskription aktiviert. Während die $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -abhängige Expressionssteigerung der MT-1/2 mRNA einer zytotoxischen Wirkung freier Zinkionen entgegenwirken könnte, kann vermutet werden, dass die Expressionssteigerung des PBR assoziiert ist mit einer bei HE beobachteten gesteigerten Neurosteroidsynthese.

I Summary

Astrocyte swelling is observed in different types of brain injury and is an important event in the pathogenesis of hepatic encephalopathy (HE). Astrocyte swelling induces the formation of reactive nitrogen and oxygen species (RNOS). RNOS formation was shown to promote the release of protein-bound zinc ions (Zn^{2+}) in different celltypes. Zinc plays an important role for the function of many proteins such as for binding of transcription factors to zinc finger binding domains on the DNA. Therefore disturbed zinc homeostasis as induced by oxidative/nitrosative stress may modulate gene transcription.

In the current dissertation the effects of astrocyte swelling on zinc homeostasis were studied using Zn^{2+} -specific fluorescent indicator dyes (*Newport Green*, *Zinquin* and *RhodZin-3-AM*) and the underlying mechanisms were characterized.

The results show that astrocyte swelling as induced by hypoosmolarity (205 mosmol/L) increased the concentration of free intracellular zinc ions ($[\text{Zn}^{2+}]_i$) already within 15 minutes and remained elevated for up to 12 h of observation. This effect was reversible, as elevated $[\text{Zn}^{2+}]_i$ returned to control levels after reconstitution of normoosmolarity (305 mosmol/L).

The hypoosmotically-induced $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -increase was sensitive to the Zn^{2+} chelator TPEN, the NMDA receptor antagonists MK801 and AP5, the antioxidant epigallocatechin gallate (EGCG) and to the nitric oxide synthase inhibitors L-NMMA and TRIM.

The present study shows that hypoosmotically-induced astrocyte swelling triggers nuclear accumulation of the transcription factors metal response element-binding transcription factor 1 (MTF-1) and the specificity protein (SP1). This was associated with enhanced transcription of the MTF-1 or SP1 responsive genes metallothionein-(MT)-1/2 and peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR), respectively. Both, nuclear accumulation of MTF-1 and SP1 as well as increased mRNA expression of MT-1/2 and PBR were abolished by the Zn^{2+} chelator TPEN.

Also further HE-relevant factors such as ammonia, diazepam and the *pro*-inflammatory cytokine $\text{TNF}\alpha$ elevated $[\text{Zn}^{2+}]_i$.

The data show that hypoosmotically-induced astrocyte swelling elevates the intracellular concentration of free zinc ions in a nitric oxide dependent way and enhances zinc dependent gene transcription.

Whereas the $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -mediated elevation of MT-1/2 mRNA expression may counteract cytotoxic effects of free zinc ions, an elevated expression of PBR may enhance neurosteroid synthesis as observed in brain in HE.

II Abkürzungsverzeichnis

AP-5	<i>((2R)-amino-5-phosphonovaleric acid; (2R)-amino-5-phosphonopentanoate)</i>
Apocynin	= Acetovanillon (4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon oder C ₉ H ₁₀ O ₃)
BAPTA-AM	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraazetat
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i>
°C	Grad Celsius
Ca²⁺	Kalziumionen
[Ca²⁺]_i	zytosolische Kalziumionenkonzentration
CaCl₂	Kalziumchlorid
CFF	<i>critical flicker frequency</i> (kritische Flimmerfrequenz)
CO₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
Da	Dalton
DAF-FM diacetate	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Adler Medium
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGCG	Epigallocatechingallat <i>((2R,3R)-2-(3,4,5-Trihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-1(2H)-benzopyran-3,5,7-triol-3-(3,4,5-trihydroxybenzoat) oder C₂₂H₁₈O₁₁)</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i> (Gamma-Aminobuttersäure)
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (sauers Gliafaserprotein)
Gö6850	Bisindolylmaleimide I (3-(1-(3-(dimethylamino)propyl)-1H-indol-3-yl)-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione)
GS	Glutaminsynthetase

h	Stunde
HCl	Wasserstoffchlorid/ in Wasser gelöst vorliegend als Salzsäure
HE	hepatische Enzephalopathie
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonicacid
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
Hoe (Hoechst) 34580	Benzenamine, N,N-dimethyl-4-[5-(4-methyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-/ 23555-00-2
Hz	Hertz (SI-Einheit für die Frequenz)
Ionomycin	Calcium (4 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,10 <i>Z</i> ,12 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>E</i> ,18 <i>R</i> ,19 <i>R</i> ,20 <i>S</i> ,21 <i>S</i>)-19,21-dihydroxy-22-[(2 <i>S</i> ,2' <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,5' <i>S</i>)-5'-[(1 <i>R</i>)-1-hydroxyethyl]-2,5'-dimethyloctahydro-2,2'-bifuran-5-yl]-4,6,8,12,14,18,20-heptamethyl-11-oxido-9-oxodocosa-10,16-dienoat
K	Kaliumion
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
kg/KG	Kilogramm Körpergewicht
LDH	Lactatdehydrogenase
L-NMMA	N(G)-Monomethyl-L-Arginin
M	molare Masse, Quotient aus Masse und Stoffmenge
Mg²⁺	Magnesiumionen
MgCl₂	Magensiumchlorid
mHE	minimale hepatische Enzephalopathie
Mitotracker Green	Benzoxazolium, 2-[3-[5,6-dichloro-1,3-bis[(4-(chloromethyl)phenyl)methyl]-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-ylidene]-1-propenyl]-3-methyl-, chloride/ 201860-17-5
Mitramycin-A	(1 <i>S</i>)-5-deoxy-1- <i>C</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-7-{[2,6-dideoxy-3- <i>O</i> -(2,6-dideoxy-β- <i>D</i> - <i>arabino</i> -hexopyranosyl)-β- <i>D</i> - <i>arabino</i> -hexopyranosyl]oxy}-3-{[2,6-dideoxy-3- <i>C</i> -methyl-β- <i>D</i> - <i>ribo</i> -hexopyranosyl-(1→3)-2,6-dideoxy-β- <i>D</i> - <i>arabino</i> -hexopyranosyl-(1→3)-2,6-dideoxy-β- <i>D</i> - <i>arabino</i> -hexopyranosyl]oxy}-5,10-dihydroxy-6-methyl-4-oxo-1,2,3,4-tetrahydroanthracen-2-yl)-1- <i>O</i> -methyl- <i>D</i> -xylulose
MK-801	Dizocilpin ([5 <i>R</i> ,10 <i>S</i>]-[+]-5-methyl-10,11- dihydro-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>a,d</i>]cyclohepten-5,10-imine)
MT	Metallothionein

MTF-1	<i>metal regulatory transcription factor 1</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaNO₂	Natriumnitrit
NaOH	Natriumhydroxid
Na₃VO₄	Trinatriumtetraoxovanadat
NeuN	<i>Neuronal Nuclear Antigen</i>
NG	<i>Newport Green</i>
NH₄⁺	Ammoniumionen
NH₄Cl	Ammoniumchlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
P	P-Wert, Signifikanzwert
PAA	Polyacrylamid
PBR	peripherer Benzodiazepinrezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen
PI	Propidium Iodid
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ponceau S	<i>3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4-sulfophenylazo]phenylazo)-2,7-naphthalenedisulfonic acid sodium salt</i>
PHES	<i>Psychometric Hepatic Encephalopathy Score</i>
PTN	Protein-Tyrosin-Nitrierung
RhodZin-3-AM	RhodZin\u2122-3 (Farbstoff), AM (C ₄₇ H ₅₃ BrN ₄ O ₁₆)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNOS	reaktive Stick- und Sauerstoffspezies
RONs	reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
S100β	<i>S100 calcium binding protein B</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler)

siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SNOC	S-Nitrosocystein
SP1	Spezifitätsprotein 1
TF	Transkriptionsfaktor
TNFα	Tumor Nekrose Faktor α
TPEN	N,N,N',N'- <i>tetrakis</i> -(2-Pyridylmethyl)ethylenediamine
TRIM	1-[2-(Trifluoromethyl)phenyl]imidazole
TBS-T	<i>TRIS buffered saline</i> , Tween 20
Zn²⁺	Zinkionen
[Zn²⁺]_i	intrazelluläre Zinkionenkonzentration
ZnCl₂	Zinkchlorid
ZnSO₄	Zinksulfat
ZNS	zentrales Nervensystem

III Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Astrozyten.....	1
1.1.1	Eigenschaften und Vorkommen	1
1.1.2	Funktionen.....	2
1.2	Hepatische Enzephalopathie.....	3
1.2.1	Klinik und Diagnostik	3
1.2.2	Therapie	6
1.2.3	Molekulare Pathomechanismen bei der hepatischen Enzephalopathie.....	7
1.2.3.1	Rolle von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren bei der HE	7
1.2.3.2	Rolle des Peripheren Benzodiazepinrezeptors bei der HE	7
1.2.3.3	Veränderungen in der Neurotransmission bei der HE.....	8
1.2.3.4	Rolle von reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies bei der HE ...	9
1.2.4	Astrozytenschwellung in der Pathogenese der HE	10
1.3	Physiologische Funktionen von Zink	11
1.3.1	Eigenschaften, Vorkommen und Funktion.....	11
1.3.2	Zinkbindende Proteine.....	12
1.4	Beeinflussung der Zinkhomöostase durch oxidativen und nitrosativen Stress	14
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Materialien	17
2.1.2	Geräte.....	19
2.1.3	Feinchemikalien.....	19
2.1.4	Primärantikörper	22
2.1.5	Sekundärantikörper	22
2.1.6	<i>Primer</i>	22
2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Präparation und Kultivierung von Rattenastrozyten	23
2.2.2	Experimentelle Behandlung der Astrozytenkulturen.....	24

2.2.3	Nachweis intrazellulärer freier Zinkionen mit dem Fluoreszenzfarbstoff <i>Newport Green</i>	25
2.2.3.1	Semiquantitativer fluorimetrischer Zink-Nachweis.....	25
2.2.3.2	Diskriminierung von zytoplasmatischen und nukleären freien Zinkionen mittels konfokaler <i>Laserscanning</i> Mikroskopie	28
2.2.4	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis intrazellulärer freier Zinkionen mittels Zinquin.....	29
2.2.5	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis mitochondrialer freier Zinkionen mittels RhodZin-3-AM	29
2.2.6	Fluoreszenzmikroskopische Vitalitätsüberprüfung mittels Propidium Iodid.....	30
2.2.7	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Stickstoffmonoxid-Bildung mittels 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein-Diacetat	31
2.2.8	<i>small interfering</i> RNA vermittelter <i>Knockdown</i> des Spezifitätsprotein 1	31
2.2.9	<i>Realtime</i> Polymerasekettenreaktion.....	32
2.2.10	<i>Western-Blot</i>	32
2.2.11	Präparation von Kernextrakten.....	34
2.2.12	Statistische Auswertung der Ergebnisse	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Spezifitätsüberprüfung des Zinkchelators <i>Newport-Green</i>	35
3.2	Einfluss einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Zellschwellung auf die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen.....	36
3.2.1	Wirkung von Hypoosmolarität auf die nukleäre und zytoplasmatische Konzentration freier Zinkionen	36
3.2.2	Kinetik der durch hypoosmotisches Medium vermittelten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen.....	37
3.2.3	Reversibilität der hypoosmotisch-induzierten Steigerung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen	38
3.2.4	Osmolaritätsabhängigkeit der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen.....	39
3.2.5	Nachweis der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen mittels Zinquin	40
3.2.6	Einfluss von Hypoosmolarität auf die mitochondriale Konzentration freier Zinkionen.....	40

3.3	Einfluss von hypoosmotischem Medium und dem Zinkchelator N,N,N',N'-tetrakis-(2-Pyridylmethyl)ethylenediamine auf die Vitalität kultivierter Rattenastrozyten	42
3.4	Charakterisierung beteiligter Signalwege an der durch hypoosmotisches Medium vermittelten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen	44
3.4.1	Bedeutung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration und von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren für den durch hypoosmotisches Zellkulturmedium induzierten Anstieg der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen	44
3.4.2	Bedeutung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies für die durch hypoosmotisches Medium induzierte Steigerung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen	46
3.4.3	Effekt einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Zellschwellung auf die Bildung von Stickstoffmonoxid in kultivierten Rattenastrozyten	47
3.4.4	Bedeutung der durch hypoosmotisches Medium induzierten Stickstoffmonoxid-Synthese für den Anstieg der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen	48
3.4.5	Bedeutung der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration und von Stickstoffmonoxid-Synthasen für die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen.....	49
3.5	Einfluss einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Zellschwellung auf die nukleäre Akkumulation der Transkriptionsfaktoren metallresponsiver Transkriptionsfaktor 1 und Spezifitätsprotein 1	50
3.5.1	Bedeutung der durch hypoosmotisches Medium induzierten Zinkfreisetzung für die nukleäre Akkumulation des metallresponsiven Transkriptionsfaktors 1	50
3.5.2	Bedeutung der Proteinkinase C für die durch hypoosmotisches Medium induzierte nukleäre Akkumulation des Spezifitätsproteins 1	51
3.6	Einfluss einer hypoosmotisch-vermittelten Zellschwellung auf die Gentranskription von Metallothionein und des peripheren Benzodiazepinrezeptors	53
3.6.1	Bedeutung von $[Zn^{2+}]_i$ für die durch hypoosmotisches Medium induzierte Erhöhung der Metallothionein-mRNA-Expression	53
3.6.2	Bedeutung von $[Zn^{2+}]_i$ für die durch hypoosmotisches Medium induzierte Erhöhung der mRNA-Expression des peripheren Benzodiazepinrezeptors	53

3.7	Effekte von Ammoniumchlorid, Diazepam und Tumornekrosefaktor α auf die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen in kultivierten Rattenastrozyten.....	55
-----	---	----

4 **Diskussion** **57**

4.1	Astrozytenschwellung vermittelt eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen – subzellulärer Nachweis mit den Fluoreszenzfarbstoffen <i>Newport Green</i> , Zinquin und RhodZin-3-AM	57
4.2	Kinetik der durch hypoosmotisches Medium vermittelten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen in Astrozyten	59
4.3	Charakterisierung zugrunde liegender molekularer Mechanismen	59
4.3.1	Bedeutung von Kalzium für die durch hypoosmotisches Medium vermittelte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen.....	59
4.3.2	Bedeutung von astroglial-exprimierten NMDA-Rezeptoren für die durch hypoosmotisches Medium vermittelte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen	60
4.3.3	Bedeutung der Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies für die durch hypoosmotisches Medium vermittelte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen	61
4.3.4	Bedeutung der Bildung von Stickstoffmonoxid für die durch hypoosmotisches Medium vermittelte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen	61
4.4	Bedeutung der durch hypoosmotisches Medium induzierten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen für Genexpressionsänderungen	63
4.4.1	Bedeutung der durch hypoosmotisches Medium induzierten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen für die metallresponsiver Transkriptionsfaktor 1 mediierte Gentranskription von Metallothioneinen	63
4.4.2	Bedeutung einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen für die Spezifitätsprotein 1 mediierte Gentranskription des peripheren Benzodiazepinrezeptors	65
4.5	HE-relevante Faktoren vermitteln wie eine experimentell herbeigeführte Astrozytenschwellung eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen	66

4.6	Schlussfolgerung und Perspektive - Pathophysiologische Relevanz der durch Astrozytenschwellung vermittelten Freisetzung von proteingebundenem Zink für die HE	67
-----	---	----

5	Literaturverzeichnis	69
----------	-----------------------------	-----------

1 Einleitung

1.1 Astrozyten

1.1.1 Eigenschaften und Vorkommen

Astrozyten gehören zu den Gliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS). Man unterscheidet drei Gliazelltypen im ZNS: Mikroglia, Oligodendrozyten und Astrozyten. Mikroglia sind immunkompetente Zellen und ähneln in ihrer Funktion Makrophagen. Astrozyten und die Myelinscheiden-bildenden Oligodendrozyten gehören zu den Makrogliazellen (Schiebler *et al.*, 1999).

Astrozyten stellen mit 40 – 50 % die Mehrheit der Gliazellen im ZNS dar, und das relative Verhältnis von Astrozyten zu Neuronen nimmt mit dem Grad der zerebralen Entwicklung eines Lebewesens zu (Ransom *et al.*, 2003).

Morphologisch zeigen Astrozyten einen zentral liegenden rundlichen Zellkern und Fortsätze. Die Astrozytenfortsätze kontaktieren sowohl Kapillaren wie auch neuronale Synapsen. Die an der Oberfläche von Kapillaren endenden "Astrozytenendfüße" bilden eine dichte *Membrana limitans gliae vascularis*. Eine ähnliche *Membrana limitans gliae superficialis* findet sich in Angrenzung an die *Pia mater* (Schiebler *et al.*, 1999).

Anhand morphologischer Kriterien lassen sich drei Astrozytenarten unterscheiden: Faserastrozyten, protoplasmatische Astrozyten und radiäre Glia. Die Faserastrozyten sind im Durchmesser 10 – 12 µm groß. Sie haben lange sehr schmale Fortsätze und kommen vorwiegend in der weißen Substanz vor. Protoplasmatische Astrozyten haben einen Durchmesser von 15 – 25 µm und besitzen kurze, aber stark verzweigte Fortsätze und sind überwiegend in der grauen Substanz zu finden. Die radiäre Glia stellt eine in der Ontogenese früh auftretende Form der Glia dar, die aber auch im adulten Gehirn zu finden ist. Die langen Fortsätze der radiären Glia lenken Nervenzellen bei ihrer Migration während der Hirnentwicklung (Schiebler *et al.*, 1999).

Astrozyten enthalten typischerweise das Intermediärfilament *glial fibrillary acidic protein* (GFAP, "Saures Gliafaserprotein"). GFAP kann neben den zytoplasmatischen Proteinen Glutaminsynthetase (GS) und S-100β als Marker für Astrozyten verwendet werden. Es sind jedoch nur ca. 15 % der Astrozyten im ZNS GFAP positiv, da GFAP ein Marker für „aktivierte“ reaktive Astrozyten ist (Eng und Ghirnikar, 1994).

1.1.2 Funktionen

Während die Funktionen von Astrozyten früher ausschließlich in der Unterstützung von Neuronen gesehen wurden, zeigen neuere Arbeiten, dass sie selbst die synaptische Transmission beeinflussen. Astrozyten sind sowohl an der Bildung der Blut-Hirn-Schranke und der *Pia Mater* beteiligt, als auch an der Regulation der zerebralen Durchblutung (Mulligan und MacVicar, 2004).

Nach neuronaler Schädigung bilden Astrozyten eine sogenannte Glianarbe aus, die neuronale Funktionen beeinträchtigen kann (Bsp. Schlaganfall, Rückenmarksläsionen).

In der embryonalen Entwicklung sowie im Hippocampus ausgereifter Gehirne dienen die Fortsätze der radiären Glia den Neuronen als Leitstrukturen, an welchen Neurone zu ihrem Zielort gelangen können (Rakic, 2005).

Eine weitere wichtige Funktion der Glia ist die neuronale Versorgung mit Nährstoffen. Astrozyten nehmen Glukose aus dem Blut *via* Glukose-Transporter auf und bilden hieraus Glykogen, welches bei Bedarf wieder umgewandelt und zu Pyruvat und Laktat metabolisiert werden kann. Das Laktat wird über Transportsysteme aus der Zelle heraus transportiert und von benachbarten Neuronen aufgenommen (Pellerin und Magistretti, 2005).

Die Regulierung des chemischen Milieus im Interzellularspalt ist eine weitere wichtige Funktion der Astrozyten, welche Neurone vor zu hohen Kalium (K^+)-Ionen-Konzentrationen und Zink (Zn^{2+})-Ionen-Konzentrationen durch Aufnahme schützen. Astrozyten besitzen eine wichtige Rolle in der Entgiftung von Ammoniak, der über die Glutaminsynthetase entgiftet wird. Auch die Regulation des Wasserhaushaltes, des pH-Wertes und die Inaktivierung freier Radikale wird von Astrozyten im Gehirn bewerkstelligt (Orkand *et al.*, 1973; Coles und Deitmer, 2005; Fonseca *et al.*, 2005; Simard und Nedergaard, 2004; Caccamo *et al.*, 2005).

Das bei der Ammoniakentgiftung gebildete Glutamin ist Ausgangssubstrat für die Bildung des Neurotransmitters GABA in GABA-ergen Neuronen (Fonesca *et al.*, 2005). Das Glutamin wird hierfür *via* Glutamin-Transporter in Neurone importiert (Bröer *et al.*, 1997).

Aufgrund ihrer synaptischen Lokalisation und Fähigkeit Neurotransmitter aufzunehmen (Anderson und Swanson, 2000; Anderson *et al.*, 1992) und zu sezernieren (Parpura *et al.*, 2004; Bezzi *et al.*, 2004) beeinflussen Astrozyten außerdem die neuronale Aktivität.

1.2 Hepatische Enzephalopathie

1.2.1 Klinik und Diagnostik

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein potentiell reversibles, neuropsychiatrisches Syndrom, welches im Gefolge akuter oder chronischer Lebererkrankungen auftreten kann (Häussinger, 2006; Hazell und Butterworth, 1999). Neuere Studien weisen jedoch darauf hin, dass die kognitiven Beeinträchtigungen bei der HE nach Auflösung akuter HE-Episoden nicht vollständig reversibel sein können (Alturi *et al.*, 2010; Frederick, 2012; Chen *et al.*, 2012; Riggio *et al.*, 2011; Bajaj *et al.*, 2010). Derzeit kann nicht abschließend beurteilt werden, ob und in welchem Umfang eine Degeneration im Gehirn von HE-Patienten den kognitiven Beeinträchtigungen zugrunde liegen könnten.

Bei der HE kommt es zu einer systemischen und damit einhergehenden zerebralen Erhöhung der Ammoniakkonzentration (Butterworth *et al.*, 1987). Eine eingeschränkte Leberfunktion sowie die Entstehung portosystemischer Umgehungskreisläufe als Folge einer portalen Hypertension bewirken, dass Ammoniak, welches beim Aminosäureabbau entsteht, nicht mehr ausreichend in der Leber entgiftet werden kann. Die daraus resultierende erhöhte zerebrale Ammoniakkonzentration bewirkt eine Astrozytenschwellung. Auch andere Faktoren wie Benzodiazepine, inflammatorische Zytokine und Hyponatriämie lösen eine Astrozytenschwellung aus (Häussinger, 2000 und 2006). Diese Wirkung HE-relevanter Faktoren erklärt, warum Ereignisse wie Blutungen, Traumen, Infektionen, Behandlungen mit Diuretika oder Sedativa, eine zu hohe Proteinzufuhr, eine azidotische Stoffwechsellage oder Elektrolytentgleisungen bei Leberzirrhosepatienten eine HE-Episode auslösen oder verschlimmern können.

Es wird eine subklinische Form der HE, welche als minimale HE (mHE) bezeichnet wird, von einer manifesten HE unterschieden. Bei der manifesten HE unterscheidet man vier Schweregrade. Die Einteilung erfolgt nach den sogenannten *West-Haven*-Kriterien. Die Schweregrade sind charakterisiert durch leichte Persönlichkeitsveränderungen bis hin zum Leberkoma (Conn, 1993). Sowohl Informationen über neuromuskuläre Störungen, als auch neuropsychometrische Tests können bei der Stadieneinteilung helfen (Tabelle 1) (Häussinger, 2006). Die Diagnostik einer minimalen HE (mHE) ist äußerst problematisch, da für den HE Grad I charakteristische Symptome auch bei Patienten ohne Lebererkrankungen beobachtet werden (Häussinger und Sies 2013).

Da die mHE nicht mit manifesten, klinischen Symptomen einhergeht, ist sie nur anhand psychometrischer und neuropsychologischer Tests beurteilbar (Groeneweg *et al.*, 1998; Weissenborn *et al.*, 2001; Kircheis *et al.*, 2002; Kircheis und Häussinger 2008).

Butz *et al.* beschrieben 2010 in einer Studie, dass motorische Symptome im Sinne von verlangsamten Fingerbewegungen, Ataxie und Tremor bei Zirrhose-Patienten schon vor dem Auftreten neuropsychiatrischer Veränderungen feststellbar sind und somit als frühe Marker einer zerebralen Dysfunktion bei der HE angesehen werden können (Butz *et al.*, 2010).

Neurophysiologische Testverfahren, die für die Diagnostik der HE angewendet werden, sind die *Paper-Pencil*-Tests (z.B. Zahlenverbindungstest), computerisierte psychometrische Tests, das Ableiten evozierter Potentiale

sowie die Analyse der kritischen Flimmerfrequenz (*critical flicker frequency* = CFF) (Kircheis *et al.*, 2002; Kircheis und Häussinger 2008; Weissenborn *et al.*, 2001).

Die in der klinischen Praxis am häufigsten eingesetzten und validierten Testverfahren bestehen in der Bestimmung des *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score (PHES)* sowie in der Analyse der CFF. Insbesondere die CFF bietet erstmalig ein objektives Messverfahren zur Beurteilung des HE-Schweregrades (Kircheis *et al.*, 2002). Sie spielt mittlerweile als sensibles und reproduzierbares Testverfahren eine große Bedeutung in der Diagnostik, Quantifizierung und Verlaufsbeurteilung der HE (Romero-Gomez *et al.*, 2007). Bei der CFF handelt es sich um diejenige Frequenz, bei der ein hochfrequenter, blinkender Lichtreiz als flimmernd wahrgenommen wird. Es wurde bei einem Mittelwert von 39 Hz eine 100-prozentige Unterscheidung zwischen Patienten mit manifester HE und Patienten mit fehlender HE (HE-Grad 0) und fehlender Leberzirrhose beobachtet. Eine Unterscheidung von Patienten mit mHE von Patienten ohne HE (HE-Grad 0) gelang mit einer Sensitivität von 55 % und einer Spezifität von 100 % (Kircheis *et al.*, 2002). Es zeigte sich eine signifikante, statistische Korrelation zwischen der CFF und individueller, psychometrischer Tests (Kircheis *et al.*, 2002).

Die am häufigsten eingesetzten psychometrischen Testbatterien zur Diagnostik der mHE sind bisher nicht standardisiert. Daraus ergeben sich Probleme bei der Definition der mHE, die durch diese psychometrischen Testverfahren erfasst wird (Häussinger, 2013). Daher wurde eine neue Einteilung der HE-Schweregrade vorgeschlagen (Häussinger *et al.*, 2006), bei der die mHE und die bisher bekannten Grade I und II der manifesten HE unter dem Sammelbegriff „geringgradige HE“ zusammengefasst werden. Die geringgradige HE kann durch objektive Testverfahren, wie CFF und Ableitung evozierter Potenziale diagnostiziert werden (Häussinger *et al.*, 2006).

Bildgebende Untersuchungen werden vorwiegend bei differentialdiagnostischen oder wissenschaftlichen Fragestellungen eingesetzt.

Ebenfalls differentialdiagnostische Bedeutung hat die Bestimmung des Ammoniakspiegels im Blut. Die Höhe der venösen Plasmaammoniakkonzentration korreliert aber nicht zuverlässig mit dem Schweregrad der HE. Bessere Ergebnisse werden mit arteriellen Blutproben erreicht (Kramer *et al.*, 2000), welche sofort weiterverarbeitet werden müssen.

Tabelle 1: Einteilung der Hepatischen Enzephalopathie (HE) nach den *West-Haven-Kriterien*

Einteilung der HE in Schweregrade nach der *West-Haven*-Klassifikation (Bewusstsein, Intellekt und Verhalten) ergänzt durch die Erfassung neuromuskulärer Störungen und neuropsychometrischer Tests. CFF: kritische Flimmerfrequenz.

Nach Häussinger, 2006. Hepatic Encephalopathy, Praxis (Bern 1994)

Grad der HE	Bewusstsein	Intellekt	Verhalten	Neuro-muskuläre Störungen	Neuropsychometrie
Grad 0 (keine HE)	unauffällig	unauffällig	unauffällig	nicht nachweisbar	unauffällig, CFF > 39 Hz
Grad 0 (minimale HE, keine manifeste HE)	unauffällig	unauffällig	unauffällig	nicht nachweisbar?	pathologische Testresultate
Grad I (gering-gradig manifeste HE)	Schlafstörungen, Schläfrigkeit, Schlaflosigkeit, Umkehrung Schlaf/Wachrhythmus	verminderte Konzentration, verminderte Aufmerksamkeit, verminderte Reaktionsgeschwindigkeit	zunehmende Erschöpfung, Euphorie oder Depression, Geschwätzigkeit, Reizbarkeit	gestörte Feinmotorik, feinschlägiges Fingerzittern, Schriftänderung	pathologische Testresultate, CFF < 39 Hz
Grad II (mittel-gradig manifeste HE)	Verlangsamung, starke Schläfrigkeit, träger Gedankenfluss, Lethargie	kein Zeitgefühl, Rechnen beeinträchtigt, Erinnerungslücken	Enthemmung, Persönlichkeitsänderung, Angst, Teilnahmslosigkeit	Zunahme des Händezitterns, verwaschene Sprache, verminderte Reflexe, verstärkter Muskeltonus	pathologische Resultate, CFF < 39 Hz
Grad III (schwere manifeste HE, Vorstufe des Komas)	Desorientiertheit, stärkste Schläfrigkeit, Bewusstseins-eintrübung, Verwirrtheit, Bewegungslosigkeit, z.T. „Erstarrung“	fortschreitende Erinnerungslücken (z.B. für Erkrankung), Unfähigkeit zu Rechnen	Desorientiertheit (zeitlich und örtlich), Wahnvorstellungen, Aggressionen	verstärkte Reflexe, Zunahme krankhafter Fremdreflexe, unwillkürliche rhythmische Augenbewegungen (Augenzittern), Augenflattern, Muskelkrämpfe, fortschreitende Spastik	keine psychometrischen bzw. computerpsychometrischen oder CFF-Untersuchungen durchführbar
Grad IV (schwerste Form der manifesten HE, Koma)	Bewusstlosigkeit	keine Funktion	erloschen	Pupillenerweiterung, Streckkrämpfe, Nackensteifigkeit, Erlöschen der Reflexe, Tonusverlust	keine psychometrischen bzw. computerpsychometrischen oder CFF-Untersuchungen durchführbar

1.2.2 Therapie

Die wichtigste Therapiemaßnahme besteht in der Elimination auslösender Faktoren (Stillen gastrointestinaler Blutungen, antibiotische Therapie von Infektionen, Absetzen von Sedativa- oder Diuretika).

Zur Therapie der HE liegen nur wenige placebokontrollierte und randomisierte Studien vor.

Die Eiweißzufuhr sollte mindestens 1 g/kgKG pro Tag betragen, da die sonst einsetzende katabole Situation zu einer Verschlechterung der Infektabwehr führen kann (Cordoba *et al.*, 2004).

Die orale Applikation von verzweigtkettigen Aminosäuren kann bei hochgradig proteinintoleranten Patienten die HE-Symptomatik verbessern (Horst *et al.*, 1984).

In der Vergangenheit haben zahlreiche Studien gezeigt, dass oral eingenommene Laktulose und nicht resorbierbare Antibiotika vergleichbar wirksam sind (Conn *et al.*, 1977; Atterbury *et al.*, 1978; Strauss *et al.*, 1992; DiPiazza *et al.*, 1991).

Eine neuere große Studie von Bass *et al.* aus dem Jahr 2010 belegt die Effektivität von Rifaximin in der Prävention der HE (Bass *et al.*, 2010). In einer anderen Studie blieb die Wirksamkeit von Rifaximin in einer Subgruppe von Patienten aus, die nicht gleichzeitig zu Rifaximin mit Laktulose behandelt wurden (Sharma *et al.*, 2010). Eine Placebogruppe fehlte in dieser Studie.

Die Wirkung von Laktulose-Einläufen in der Behandlung der HE gilt als gesichert (Uribe *et al.*, 1987). Nachdem die orale Laktulosetherapie schon lange typischerweise in der Therapie der HE klinische Anwendung fand, ohne dass eine placebokontrollierte Studie die Wirksamkeit belegte, konnten Sharma *et al.* 2009 in einer placebokontrollierten Studie die Wirksamkeit von Laktulose in der Prävention der rekurrenten HE als Sekundärprophylaxe zeigen (Sharma *et al.*, 2009). Auch nach gastrointestinalen Blutungen sollte in ein- bis zweistündigen Abständen eine Laktulose-Gabe von 500 – 1000 ml 20 %-iger Laktulose oral oder als Einlauf erfolgen, da die Studie von Sharma *et al.* aus dem Jahr 2011 zeigt, dass Laktulose in der Verhinderung der HE bei Leberzirrhosepatienten mit akuten Varizenblutungen effektiv ist (Sharma *et al.*, 2011).

Eine metabolische Alkalose wirkt sich positiv auf die HE aus, weil sie zu einer kompensatorischen Hochregulierung des Harnstoffzyklus und somit zu einer gesteigerten Ammoniakentgiftung beiträgt.

L-Ornithin-L-aspartat hat sich in kontrollierten Studien als wirksam herausgestellt (Kircheis *et al.*, 1997; Stauch *et al.*, 1998), indem es im Harnstoffzyklus die Ammoniumentgiftung steigert.

Leberzirrhosepatienten zeigen erniedrigte Serumzinkspiegel. Die Wirksamkeit einer Zinksupplementation im Hinblick auf eine Verbesserung der HE-Symptomatik wird jedoch kontrovers diskutiert. Während einige Untersuchungen eine Steigerung der mentalen Leistungsfähigkeit unter Zinksupplementation zeigen konnten (Marchesini *et al.*, 1996; Reding *et al.*, 1984; Riggio *et al.*, 1992), blieben statistisch signifikante Effekte auf die HE-Symptomatik in der Arbeitsgruppe von Bresci *et al.* 1993 aus.

Die Wirksamkeit von Probiotika gilt als nicht gesichert (Pereg *et al.*, 2011).

Die einzige therapeutisch langfristig wirksame Option bei der Behandlung von HE-Patienten besteht in einer Lebertransplantation.

1.2.3 Molekulare Pathomechanismen bei der hepatischen Enzephalopathie

1.2.3.1 Rolle von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren bei der HE

Ammoniak bewirkt in Astrozyten bereits in geringen Konzentrationen eine Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren), was zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) und zu nachfolgender Bildung von reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies führt (Schliess *et al.*, 2002). Aufgrund der erhöhten NO-Bildung kommt es sowohl zu einer zerebalen Hyperämie (Larsen *et al.*, 2001) als auch zu einer Tyrosin-Nitrierung von für die Pathogenese der HE relevanten Proteinen wie der Glutaminsynthetase (GS), dessen Aktivität dadurch vermindert wird (Görg *et al.*, 2007; Schliess *et al.*, 2002). Die Protein-Tyrosin-Nitrierung (PTN) wurde *in vivo* nachgewiesen in Tiermodellen zur HE (Schliess *et al.*, 2002), aber auch in *post mortem* Hirnproben von Zirrhose-Patienten mit HE (Görg *et al.*, 2010). In Tiermodellen zur HE wurde sie insbesondere in kapillarnahen Astrozyten beobachtet, was möglicherweise eine verringerte Integrität der Blut-Hirn-Schranke bewirken könnte (Schliess *et al.*, 2002; Görg *et al.*, 2003, 2006). Studien haben gezeigt, dass NMDA-Rezeptorantagonisten sowohl die Protein-Tyrosin-Nitrierung (Schliess *et al.*, 2002), als auch die Ammoniaktoxizität im Tiermodell (Hermenegildo *et al.*, 1996; Vogels *et al.*, 1997) verhindern können, was für eine bedeutende Rolle der NMDA-Rezeptoraktivierung in der HE-Pathogenese spricht.

1.2.3.2 Rolle des Peripheren Benzodiazepinrezeptors bei der HE

Der Periphere Benzodiazepinrezeptor (PBR) ist Teil eines 140-200 kDa Proteinkomplexes. Er ist hauptsächlich an der Außenseite der Mitochondrienmembran lokalisiert und kommt im ZNS in Gliazellen vor (Anholt *et al.*, 1986; Itzhak *et al.*, 1993). Die am besten untersuchte Funktion des PBRs ist die Neurosteroidbiosynthese (Papadopoulos *et al.*, 1992, 1993). Der PBR transportiert Cholesterol als Substrat für die Neurosteroidbiosynthese von der Außenseite der Mitochondrienmembran in das Mitochondrieninnere (Papadopoulos *et al.*, 1992; Papadopoulos, 1993), was den limitierenden Faktor bei der Neurosteroidbiosynthese darstellt (Simpson und Waterman, 1983; Jefcoate *et al.*, 1992). Ende der 80er Jahre wurde der PBR erstmalig als ein möglicher für die Pathogenese der HE relevanter Faktor diskutiert (Ducis *et al.*, 1989). 1990 fanden Lavoie *et al.* in Hirnschnitten von Leberzirrhosepatienten, die im Leberkoma gestorben waren, eine erhöhte Expression des peripheren Benzodiazepinrezeptors. Nachfolgende Studien zeigten, dass Ammoniak einen Anstieg der PBR-Expression und eine gesteigerte Neurosteroidsynthese

induziert (Giguere *et al.*, 1992), welche eine Steigerung des GABAergen Tonus verursachen könnte. Ein erhöhter GABAerge Tonus kann mit einer bei HE auftretenden Neurodepression einhergehen.

Es konnte eine von PBR-Liganden induzierte Bildung freier Radikale nachgewiesen werden (Jayakumar *et al.*, 2002; Fennell *et al.*, 2001; Görg *et al.*, 2003), welche wiederum Zellschwellung (Lachmann *et al.*, 2013), Proteinmodifikationen, RNA-Oxidation und weitere Veränderungen in der Signaltransduktion bedingen (Görg *et al.* 2003).

1.2.3.3 Veränderungen in der Neurotransmission bei der HE

Die hepatische Enzephalopathie ist ein neuropsychiatrisches Syndrom, welches in der Folge akuter und chronischer Lebererkrankungen auftreten kann (Häussinger, 2006; Hazell und Butterworth, 1999). Klinisch können die Symptome von einer leichten Beeinträchtigung der Konzentrationsfähigkeit bis hin zu schweren Bewusstseinsstörungen, Koma und Tod reichen. Die klinischen Symptome gehen mit einem veränderten Verhältnis zwischen inhibitorischer und exzitatorischer Neurotransmission einher. Während die Symptomatik der HE bei chronischen Lebererkrankungen durch Neurodepression gekennzeichnet ist, ist sie bei der HE im Rahmen eines fulminanten Leberversagens durch Neuroexzitation charakterisiert (Häussinger, 2006).

Glutamat ist der bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn. Ammoniak ist Bestandteil des Glutamat-Glutamin-Zyklus (Chan und Butterworth, 2005). Unter physiologischen Bedingungen dient die astrozytäre Glutaminsynthetase (GS) der Ammoniakentgiftung, indem aus Glutamat und NH_4^+ Glutamin gebildet wird. Glutamin wird *via* spezifischer Transportsysteme aus den Astrozyten exportiert und gelangt über neuronale Glutamintransporter in Nerven, wo durch die Glutaminase aus Glutamin der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat und NH_4^+ entstehen. Glutamat wird insbesondere in Vesikeln gespeichert und bei Erregung freigesetzt. Die dadurch induzierte Exzitation wird durch Astrozyten kontrolliert, indem sie extrazelluläres Glutamat wieder aufnehmen und so Neurone vor Übererregung schützen.

Die gestörte glutamaterge Neurotransmission bei HE ist gekennzeichnet durch erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentrationen. Es konnte gezeigt werden, dass die Gesamtkonzentration von Glutamat im Hirngewebe von Patienten, welche im Leberkoma gestorben waren, reduziert war (Lavoie *et al.*, 1987). Die extrazellulären Glutamatkonzentrationen von Tieren, die sich im akuten Leberversagen befunden hatten, waren jedoch erhöht (de Knecht *et al.*, 1994). Hamberger *et al.* beobachteten 1982 eine durch Ammoniak induzierte gesteigerte neuronalen Glutamat-Freisetzung. Mehrere Arbeiten zeigen außerdem, dass Ammoniak eine Glutamatfreisetzung aus Astrozyten induziert (Görg *et al.*, 2010, Rose *et al.*, 2005). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Ammoniak eine Herunterregulation der Glutamatrezeptoren in Astrozyten bewirkt (Chan *et al.*, 2000; Suarez *et al.*, 2000; Knecht *et al.* 1997), und dadurch die Glutamataufnahme durch Astrozyten erniedrigt.

Butterworth und Giguere zeigten 1986, dass HE-Patienten stark erhöhte zerebrale Glutaminkonzentrationen aufweisen. Mehrere Arbeiten zeigen, dass

infolge einer erhöhten Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies die Glutaminsynthetase in mit Ammoniak behandelten Astrozyten und in Gehirnen von Zirrhosepatienten mit HE durch Tyrosinnitrierung inaktiviert wird (Schliess *et al.*, 2002; Görg *et al.*, 2007 und 2010). Tyrosin-Nitrierung der GS könnte zu einer Aktivitätsabnahme des Enzyms führen. Die funktionale Bedeutung der Tyrosin-Nitrierung der GS bei der HE ist bislang nicht geklärt.

1.2.3.4 Rolle von reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies bei der HE

Eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der HE und der Ammoniaktoxizität spielt die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) (Häussinger *et al.*, 2006; Schliess *et al.*, 2006 und 2008; Norenberg *et al.*, 2004). In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Astrozytenschwellung die Bildung von RNOS induziert (Reinehr *et al.*, 2007, Schliess *et al.*, 2002, 2004). Andererseits deuten andere Arbeiten darauf hin, dass RNOS auch selbst eine Astrozytenschwellung induzieren (Lachmann *et al.*, 2013; Norenberg *et al.*, 2007). Osmotischer und oxidativer Stress können sich demzufolge wechselseitig verstärken (Häussinger, 2006): einerseits erhöht eine Astrozytenschwellung die Synthese von RNOS (Reinehr *et al.*, 2007, Schliess *et al.*, 2002, 2004), und andererseits bewirken RNOS eine Astrozytenschwellung (Lachmann *et al.*, 2013; Norenberg *et al.*, 2007). Folgen erhöhter RNOS-Bildung in Astrozyten sind die Induktion einer Protein-Tyrosin-Nitrierung (Schliess *et al.*, 2002, 2004) und RNA-Oxidation (Görg *et al.*, 2008). Die Protein-Tyrosin-Nitrierung (PTN) wurde *in vivo* nachgewiesen in Tiermodellen zur HE (Schliess *et al.*, 2002), aber auch in *post mortem* Hirnproben von Zirrhose-Patienten mit HE (Görg *et al.*, 2010). In Tiermodellen zur HE wurde sie insbesondere in kapillarnahen Astrozyten beobachtet, was möglicherweise eine verringerte Integrität der Blut-Hirn-Schranke bewirken könnte (Schliess *et al.*, 2002; Görg *et al.*, 2003, 2006). In Ihrer Gesamtheit tragen die Folgen erhöhter RNOS-Bildung zu Veränderungen der Astrozytenfunktion, des Zellstoffwechsels, der Genexpression und der glioneuronalen Kommunikation bei.

1.2.4 Astrozytenschwellung in der Pathogenese der HE

Die HE ist die klinische Manifestation eines geringgradigen, chronischen Gliaödems (Häussinger *et al.*, 1994). Nach heutigem Kenntnisstand beeinträchtigt die Astrozytenschwellung die Funktion der Astrozyten und stört die glioneuronale Kommunikation. Es ist allgemein anerkannt, dass Ammoniak ein Haupttoxin bei der HE darstellt. Auch andere HE-relevante Faktoren wie Benzodiazepine, Hyponatriämie und inflammatorische Zytokine können eine Astrozytenschwellung verursachen oder verstärken (Häussinger, 2006). Die Zellschwellung ist vergesellschaftet mit einer Osmolytdepletion und aktiviert Signaltransduktionsprozesse, welche auf vielfältige Weise den Zellstoffwechsel und die Genexpression verändern (Schliess *et al.*, 2007).

Eine Astrozytenschwellung ist ein frühes Ereignis unterschiedlicher Hirnfunktionsstörungen, die durch Schlaganfall, Traumen, Ischämie oder Lebererkrankungen (Häussinger, 1994 und 2006; Kimelberg, 2005) ausgelöst werden können. Bei der hepatischen Enzephalopathie, einer potentiell reversiblen neuropsychiatrischen Komplikation, ist die dort zu beobachtende Astrozytenschwellung mit der Bildung von Glutamin, welches bei der Ammoniakentgiftung entsteht, vergesellschaftet (Norenberg, 1998). Die Glutaminakkumulation induziert osmotischen Stress, der durch eine Freisetzung organischer Osmolyte aus den Astrozyten begleitet wird (Häussinger *et al.*, 1994). Hierdurch wird der Osmolytpool der Astrozyten depletiert und der Astrozyt empfindlich gegenüber weiteren eine Astrozytenschwellung induzierenden Faktoren wie *pro*-inflammatorischen Zytokinen, Benzodiazepinen etc.. Während Astrozytenschwellung infolge kompletten Leberversagens zu der Entwicklung eines klinisch ausgeprägten zerebralen Ödems führt, ist die HE infolge einer chronischen Lebererkrankung durch ein geringgradiges zerebrales Ödem charakterisiert (Häussinger *et al.*, 1994).

Abb. 1 zeigt schematisch das heutige akzeptierte Pathogenesemodell. Die Wirkung einer heterogenen Gruppe HE-präzipitierender Faktoren konvergiert auf der Ebene der Astrozytenschwellung und der Bildung von RNOS. Da sich Zellschwellung und Synthese von RNOS wechselseitig bedingen können, setzt sich hierdurch ein sich selbst verstärkender Kreislauf in Gang. In der Folge werden Proteine posttranslational modifiziert, z.B. durch Phosphorylierung und Tyrosinierung (Schliess *et al.*, 2002) oder Glycosylierung (Karababa *et al.*, 2014), RNA oxidiert (Görg *et al.*, 2008), die Gentranskription moduliert (Warskulat *et al.*, 2001; Görg *et al.*, 2013) und Seneszenz induziert (Görg *et al.*, 2015). Daraus resultiert eine Astrozytendysfunktion, welche Störungen der glioneuronalen Kommunikation und der synaptischen Übertragung verursacht (Häussinger, 2006).

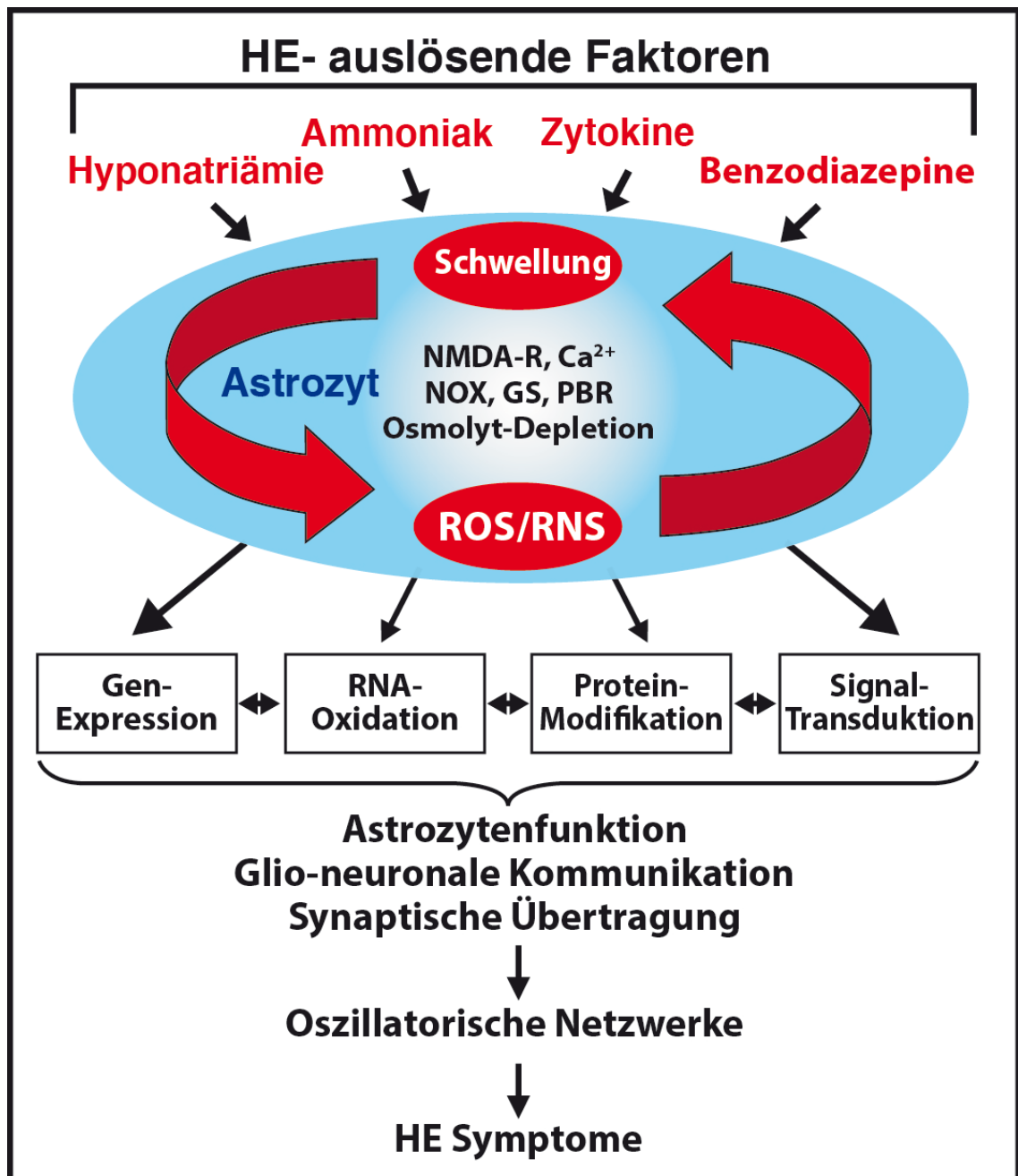


Abb. 1: Schematische Darstellung zur Pathogenese der Hepatischen Enzephalopathie (HE). Modifiziert nach Häussinger und Sies, 2013

1.3 Physiologische Funktionen von Zink

1.3.1 Eigenschaften, Vorkommen und Funktion

Die höchsten Zinkionen-Konzentrationen (Zn^{2+} -Konzentrationen) im menschlichen Körper finden sich in den β -Zellen des Pankreas und im Gehirn (Frazzini *et al.*, 2006). Zink ist ein essentielles Spurenelement und muss mit der Nahrung zugeführt werden. Der Zinkgehalt des Körpers eines gesunden Erwachsenen beträgt 2 bis 3 g. Die Plasma-Zink-Konzentration liegt unter physiologischen Bedingungen bei 15 bis 20 $\mu\text{mol/L}$ (King *et al.*, 2000). Obwohl in eukaryotischen Zellen eine Zn^{2+} -Konzentration von 180 bis 250 $\mu\text{mol/L}$

vorliegt, liegt die Konzentration von intrazellulärem, freiem Zn^{2+} ($[\text{Zn}^{2+}]_i$) im pico- bis nanomolaren Bereich (Palmiter und Findley, 1995; Krezel und Maret, 2006). Zerebrales Zink ist vorwiegend in synaptischen Vesikeln glutaminerger Neurone lokalisiert (Wei *et al.*, 2004). Bei seiner Freisetzung moduliert freies Zn^{2+} die Neurotransmission, sowohl an inhibitorischen GABA-Rezeptoren als auch an exzitatorischen Glutamaterezeptoren (Smart *et al.*, 1994; Xie *et al.*, 1994). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Zn^{2+} in hohen Konzentrationen toxisch auf Neurone wirkt und neuronale Apoptose und Zelltod induziert (Kim *et al.*, 1999; Lobner *et al.*, 2000). Unter physiologischen Bedingungen schützen Astrozyten Neurone vor zu hohen extrazellulären Zn^{2+} - und K^+ -Konzentrationen, indem die Ionen aus dem synaptischen Spalt aufgenommen werden (Simard und Nedergaard, 2004).

Als zweiwertiges Kation kommt Zn^{2+} hauptsächlich molekular gebunden in zahlreichen Enzymen, Strukturproteinen, im Zinkspeicherprotein Metallothionein (MT) und in Transkriptionsfaktoren (TF) vor (Choi und Koh, 1998). In molekular gebundener Form hat Zn^{2+} katalytische oder strukturgebende Bedeutung. So ist Zn^{2+} im TF *metal regulatory transcription factor 1* (MTF-1) und im Spezifitätsprotein 1 (SP1) Bestandteil von Zinkfingerdomänen (Vallee und Falchuk, 1993), welche für die DNA-Bindung verantwortlich sind. Dort, aber auch in anderen Proteinen, stabilisiert Zn^{2+} die Proteinkonformation in Cystein-Histidin-Tetrameren (Abb. 2). Oxidativer Stress, Inflammation und Schwermetallbelastung führen zu einer Freisetzung von Zn^{2+} aus den Zn^{2+} -Schwefel-Komplexen von Proteinen und damit zu einem Anstieg von $[\text{Zn}^{2+}]_i$ in unterschiedlichen Zelltypen (Kröncke, 2007).

Eine Vielzahl von Arbeiten weisen darauf hin, dass die $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Homöostase eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion und Genexpression spielt und damit an der Kontrolle von Energiestoffwechsel, Proliferation und Apoptose beteiligt ist (Beyersmann und Haase, 2001; Kröncke 2001b, 2007).

Zink beeinflusst Wachstum und Entwicklung (MacDonald *et al.*, 2000) sowie die Immunabwehr (Fraker *et al.*, 2000) und besitzt antioxidative Eigenschaften (Powell, 2000).

Im Gehirn ist Zn^{2+} essentiell für die Ausbildung von Langzeitgedächtnis und der Aufrechterhaltung der synaptischen Plastizität (Li *et al.*, 2001).

Während in einigen Studien beobachtet wurde, dass eine exzessive Zn^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern und ein erhöhter transsynaptischer Zn^{2+} -Transport bei Hirnfunktionsstörungen nach Schlaganfall, Traumen, Epilepsie und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt ist (Frazzini *et al.*, 2006; Takeda, 2001; Vallee und Falchuk, 1993), ist andererseits ein Zinkdefizit mit Störungen von Gedächtnis, Lernleistung und emotionaler Stabilität assoziiert (Takeda *et al.* 2000; Cope *et al.* 2010).

1.3.2 Zinkbindende Proteine

Metallothioneine (MT) zählen zu den Proteinen, die Zink binden können. Sie haben ein Molekulargewicht zwischen 6000 - 7000 Da und bestehen aus 60 - 68 Aminosäuren (Kagi und Kojima, 1987). In Säugetieren kommen vier verschiedene MT-Isoformen vor. Während MT-1 und MT-2 ubiquitär im Körper gefunden werden, finden sich die Isoformen MT-3 und MT-4 hauptsächlich in Gehirn (Montoliu *et al.*, 2000) und Haut (Moffat und Denizeau, 1997). MT ist ein

monomeres Protein, welches sich aus zwei globulären Domänen zusammensetzt. Die α -Domäne kann drei und die β -Domäne vier Metallionen, insbesondere Zn^{2+} , in Metall-Schwefel-Clustern binden (Abb. 2) (Riek *et al.*, 1999).

MT spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Zn^{2+} -Homöostase. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Zinkanreicherung im Gewebe mit einer *de novo* MT-Synthese (Richards und Cousins, 1975; McCormick *et al.*, 1981) korreliert.

MT hat protektive Eigenschaften. Es schützt vor oxidativem Stress und Metalltoxizität (Aschner, 1996), vor reaktiven Stickoxiden (Schwarz *et al.*, 1995) und alkylierenden Substanzen (Lohrer und Robson, 1989). Es wurde gezeigt, dass Inflammation Zytokin-vermittelt die MT-Expression steigert (De *et al.*, 1990).

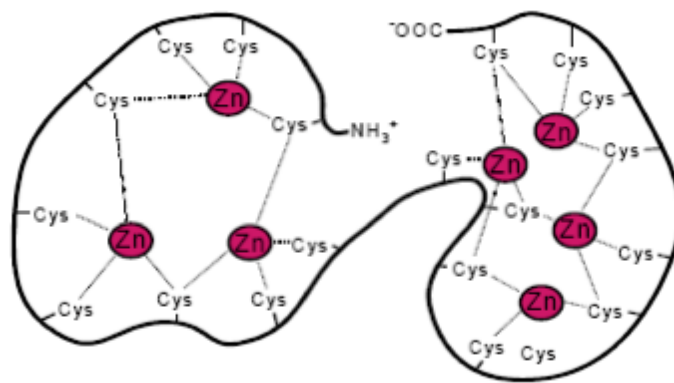


Abb. 2: Struktur des intrazellulären Metalloproteins Metallothionein (MT). Über Zink-Schwefel-Bindungen (Zn-S) können bis zu sieben Zinkionen (Zn^{2+}) komplexiert werden (mit freundlicher Genehmigung von Prof. K.-D. Kröncke nach Kröncke, 1998).

Zink ist essentieller Bestandteil von Zinkfingern in Transkriptionsfaktoren.

Zinkfingertranskriptionsfaktoren sind Proteine, die mindestens eine Zinkfingerdomäne enthalten, in denen Zn^{2+} -Ionen in Cystein-Histidin-Tetrameren gebunden sind. Die Zink-Schwefel-Komplexe (Zn^{2+} -S-Komplexe) der Zinkfingerdomänen haben eine zentrale Bedeutung für die Struktur der Transkriptionsfaktoren. Die Zinkfinger bilden eine schleifenförmige Struktur, welche spezifisch mit der DNA interagieren kann (Thiel und Lietz, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Zn^{2+} -Konzentration die Funktion von Zinkfingertranskriptionsfaktoren und die Genexpression beeinflusst.

Der metallresponsive Transkriptionsfaktor MTF-1 ist 72,5 KDa schwer und enthält sechs Zinkfinger. Mit Hilfe einer Zink-sensitiven-Zinkfingerdomäne registriert MTF-1 einen $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Anstieg. Die Registrierung des $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Anstiegs induziert die Translokation von MTF-1 in den Kern und die Transkription von MT und anderen Proteinen, die an der Zn^{2+} -Homöostase und antioxidativen Prozessen beteiligt sind (Aschner, 1996). Abbildung 4 zeigt mögliche Signalwege der Zn^{2+} -vermittelten Transkriptionsaktivierung von MTF-1.

Das Spezifitätsprotein 1 (SP1) ist ein weiterer Zinkfingertranskriptionsfaktor. Die unterschiedlichen Zinkfingerdomänen von Proteinen weisen nicht alle die gleiche Affinität zu Zn^{2+} auf. So zeigt die von Bittel *et al.* 2000 veröffentlichte

Untersuchung, dass die Zinkfingerdomänen von SP1 sowie die Zinkfingerdomänen II-VI von MTF-1 eine geringere Affinität zu $[Zn^{2+}]_i$ -Veränderungen aufweisen als die Zinkfingerdomäne I von MTF-1.

Csermely *et al.* 1988 fanden, dass ein $[Zn^{2+}]_i$ -Anstieg die Proteinkinase C (PKC) aktiviert, während You *et al.* 2007 fanden, dass die PKC SP1 aktiviert. Die PKC-Proteine besitzen eine wichtige Funktion in der zellulären Signaltransduktion und werden in drei Gruppen unterteilt: die *classic* PKC-Isoformen (cPKC), welche durch die *second messenger* Ca^{2+} und Diacylglycerin aktiviert werden, die *novel* PKC-Isoformen (nPKC), welche ebenfalls durch Diacylglycerin aktiviert werden und die *atypical* PKC-Isoformen (aPKC), welche Ca^{2+} - und Diacylglycerin-unabhängig sind.

SP1 aktiviert aber auch die Transkription des PBR (Giatzakis *et al.*, 2004).

1.4 Beeinflussung der Zinkhomöostase durch oxidativen und nitrosativen Stress

Viele neurodegenerative Erkrankungen gehen mit einer Störung der Zn^{2+} -Homöostase einher. Obwohl Zn^{2+} selbst weder oxidiert noch reduziert wird, ist die Zn^{2+} -Homöostase eng an den Redoxstatus der Zelle gekoppelt. Oxidativer Stress, Inflammation und Schwermetallbelastung führen zu einer Erhöhung der intrazellulären freien Zn^{2+} -Konzentration ($[Zn^{2+}]_i$) in unterschiedlichen Zelltypen (Kröncke, 2007).

NO reagiert in Proteinen unter aeroben Bedingungen mit den Schwefel-Wasserstoff-Gruppen (SH-Gruppen) der Aminosäure Cystein, wodurch S-Nitrosothiole gebildet werden (Kröncke, 2001a). Bei diesem Vorgang wird Zn^{2+} aus den Zn-S-Clustern freigesetzt und dadurch eine Konformationsänderung des Proteins induziert. Da die Zn^{2+} -S-Komplexe zentrale Bedeutung für die Struktur von Proteinen haben, bewirkt NO eine Funktionsänderung, welche sich im Falle der Zinkfinger-TF wie MTF-1 in einer veränderten DNA-Bindungsaffinität auswirkt (Abb. 3) (Kröncke *et al.*, 1994). Während die Beeinträchtigung von Zinkfingern durch NO reversibel ist und über das zelluläre Redoxsystem wieder regeneriert werden kann, sind Thiolmodifikationen wie Disulfidbrüche in den Transkriptionsfaktoren durch oxidativen Stress irreversibel, wahrscheinlich aufgrund einer oxidativen, nicht mehr reduzierbaren Modifikation des Proteins (Kröncke *et al.*, 2002).

NO setzt Zn^{2+} aus dem Metallspeicherprotein MT frei (Kröncke *et al.*, 1994). Auch hier erfolgt die Freisetzung aufgrund einer S-Nitrosierung von Cystein-SH-Gruppen.

Eine Zn^{2+} -Freisetzung wurde hier sowohl unter niedrigen als auch unter hohen NO-Konzentrationen beobachtet (Kröncke, 2003). Die Daten weisen darauf hin, dass eine niedrige NO-Konzentration eine Transkriptionsaktivierung von Zinkfinger-TF wie MTF-1 bewirkt, indem Zn^{2+} von MT bereitgestellt und dadurch Signalkaskaden (z. B. PKC-vermittelt) aktiviert werden (Stitt *et al.*, 2006). Exzessive NO-Konzentrationen führen zu einer Abnahme der DNA-Bindungsaffinität von TF, weil Zn^{2+} aus den Zinkfingerdomänen von TF freigesetzt wird (Abb. 4). Nitrosativer Stress und die nachfolgende Abnahme der DNA-Bindungsaffinität kann entweder die Transkription aktivieren, wenn es sich um reprimierende TF handelt, oder die Transkription hemmen bei Zn^{2+} -Freisetzung aus aktivierend wirkenden TF (Abb. 4).

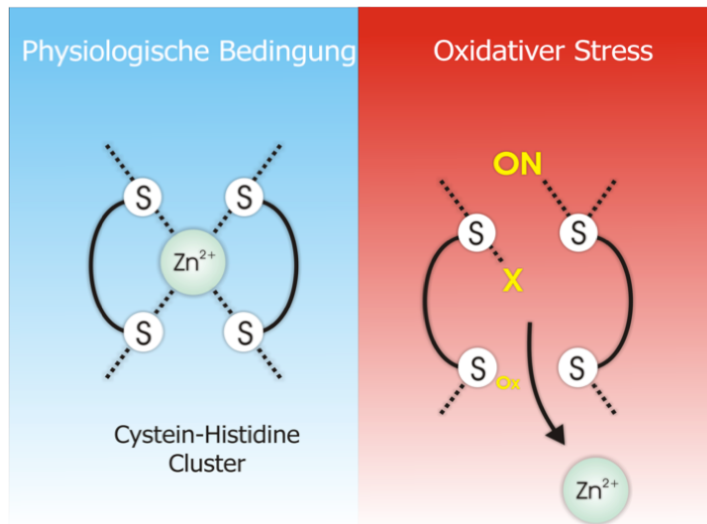


Abb. 3: Beeinträchtigung von Zinkfinger-Strukturen in zinkhaltigen Proteinen durch Stickstoffmonoxid (NO). (mit freundlicher Genehmigung von Prof. K.-D. Kröncke modifiziert nach Kröncke *et al.*, 1995).

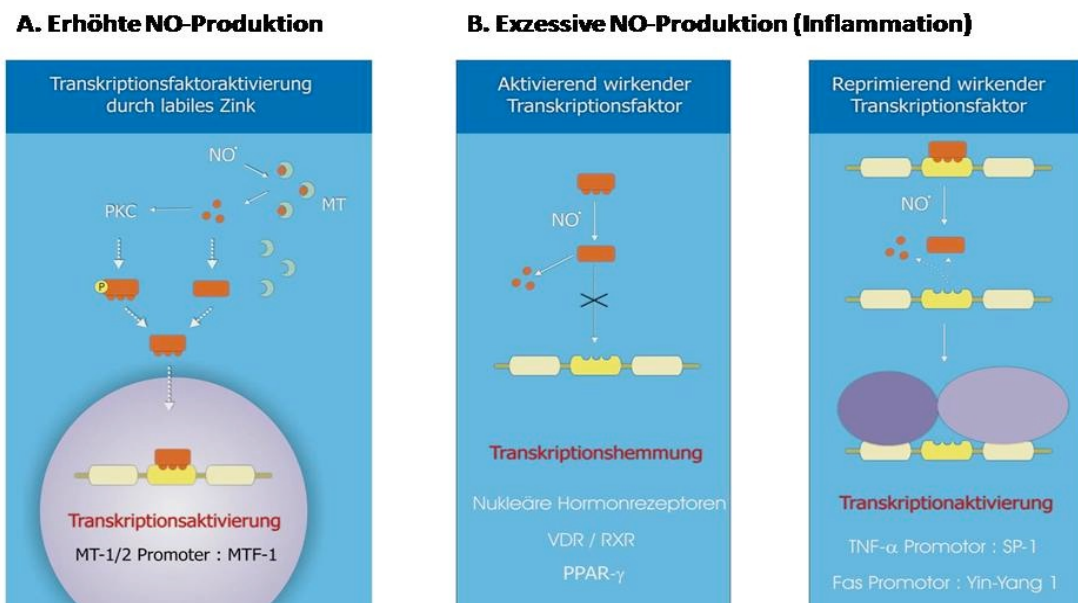


Abb. 4: Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) auf die Zinkabhängige (Zn^{2+} -abhängige) Transkription

(A.) Unter geringer NO-Produktion kommt es zu einer Transkriptionsaktivierung von Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (TF), entweder indem Signalkaskaden wie die Proteinkinase C (PKC) durch den Anstieg der intrazellulären freien Zinkionenkonzentration ($[Zn^{2+}]_i$) aktiviert werden, oder indem sich das aus Metallothionein (MT) freigesetzte Zn^{2+} direkt an den TF anlagert und zu einer Translokation in den Kern und Bindung an die DNA führt.

(B.) Exzessive NO-Konzentrationen, wie sie bei Inflammation vorkommen, bewirken eine Zn^{2+} -Freisetzung aus den Zinkfingerdomänen von TF, was bei reprimierenden TF eine Transkriptionsaktivierung und bei aktivierenden TF eine Transkriptionshemmung auslöst. (modifiziert nach Kröncke, 2003)

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer experimentell ausgelösten Astrozytenschwellung auf die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen in kultivierten Rattenastrozyten zu untersuchen und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und daraus resultierende funktionell bedeutsame Konsequenzen zu charakterisieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Materialien

100 mm-Zellkulturschalen	Falcon, Heidelberg Deutschland (DE)
14 ml-Röhrchen	Falcon, Heidelberg, DE
24-Well-Zellkulturplatten	Falcon, Heidelberg, DE
96-Well-Platten	Applied Biosystem, Carlsbad, Californien, USA
50 ml-Röhrchen	Falcon, Heidelberg, DE
60 mm-Zellkulturschalen	Falcon, Heidelberg, DE
<i>ABI 7500 real-time PCR System</i>	Applied Biosystem, Carlsbad, Californien, USA
<i>Bottle top-Filter</i>	Falcon, Heidelberg, DE
<i>Bradford Protein Assay</i>	BioRad, München, DE
<i>Complete Protease-Inhibitor-Cocktail</i>	Roche, Mannheim, DE
Deckgläser (Durchmesser Ø 12 mm)	Roth, Karlsruhe, DE
Dulbecco's modifiziertes Adler Medium (DMEM)(1000 mg/L D-Glucose)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
DMEM (1000 mg/L D-Glucose) Phenolrot frei	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
DMEM (1000 mg/L D-Glucose) Natriumchlorid (NaCl) frei	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
<i>Dual Color Protein Standard</i>	BioRad, München, DE
Einkanal-Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg DE
Einwegküvetten	Sarstedt AG & Co. ,Nümbrecht, DE
<i>Enhanced Chemilumineszenz Detection Kit</i>	Amersham, Braunschweig, DE
Filterpapier	Whatman, Maidstone, <i>United Kingdom</i> (UK)

<i>First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Qiagen, Hilden, DE
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Gewebekulturflaschen	Falcon, Heidelberg, DE
Glasbodenpetrischalen (35 mm)	MatTek Corporation, <i>United States of America</i> (USA)
<i>HiPerFect</i> Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden, DE
<i>HPGenomeWide small interfering</i> Ribonukleinsäure <i>siRNA</i>	Qiagen, Hilden, DE
Nitrocellulose Transfer Membran Protran®	Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel, DE
Objektträger (76 x 26 mm) mit Mattrand	Engelbrecht, Edermünde, DE
<i>3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-[4-sulfophenylazo]phenylazo)-2,7-naphthalenedisulfonic acid sodium salt</i> (Ponceau S)	Serva, Heidelberg, DE
<i>Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kit</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Ribonuklease (RNase)	Invitek Berlin, DE
RNase freie Desoxyribonuklease (DNase)	Qiagen, Hilden, DE
<i>RNeasy mini Kit</i>	Qiagen, Hilden, DE
Spritzen Omnifix	B. Braun, Melsungen, DE
<i>SYBR Green [polymerase chain reaction (PCR) Master Mix]</i>	Applied Biosystems, Weiterstadt, DE

2.1.2 Geräte

Analysenwaage Kern 770	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Blotting-Kammer	Biometra, Göttingen, DE
Entwicklermaschine AGFA CURIX 60	Agfa-Gevaert, Leverkusen, DE
Konfokales <i>Laserscanning</i> -Mikroskop (LSM) 510	Carl-Zeiss AG, Oberkochen DE
Fluorimeter <i>FL Ascent</i>	Thermo Electron Corporation, Dreieich, DE
Gelelektrophoresekammern	Biometra GmbH, Göttingen, DE
<i>Kodak Digital Image Station 440CF</i>	Eastman Kodak Co., Rochester, USA
Magnetrührer MR 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwalbach, DE
Phasenkontrast-Mikroskop	Carl-Zeiss AG, Oberkochen, DE
Schüttelapparat GFL-3017	Hilab, Düsseldorf, DE
Spectrophotometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, DE
Sterile Werkbank Hera Cell	Heraus, Karlsruhe, DE
Tischzentrifuge: Centrifuge 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge AHT 35R	Hettich, Tuttlingen, DE

2.1.3 Feinchemikalien

EGCG (-)-Epigallocatechingallat	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
Acrylamid 4K-Lösung (30 %)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
AP-5 (<i>(2R)</i> -amino-5-phosphonovaleric acid; (<i>(2R)</i> -amino-5-phosphonopentanoate)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
Apocynin = Acetovanillon (4-Hydroxy-3-methoxyacetophenon)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
BAPTA-AM (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraazetat))	Molecular, Probes, Oregon, USA

<i>Bovine Serum Albumine (BSA)</i>	PAA Laboratories, Linz, Österreich
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
DAF-FM diacetate (4-Amino-5-Methylamino-2',7'- -Difluorofluorescein Diacetate)	Molecular Probes, Oregon, USA
Diazepam	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
Gö6850 (Bisindolylmaleimide I (3-(1-(3-(dimethylamino)propyl)-1H-indol-3-yl)- -4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione))	Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
Hoechst 34580 (Benzenamine, N,N-dimethyl-4-[5- -(4-methyl-1-piperazinyl)[2,5'-bi-1H- -benzimidazol]-2'-yl]-/ 23555-00-2)	Molecular Probes, Oregon, USA
Ionomycin (Calcium- -(4 <i>R</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>S</i> ,10 <i>Z</i> ,12 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>E</i> ,18 <i>R</i> ,19 <i>R</i> , 20 <i>S</i> ,21 <i>S</i>)- -19,21-dihydroxy-22-{(2 <i>S</i> ,2' <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,5' <i>S</i>)-5'- -[(1 <i>R</i>)-1-hydroxyethyl]-2,5'-dimethyloctahydro- -2,2'-bifuran-5-yl}-4,6,8,12,14,18,20-heptamethyl- -11-oxido-9-oxodocosa-10,16-dienoat)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
L-NMMA (N(G)-Monomethyl-L-Arginin)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
<i>Mitotracker green</i> (Benzoxazolium, 2-[3-[5,6-dichloro- -1,3-bis[[4-(chloromethyl)phenyl]methyl]- -1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-ylidene]- -1-propenyl]-3-methyl-, chloride/ 201860- 17-5)	Molecular Probes, Oregon, USA
Mitramycin-A ((1 <i>S</i>)-5-deoxy-1- <i>C</i> -((2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>)-7- -[2,6-dideoxy-3- <i>O</i> - -(2,6-dideoxy-β- <i>D</i> - <i>arabino</i> -hexopyranosyl)- -β- <i>D</i> - <i>arabino</i> -hexopyranosyl]oxy}-3- -[2,6-dideoxy-3- <i>C</i> -methyl-β- <i>D</i> - -ribo-hexopyranosyl-(1→3)-2,6-dideoxy- -β- <i>D</i> - <i>arabino</i> -hexopyranosyl-(1→3)- -2,6-dideoxy-β- <i>D</i> - <i>arabino</i> -hexopyranosyl]oxy} - -5,10-dihydroxy-6-methyl-4-oxo- -1,2,3,4-tetrahydroanthracen-2-yl)- -1- <i>O</i> -methyl- <i>D</i> -xylulose)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE

MK-801 (Dizocilpin ([5R,10S]-[+]-5-methyl-10,11- -dihydro-5 <i>H</i> -dibenzo[<i>a,d</i>]cyclohepten- 5,10-imine))	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
<i>Newport-Green</i> TM (NG)	Molecular Probes, Oregon, USA
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS (+Ca ²⁺ /+Mg ²⁺))	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
Propidium Iodid (PI)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
Pyrithion	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
RhodZin-3-AM (RhodZin\u2122-3, Azetoxymethylester)	Molecular Probes, Oregon, USA
S-Nitrosocystein (SNOC)	frisch hergestellt (Protokoll 2.2.3.2.5)
Tumor Nekrose Faktor α (TNF α)	Roche, Mannheim, DE
TPEN (N,N,N',N'- <i>tetrakis</i> -(2-Pyridylmethyl)- -ethylenediamine)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
TRIM (1-[2-(Trifluoromethyl)phenyl]imidazole)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
Zinquin ethylester	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE
Zinksulfat (ZnSO ₄)	Sigma Aldrich, Deisenhofen, DE

2.1.4 Primärantikörper

Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH)

GAPDH aus Ratte monoklonal Biotrend, Köln, DE

glial fibrillary acidic protein (sauers Gliafaserprotein) (GFAP)

GFAP aus Maus polyklonal Sigma Aldrich,
Deisenhofen, DE

metal regulatory transcription factor 1 (MTF-1)

MTF-1 aus Kaninchen polyklonal Santa Cruz, Californien
(CA), USA

Spezifitätsprotein 1 (SP1)

SP1 aus Kaninchen polyklonal Santa Cruz, CA, USA

2.1.5 Sekundärantikörper

HRPOD-Anti Kanninchen Antikörper DAKO, Hercules, USA

HRPOD-Anti Maus Antikörper BioRad, Hercules, USA

2.1.6 Primer

HPRT-vorwärts: 5'-tgctcgagatgtcatgaagga-3' MWG-Biotec AG,
Ebersberg, DE

HPRT-rückwärts: 5'-cagagggccacaatgtgatg-3' MWG-Biotec AG,
Ebersberg, DE

MT1-vorwärts: 5'-gtgggctgctccaaatgtg-3' MWG-Biotec AG,
Ebersberg, DE

MT1-rückwärts: 5'-cacttgctccgaggcacttt-3' MWG-Biotec AG,
Ebersberg, DE

PBR-vorwärts: 5'-cacactgtattcggccatgg-3' MWG-Biotec AG,
Ebersberg, DE

PBR-rückwärts: 5'-cctcccagctctttccagatt-3' MWG-Biotec AG,
Ebersberg, DE

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation und Kultivierung von Rattenastrozyten

Primäre Astrozyten wurden aus den kortikalen Großhirnhemisphären neugeborener Wistarratten präpariert (Matthiessen *et al.*, 1989). Die durch Äthernarkose getöteten Tiere wurden für wenige Sekunden in eine Ethanollösung (70 % Ethanol, 30 % bidestilliertes Wasser) gelegt und die Haut vom Kopf entfernt. Nach Eröffnung des Schädels wurde das Hirn entnommen und die Hemisphären mit Hilfe einer Stereolupe entlang der Sagittallinie durchtrennt, wobei die Meningen entfernt wurden. Das aus dem zerebralen Kortex gewonnene Material wurde zerkleinert und für eine Minute bei 1500 U/min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen und die sedimentierten Zellen und Gewebestücke in 2 ml frischem Medium aufgenommen worden waren, wurden die Zellen mit Hilfe einer Pasteurpipette durch wiederholte Resuspension vereinzelt. Es wurden 8 ml DMEM (1000 mg/L D-Glucose) mit einem FCS-Anteil von 10 % hinzugefügt. Die so entstandene Suspension wurde mittels einer sterilen Nylongaze (60 µm Porengröße) filtriert, nachfolgend auf zwei Gewebekulturflaschen separiert und mit Zellkulturmedium jeweils auf ein Volumen von 20 ml aufgefüllt. Die Präparation der Zellen erfolgte durch Frau Brigida Ziegler (Neurologische Klinik, Universitätsklinikum Düsseldorf). Die Tiere stammten aus dem Organentnahmeprojekt: 036/11 (Leiter: Prof. Dr. Werner Müller, Neurochemisches Labor der Neurologischen Klinik, Universitätsklinikum Düsseldorf).

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bis zu acht Wochen in einem Brutschrank unter Wasserdampfsättigung bei 37 °C und einem Kohlenstoffdioxid(CO₂)-Anteil von 5 %. Als Zellkulturmedium wurde DMEM (1000 mg/L D-Glucose) mit 10 % FCS eingesetzt. Zur Erhöhung der Reinheit der Astrozytenkulturen wurden die Zellkulturflaschen für zwölf Stunden bei 200 U/min auf einen Schüttler gegeben. Dadurch konnten Mikroglia, Oligodendrozyten und in der Kultur verbliebene Neurone abgelöst werden (Booher und Sensenbrenner 1972). Alle präparativen Arbeiten erfolgten unter einer Frontluft-Sterilbank. Nach Bildung eines subkonfluenten *Monolayers* wurden die Astrozyten mit Ethylendiamintetraacetat/Trypsin (EDTA/Trypsin) von der Gewebekulturflasche abgelöst und im Verhältnis 1 : 2 erneut auf Gewebekulturflaschen ausgesät. Nachdem die Astrozyten erneut zur Subkonfluenz gewachsen waren, wurden sie auf unbeschichtete Gewebekulturschalen (Ø 60 mm und Ø 100 mm), 24-Well-Zellkulturplatten, Glasbodenpetrischalen (MatTek Schalen auf Ø 35 mm) oder auf Deckgläsern (Ø 12 mm) subkultiviert. Das Zellkulturmedium wurde dreimal pro Woche gewechselt. Das Wachstum der Astrozytenkulturen wurde am Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

Die Charakterisierung der Reinheit erfolgte durch Immunfluoreszenzanalysen unter Verwendung des Astrozytenmarkerproteins GFAP und des neuronenspezifischen NeuN. NeuN konnte in den Kulturen nicht nachgewiesen werden.

Vor Durchführung der Experimente wurden die Astrozyten über Nacht in Zellkulturmedium ohne FCS kultiviert, um FCS-abhängige Effekte zu minimieren.

2.2.2 Experimentelle Behandlung der Astrozytenkulturen

Hypoosmolarität wurde eingestellt durch Verwendung von NaCl-freiem DMEM (1000 mg/L D-Glucose), das eine Osmolarität von 205 mosmol/L aufwies. Bei den normoosmotischen Kontrollen wurde das Zellkulturmedium ebenfalls ausgetauscht. In den Experimenten, in denen die Osmolaritäten zwischen 320 und 205 mosmol/L variierten, wurden die Osmolaritäten durch Zugabe unterschiedlicher NaCl-Mengen in DMEM erreicht. In allen Experimenten wurde DMEM ohne Phenolrot verwendet, um fluoreszenzbeeinträchtigende Effekte des Phenolrots zu vermeiden.

Der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Zinkhomöostase kultivierter Rattenastrozyten wurde sowohl unter hypoosmotischen Bedingungen, als auch unter normoosmotischen Bedingungen untersucht.

In den Versuchen, in denen Inhibitoren verwendet wurden (AP-5, Apocynin, BAPTA-AM, EGCG, Gö6850, L-NMMA, Mitramycin, MK-801, TPEN, TRIM), wurden die kultivierten, gehungerten Rattenastrozyten mit den jeweiligen Substanzen 30 min vor Stimulation mit hypoosmotischem bzw. normoosmotischem Medium inkubiert. Die Inhibitoren waren während des gesamten Versuchs im Zellkulturmedium anwesend.

Kultivierte, gehungerte Rattenastrozyten wurden mit Ammoniumchlorid (NH_4Cl , 5 mmol/L, 6 h), Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$, 10 ng/ml, 6 h) oder Diazepam (10 mmol/L, 6 h) inkubiert.

Dreißig Minuten vor Beendigung der sechsstündigen Inkubationsdauer mit den jeweiligen Substanzen wurde der zinkspezifische Fluoreszenzfarbstoff NG in einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$ hinzugegeben und 30 min lang inkubiert.

Zehn Minuten vor Beendigung der sechsstündigen Inkubationsdauer mit den jeweiligen Substanzen wurde der Kernfarbstoff Hoechst 34580 in einer Verdünnung von 1 : 10000 hinzugegeben und für zehn Minuten inkubiert.

Am Ende des Experiments wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen.

Anschließend wurden die Astrozyten wie beschrieben untersucht.

2.2.3 Nachweis intrazellulärer freier Zinkionen mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Newport Green*

2.2.3.1 Semiquantitativer fluorimetrischer Zink-Nachweis

Es erfolgten semiquantitative fluorimetrische Bestimmungen des zinkspezifischen Farbstoffes *Newport Green* sowohl in kultivierten Rattenastrozyten als auch in zellfreien Kalziumchlorid- oder Zinkchlorid-haltigen Medien.

Kultivierte, gehungerte Rattenastrozyten wurden in 24-Well-Zellkulturplatten 30 min mit dem Zinkionophor Pyrithion (20 µmol/L) oder mit dem Kalziumionophor Ionomycin (1 µmol/L) vorbehandelt. Wo angegeben wurden entsprechend 3, 30 oder 300 µmol/L CaCl₂ bzw. ZnCl₂ hinzu gegeben. In jeweils einer Probe der mit CaCl₂ bzw. ZnCl₂ behandelten Astrozyten befand sich zusätzlich der Zn²⁺-Chelator TPEN (25 µmol/L). TPEN cheliert Zn²⁺, nicht jedoch Ca²⁺ mit hoher Affinität (Arslan *et al.*, 1985). TPEN wurde bereits 30 min vor Versuchsbeginn inkubiert und war während des gesamten Experiments anwesend.

Der zinkspezifische Fluoreszenzfarbstoff NG wurde in einer Konzentration von 5 µmol/L hinzugefügt und die Astrozyten für 30 min damit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS (+Ca²⁺/+Mg²⁺) gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Am Ende des letzten Waschvorganges wurde PBS auf den Zellen belassen.

Die semiquantitative Bestimmung der NG-Fluoreszenz im Fluorimeter mit dem *Fluoscan Ascent FL* erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 488 nm. Die Emission wurde bei 538 nm gemessen.

Die Quantifizierung der NG-Fluoreszenz in Zell-freien Medien erfolgte 5 min nach Zugabe von NG.

Semiquantitative fluorimetrische Bestimmungen von [Zn²⁺]_i in kultivierten Rattenastrozyten erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach hypoosmotischer Behandlung.

Dafür wurden die Zellen auf 24-Well-Zellkulturplatten für unterschiedliche Dauer (15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h) mit hypoosmotischem Medium (205 mosmol/L) bzw. normoosmotischem Medium (305 mosmol/L) inkubiert.

Dreißig Minuten vor Beendigung der jeweiligen Inkubationsdauer wurde der zinkspezifische Fluoreszenzfarbstoff NG (5 µmol/L) hinzu gegeben und 30 min inkubiert. Im Falle der 15-minütigen hypoosmotischen bzw. normoosmotischen Inkubation war der Farbstoff für 15 min anwesend. Nach Beendigung der Inkubation wurde überschüssiger Farbstoff dreimal mit PBS (+Ca²⁺/+Mg²⁺) herunter gewaschen und infolge des letzten Waschvorganges auf den Zellen belassen.

Danach erfolgte eine semiquantitative Bestimmung des freien Zn²⁺ durch Messung der NG-Fluoreszenz mit dem *Fluoscan Ascent FL*, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben.

Die bei der normoosmotischen Kontrolle ermittelten NG-Fluoreszenzen wurden gleich eins gesetzt, und die entsprechenden nach hypoosmotischer Stimulation ermittelten NG-Fluoreszenzen wurden relativ dazu angegeben.

Es wurden semiquantitative fluorimetrische Bestimmungen von $[Zn^{2+}]_i$ in kultivierten Rattenastrozyten nach Reinstitution von Normoosmolarität im Anschluss an hypoosmotische Stimulation durchgeführt.

Hierfür wurden die Zellen in 24-Well-Zellkulturplatten eine Stunde oder sechs Stunden mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) und als Kontrolle mit normoosmotischem Medium (305 mosmol/L) versetzt. In einer weiteren Versuchsbedingung wurden die Zellen erst eine Stunde mit hypoosmotischem Medium und nachfolgend fünf Stunden mit normoosmotischem Medium behandelt.

Zugabe des Farbstoffes NG, anschließender Waschvorgang und semiquantitative fluorimetrische Bestimmung der NG-Fluoreszenz erfolgten wie zuvor beschrieben.

Für alle Bedingungen wurden die unter normoosmotischen Kontrollbedingungen gemessenen NG-Fluoreszenzen gleich eins gesetzt, und die der entsprechenden Versuchsbedingungen wurden relativ dazu angegeben.

Nach einstündiger Inkubation kultivierter Rattenastrozyten mit Zellkulturmedium unterschiedlicher Osmolaritäten wurden semiquantitative fluorimetrische Bestimmungen von $[Zn^{2+}]_i$ durchgeführt.

Die Osmolaritäten wurden durch unterschiedliche NaCl-Konzentrationen in identischen DMEM-Volumina eingestellt.

Inkubation des Farbstoffes NG und semiquantitative fluorimetrische Bestimmung der NG-Fluoreszenz erfolgten wie angegeben.

Der ermittelte Fluoreszenzwert für 320 mosmol/L wurde gleich eins gesetzt, und die Werte, die bei den anderen Osmolaritäten gefunden wurden, wurden relativ dazu ausgedrückt.

Semiquantitativ fluorimetrisch wurde $[Zn^{2+}]_i$ in mit hypoosmotischem und normoosmotischem Medium behandelten Zellen in An- oder Abwesenheit inhibitorisch wirkender Substanzen bestimmt.

Die kultivierten Rattenastrozyten wurden in 24-Well-Zellkulturplatten entweder ohne weitere Behandlung oder nach einer 30-minütigen Vorbehandlung mit und in der Anwesenheit von BAPTA-AM (10 μ mol/L), MK-801 (100 μ mol/L, 10 μ mol/L), AP-5 (50 μ mol/L), L-NMMA (1 mmol/L), TPEN (25 μ mol/L), EGCG (30 μ mol/L), TRIM (100 μ mol/L) oder Apocynin (300 μ mol/L) für eine Stunde mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) und normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium behandelt.

Die Inkubation des Farbstoffes NG und die semiquantitative Bestimmung der NG-Fluoreszenz wurden wie angegeben durchgeführt.

Die Beteiligung einer Ca^{2+} -abhängigen NO-Synthase an der Zinkhomöostase in kultivierten Rattenastrozyten wurde untersucht.

Hierfür wurden NG beladene (5 μ mol/L, 30 min), kultivierte Rattenastrozyten in 24-Well-Zellkulturplatten entweder in An- oder Abwesenheit des Zinkchelators TPEN (25 μ mol/L) oder des nNOS-Hemmstoffs TRIM (Bachetti *et al.*, 2004; 100 μ mol/L) mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin (5 μ mol/L) versetzt. Die NG-Fluoreszenz wurde fünf Minuten nach Zugabe von Ionomycin fluorimetrisch ermittelt, nachdem die Zellen dreimal mit PBS (+ Ca^{2+} /+ Mg^{2+}) gewaschen worden waren, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Am Ende des letzten Waschvorganges wurde PBS auf den Zellen belassen.

Unter Stimulation mit dem NO-Donor SNOC wurden semiquantitative fluorimetrische Bestimmungen von $[Zn^{2+}]_i$ in kultivierten Rattenastrozyten im zeitlichen Verlauf untersucht

Der NO-Donor SNOC wurde stets frisch hergestellt unter Verwendung von Cystein-Wasserstoffchlorid (Cystein-HCL) und Natriumnitrit ($NaNO_2$) und Einstellung des pH-Wertes auf 6 - 7. SNOC zerfällt unmittelbar nach dem Lösen. Als Zerfallskontrolle wurde SNOC über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Kultivierte, gehungerte Rattenastrozyten wurden in 24-Well-Zellkulturplatten für unterschiedliche Dauer (15 min, 1, 3 oder 6 h) mit dem NO-Donor SNOC in einer Konzentration von 1 mmol/L versetzt. Dreißig Minuten vor Beendigung der jeweiligen Inkubationsdauer mit SNOC wurde NG (5 μ mol/L) hinzugegeben. Im Falle der 15-minütigen SNOC-Inkubation wurde NG gleichzeitig mit dem NO-Donor auf die Zellen gegeben.

Am Ende des Experiments wurden die Zellen mit PBS (+ Ca^{2+} /+ Mg^{2+}) gewaschen und die NG-Fluoreszenz semiquantitativ fluorimetrisch bestimmt, wie oben angegeben.

Die unter Kontrollbedingungen (Abwesenheit von SNOC) ermittelte NG-Fluoreszenz wurde gleich eins gesetzt, und die unter SNOC-Stimulation gemessenen NG-Fluoreszenzen wurden relativ dazu angegeben.

2.2.3.2 Diskriminierung von zytoplasmatischen und nukleären freien Zinkionen mittels konfokaler *Laserscanning* Mikroskopie

Kultivierte, gehungerte Rattenastrozyten wurden auf Glasplattenpetrischalen (Matek-Schalen) für eine Stunde mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) oder normosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert oder für sechs Stunden mit NH_4Cl (5 mmol/L), $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) oder Diazepam (10 $\mu\text{mol/L}$) behandelt. Als Kontrolle für die sechsständigen Experimente wurden die Zellen für sechs Stunden mit normosmotischem Medium (305 mosmol/L) inkubiert.

Dreißig Minuten vor Beendigung der Inkubationsdauer wurden die Zellen mit NG (5 $\mu\text{mol/L}$, 30 min) inkubiert, und zehn Minuten vor Beendigung der Inkubationsdauer wurde der Kernfarbstoff Hoechst 34580 (Verdünnung 1:10000, 10 min) hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS (+ Ca^{2+} /+ Mg^{2+}) gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Am Ende des letzten Waschvorganges wurde PBS auf den Zellen belassen.

Der Nachweis ungebundener zytoplasmatischer und nukleärer Zn^{2+} -Ionen erfolgte durch Kolokalisation der Fluoreszenzsignale von NG und Hoechst 34580 mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie. Die Exzitation des Kernfarbstoffes Hoechst 34580 erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm und die für NG bei einer Wellenlänge von 488 nm.

Nach Erstellung von Stapel-Aufnahmen konnten mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware *ImageJ* (Wayne Rusband, NIH) Hoechst 34580 und NG kolokalisierende Signale extrahiert werden und mittels dreidimensionaler Rekonstruktion unter Verwendung der *Volocity-4 Software* (Improvision, Lexington, MA) visualisiert werden. Das für Zn^{2+} -spezifische Fluoreszenzsignal wurde mit dem Hoechst 34580-Fluoreszenzsignal kolokalisiert und mittels *ImageJ Software* (Wayne Rusband, NIH) quantifiziert.

Der zytoplasmatische und nukleäre Zn^{2+} -Nachweis in kultivierten Rattenastrozyten wurde mit Unterstützung von Dr. Boris Görg und Torsten Janssen durchgeführt.

Die dreidimensionale Rekonstruktion wurde von Herrn Dr. Boris Görg durchgeführt.

2.2.4 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis intrazellulärer freier Zinkionen mittels Zinquin

In 24-Well-Zellkulturplatten auf Deckgläsern kultivierte Rattenastrozyten wurden für eine Stunde in hypoosmotischem (205 mosmol/L) oder normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert und jeweils 30 min vor Beendigung des Experiments mit 25 µmol/L des zinkbindenden Fluoreszenzfarbstoffes Zinquin (Zalewski *et al.*, 1994) inkubiert.

Bei den Versuchen, bei denen Inhibitoren verwendet wurden, erfolgte eine 30-minütige Vorinkubation mit dem jeweiligen Inhibitor (TPEN, 25 µmol/L; EGCG, 30 µmol/L oder L-NMMA, 1 mmol/L). Die Inhibitoren blieben während des gesamten Experiments anwesend.

Als Positivkontrolle wurden Astrozyten 30 min mit ZnSO₄ (300 µmol/L) und dem Ionophor Pyrithion (20 µmol/L) inkubiert, gleichzeitig wurde der Fluoreszenzfarbstoff Zinquin zugegeben und für 30 min inkubiert.

Am Ende des Experiments wurden die Deckgläser vorsichtig aus dem Medium genommen und mit einer Pipette mindestens dreimal vorsichtig mit PBS (+Ca²⁺/+Mg²⁺) gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Deckgläser wurden mit den Zellen nach oben auf einen Objektträger gelegt und mit einem Tropfen PBS beträufelt, um die Zellen vor Austrocknung zu schützen. Dann wurden schnellstmöglich die Aufnahmen mit einem Epifluoreszenzmikroskop gemacht. Die Anregung von Zinquin erfolgte durch Licht der Wellenlänge 405 nm. Die erhaltenen Epifluoreszenzmikroskopaufnahmen wurden nachfolgend Falschfarben-kodiert.

2.2.5 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis mitochondrialer freier Zinkionen mittels RhodZin-3-AM

Hypoosmotisch induzierte Veränderungen der Konzentration freier Zn²⁺-Ionen in Mitochondrien wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes RhodZin-3-AM untersucht. RhodZin-3-AM ist ein Zn²⁺-Chelator, der spezifisch in Mitochondrien akkumuliert und nach Bindung von Zink fluoresziert (Sensi *et al.*, 2003).

Kultivierte Rattenastrozyten wurden in An- oder Abwesenheit des Zinkchelators TPEN auf Matek-Dishes für eine Stunde einerseits mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) oder andererseits mit normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert. In den Versuchen, in denen TPEN anwesend war, wurden die Zellen mit TPEN bereits 30 min vor hypoosmotischer bzw. normoosmotischer Stimulation inkubiert. TPEN war während des jeweiligen gesamten Versuches anwesend. Zehn Minuten vor Beendigung der Experimente wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen RhodZin-3-AM (1 µmol/L) und *MitoTracker Green* (1 µmol/L) inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS (+Ca²⁺/+Mg²⁺) gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Nach dem letzten Waschvorgang wurde PBS auf den Zellen belassen.

Die Visualisierung freier mitochondrialer Zn²⁺-Ionen erfolgte durch konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie.

Die Untersuchungen zur RhodZin-3-AM Fluoreszenz wurden mit Unterstützung von Dr. Boris Görg und Torsten Janssen durchgeführt.

2.2.6 Fluoreszenzmikroskopische Vitalitätsüberprüfung mittels Propidium Iodid

Um eine potentielle Toxizität von Hypoosmolarität und/oder TPEN auf Astrozyten zu untersuchen, wurde der Farbstoff Propidium Iodid (PI) verwendet, welcher die Zellmembran geschädigter Zellen passieren kann und nachfolgend die DNA im Zellkern bindet und hierdurch fluoresziert.

Frühere Studien haben gezeigt, dass eine Inkubation von Astrozyten mit hypoosmotischem Medium bis zu 24 h zu keinem Anstieg der LDH-Freisetzung führt (Schliess *et al.*, 2004), und somit die Behandlung nicht toxisch ist.

In 24-Well-Zellkulturplatten auf Deckgläsern kultivierte Rattenastrozyten wurden für 6, 9 und 24 Stunden entweder in An- oder Abwesenheit des Zinkchelators TPEN mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) bzw. normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert. Als Positivkontrolle für die PI-Färbung wurden die Astrozyten für eine Stunde mit 5 mmol/L H₂O₂ inkubiert. Zehn Minuten vor Beendigung der Experimente wurden die Zellen mit dem Kernfarbstoff Hoechst 34580 (Verdünnung 1 : 10000) und dem Fluoreszenzfarbstoff PI (25 µmol/L) inkubiert. Nach Beendigung der Experimente wurden die Deckgläser vorsichtig aus dem Medium genommen und mit einer Pipette dreimal vorsichtig mit PBS (+Ca²⁺/+Mg²⁺) gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Deckgläser wurden mit den Zellen nach oben auf einen Objektträger gelegt und mit einem Tropfen PBS beträufelt, um die Zellen vor Austrocknung zu schützen. Dann wurden schnellstmöglich Aufnahmen mit einem Epifluoreszenzmikroskop gemacht. Der Verlust der Astrozytenmembranintegrität wurde durch Anfärbung der Kerne mit PI erkennbar.

Die oben genannten Analysen wurden mit Unterstützung von Dr. Boris Görg und Torsten Janssen durchgeführt.

2.2.7 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Stickstoffmonoxid-Bildung mittels 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein-Diacetat

Um Effekte von Hypoosmolarität auf die NO-Synthese in kultivierten Rattenastrozyten zu untersuchen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM diacetate (DAF-FM) verwendet. Die Fluoreszenz von DAF-FM ist proportional zur NO-Produktion (Rodriguez *et al.*, 2005).

Auf Glasplattenpetrischalen kultivierte Rattenastrozyten wurden für 30 Minuten mit dem NOS-Inhibitor L-NMMA (1 mmol/L) vorinkubiert. Als Kontrolle blieben die Zellen mit L-NMMA unvorbehandelt. Anschließend wurden die Astrozyten für 10 Minuten mit 1 µmol/L DAF-FM vorinkubiert. Im Fall der mit L-NMMA vorbehandelten Astrozyten war L-NMMA während der DAF-FM-Inkubation anwesend. Anschließend wurde die Osmolarität des Mediums durch Zugabe von salzfreiem DMEM auf 205 mosmol/L eingestellt oder eine identische Menge von normoosmolarem Medium (305 mosmol/L) hinzugegeben.

Nach fünfminütiger Inkubation der mit DAF-FM vorbehandelten Zellen mit normoosmotischem bzw. hypoosmotischem Medium wurde die DAF-FM-Fluoreszenz erfasst. Im Falle der Vorinkubation mit dem NOS-Inhibitor L-NMMA war L-NMMA während des gesamten Experimentes anwesend. Als Positivkontrolle und um eine Interferenz von L-NMMA mit der DAF-FM-Detektion auszuschließen, wurden die mit L-NMMA beladenen Astrozyten mit dem NO-Donor SNOC (1 mmol/L, 3 min) versetzt.

Die DAF-FM-Fluoreszenz wurde mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie erfasst. Die Exzitation erfolgte bei 488 nm, und die Emission wurde bei 535 nm detektiert. Die erhaltenen Aufnahmen wurden nachfolgend Falschfarbencodiert.

2.2.8 *small interfering* RNA vermittelter Knockdown des Spezifitätsprotein 1

Die Expression des SP1 Proteins wurde mit Hilfe spezifisch gegen die SP1 mRNA-Sequenz TGC-AAG-GGT-CTG-AAT-CTC-TAA gerichteter siRNA (HP GenomeWide siRNA, Qiagen, Hilden, Deutschland) herunterreguliert. Hierfür wurde die siRNA mit dem Transfektionsreagenz Hi-Perfect (Qiagen, Hilden, Deutschland) versetzt und auf auf 60 mm Plastikzellkulturschalen kultivierte Rattenastrozyten gegeben und für 24 h inkubiert. Nach 24 h wurde das Zellkulturmedium gegen siRNA-freies Zellkulturmedium ausgetauscht und die Zellen für weitere 48 h weiter inkubiert, bevor die Experimente durchgeführt wurden.

2.2.9 *Realtime Polymerasekettenreaktion*

Gesamt-RNA wurde nach Herstellerprotokoll aus kultivierten Astrozyten mit dem *RNeasy mini kit* isoliert (Qiagen, Hilden, Deutschland). Anschließend wurde die aufgereinigte RNA mit Hilfe des *Quant-iT RiboGreen RNA Assay Kits* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) fluorimetrisch quantifiziert. Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus 1 µg Gesamt-RNA.

Mit Hilfe der *realtime SYBR Green PCR* und des ABI 7500 *realtime PCR Systems* (Applied Biosystem, Carlsbad, Californien) wurde das Genexpressionsniveau quantifiziert.

Der Standard-PCR-Mix setzte sich bei einem Gesamtvolumen von 25 µl zusammen aus: 1,2 µl cDNA (1:6 verdünnt), 1,0 µl *Primer* vorwärts (10 pmol/µl), 1,0 µl *Primer* rückwärts (10 pmol/µl), 12,5 µl 2 x *SYBRGreen*, 9,3 µl Nuklease freies Wasser.

SYBRGreen ist ein fluoreszierender Farbstoff, welcher an doppelsträngige DNA bindet. Seine spezifische Anregungswellenlänge liegt bei 494 nm und seine Emissionswellenlänge bei 521 nm. Durch Ermittlung der Fluoreszenzsignale ist eine Quantifizierung der DNA-Menge nach jedem Amplifikationsschritt möglich, da das Fluoreszenzsignal während der *PCR* proportional zur Menge der synthetisierten DNA ansteigt.

96-Well-Platten wurden mit dem Standard-PCR-Mix beladen. Jedes Gen wurde jeweils im Triplikat bestimmt. Dabei wurden die in Kapitel 2.1.6 aufgeführten *Primer* verwendet.

Für die *realtime PCR* wurden folgende Einstellungen gewählt: Denaturierung für zwei Minuten bei 50 °C; Denaturierung bei 95 °C; *Annealing* bei 95 °C für fünfzehn Sekunden; Elongation bei 60 °C für eine Minute. Die Schritte wurden für 24 Zyklen wiederholt.

Anhand der Schmelzkurve wurde die amplifizierte DNA im Anschluss der *realtime PCR* im Hinblick auf das gebildete Produkt überprüft.

Zur relativen Quantifizierung des jeweiligen Gens wurde die Delta-Delta-C_T-Methode verwendet, welche quantitative Veränderungen von Transkripten zu einer definierten Kontrolle ermittelt. Zur Standardisierung der ermittelten RNA-Menge des zu untersuchenden Gens wurde das Expressionsniveau auf das der endogenen Kontrolle (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)) normiert.

Die oben beschriebenen Analysen wurden von Frau Prof. Dr. med. Verena Keitel durchgeführt.

2.2.10 *Western-Blot*

Rattenastrozyten wurden auf 60 oder 100 mm-Plastikkulturschalen kultiviert. Nach Beendigung des jeweiligen Experiments wurde das Medium entfernt und die Zellen sofort mit Tris/HCL-Puffer (pH 7,4) bei 4 °C lysiert. Der Tris/HCL-Puffer enthielt 1 % Triton X-100, 140 mmol/L NaCl, 1 mmol/L Ethylendiamintetraazetat (EDTA), 1 mmol/L Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraessigsäure (EGTA), 10 mmol/L Natriumfluorid (NaF), 10 mmol/L Na-pyrophosphat, 1 mmol/L Sodiumvanadat, 20 mmol/L β-Glycerophosphat und einen Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete, Roche, Mannheim,

Deutschland). Die Lysate wurden für zehn Minuten bei 20.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand weiterverwendet.

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte nach Bradford mit Hilfe des BioRad-Protein-Assays (Biorad, München, Deutschland) nach Herstellerprotokoll.

Für die SDS-Gelelektrophorese und *Western-Blot*-Analyse wurden Proben mit gleichen Proteinmengen verwendet, die jeweils mit identischen Volumina des zweimal konzentrierten SDS-Auftragspuffers ((pH 6,8), 200 mmol/L Dithiothreitol (DTT)) versetzt wurden. Anschließend wurden die Proben durch Erhitzen auf 95 °C für fünf Minuten denaturiert.

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse erfolgte in Polyacrylamidgelen (PAA-Gelen) unterschiedlicher PAA-Konzentration (10 %, 12 %). Als Größenstandard wurde der *Dual Color Protein Standard* (BioRad, München, Deutschland) verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Apparatur mit Elektrophoresepuffer (25 mmol/L Tris, 4 mmol/L SDS, 250 mmol/L Glycin) durchgeführt. Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 160 V, das Auftrennen der Proteine im Trenngel bei 200 - 240 V.

Nach Elektrophorese wurden die PAA-Gele mit Transferpuffer (39 mmol/L Glycin, 48 mmol/L Tris/HCL, 0,03 % SDS, 20 % Methanol) äquilibriert. Die Proteine wurden anschließend nach der *semi-dry-Blot*-Methode in einer Blottingkammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dafür wurden jeweils drei Lagen in *Blotting*puffer getränktes *Whatman*-Filterpapier unterhalb und drei Lagen oberhalb des Gels und der Nitrozellulosemembran auf die Graphitelektroden platziert.

Von der Anode (unten) zur Kathode (oben) sah der Aufbau folgendermaßen aus: Anode, *Whatman*-Filterpapier, Nitrozellulosemembran, PAA-Gel, *Whatman*-Filterpapier, Kathode. Das Blotten wurde bei 0,8 mA/cm² für 2 h durchgeführt.

Nach Beendigung des *Blotting*verfahrens wurden freie, nicht von Protein gesättigte Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran mit Blockierungslösung für 15 min auf dem Schüttler abgesättigt. Die Blockierungslösung bestand aus 5 % BSA gelöst in 20 mmol/L Tris/HCL (pH 7,5), welches 150 mmol/L NaCl und 0,1 % Tween 20 enthielt (TBS-T). Anschließend wurde der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1 : 5000 in TBS-T mit 5 % BSA über Nacht bei 4 °C leicht schüttelnd inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für jeweils 10 min mit TBS-T wurde der mit HRP-OD gekoppelte Zweitantikörper in einer Konzentration von 1 : 10000 für zwei Stunden schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min wurde das Protein mittels *Enhanced Chemilumineszenz Detection Kit* (Amersham, Braunschweig, Deutschland) nachgewiesen. Die densitometrische Analyse der Lichtemission wurde mit der *Kodak Image Station 440CF* (Eastman Kodak Co., Rochester, USA) und der *Kodak 1D Molecular Imaging Software* durchgeführt.

2.2.11 Präparation von Kernextrakten

Nach Beendigung der entsprechenden Experimente wurden die auf 100 mm-Schalen kultivierten Astrozyten mit 400 µl eiskaltem PBS mit 100 µmol/L Trinatriumtetraoxovanadat (Na_3VO_4) zügig abgelöst. Anschließend wurden die Zellmembranen durch Zugabe von 400 µl Puffer und Inkubation für 10 min bei 4 °C aufgeschlossen. Der Puffer enthielt 10 mmol/L N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonicacid (HEPES, pH 7,9), 1,5 mmol/L Magnesiumchlorid (MgCl_2), 10 mmol/L Kaliumchlorid (KCl), 0,5 mmol/L DTT, 0,2 mmol/L Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 1 mmol/L Na_3VO_4 . Nach Zentrifugierung der Proben mit 20.000 x g bei 4 °C für zwei Minuten wurde der Überstand verworfen und die isolierten Kerne durch 30-minütige Inkubation von 80 µl Extraktionspuffer bei 4 °C aufgebrochen. Der Extraktionspuffer bestand aus 20 mmol/L HEPES (pH 7,9), 420 mmol/L NaCl, 1,5 mmol/L MgCl_2 , 0,2 mmol/L EDTA (pH 8,0), 66,5 % (v/v) Glyzerol, 0,5 mmol/L DTT, 0,2 mmol/L PMSF und 1 mmol/L Na_3VO_4 . Zum Schluss wurden die Kernextrakte nochmals bei 20.000 x g und 4 °C für zwei Minuten zentrifugiert und der Überstand mit den Kernextrakten weiteren Analysen zugeführt.

2.2.12 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung vom Mittelwert (SEM) von mindestens drei unabhängigen Experimenten, d.h. von mindestens drei unterschiedlichen Zellpräparationen, angegeben. Signifikanzen wurden mit Hilfe des t-Tests nach Student berechnet, wobei $P \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Spezifitätsüberprüfung des Zinkchelators *Newport-Green*

Die Validierung der Spezifität des Zn^{2+} -Nachweises durch den Fluoreszenzfarbstoff NG in kultivierten Rattenastrozyten erfolgte, indem Astrozyten einerseits mit dem Zinkionophor Pyrithion (20 $\mu\text{mol/L}$) oder andererseits mit dem Calciumionophor Ionomycin (1 $\mu\text{mol/L}$) 30 min behandelt wurden. Gleichzeitig wurden 3, 30 oder 300 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 oder ZnCl_2 hinzu gegeben. Tabelle 2 zeigt, dass nur ZnCl_2 einen konzentrationsabhängigen und TPEN-sensitiven Anstieg der NG-Fluoreszenz vermittelt. Der Zinkchelator TPEN cheliert Zn^{2+} , nicht jedoch Ca^{2+} mit hoher Affinität (Arslan *et al.*, 1985). Ein geringerer als bei ZnCl_2 beobachteter TPEN-sensitiver Anstieg der NG-Fluoreszenz konnte aber auch bei einer CaCl_2 -Konzentration von 30 $\mu\text{mol/L}$ beobachtet werden. Tabelle 3 zeigt, dass die NG-Fluoreszenz durch Ca^{2+} -Ionen in zellfreien Medien nicht beeinflusst wird. In diesem Experiment wurden ZnCl_2 - und CaCl_2 -haltige Lösungen in aufsteigenden Konzentrationen mit NG fünf Minuten inkubiert.

Tabelle 2: Validierung der Spezifität von *Newport-Green* (NG) in kultivierten Astrozyten

Zugabe von ZnCl_2 zu Pyrithion-behandelten Astrozyten					
ZnCl_2	0 μM	+3 μM	+30 μM	+30 μM + TPEN	+300 μM
NG-Fluoreszenz	1,00 $\pm$ 0,09	1,59 $\pm$ 0,08*	1,65 $\pm$ 0,10*	0,81 $\pm$ 0,09	1,73 $\pm$ 0,09*

Zugabe von CaCl_2 zu Ionomycin-behandelten Astrozyten					
CaCl_2	0 μM	+3 μM	+30 μM	+30 μM + TPEN	+300 μM
NG-Fluoreszenz	1,00 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,03	1,10 $\pm$ 0,02*	0,99 $\pm$ 0,02	1,0 $\pm$ 0,01

Kultivierte Rattenastrozyten wurden 30 min mit den Ionophoren Pyrithion (20 $\mu\text{mol/L}$) oder Ionomycin (1 $\mu\text{mol/L}$) und den aufgeführten Zinkchlorid- (ZnCl_2)- bzw. Kalziumchlorid- (CaCl_2)-Konzentrationen inkubiert. Dort, wo angegeben, wurde der Zn^{2+} -Chelator TPEN (25 $\mu\text{mol/L}$) bereits 30 min vor Versuchsbeginn hinzugefügt. Am Ende des Experiments wurde die *Newport Green*-(NG)-Fluoreszenz fluorimetrisch ermittelt. (modifiziert nach Kruczek *et al.* 2009, Glia)

*, signifikanter ($P \leq 0,05$) Anstieg der NG-Fluoreszenz im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollbedingungen (0 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} bzw. Zn^{2+}) (modifiziert nach Kruczek *et al.* 2009, Glia)

Tabelle 3 Validierung der Spezifität von *Newport-Green* (NG) *in vitro*

Zugabe von CaCl_2 bzw. ZnCl_2				
CaCl_2 bzw. ZnCl_2	0 μM	2,5 μM	25 μM	37,5 μM
NG-Fluoreszenz (Zn^{2+})	1,00 $\pm$ 0,01	1,00 $\pm$ 0,02	1,03 $\pm$ 0,01	1,09 $\pm$ 0,00*
NG-Fluoreszenz (Ca^{2+})	1,00 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,01	0,95 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,02

CaCl_2 bzw. ZnCl_2	50 (μM)	125 (μM)	250 (μM)	500 (μM)
NG-Fluoreszenz (Zn^{2+})	1,14 $\pm$ 0,01*	1,24 $\pm$ 0,01*	1,34 $\pm$ 0,02*	1,72 $\pm$ 0,03*
NG-Fluoreszenz (Ca^{2+})	0,94 $\pm$ 0,01	0,96 $\pm$ 0,01	0,92 $\pm$ 0,02	0,94 $\pm$ 0,02

Newport-Green (NG, 5 $\mu\text{mol/L}$) wurde in Phosphatpuffer mit den entsprechenden Kalziumchloridionen- (CaCl_2)- und Zinkchloridionen- (ZnCl_2)-Konzentrationen inkubiert und die NG-Fluoreszenz fluorimetrisch quantifiziert. (modifiziert nach Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.2 Einfluss einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Zellschwellung auf die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen

3.2.1 Wirkung von Hypoosmolarität auf die nukleäre und zytoplasmatische Konzentration freier Zinkionen

Die Schwellung von Astrozyten ist ein frühes Ereignis bei unterschiedlichen Hirnfunktionsstörungen, z.B. bei Schlaganfall, bei Traumen, bei Ischämie und bei der mit einer Lebererkrankung einhergehenden Enzephalopathie (Häussinger, 2006; Kimelberg, 2005). Daher wurde der Einfluss einer experimentell herbeigeführten Astrozytenschwellung auf die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Astrozytenschwellung, welche durch Inkubation mit hypoosmotischem Medium (205 mosmol/L, 1 h) erreicht wurde, zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Konzentration von freien Zn^{2+} -Ionen ($[\text{Zn}^{2+}]_i$) gegenüber normoosmotischen Kontrollbedingungen (305 mosmol/L) führt.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden für eine Stunde mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) oder mit normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert und Veränderungen der intrazellulären Konzentration freier Zn^{2+} -Ionen ($[\text{Zn}^{2+}]_i$) im Zytoplasma und im Kern mit dem zinkspezifischen Fluoreszenzfarbstoff NG untersucht. Abb. 5 zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion der $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Fluoreszenz in kultivierten Astrozyten im Zytoplasma und im mit Hoechst 34580 angefärbten Kern. Die NG-Fluoreszenzintensität im Kern wurde gemessen, und nach hypoosmotischer Stimulation stieg die NG-Fluoreszenz um den Faktor $2,08 \pm 0,21$ ($P < 0,04$, $n = 3$) gegenüber normoosmotischen Kontrollbedingungen.

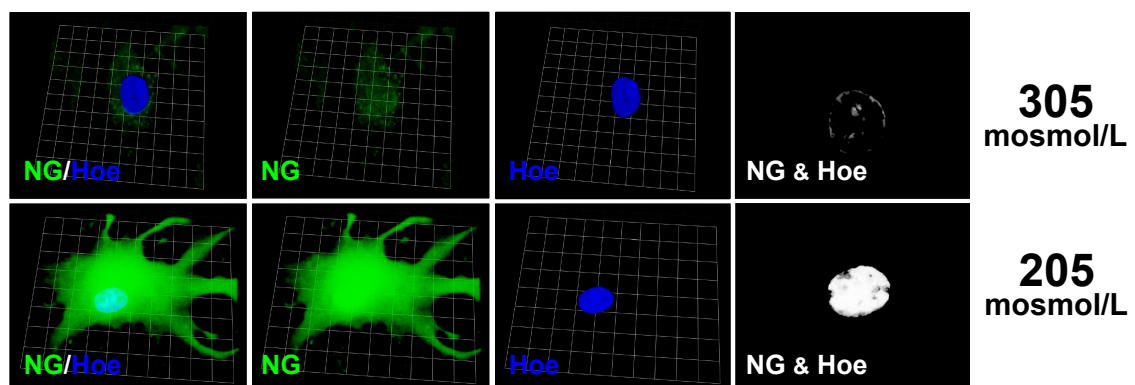


Abb. 5: Visualisierung von nukleären und zytoplasmatischen freien Zinkionen ($[\text{Zn}^{2+}]_i$) in Astrozyten unter normoosmotischen (305 mosmol/L) und hypoosmotischen Bedingungen (205 mosmol/L) mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (LSM). Astrozyten wurden mit hypoosmotischem (205 mosmol/L, 1 h) oder normoosmotischem (305 mosmol/L, 1 h) Medium behandelt und mit *Newport-Green* (NG; 30 min) und Hoechst 34580 (Hoe, 10 min) angefärbt. Die erhaltenen Bilder wurden für die Anfertigung dreidimensionaler Rekonstruktionen verwendet. Der Zn^{2+} -Gehalt des Kerns wurde selektiv visualisiert, indem die überlappenden Hoe- und NG- Fluoreszenzsignale extrahiert und in weiß dargestellt wurden. (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.2.2 Kinetik der durch hypoosmotisches Medium vermittelten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

Abb. 6 zeigt den zeitlichen Verlauf des $[Zn^{2+}]_i$ -Anstiegs in kultivierten Rattenastrozyten unter hypoosmotischen Bedingungen.

Hierfür wurden Zellen auf 24-Well-Zellkulturplatten für die angegebenen Zeiten mit normoosmotischem (305 mosmol/L) oder hypoosmotischem Medium (205 mosmol/L) inkubiert. Anschließend wurden Veränderungen der Konzentration freier Zn^{2+} -Ionen durch fluorimetrische Bestimmungen der NG-Fluoreszenz ermittelt.

Eine signifikant erhöhte NG-Fluoreszenz wurde erstmals 30 Minuten nach hypoosmotischer Stimulation gemessen. Dieser Anstieg persistierte über einen Beobachtungszeitraum von sechs Stunden nach Stimulation.

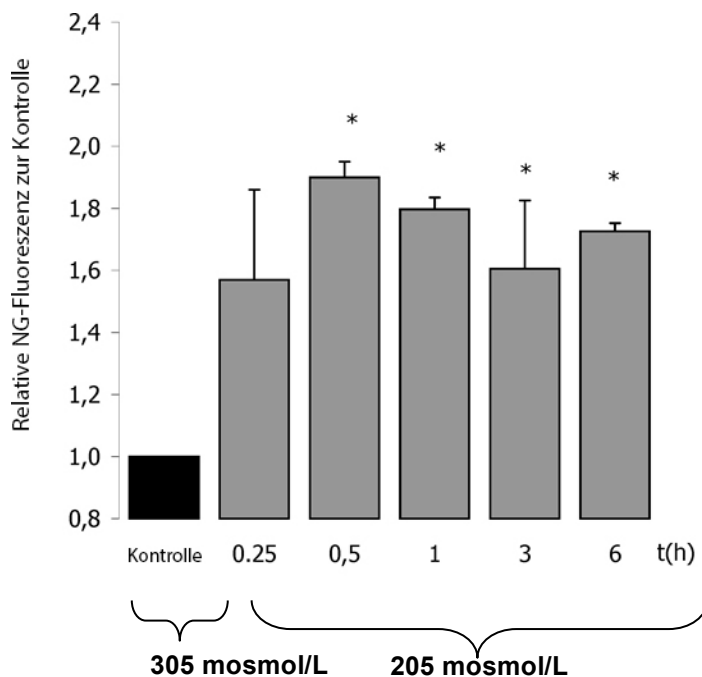


Abb. 6: Zeitverlauf der durch Hypoosmolarität induzierten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen. Kultivierte Rattenastrozyten wurden für die angegebenen Zeitdauern (t) mit normoosmotischem (305 mosmol/L) oder hypoosmotischem (205 mosmol/L) Medium inkubiert und die *Newport-Green*-(NG)-Fluoreszenzintensität fluorimetrisch ermittelt.

* signifikant unterschiedlich ($P \leq 0,05$) gegenüber normoosmotischen Kontrollbedingungen.
(Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.2.3 Reversibilität der hypoosmotisch-induzierten Steigerung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

Abb. 7 zeigt die Reversibilität des durch Astrozytenschwellung induzierten $[Zn^{2+}]_i$ -Anstiegs.

Die fluorimetrisch ermittelte Konzentration freier Zinkionen war sowohl nach einer als auch nach sechs Stunden hypoosmotischer Inkubation (205 mosmol/L) gegenüber normoosmotischen Kontrollen (305 mosmol/L) signifikant erhöht. Demgegenüber wurde nach einer Stunde Inkubation in hypoosmotischem Medium gefolgt von einer fünfstündigen Inkubation in normoosmotischem Medium ein Absinken der fluorimetrisch detektierten NG-Fluoreszenz unter Kontrollniveau beobachtet. Diese Untersuchungen zeigen, dass die durch hypoosmotisches Medium herbeigeführte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen reversibel ist.

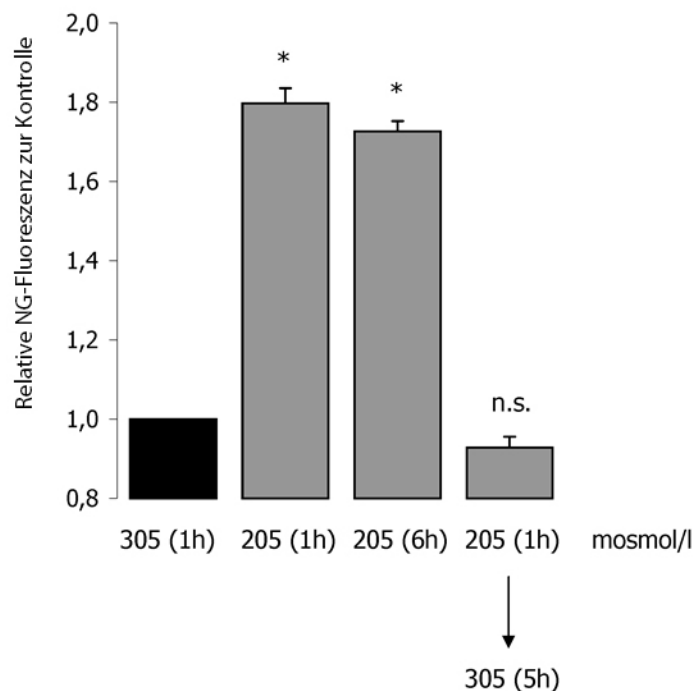


Abb. 7: Reversibilität des hypoosmotisch-induzierten Anstiegs der freien intrazellulären Zinkionenkonzentration. Kultivierte Astrozyten wurden für 1 h und 6 h mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) bzw. als Kontrolle mit normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium oder nach 1 h Inkubation mit hypoosmotischem Medium nachfolgend für 5 h mit normoosmotischem Medium inkubiert. Die Konzentration freier Zn^{2+} -Ionen in Astrozyten wurde nachfolgend mit *Newport-Green* (NG) fluorimetrisch gemessen und in Relation zur Kontrolle ausgedrückt.
* signifikant unterschiedlich ($P \leq 0,05$) gegenüber normoosmotischen Kontrollbedingungen.
(Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.2.4 Osmolaritätsabhängigkeit der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

Abb. 8 zeigt die Osmolaritätsabhängigkeit der $[Zn^{2+}]_i$ -Veränderungen. Astrozyten wurden für eine Stunde mit DMEM unterschiedlicher Osmolaritäten zwischen 320 und 205 mosmol/L versetzt. Die Osmolaritäten wurden durch Einstellung der NaCl-Konzentrationen erreicht. Bereits eine Verringerung der Osmolarität des Mediums um 33 mosmol/L von 305 mosmol/L auf 272 mosmol/L bewirkte einen signifikanten Anstieg der NG-Fluoreszenz. Mit abnehmender Osmolarität stieg die NG-Fluoreszenz schrittweise an. Die Ergebnisse zeigen, dass die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen mit abnehmender Osmolarität ansteigt.

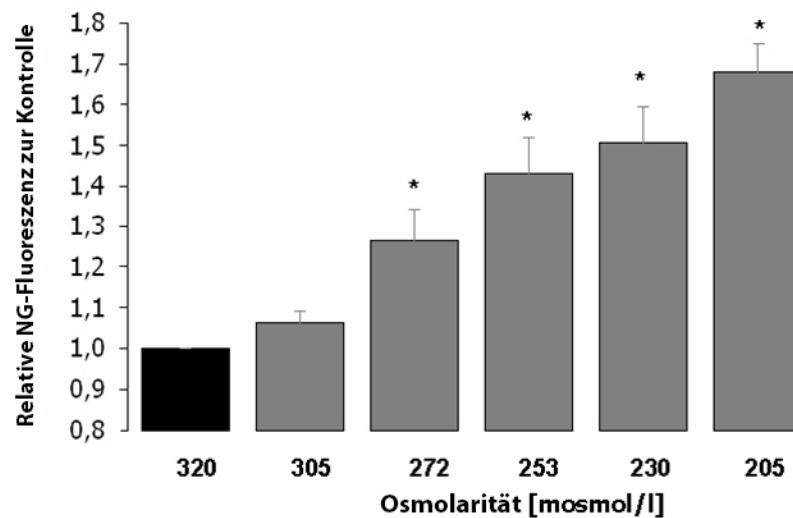


Abb. 8: Osmolaritätsabhängigkeit der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen. Astrozyten wurden für 1 h mit DMEM unterschiedlicher Osmolaritäten inkubiert und die *Newport-Green*-(NG)-Fluoreszenz fluorimetrisch ermittelt.

* signifikant unterschiedlich ($P \leq 0,05$) gegenüber der normoosmotischen Kontrolle. (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.2.5 Nachweis der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen mittels Zinquin

Um die mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Newport Green* (NG) gemessene hypoosmotisch-induzierte Erhöhung von $[Zn^{2+}]_i$ zu validieren, wurde der zinkspezifische Fluoreszenzfarbstoff Zinquin (Zalewski *et al.*, 1994) verwendet. Astrozyten wurden für 1 h mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) oder normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert und 30 min vor Beendigung der Experimente mit Zinquin (25 μ mol/L) beladen. Als Positivkontrolle wurden die Astrozyten mit Zinksulfat ($ZnSO_4$, 300 μ mol/L) und Pyrithion (20 μ mol/L) inkubiert.

Abb. 9 zeigt den Fluoreszenzanstieg in einem mit Zinquin-beladenen Astrozyten nach Inkubation mit hypoosmotischem Medium (205 mosmol/L, 1 h) gegenüber normoosmotischen Kontrollbedingungen (305 mosmol/L, 1 h). Als Positivkontrolle wurden die Astrozyten 30 min mit extrazellulärem Zn^{2+} ($ZnSO_4$, 300 μ mol/L) in Anwesenheit des Ionophors Pyrithion (20 μ mol/L) behandelt. Auch hier war eine deutliche Zunahme der Zinquinfluoreszenz zu beobachten.

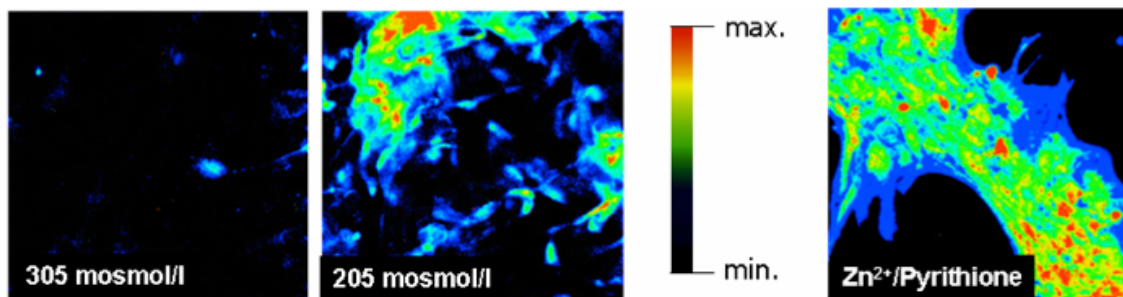


Abb. 9: Nachweis intrazellulärer freier Zinkionen in kultivierten Rattenastrozyten mittels Zinquin. Astrozyten wurden für 1 h mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) oder normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert und 30 min vor Beendigung der Experimente mit Zinquin (25 μ mol/L) beladen. Als Positivkontrolle wurden die Astrozyten mit Zinksulfat ($ZnSO_4$, 300 μ mol/L) und Pyrithion (20 μ mol/L) für 30 min inkubiert. Die Zinquinfluoreszenz wurde mittels Epifluoreszenzmikroskopie aufgenommen und in Falschfarben dargestellt. (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.2.6 Einfluss von Hypoosmolarität auf die mitochondriale Konzentration freier Zinkionen

Hypoosmotisch-induzierte Veränderungen der Konzentration freier Zinkionen in Mitochondrien wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes RhodZin-3-AM beobachtet. RhodZin-3-AM ist ein in Mitochondrien akkumulierender Zn^{2+} -Chelator (Sensi *et al.*, 2003).

Wie in Abb. 10 gezeigt, induziert die Behandlung von Astrozyten mit hypoosmotischem Medium (205 mosmol/L) nach einer Stunde eine Steigerung der Konzentration freier Zinkionen in Mitochondrien. Ein signifikanter Anstieg der RhodZin-3-AM-Fluoreszenz um das 1,12-fache $\pm 0,02$ ($P < 0,008$) wurde

nach einer Stunde in mit hypoosmotischem Medium behandelten Astrozyten gegenüber normoosmotischen (305 mosmol/L) Kontrollbedingungen nachgewiesen. In Gegenwart des Zinkchelators TPEN (25 $\mu\text{mol/L}$) blieb die durch hypoosmotisches Medium herbeigeführte Erhöhung der mitochondrialen RhodZin-3-AM-Fluoreszenz aus. In mit TPEN behandelten Astrozyten ergaben sich nach Stimulation mit hypoosmotischem Medium RhodZin-3-AM-Fluoreszenzwerte um $0,84 \pm 0,01$ (signifikant ($P < 0,008$) kleiner als in Astrozyten, die mit hypoosmotischem Medium in Abwesenheit von TPEN ($n = 3$) behandelt wurden. Um die mitochondriale Lokalisation von RhodZin-3-AM zu überprüfen, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Mitochondrienfarbstoff *MitoTracker Green* (1 $\mu\text{mol/L}$, 10 min) beladen.

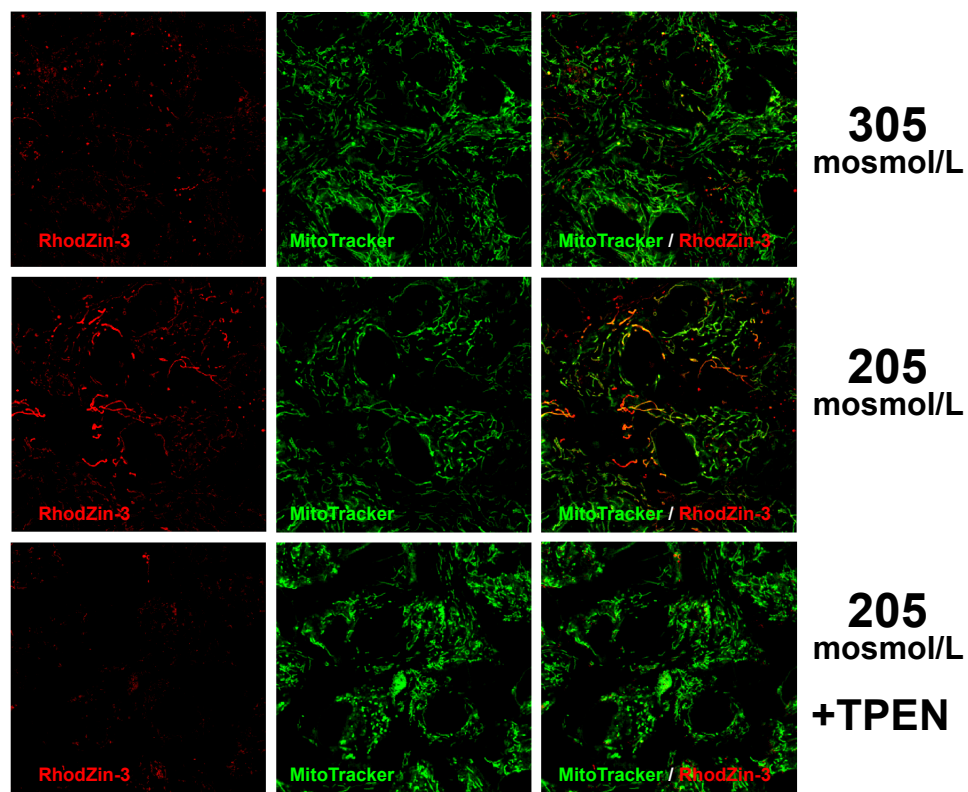


Abb. 10: Nachweis der Konzentration freier Zinkionen in Mitochondrien mit RhodZin-3.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden in An- oder Abwesenheit von TPEN (25 $\mu\text{mol/L}$) für 1 h mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) oder normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert. Die mitochondriale Konzentration von $[\text{Zn}^{2+}]_i$ wurde mittels Fluoreszenz von RhodZin-3-AM (1 $\mu\text{mol/L}$, rot, 10 min) und durch *MitoTracker Green* (1 $\mu\text{mol/L}$, grün, 10 min) fluoreszierende Mitochondrien mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (LSM) visualisiert. (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.3 Einfluss von hypoosmotischem Medium und dem Zinkchelator N,N,N',N'-tetrakis-(2-Pyridylmethyl)ethylenediamine auf die Vitalität kultivierter Rattenastrozyten

Um eine potentielle Toxizität von hypoosmotischem Medium (205 mosmol/L) und dem Zinkchelator TPEN auf Astrozyten zu untersuchen, wurde der Farbstoff Propidium Iodid (PI) verwendet, welcher die Membran toter Zellen permeiert und die DNA anfärbt.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Inkubation kultivierter Rattenastrozyten bis zu 24 h mit hypoosmotischem Medium keine erhöhte PI-Fluoreszenz in Astrozyten induziert (Abb. 11). Während eine Anfärbung der Kerne mit PI (25 µmol/l, 10 min) in mit hypoosmotischem Medium inkubierten Astrozyten nicht nachweisbar war, stieg die PI-Fluoreszenz nach Behandlung der Zellen mit 5 mmol/L H₂O₂ für 1 h stark an. Auch eine Inkubation der Astrozyten mit dem Zinkchelator TPEN (25 µmol/L) steigerte 9 h und 24 h nach Behandlung die nukleäre PI-Fluoreszenz.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine anhaltende Zn²⁺-Depletion toxisch ist, und dass Hypoosmolarität die Astrozytenvitalität über einen Beobachtungszeitraum von bis zu 24 h nicht vermindert.

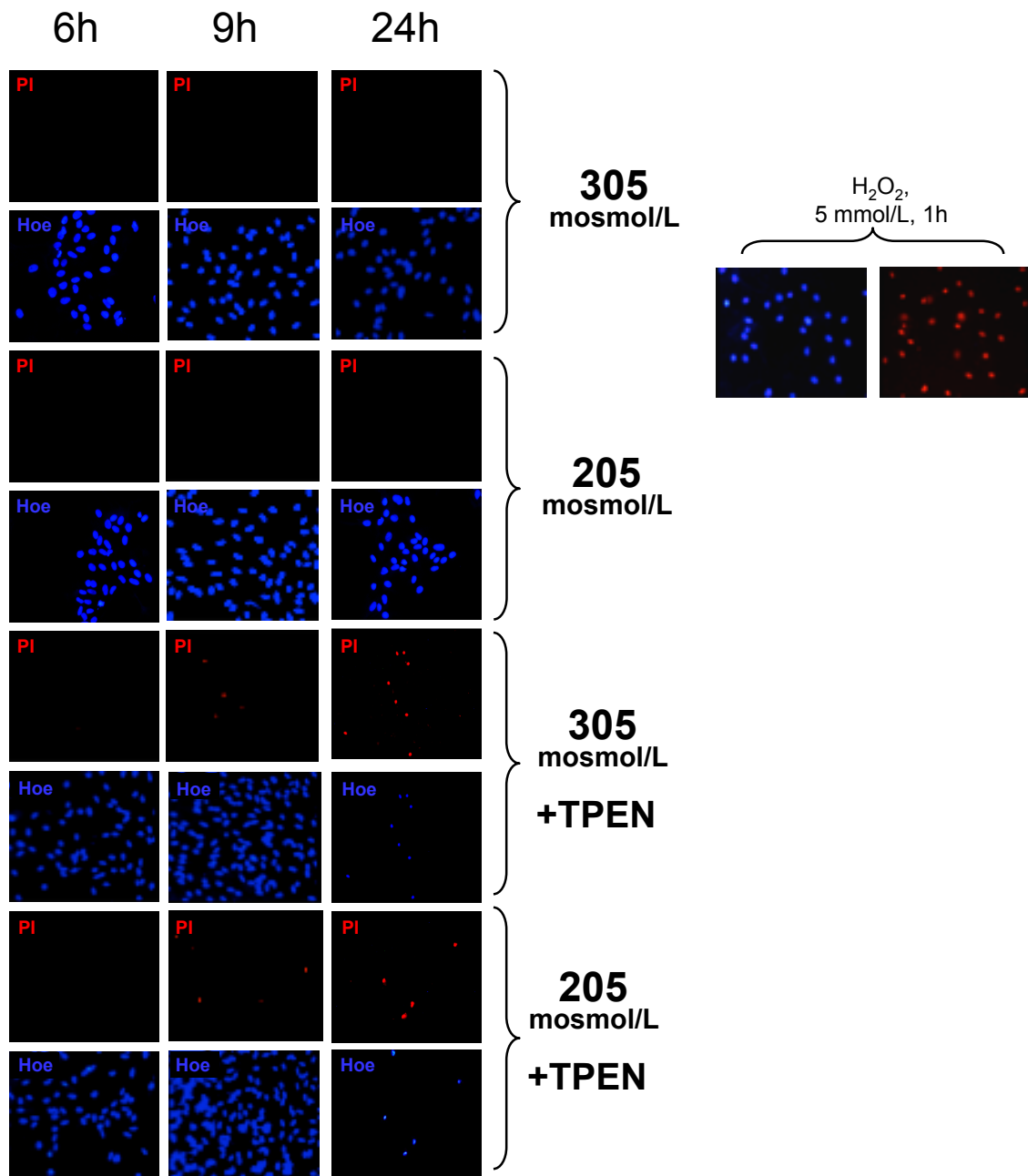


Abb. 11: Einfluss einer Behandlung kultivierter Astrozyten mit hypoosmotischem Medium und dem Zinkchelator TPEN auf die Astrozytenvitalität. Astrozyten wurden in An- oder Abwesenheit von TPEN (25 μ mol/L) für die angegebenen Zeiträume mit hypoosmotischem (205 mosmol/) oder normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium inkubiert. In Kontrollexperimenten wurden die Zellen mit einer toxischen Konzentration Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (5 mmol/L, 1 h) inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit dem DNA-Farbstoff Propidium Iodid und mit Hoechst 34580 inkubiert und mittels Epifluoreszenzmikroskopie Hoechst und PI detektiert. Blau: mit Hoechst 34580 (Hoe, Verdünnung 1:10000, 10 min) angefärbte Zellkerne. Rot: Verlust der mit Propidium Iodid (PI, 25 μ mol/L, 10 min) angefärbten Zellkerne. (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.4 Charakterisierung beteiligter Signalwege an der durch hypoosmotisches Medium vermittelten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

3.4.1 Bedeutung der intrazellulären Kalziumionenkonzentration und von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren für den durch hypoosmotisches Zellkulturmedium induzierten Anstieg der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

Die Charakterisierung von Signalwegen, die an der durch hypoosmotisches Medium induzierten Zunahme von $[Zn^{2+}]_i$ beteiligt sind, erfolgte, indem kultivierte Rattenastrozyten mit pharmakologischen Inhibitoren, die in unterschiedliche Signalwege eingreifen, inkubiert wurden. Veränderungen von $[Zn^{2+}]_i$ wurden am Ende der Experimente mit den für Zinkionen sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen und Zn^{2+} -Chelatoren NG oder Zinquin ermittelt.

TPEN ist ein Zn^{2+} -Chelator, der den hypoosmotisch induzierten $[Zn^{2+}]_i$ -Anstieg verhindert, wie Abb. 12 und 13 zeigen.

Der Einfluss von Ca^{2+} auf die durch hypoosmotisches Medium (205 mosmol/L) vermittelte Zunahme der intrazellulären Konzentration freier Zn^{2+} -Ionen wurde unter anderem mit dem Ca^{2+} -Chelator BAPTA-AM untersucht. BAPTA-AM cheliert mit hoher Affinität Ca^{2+} , aber auch Zn^{2+} (Benters *et al.*, 1997; Csermely *et al.*, 1989). Wie in Abb. 13 gezeigt, wurde der durch hypoosmotisches Medium (205 mosmol/L, 1 h) vermittelte Anstieg von $[Zn^{2+}]_i$ in Gegenwart von BAPTA-AM (10 μ mol/L) signifikant vermindert.

Die potentielle Bedeutung von astroglial exprimierten NMDA-Rezeptoren für die durch hypoosmotisches Medium vermittelte intrazelluläre Freisetzung von Zn^{2+} wurde mit dem nicht-kompetitiven NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 (Wong *et al.*, 1986) untersucht. Die in Abb. 13 präsentierten Ergebnisse zeigen, dass MK-801 (100 μ mol/L) auch den durch hypoosmotisches Medium (205 mosmol/L, 1 h) vermittelten Anstieg der NG-Fluoreszenz hemmt.

Auch der kompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonist AP-5 (50 μ mol/L) (Olverman *et al.*, 1984) hemmte die durch hypoosmotisches Medium (205 mosmol/L, 1 h) vermittelte Steigerung der NG-Fluoreszenz (Abb. 13).

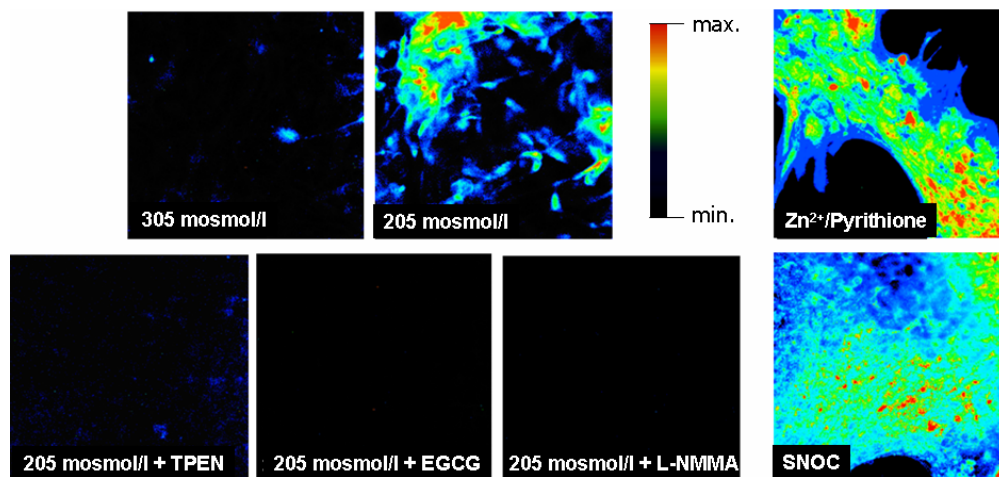


Abb. 12: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis freier Zinkionen in kultivierten Rattenastrozyten. Astrozyten wurden entweder mit normoosmotischem (305 mosmol/L) oder mit hypoosmotischem Medium (205 mosmol/L) für 1 h in An- und in Abwesenheit von TPEN (25 μ mol/L), EGCG (30 μ mol/L) und L-NMMA (1 mmol/L) inkubiert und mit Zinquin (25 μ mol/L) beladen. Nachfolgend wurde die Zinquin-Fluoreszenz mittels Epifluoreszenzmikroskopie detektiert und die Fluoreszenzintensitäten in Falschfarben kodiert. Als Positivkontrolle wurden die Astrozyten mit Zinksulfat (ZnSO_4 , 300 μ mol/L) plus Pyrithion (20 μ mol/L) oder mit SNOC (1 mmol/L, 1 h) inkubiert. (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

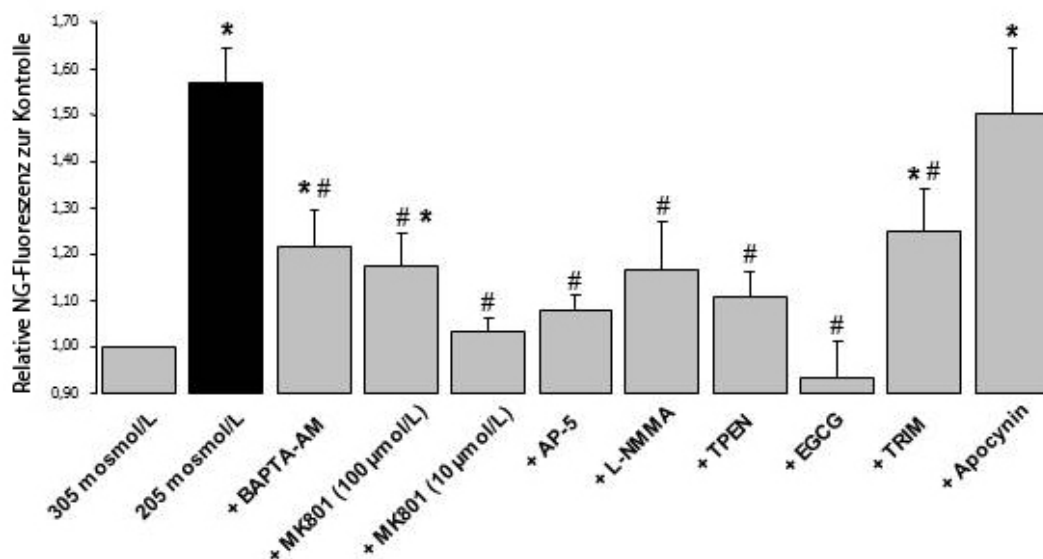


Abb. 13: Semiquantitative Bestimmung des Einflusses unterschiedlicher Inhibitoren auf die durch hypoosmotisches Medium induzierte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen. Astrozyten wurden für 1 h mit normo- (305 mosmol/L) oder hypoosmotischem (205 mosmol/L) Medium in An- oder Abwesenheit von Inhibitoren (BAPTA-AM 10 μ mol/L, MK-801 100 μ mol/L bzw. 10 μ mol/L, AP-5 50 μ mol/L, L-NMMA 1 mmol/L, TPEN 25 μ mol/L, EGCG 30 μ mol/L, TRIM 100 μ mol/L, Apocynin 300 μ mol/L) inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit Newport Green (NG, 5 μ mol/L, 30 min) beladen und die NG-Fluoreszenz fluorimetrisch ermittelt.

* signifikant unterschiedlich ($P \leq 0,05$) gegenüber normoosmotischen Kontrollen (normoosmotisches Medium plus Inhibitor)

signifikant unterschiedlich ($P \leq 0,05$) gegenüber mit hypoosmotischem Medium behandelten Zellen in Abwesenheit von Inhibitoren. (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.4.2 Bedeutung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies für die durch hypoosmotisches Medium induzierte Steigerung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

Es ist bekannt, dass eine Astrozytenschwellung die Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (RONS) in Astrozyten induziert (Reinehr *et al.*, 2007; Schliess *et al.*, 2002, 2004). Die Bedeutung der durch hypoosmotisches Medium induzierten RONS-Bildung wurde durch das potente Antioxidanz Epigallocatechingallat (EGCG) sowie die NOS-Inhibitoren TRIM und L-NMMA überprüft (Chan *et al.*, 1997; Saffari und Sadrzadeh, 2004).

Abb. 12 und 13 zeigen, dass EGCG (30 $\mu\text{mol/L}$) in kultivierten Rattenastrozyten den durch hypoosmotisches Medium (205 mosmol/L) induzierten $[\text{Zn}^{2+}]$ -Anstieg vollständig blockiert.

Wie in Abb. 12 bzw. 13 erkennbar, hemmte EGCG sowohl den Anstieg der Zinquin- als auch der NG-Fluoreszenz.

Eine deutliche Steigerung der Zinquinfluoreszenz wurde auch in mit dem NO-Donor SNOC (1 mmol/L, 1 h) behandelten Astrozyten gefunden (Abb. 12).

Abb. 14 zeigt den zeitlichen Verlauf des Anstiegs der NG-Fluoreszenz nach Stimulation mit SNOC (1 mmol/L, 15 min, 1 h, 3 h und 6 h). Eine signifikante Steigerung der NG-Fluoreszenz wurde erstmals 15 min nach Behandlung mit SNOC gemessen.

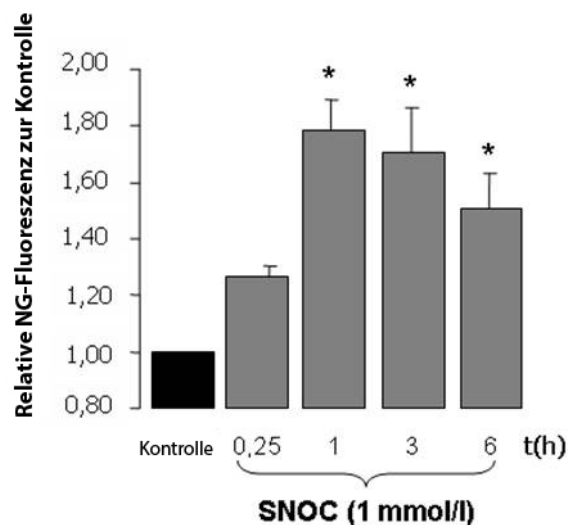


Abb. 14: Wirkung des NO-Donors SNOC auf die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen. Kultivierte Rattenastrozyten wurden für die angegebenen Zeiten mit SNOC (1 mmol/L) inkubiert und die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen fluorimetrisch mittels *Newport-Green*-(NG)-Fluoreszenz erfasst.

*, signifikant unterschiedlich ($P \leq 0,05$) gegenüber unbehandelten Kontrollen. (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

Eine Beteiligung von ROS bei der durch hypoosmotisches Medium induzierten Steigerung von $[Zn^{2+}]_i$ wurde mit dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin (Muijsers *et al.*, 2000) überprüft.

Abb. 13 zeigt, dass die Behandlung der Astrozyten mit Apocynin (300 $\mu\text{mol/L}$) den durch hypoosmotisches Medium (205 mosmol/L) induzierten $[Zn^{2+}]_i$ -Anstieg nicht hemmt.

Die Daten zeigen, dass NO, nicht aber durch die NADPH-Oxidase gebildetes Superoxid, beteiligt ist an der durch hypoosmotisches Medium induzierten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen.

3.4.3 Effekt einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Zellschwellung auf die Bildung von Stickstoffmonoxid in kultivierten Rattenastrozyten

In weiteren Experimenten wurde die Wirkung einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Astrozytenschwellung auf die Bildung von NO untersucht. Hierfür wurde der Farbstoff DAF-FM diacetate verwendet, dessen Fluoreszenzintensität proportional zur NO-Konzentration ansteigt (Rodriguez *et al.*, 2005).

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit DAF-FM (1 $\mu\text{mol/L}$, 10 min) beladen, und die NO-Bildung wurde in mit normo- (305 mosmol/L) oder hypoosmotischem (205 mosmol/L) Medium behandelten Zellen mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie untersucht (Abb. 15).

Wie in Abb. 15 erkennbar, steigert die Behandlung kultivierter Astrozyten mit hypoosmotischem Medium innerhalb von fünf Minuten die DAF-FM-Fluoreszenzintensität. Dieser Anstieg konnte mit dem NOS-Inhibitor L-NMMA (1 mmol/L, 30-minütige Vorbehandlung) vollständig verhindert werden.

Um eine Interferenz von L-NMMA mit der Detektion der DAF-FM-Fluoreszenz auszuschließen, wurden mit L-NMMA behandelte Astrozyten mit dem NO-Donor SNOC (1 mmol/L, 3 min) versetzt, was einen sehr starken Anstieg der DAF-FM-Fluoreszenz induziert (Abb. 15).

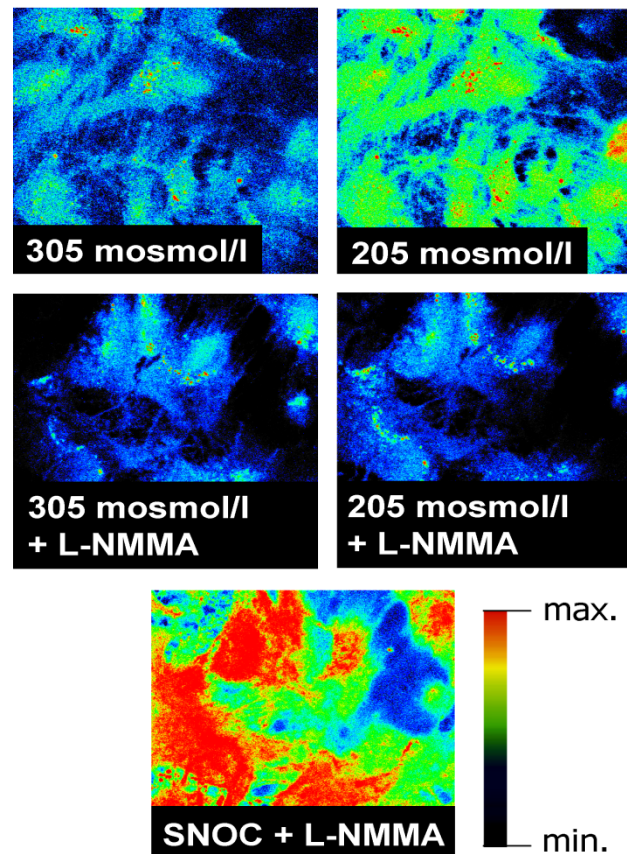


Abb. 15: Nachweis der Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) in kultivierten Rattenastrozyten mittels Fluoreszenzmikroskopie. Fünf Minuten nach Stimulation mit hypoosmotischem Medium (205 mosmol/L) wurde die Detektion der Fluoreszenzintensität von mit DAF-FM (1 μ mol/L, 10 min) beladenen Zellen mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie nachgewiesen. Wo angegeben, wurden die Experimente in Gegenwart von L-NMMA (30 min Vorbehandlung, 1 mmol/L) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden die mit L-NMMA behandelten Zellen mit SNOC (1 mmol/L, 3 min) inkubiert. Die erhaltenen Fluoreszenzintensitäten sind in Falschfarben kodiert. (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.4.4 Bedeutung der durch hypoosmotisches Medium induzierten Stickstoffmonoxid-Synthese für den Anstieg der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

Um die Rolle von NO-Synthasen auf die schwellungsbedingte intrazelluläre Zn^{2+} -Freisetzung in Astrozyten zu untersuchen, wurde der Breitband-NOS-Hemmstoff L-NMMA (Knowles und Moncada, 1994) eingesetzt.

Abb. 12 zeigt, dass in mit L-NMMA behandelten Astrozyten die durch hypoosmotisches Medium induzierte Erhöhung der Zinquinfluoreszenz nicht detektierbar ist.

L-NMMA hemmte auch die durch hypoosmotisches Medium induzierte Steigerung der NG-Fluoreszenz (Abb. 13).

Die Untersuchungen zeigen, dass L-NMMA den hypoosmotisch induzierten $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Anstieg nahezu vollständig hemmt.

3.4.5 Bedeutung der intrazellulären Kalziumionen-Konzentration und von Stickstoffmonoxid-Synthasen für die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen

Weitere Untersuchungen dienten der Charakterisierung der an der Zinkfreisetzung beteiligten NO-Synthasen. Hierfür wurden Experimente mit dem nNOS-Hemmstoff TRIM (Bachetti *et al.*, 2004) durchgeführt. Kultivierte Astrozyten wurden in An- oder Abwesenheit von TRIM (100 $\mu\text{mol/L}$, 30 min Vorbehandlung) für eine Stunde mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) oder normoosmotischem (305 mosmol/L) Medium versetzt und 30 min mit dem zinkspezifischen Fluoreszenzfarbstoff NG (5 $\mu\text{mol/L}$) inkubiert. Anschließend wurde die NG-Fluoreszenz mittels Fluoreszenzmikroskopie erfasst. Abb. 13 zeigt, dass TRIM den hypoosmotisch induzierten $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Anstieg signifikant vermindert.

In weiteren Experimenten wurde die Bedeutung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration für die $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Freisetzung untersucht. Dafür wurden kultivierte Rattenastrozyten mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin (5 $\mu\text{mol/L}$, 5 min) behandelt und die intrazelluläre Konzentration freier Zn^{2+} -Ionen mittels NG-Fluoreszenz erfasst. Abb. 16 zeigt, dass eine durch Ionomycin hervorgerufene $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Erhöhung in kultivierten Rattenastrozyten nach fünf Minuten zu einem signifikanten $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Anstieg führt, welcher sowohl mit dem Zn^{2+} -Chelator TPEN (25 $\mu\text{mol/L}$, 30 min Vorbehandlung) als auch mit dem nNOS-Hemmstoff TRIM (100 $\mu\text{mol/L}$, 30 min Vorbehandlung) gehemmt wurde.

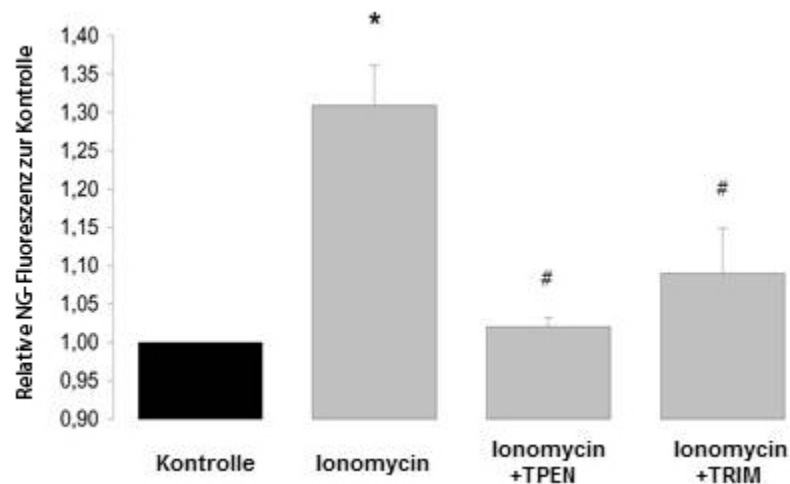


Abb. 16: Bedeutung von Kalziumionen (Ca^{2+}) und der nNOS für den Anstieg der intrazellulären freien Zinkionenkonzentration ($[\text{Zn}^{2+}]_i$). Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit Ionomycin (5 $\mu\text{mol/L}$, 5 min) inkubiert in An- oder Abwesenheit von TPEN (25 $\mu\text{mol/L}$, 30 min Vorbehandlung) oder TRIM (100 $\mu\text{mol/L}$, 30 min Vorbehandlung) und die NG-Fluoreszenz semiquantitativ fluorimetrisch erfasst.

Die NG-Fluoreszenz unbehandelter Kontrollen wurde gleich eins gesetzt.

* signifikant unterschiedlich ($P \leq 0,05$) gegenüber unbehandelten Kontrollen.

signifikant unterschiedlich ($P \leq 0,05$) gegenüber Ionomycin-behandelten Astrozyten. (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.5 Einfluss einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Zellschwellung auf die nukleäre Akkumulation der Transkriptionsfaktoren metallresponsiver Transkriptionsfaktor 1 und Spezifitätsprotein 1

3.5.1 Bedeutung der durch hypoosmotisches Medium induzierten Zinkfreisetzung für die nukleäre Akkumulation des metallresponsiven Transkriptionsfaktors 1

Um den Effekt eines durch hypoosmotisches Zellkulturmedium herbeigeführten Anstiegs von $[Zn^{2+}]_i$ in kultivierten Rattenastrozyten auf eine mögliche Akkumulation des Zinkfingertranskriptionsfaktors metallresponsiver Transkriptionsfaktor 1 (MTF-1) im Kern zu untersuchen, wurden *Western-Blot*-Analysen unter Verwendung von Kernextrakten durchgeführt. Kultivierte Astrozyten wurden für eine Stunde in An- oder Abwesenheit des Zn^{2+} -Chelators TPEN (25 $\mu\text{mol/L}$, 30 min Vorbehandlung) mit hypoosmotischem (205 mosmol/L) oder mit normoosmotischem Medium (305 mosmol/L) inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellkerne präpariert und Protein extrahiert. Anschließend wurden die aus den Kernen isolierten Proteine in *Western-Blot*-Analysen verwendet.

Abb. 17 zeigt, dass die Stimulation mit hypoosmotischem Medium im Vergleich zu normoosmotischem Medium einen signifikanten Anstieg der MTF-1-Konzentration in den Kernextrakten induziert. In Kernextrakten von mit hypoosmotischem Medium behandelten Rattenastrozyten, die mit dem Zn^{2+} -Chelator TPEN behandelt wurden, fand sich eine signifikant geringere MTF-1-Expression als in Kernextrakten von mit hypoosmotischem Medium behandelten Rattenastrozyten, die nicht mit dem Zn^{2+} -Chelator TPEN behandelt wurden.

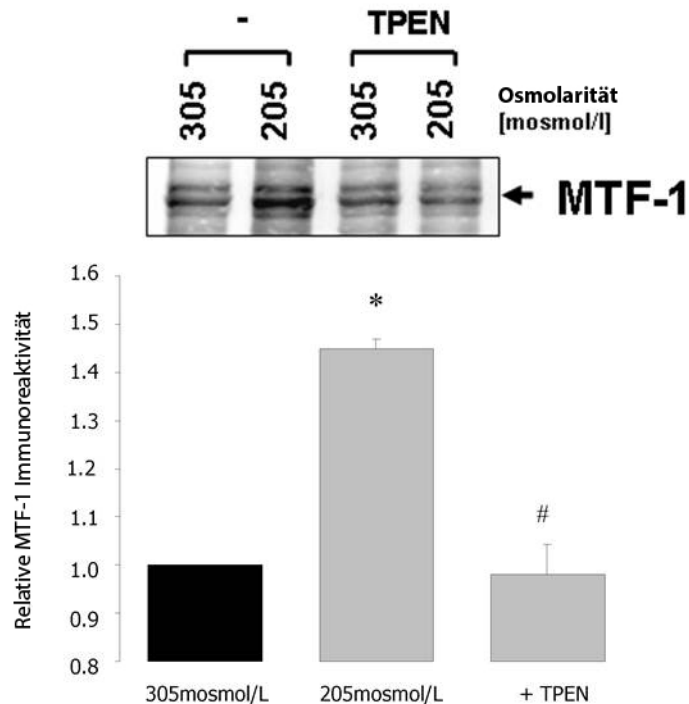


Abb. 17: Effekt einer durch hypoosmotisches Medium herbeigeführten Zellschwellung auf die Expression des Transkriptionsfaktors MTF-1. Astrozyten wurden für 1 h mit normo- (305 mosmol/L) oder hypoosmotischem (205 mosmol/L) Medium in An- oder Abwesenheit von TPEN (25 μ mol/L) inkubiert und MTF-1 in Kernextrakten mittels *Western-Blot* analysiert. Unten: Densitometrische Quantifizierung der MTF-1-Konzentration der Kernextrakte. Die unter normoosmotischer Kontrollbedingung gemessene Immunoreaktivität wurde gleich eins gesetzt und die Immunoreaktivität, die unter hypoosmotischer Bedingung plus TPEN gemessen wurde, relativ dazu angegeben. *, signifikant ($P \leq 0,05$) gegenüber mit normoosmotischem Medium behandelten Astrozyten #, signifikant ($P \leq 0,05$) gegenüber mit hypoosmotischem Medium in Abwesenheit von TPEN behandelten Astrozyten (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.5.2 Bedeutung der Proteinkinase C für die durch hypoosmotisches Medium induzierte nukleäre Akkumulation des Spezifitätsproteins 1

In weiteren Untersuchungen wurde überprüft, ob die Behandlung kultivierter Astrozyten eine nukleäre Akkumulation des Spezifitätsproteins 1 (SP1) induziert. Eine potentielle nukleäre Akkumulation des Transkriptionsfaktors SP1 als Antwort auf hypoosmotische Schwellung wurde analog zu den MTF-1-Untersuchungen (3.5.1) durchgeführt. Hierfür wurden Kernextrakte aus mit normo- (305 mosmol/L) oder hypoosmotischem (205 mosmol/L) Medium behandelten Astrozyten präpariert und die SP1-Expressionslevel mittels *Western-Blot*-Analyse bestimmt. Ein Einfluss von Zn^{2+} wurde durch Verwendung des Zinkchelators TPEN (25 μ mol/L, 30 min Vorbehandlung) überprüft. Abb. 18 zeigt, dass es nach einstündiger Stimulation mit hypoosmotischem Medium zu einem signifikanten Anstieg der SP1-Expression

im Kern gegenüber mit normoosmotischem Medium behandelten Kontrollen kommt.

Eine Beteiligung der PKC bei der durch Zn^{2+} -vermittelten Aktivierung von SP1 wurde mit dem selektiven cPKC-Inhibitor Gö6850 untersucht. Gö6850 hemmt sowohl PKC α , PKC β I, PKC β II, γ als auch δ (Martiny-Baron *et al.*, 1993). Abb. 18 zeigt, dass Gö6850 die nukleäre Akkumulation von SP1 in mit hypoosmotischem Medium behandelten Astrozyten signifikant hemmt.

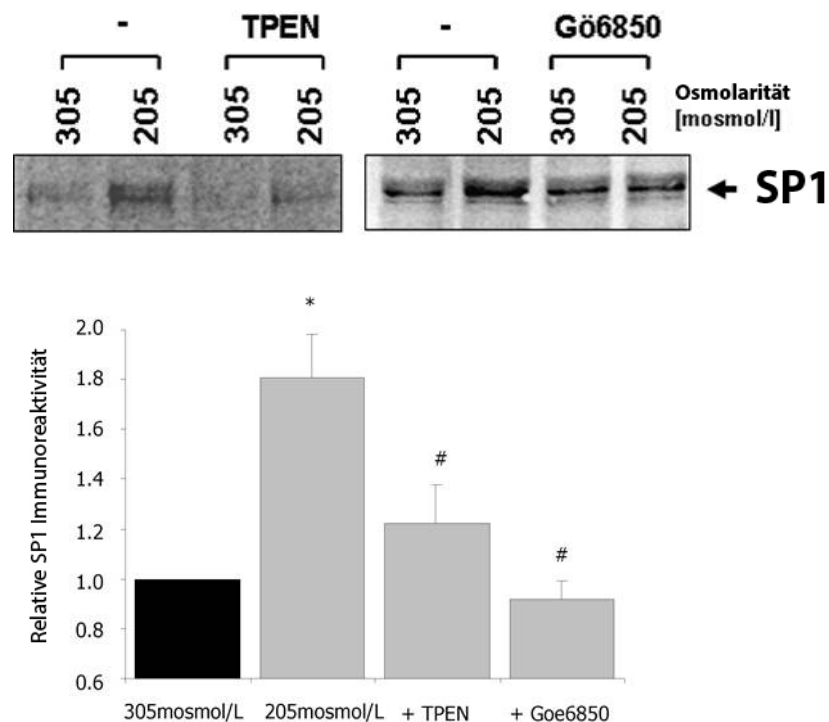


Abb. 18: Bedeutung von $[\text{Zn}^{2+}]_i$ und der cPKC für die durch hypoosmotisches Medium induzierte nukleäre Akkumulation von SP1. Astrozyten wurden für 1 h mit normo- (305 mosmol/L) oder hypoosmotischem (205 mosmol/L) Medium in An- oder Abwesenheit von TPEN (25 $\mu\text{mol/L}$, 30 min Vorbehandlung) oder Gö6850 (10 $\mu\text{mol/L}$, 30 min Vorbehandlung) inkubiert und SP1 in Kernextrakten mittels *Western-Blot* analysiert.

Unten: Densitometrische Quantifizierung der SP1-Konzentration der Kernextrakte.

Die unter normoosmotischer Kontrollbedingung gemessene Immunoreaktivität wurde gleich eins gesetzt und die Immunoreaktivität, die unter hypoosmotischer Bedingung plus TPEN bzw. Gö6850 gemessen wurde, relativ dazu angegeben.

*, signifikant ($P \leq 0,05$) gegenüber mit normoosmotischem Medium behandelten Astrozyten

#, signifikant ($P \leq 0,05$) gegenüber mit hypoosmotischem Medium in Abwesenheit von TPEN bzw. Gö6850 behandelten Astrozyten (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.6 Einfluss einer hypoosmotisch-vermittelten Zellschwellung auf die Gentranskription von Metallothionein und des peripheren Benzodiazepinrezeptors

3.6.1 Bedeutung von $[Zn^{2+}]_i$ für die durch hypoosmotisches Medium induzierte Erhöhung der Metallothionein-mRNA-Expression

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss des schwellungsbedingten $[Zn^{2+}]_i$ -Anstiegs auf die Genexpression von Metallothionein 1/2 (MT-1/2) untersucht. Hierfür wurden kultivierte Astrozyten in An- oder Abwesenheit des Zn^{2+} -Chelators TPEN mit normoosmotischem (305 mosmol/L) oder hypoosmotischem (205 mosmol/L) Medium für 1 h oder 4 h inkubiert und anschließend die MT-1/2-mRNA-Spiegel mittels *RT-PCR* in RNA-Präparationen quantifiziert.

Wie in Abb. 19 A gezeigt, steigt die mRNA-Expression von MT-1/2 eine Stunde und stärker vier Stunden nach Inkubation mit hypoosmotischem Medium signifikant an. Dieser Anstieg konnte durch den Zinkchelator TPEN (25 μ mol/L, 30 min Vorbehandlung) vollständig gehemmt werden.

3.6.2 Bedeutung von $[Zn^{2+}]_i$ für die durch hypoosmotisches Medium induzierte Erhöhung der mRNA-Expression des peripheren Benzodiazepinrezeptors

In den nachfolgenden Experimenten wurde der Einfluss des schwellungsbedingten $[Zn^{2+}]_i$ -Anstiegs auf die Genexpression des PBRs untersucht. Hierfür wurden kultivierte Astrozyten in An- oder Abwesenheit des Zn^{2+} -Chelators TPEN (25 μ mol/L, 30 min Vorbehandlung) mit normoosmotischem (305 mosmol/L) oder hypoosmotischem (205 mosmol/L) Medium für 1 h oder 4 h inkubiert und anschließend die PBR-mRNA-Expression mittels *RT-PCR* quantifiziert.

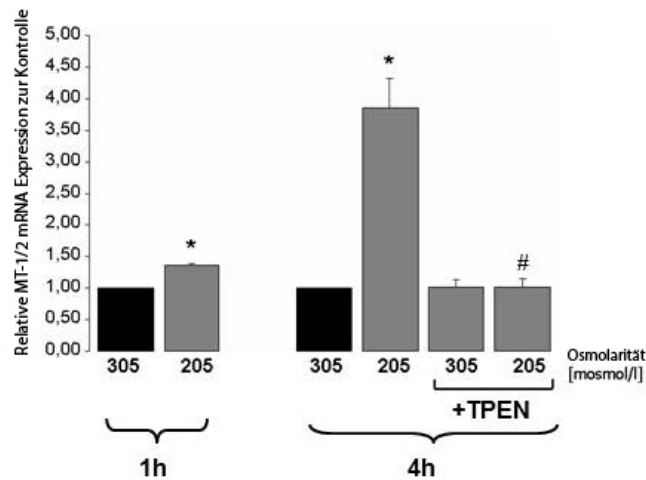
Die Bedeutung von SP1 für die durch hypoosmotisches Medium herbeigeführte Expressionssteigerung wurde mit dem SP1-Inhibitor Mitramycin (Huang *et al.*, 2008) untersucht.

Abb. 19.B zeigt, dass die Behandlung kultivierter Rattenastrozyten mit hypoosmotischem Medium innerhalb von 4 h zu einem signifikanten und durch den Zn^{2+} -Chelator TPEN hemmbaren Anstieg der PBR-mRNA-Expression gegenüber normoosmotischen Kontrollen führt. Auch der SP1-Inhibitor Mitramycin (500 nmol/L, 30 min Vorbehandlung) inhibiert die durch hypoosmotisches Medium induzierte PBR-Expressionssteigerung vollständig.

Um die SP1-Abhängigkeit der PBR-Transkription zu überprüfen, wurde SP1 mittels Transfektion einer SP1-spezifischen siRNA herunterreguliert. Als Kontrolle diente die Transfektion mit *scrambled* siRNA. Nachfolgend wurde die PBR-mRNA-Expression mittels *RT-PCR* quantifiziert.

Abb. 19.B zeigt, dass ein SP1-*Knockdown* in kultivierten Astrozyten die durch hypoosmotisches Medium induzierte Hochregulierung der PBR-mRNA-Expression vermindert.

A



B

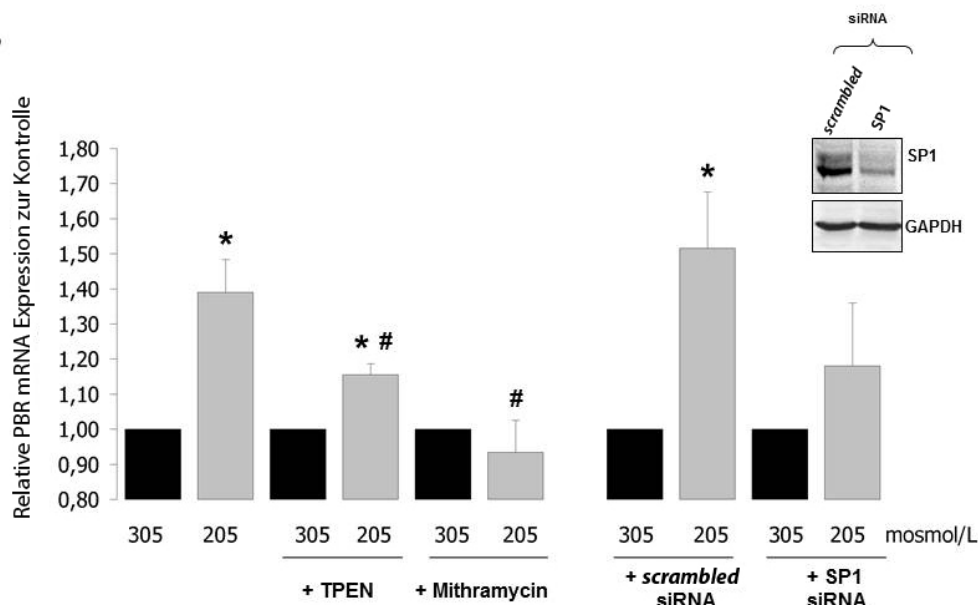


Abb. 19: Bedeutung von $[Zn^{2+}]_i$ und von SP1 für die durch hypoosmotisches Medium induzierte Expressionssteigerung von MT-1/2- und PBR-mRNA. (A) Astrozyten wurden für 1 h oder 4 h mit normo- (305 mosmol/L) oder hypoosmotischem (205 mosmol/L) Medium in An- oder Abwesenheit von TPEN (25 μ mol/L, 30 min Vorbehandlung) inkubiert. Anschließend wurde die MT-1/2-mRNA mittels *RT-PCR* in RNA-Präparationen quantifiziert. (B, links) Astrozyten wurden für 4 h mit normo- (305 mosmol/L) oder hypoosmotischem (205 mosmol/L) Medium in An- oder Abwesenheit von TPEN (25 μ mol/L, 30 min Vorbehandlung) oder Mitramycin (500 nmol/L, 30 min Vorbehandlung) inkubiert. Anschließend wurde die PBR-mRNA mittels *RT-PCR* in RNA-Präparationen quantifiziert.

Die unter normoosmotischer Kontrollbedingung gemessene Immunoreaktivität wurde gleich eins gesetzt und die Immunoreaktivität, die unter hypoosmotischer Bedingung plus TPEN oder Mitramycin gemessen wurde, relativ dazu angegeben.

(B, rechts) Nach Transfektion von spezifischer SP1-siRNA (SP1-Knockdown) oder Transfektion von *scrambled* siRNA (Kontrolle) erfolgte die Quantifizierung der PBR-mRNA-Expression in RNA-Präparationen mittels *RT-PCR*. Die *Western-Blot*-Analyse zeigt den SP1-Gehalt mit GAPDH-Beladungskontrolle der kultivierten Astrozyten.

*, signifikant ($P \leq 0,05$) unterschiedlich gegenüber normoosmotischen Kontrollen

#, signifikant ($P \leq 0,05$) unterschiedlich gegenüber mit hypoosmotischem Medium in Abwesenheit von TPEN oder Mitramycin behandelten Astrozyten (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

3.7 Effekte von Ammoniumchlorid, Diazepam und Tumornekrosefaktor α auf die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen in kultivierten Rattenastrozyten

Die Effekte der HE-relevanten Faktoren Ammoniumchlorid (NH_4Cl), Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$) und Diazepam auf die intrazelluläre und nukleäre Konzentration freier Zinkionen wurden mittels des $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -sensitiven Farbstoffes NG und konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie (LSM) untersucht.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 6 h mit NH_4Cl (5 mmol/L), $\text{TNF}\alpha$ (10 ng/ml) oder Diazepam (10 $\mu\text{mol/L}$) inkubiert oder unbehandelt belassen. Anschließend wurden die Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen NG (5 $\mu\text{mol/L}$, 30 min) und Hoechst 34580 (Verdünnung 1 : 10000, 10 min) angefärbt und die Fluoreszenzsignale mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie (LSM) erfasst. Nachfolgend erfolgte eine dreidimensionale Rekonstruktion der LSM-Aufnahmen. Die Kolokalisation der NG- und Hoechts 34580-Fluoreszenzsignale erfolgte zur Visualisierung der Konzentration freier Zinkionen im Kern und wurde in weiß kodiert.

Abb. 20 zeigt, dass eine sechsstündige Behandlung mit NH_4Cl , $\text{TNF}\alpha$ oder Diazepam einen mit NG detektierbaren Anstieg der intrazellulären freien und nukleären Zinkionenkonzentration in kultivierten Rattenastrozyten induziert.

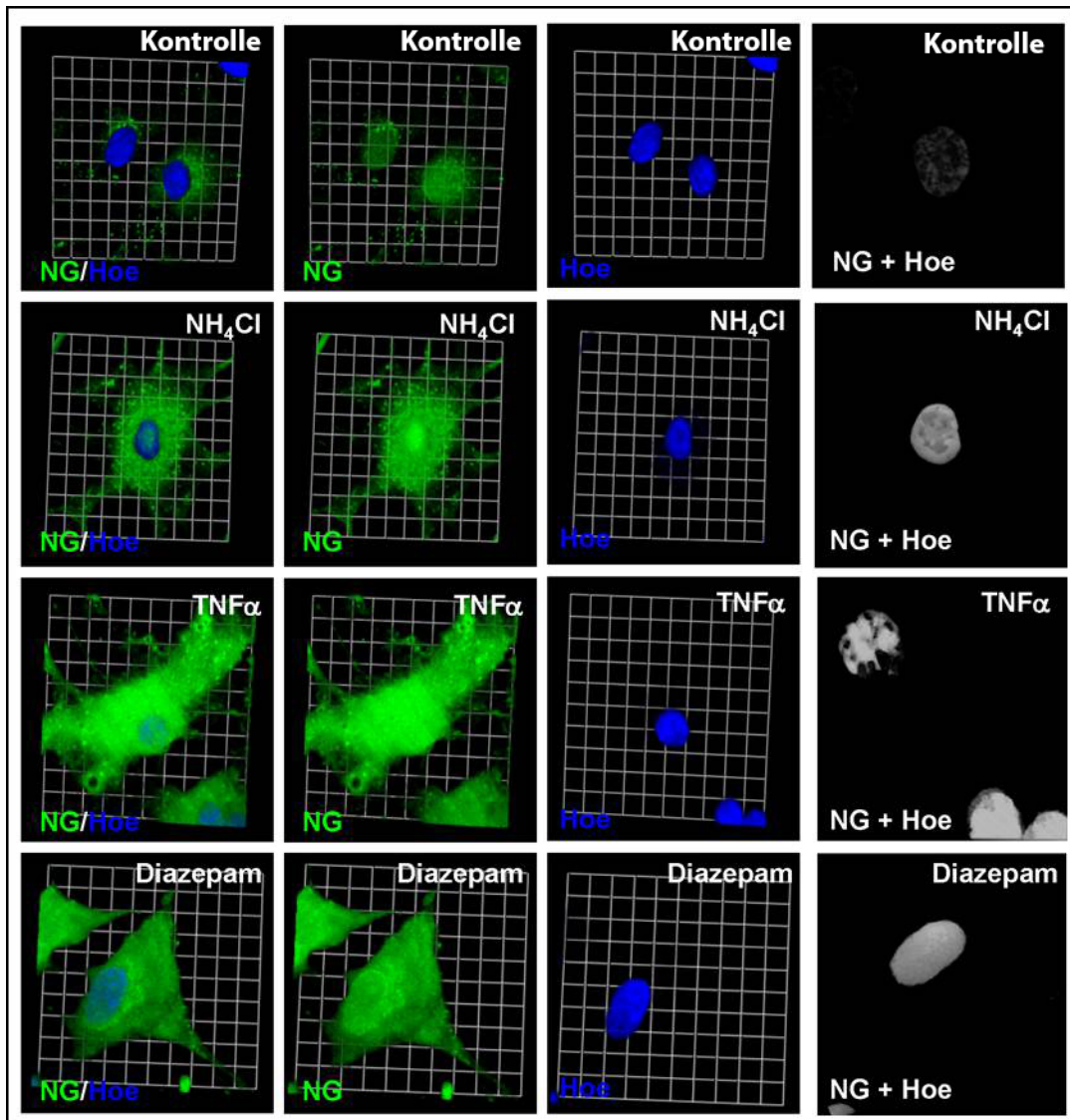


Abb. 20: Visualisierung der Konzentration freier Zinkionen ($[Zn^{2+}]_i$) in mit Ammoniumchlorid, Diazepam oder $TNF\alpha$ behandelten kultivierten Rattenastrozyten. Astrozyten wurden mit NH_4Cl (5 mmol/L), Diazepam (10 mmol/L) oder $TNF\alpha$ (10 ng/ml) für 6 h inkubiert oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Nachfolgend wurden Zellkerne mit Hoechst 34580 (Hoe, Verdünnung 1 : 10000) und freie Zn^{2+} -Ionen mit *Newport-Green* (NG, 5 μ mol/, 30 min) gefärbt und mittels konfokaler *Laserscanning*-Mikroskopie erfasst. Rechte Seite: Extraktion der Kolo-kalisation von NG und Hoechst-Fluoreszenzsignalen und Kodierung in weiß. (Quelle: Kruczek *et al.* 2009, Glia)

4 Diskussion

4.1 Astrozytenschwellung vermittelt eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen – subzellulärer Nachweis mit den Fluoreszenzfarbstoffen *Newport Green*, Zinquin und RhodZn-3-AM

Eine Astrozytenschwellung ist ein frühes Ereignis, das bei unterschiedlichen Hirnfunktionsstörungen auftritt, z.B. infolge eines Schlaganfalls, Traumas, einer Ischämie oder einer Lebererkrankung (Häussinger, 2006; Kimelberg, 2005). Bei diesen neurologischen Störungen kommt es ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Ionenbalance (Kimelberg, 1995). Dieser wird eine große Bedeutung bei den genannten Erkrankungen beigemessen. Daher wurde der Einfluss einer experimentell herbeigeführten Astrozytenschwellung auf die Zn^{2+} -Homöostase mit den selektiven Zn^{2+} -bindenden Fluoreszenzfarbstoffen NG, Zinquin und RhodZn-3-AM untersucht.

Die Spezifität des Nachweises freier Zinkionen mit dem Fluoreszenzfarbstoff NG erfolgte sowohl in Astrozyten als auch in zellfreien Medien. Astrozyten wurden dafür einerseits mit Zn^{2+} -Pyridithion und andererseits mit dem Calciumionophor Ionomycin behandelt und CaCl_2 oder ZnCl_2 hinzu gegeben. Die Ergebnisse zeigen, dass nur ZnCl_2 einen konzentrationsabhängigen, TPEN-sensitiven Anstieg der NG-Fluoreszenz in Astrozyten induziert. Der Zinkchelator TPEN cheliert mit hoher Affinität Zn^{2+} , nicht jedoch Ca^{2+} (Arslan *et al.*, 1985). Ein geringer Anstieg der NG-Fluoreszenz wurde auch unter Behandlung der Astrozyten mit 30 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 ermittelt (siehe Tabelle 2, Kapitel 3.1). Sensi *et al.* zeigten 2002 bereits einen Ca^{2+} -induzierten Anstieg der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass eine Erhöhung der Ca^{2+} -Ionenkonzentration in Astrozyten exponierte NO-Synthase aktiviert und dadurch NO-vermittelt Zn^{2+} freigesetzt wird, wie in dieser Arbeit gezeigt. In Übereinstimmung damit führten ansteigende CaCl_2 -Konzentrationen in zellfreien Medien nicht zu einer verstärkten NG-Fluoreszenz (siehe Tabelle 3, Kapitel 3.1).

Diese Ergebnisse weisen auf einen spezifischen Nachweis von Zn^{2+} mit NG hin und stehen im Einklang mit bereits in früheren Publikationen von Anderen gezeigten Daten (Aizenman *et al.*, 2000; Canzoniero *et al.*, 1999; Dineley *et al.*, 2002).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine einstündige Inkubation von Astrozyten mit hypoosmotischem Medium (205 mosmol/L) zu einem mit NG detektierbaren, signifikanten $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Anstieg gegenüber normoosmotischen Kontrollbedingungen (305 mosmol/L) führt. Abb. 5 in Kapitel 3.2.1 zeigt die signifikant höheren NG-Fluoreszenzen im Kern und im Zytoplasma von dreidimensional rekonstruierten hypoosmotisch behandelten Astrozyten gegenüber normoosmotisch behandelten Astrozyten. Im Einklang mit diesen Ergebnissen hat Kröncke 2007 gezeigt, dass Stress, Inflammation und Schwermetallbelastung zu einer Freisetzung von Zn^{2+} aus den Zn^{2+} -Schwefel-Komplexen von Proteinen und damit zu einem Anstieg von $[\text{Zn}^{2+}]_i$ in unterschiedlichen Zelltypen (Kröncke, 2007) führt. Da Zn^{2+} in den Transkriptionsfaktoren MTF-1 und SP1 Bestandteil von Zinkfingerdomänen ist (Vallee und Falchuk, 1993), welche für die DNA-Bindung verantwortlich sind,

legt der in der vorliegenden Arbeit gezeigte signifikante Anstieg der NG-Fluoreszenz im Kern eine Bedeutung des $[Zn^{2+}]_i$ -Anstieges für Veränderungen in Signaltansduktion und Genexpression nahe, die bei Astrozytenschwellung beobachtet werden. Im Einklang mit den gezeigten Ergebnissen weisen auch die Daten anderer Arbeiten darauf hin, dass die $[Zn^{2+}]_i$ -Homöostase eine wichtige Rolle in der zellulären Signaltransduktion und Genexpression spielt und damit an der Kontrolle von Energiestoffwechsel, Proliferation und Apoptose beteiligt ist (Beyersmann und Haase, 2001; Kröncke 2001b, 2007).

Um die mit dem Fluoreszenzfarbstoff NG detektierte hypoosmotisch induzierte $[Zn^{2+}]_i$ -Erhöhung zu validieren, erfolgten weitere Experimente mit dem zinkbindenden Fluoreszenzfarbstoff Zinquin (Zalewski *et al.*, 1994). Abb. 9 in Kapitel 3.2.5 zeigt, dass auch in mit Zinquin beladenen Astrozyten eine Fluoreszenzzunahme nach Behandlung mit hypoosmotischem Medium (205 mosmol/L) gegenüber normoosmotischen Kontrollbedingungen (305 mosmol/L) zu beobachten ist. Wie erwartet, führt eine Stimulation der Astrozyten mit extrazellulärem Zn^{2+} in Anwesenheit des Zn^{2+} -Ionophors Zn^{2+} -Pyrithion ebenfalls zu einer Zunahme der Zinquinfluoreszenz.

Auch in Mitochondrien konnte eine durch hypoosmotisches Medium induzierbare Erhöhung der Konzentration freier Zn^{2+} -Ionen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes RhodZin-3-AM beobachtet werden. RhodZin-3-AM ist ein Fluorophor, welcher in Mitochondrien akkumuliert (Sensi *et al.*, 2003). Um die mitochondriale Lokalisation der mit RhodZin-3-AM beobachteten Zn^{2+} -Veränderungen zu verifizieren, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Mitochondrienfarbstoff *MitoTracker Green* beladen.

Die in Kapitel 3.2.6 gezeigten Experimente belegen, dass durch hypoosmotisches Medium ein signifikanter, mit dem Zinkchelator TPEN hemmbarer Fluoreszenzanstieg von RhodZin-3-AM gegenüber mit normoosmotischem Medium behandelten Kontrollen beobachtet wird (Abb. 10). Damit konnte, neben der bereits erwähnten durch hypoosmotisches Medium induzierten $[Zn^{2+}]_i$ -Erhöhungen im Zytoplasma und im Kern, auch eine Zunahme der freien mitochondrialen Zn^{2+} -Ionenkonzentration belegt werden.

Da Mitochondrien eine große Bedeutung für den Energiestoffwechsel von Zellen haben, legen die Ergebnisse eine Beteiligung der Zinkhomöostase an dem veränderten Energiestoffwechsel von Astrozyten bei der Astrozytenschwellung nahe.

Ende der 80er Jahre wurde der PBR erstmalig als ein möglicher für die Pathogenese der HE relevanter Faktor diskutiert (Ducis *et al.* 1989). Der PBR kommt hauptsächlich an der Außenseite von Mitochondrienmembranen und im ZNS in Gliazellen vor (Anholt *et al.*, 1986; Itzhak *et al.*, 1993) und ist u. a. für die Neurosteroidbiosynthese (Papadopoulos *et al.*, 1992, 1993) verantwortlich. 1990 fanden Lavoie *et al.* in Hirnschnitten von Leberzirrhosepatienten, die im Leberkoma gestorben waren, eine erhöhte Expression des peripheren Benzodiazepinrezeptors. Nachfolgende Studien zeigten, dass Ammoniak einen Anstieg der PBR-Expression und eine gesteigerte Neurosteroidsynthese induziert (Giguere *et al.*, 1992), welche eine Steigerung des GABAergen Tonus verursachen könnte. Ein erhöhter GABAerger Tonus kann mit einer bei HE auftretenden Neurodepression einhergehen. Welche Bedeutung der hier gezeigte Anstieg der freien Zinkionenkonzentration in Mitochondrien für die

Regulation des PBRs und der Neurosteroidsynthese bei der Astrozytenschwellung hat, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

4.2 Kinetik der durch hypoosmotisches Medium vermittelten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen in Astrozyten

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine durch hypoosmotisches Medium induzierte Astrozytenschwellung bereits nach 15 Minuten einen durch NG nachweisbaren $[Zn^{2+}]_i$ -Anstieg induziert, welcher bis zu sechs Stunden signifikant erhöht gegenüber dem mit normoosmotischem Medium behandelten Kontrollen blieb.

Die Ergebnisse zeigen, dass die durch hypoosmotisches Medium induzierte $[Zn^{2+}]_i$ -Erhöhung reversibel ist, da die Reinstitution von Normoosmolarität die Erhöhung von $[Zn^{2+}]_i$ auf unter das Basalniveau absenkte.

Da die durch hypoosmotisches Medium induzierte Bildung von oxidativem Stress ebenfalls reversibel ist, und oxidativ/nitrosativer Stress die Freisetzung von Zinkionen vermitteln kann, ist es denkbar, dass nachfolgend freie Zinkionen durch Metallothioneine komplexiert werden.

Experimente mit variierenden Osmolaritäten zeigen darüber hinaus, dass bereits eine Verringerung der extrazellulären Osmolarität um 33 mosmol/L (von 305 mosmol/L auf 272 mosmol/L) einen signifikanten Anstieg der mit NG fluorimerisch detektierbaren intrazellulären Konzentration freier Zn^{2+} -Ionen in Astrozyten bewirkt (Kapitel 3.2.4, Abb. 8). Weiter absteigende Osmolaritäten steigerten die NG-Fluoreszenz osmolaritätsabhängig bis hin zu 205 mosmol/L. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Ausmaß der $[Zn^{2+}]_i$ -Freisetzung unter durch hypoosmotisches Medium induzierter Astrozytenschwellung osmolaritätsabhängig ist.

Da bereits eine geringgradige Abnahme der Osmolarität und somit eine geringgradige Schwellung eine signifikante $[Zn^{2+}]_i$ -Freisetzung induziert, sprechen diese Experimente für die *in vivo* Relevanz der durch eine Zellschwellung induzierbaren Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen.

4.3 Charakterisierung zugrunde liegender molekularer Mechanismen

4.3.1 Bedeutung von Kalzium für die durch hypoosmotisches Medium vermittelte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine signifikante, durch $CaCl_2$ -induzierbare Zunahme der NG-Fluoreszenz und damit eine $[Zn^{2+}]_i$ -Erhöhung in Astrozyten gegenüber Kontrollbedingungen (Tabelle, Kapitel 3.1). Die $CaCl_2$ -abhängige $[Zn^{2+}]_i$ -Erhöhung in Astrozyten ließ sich durch den Zn^{2+} -Chelator TPEN hemmen. *In Vitro* in zellfreien Medien blieb eine Zunahme der NG-Fluoreszenz aus. Weitere Untersuchungen zum Einfluss von Ca^{2+} auf die $[Zn^{2+}]_i$ -Homöostase von Astrozyten zeigen, dass das Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin

in Astrozyten die intrazelluläre Konzentration freier Zn^{2+} -Ionen gegenüber Kontrollbedingungen steigert, und dass dies durch den Zn^{2+} -Chelator TPEN hemmbar ist (Kapitel 3.4.5, Abb. 16).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung der Ca^{2+} -Ionenkonzentration einen $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Anstieg in kultivierten Rattenastrozyten vermittelt.

In Übereinstimmung damit zeigt die vorliegende Arbeit, dass BAPTA-AM die Erhöhung der intrazellulären Zn^{2+} -Konzentration nach Behandlung mit hypoosmotischem Medium blockiert (Abb. 3, Kapitel 3.4.5). BAPTA-AM cheliert sowohl Zn^{2+} als auch Ca^{2+} (Benters *et al.*, 1997; Csermely *et al.*, 1989) und puffert effektiv intrazelluläres Ca^{2+} in mit normoosmotischem oder hypoosmotischem Medium behandelten Astrozyten (Fischer *et al.*, 1997).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse auf eine Bedeutung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ für die Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Zn^{2+} durch hypoosmotisch-induzierte Zellschwellung hin.

In Übereinstimmung damit zeigt die Arbeit von Sensi *et al.* (2002), in welcher die Interaktion zwischen Kalziumionen und Zinkionen in kortikalen Neuronen untersucht wurde, dass es in kortikalen Neuronen zu einer kalziumabhängigen Freisetzung zytoplasmatischer gebundener Zinkionen kommt. Kortikale Neurone wurden mit Zink vorbehandelt. Nach Induktion eines Kalziumeinstromes in die Zellen wurde eine kalziumabhängige zytoplasmatische Freisetzung gebundener Zinkionen beobachtet, welche mit *Newport Green* detektiert worden ist. Die Freisetzung erfolgte zum Großteil aus Mitochondrien.

4.3.2 Bedeutung von astroglial-exprimierten NMDA-Rezeptoren für die durch hypoosmotisches Medium vermittelte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

In Zusammenhang mit der Bedeutung von Kalzium wurde die Rolle des NMDA-Rezeptors für die schwellungsvermittelte intrazelluläre Zn^{2+} -Freisetzung in dieser Arbeit untersucht. Hierfür wurden sowohl der nicht-kompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonist MK-801 (Wong *et al.*, 1986) als auch der kompetitive NMDA-Rezeptor-Antagonist AP-5 (Olverman *et al.*, 1984) eingesetzt. Die in Abb. 13 in Kapitel 3.4.1 gezeigten Ergebnisse belegen, dass beide Antagonisten den durch hypoosmotisches Medium induzierten $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Anstieg verhindern können.

In Übereinstimmung mit der durch NMDA-Rezeptoren und durch Ca^{2+} vermittelten Erhöhung von $[\text{Zn}^{2+}]_i$ konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass Hypoosmolarität in Astrozyten NMDA-Rezeptor vermittelt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erhöht und die Bildung von ROS induziert (Schliess *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass dies auf einer schwellungsvermittelten Freisetzung von Glutamat (Kimmelberg, 1995; Kimmelberg *et al.*, 1990) beruht.

4.3.3 Bedeutung der Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies für die durch hypoosmotisches Medium vermittelte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Beteiligung von reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies (RNOS) für die durch hypoosmotisches Medium induzierbare Erhöhung der Konzentration intrazellulärer Zinkionen untersucht.

Es erfolgten Untersuchungen mit dem Antioxidanz und NOS-Inhibitor Epigallocatechingallat (EGCG) (Chan *et al.*, 1997; Saffari und Sadrzadeh, 2004) und dem NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin (Muijsers *et al.*, 2000), welcher die durch hypoosmotisches Medium induzierbare Bildung von ROS in kultivierten Rattenastrozyten verhindert (Reinehr *et al.*, 2007).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass EGCG den durch hypoosmotisches Medium induzierten $[Zn^{2+}]_i$ -Anstieg in Astrozyten hemmt (Kapitel 3.4.1, Abb. 12 und Abb. 13).

Der NADPH-Oxidase-Inhibitor Apocynin konnte den durch hypoosmotisches Medium induzierten $[Zn^{2+}]_i$ -Anstieg jedoch nicht verhindern (Kapitel 3.4.1, Abb. 13).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Bildung von RNOS bei der durch hypoosmotisches Medium induzierten Erhöhung von $[Zn^{2+}]_i$ eine Bedeutung zukommt. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Arbeiten, die zeigen, dass Hypoosmolarität die Bildung von ROS induziert (Reinehr *et al.*, 2007, Schliess *et al.*, 2002, 2004).

Ein Einfluss einer durch hypoosmotisches Medium induzierten O_2^- -Produktion für die Erhöhung von $[Zn^{2+}]_i$ erscheint jedoch unwahrscheinlich.

4.3.4 Bedeutung der Bildung von Stickstoffmonoxid für die durch hypoosmotisches Medium vermittelte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

Die Rolle von NO für die durch hypoosmotisches Medium induzierte Astrozytenschwellung wurde in weiteren Experimenten näher untersucht. Hierfür kam der Farbstoff DAF-FM diacetate zum Einsatz, dessen Fluoreszenz proportional zur Bildung von NO ansteigt (Rodriguez *et al.*, 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Stimulation mit hypoosmotischem Medium innerhalb von fünf Minuten die Bildung von NO in Astrozyten induziert (Kapitel 3.4.3, Abb. 15). Die durch hypoosmotisches Medium gesteigerte DAF-FM-Fluoreszenz konnte durch den NOS-Inhibitor L-NMMA gehemmt werden. Um eine Interferenz von L-NMMA mit der Detektion der DAF-FM-Fluoreszenz auszuschließen, wurden mit L-NMMA behandelte Astrozyten mit dem NO-Donor SNOC versetzt, der einen sehr starken Anstieg der DAF-FM-Fluoreszenz induzierte.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für eine durch hypoosmotisches Medium induzierbare NO-Produktion in Astrozyten. Dieser Befund steht im Einklang mit den bereits in Kapitel 4.3.3 diskutierten Ergebnissen und früheren Arbeiten, in denen ebenfalls die Bildung von RNOS als Antwort auf Hypoosmolarität beobachtet wurde (Reinehr *et al.*, 2007, Schliess *et al.*, 2002, 2004).

Um den Einfluss von NO als wichtiges Molekül in der Pathogenese der HE auf die astrozytäre $[Zn^{2+}]_i$ -Homöostase weiter zu untersuchen, wurden Astrozyten mit dem NO-Donor SNOC behandelt. Die in Abb. 14 in Kapitel 3.4.2 präsentierten Ergebnisse zeigen eine $[Zn^{2+}]_i$ -Erhöhung in Astrozyten nach Zugabe des NO-Donors SNOC. Ähnlich wie nach Behandlung mit hypoosmotischem Medium kommt es auch nach Inkubation mit NO rasch, innerhalb von fünfzehn Minuten, zu einem mit NG messbaren $[Zn^{2+}]_i$ -Anstieg in Astrozyten. Es konnte auch gezeigt werden, dass es nach NO-Behandlung zu einem Anstieg der Fluoreszenz von Zinquin kommt.

Die Ergebnisse weisen auf eine NO-abhängige $[Zn^{2+}]_i$ -Freisetzung in Astrozyten hin und stehen im Einklang mit den Befunden anderer Arbeiten, die in anderen Zelltypen ebenfalls eine NO-abhängige Erhöhung von $[Zn^{2+}]_i$ gezeigt haben (Kröncke 2001, 2003, 2007; Kröncke *et al.* 1994).

Zur Identifizierung von an der durch hypoosmotisches Medium induzierten $[Zn^{2+}]_i$ -Freisetzung in Astrozyten beteiligten NO-Synthasen wurden Experimente mit dem Breitband-NOS-Hemmstoff L-NMMA (Knowles und Moncada, 1994) und dem spezifischen nNOS-Hemmstoff TRIM (Bachetti *et al.*, 2004) durchgeführt.

Die in Abb. 12 in Kapitel 3.4.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass L-NMMA das durch hypoosmotisches Medium in Astrozyten gesteigerte Zinquinsignal blockiert. Abb. 13 in Kapitel 3.4.1 zeigt in Übereinstimmung damit, dass der durch hypoosmotisches Medium induzierbare und mit NG gemessene Anstieg von $[Zn^{2+}]_i$ ebenfalls durch L-NMMA blockiert werden kann.

Diese Ergebnisse zeigen, dass an der durch hypoosmotisches Medium induzierbaren Erhöhung von $[Zn^{2+}]_i$ NO-Synthasen und insbesondere die neuronale Isoform beteiligt sind.

Schliess *et al.* konnten 2004 zeigen, dass L-NMMA in einer Konzentration von 1 mmol/L die schwellungsvermittelte Protein-Tyrosin-Nitrierung (PTN) in kultivierten Rattenastrozyten verhindert (Schliess *et al.*, 2004), was ebenfalls auf eine Aktivierung von NO-Synthasen durch hypoosmotisches Medium hinweist.

Der Einfluss von nNOS auf die schwellungsbedingte astrozytäre $[Zn^{2+}]_i$ -Homöostase wurde mit dem nNOS spezifischen Hemmstoff TRIM (Bachetti *et al.*, 2004) untersucht.

TRIM konnte den durch hypoosmotisches Medium induzierten $[Zn^{2+}]_i$ -Anstieg antagonisieren.

Diese Ergebnisse belegen eine Bedeutung der durch hypoosmotisches Medium aktivierten nNOS und NO-Synthese für die $[Zn^{2+}]_i$ -Freisetzung in Astrozyten. In Übereinstimmung damit zeigen frühere Arbeiten, dass Astrozyten nNOS, nicht jedoch eNOS oder iNOS exprimieren (Görg *et al.*, 2006).

Die Aktivität der nNOS ist Ca^{2+} -abhängig (Knowles und Moncada, 1994).

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob eine experimentell herbeigeführte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$, die eine nNOS-abhängige NO-Synthese vermittelt, den hypoosmotischen $[Zn^{2+}]_i$ -Anstieg imitieren kann. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration wurde dafür in kultivierten Rattenastrozyten mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin erhöht und die intrazelluläre freie Zn^{2+} -Konzentration mittels NG-Fluoreszenz erfasst und mit der unter Kontrollbedingungen Gefundenen verglichen.

Tatsächlich steigert die Behandlung der Astrozyten mit dem Ca^{2+} -Ionophor Ionomycin bereits nach fünf Minuten die Konzentration von $[\text{Zn}^{2+}]_i$. Dieser Effekt ist sowohl mit dem Zn^{2+} -Chelator TPEN als auch durch den nNOS-Inhibitor TRIM signifikant hemmbar (Abb. 16, Kapitel 3.4.5).

Auch in Arbeiten Anderer konnte gezeigt werden, dass nitrosativer, aber auch oxidativer Stress sowie Inflammation und Schwermetallbelastung zu einer $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Erhöhung in unterschiedlichen Zelltypen führen (Kröncke, 2007). Kröncke konnte ebenfalls eine NO-abhängige Zn^{2+} -Freisetzung beobachten und den Einfluss auf Veränderungen in Signaltransduktionsprozessen beschreiben (Kröncke, 2003). Beyersmann und Haase zeigten 2001, dass Veränderungen von $[\text{Zn}^{2+}]_i$ einen wichtigen Beitrag zu NO-abhängigen Signaltransduktionsprozessen leisten. Erhöhte NO-Konzentrationen lösen in Astrozyten weitere Signaltransduktionsprozesse aus, wie die von Schliess *et al.* 2002 und 2004 beschriebene Aktivierung von mitogen-aktivierten Proteinen und induzierte posttranslationale Proteinmodifikation und Oxidation von RNA (Schliess *et al.*, 2002; Görg *et al.* 2008).

4.4 Bedeutung der durch hypoosmotisches Medium induzierten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen für Genexpressionsänderungen

4.4.1 Bedeutung der durch hypoosmotisches Medium induzierten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen für die metalresponsiver Transkriptionsfaktor 1 medierte Gentranskription von Metallothioneinen

Beyersmann und Haase zeigten 2001, dass Veränderungen von $[\text{Zn}^{2+}]_i$ einen wichtigen Beitrag zu NO-abhängigen Signaltransduktionsprozessen leisten. In weiteren Experimenten sollte die Bedeutung der schwellungsbedingten $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Homöostase für die zelluläre Signaltransduktion und Genexpression untersucht werden unter besonderer Berücksichtigung der Zn^{2+} -bindenden Transkriptionsfaktoren MTF-1 und SP1.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Inkubation kultivierter Rattenastrozyten mit hypoosmotischem Medium die Expression von MTF-1 im Kern gegenüber normoosmotischen Kontrollbedingungen steigert, und dass diese mit dem Zn^{2+} -Chelator TPEN hemmbar ist (Kapitel 3.5.1, Abb. 17). Die Experimente lassen vermuten, dass Hypoosmolarität in Astrozyten zinkabhängig eine Akkumulation von MTF-1 im Kern induziert.

MTF-1 ist ein metallresponsiver Transkriptionsfaktor (TF), der sechs Zinkfingerdomänen besitzt (Radtke *et al.*, 1995) und die Expression von Metallothioneinen (MT) reguliert und somit in den zellulären Schwermetallstoffwechsel involviert ist.

In nachfolgenden Experimenten wurde daher der Einfluss des schwellungsbedingten $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Anstiegs auf die durch MTF-1 vermittelte Genexpression untersucht.

Die in Kapitel 3.6.1 Abb. 19 A präsentierten Ergebnisse zeigen, dass zeitabhängig bereits nach einer Stunde durch hypoosmotisches Medium ein signifikanter Anstieg der MT-1/2-mRNA-Expression in Astrozyten induziert wird,

welcher mit dem Zinkchelator TPEN gehemmt werden kann. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen damit, dass hypoosmotische Stimulation in kultivierten Rattenastrozyten nicht nur eine Zn^{2+} -abhängige Akkumulation von MTF-1 im Kern bewirkt, sondern auch eine Zn^{2+} -abhängige Expressionssteigerung der durch MTF-1 regulierten MT-1/2-mRNA vermittelt.

Im Einklang mit diesen Daten konnten Andere zeigen, dass MTF-1 über ein spezifisches Zinkfingermotiv verfügt, welches $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Erhöhungen wahrnimmt und dadurch eine Translokation von MTF-1 in den Kern induziert wird, was eine Transkriptionsaktivierung und Expressionssteigerung von MT 1 und MT 2 bewirkt (Laity und Andrews, 2007).

Die $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Homöostase spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Regulation des Energiestoffwechsels, der Proliferation und der Apoptose (Beyersmann und Haase, 2001; Kröncke 2001b, 2007). Ob die beobachtete Erhöhung von $[\text{Zn}^{2+}]_i$ in Zusammenhang steht mit durch hypoosmotisch-vermittelten Änderungen des astroglialen Metabolismus, wie z.B. der Glycogensynthese, ist derzeit unbekannt. Freie Zinkionen können toxisch für Zellen sein. Daher ist die Expressionssteigerung von MT 1/2 als eine protektive Antwort interpretierbar.

Um eine potentielle Toxizität von durch Hypoosmolarität freigesetzten Zinkionen auf Astrozyten zu untersuchen, wurde der Farbstoff Propidium Iodid (PI) eingesetzt, welcher die Kerne von toten Zellen anfärbt. Die in Kapitel 3.3 beschriebenen Untersuchungen haben gezeigt, dass eine hypoosmotische Stimulation kultivierter Rattenastrozyten bis zu 24 h ohne Effekt auf die Astrozytenvitalität bleibt (Abb. 11). In Übereinstimmung damit blieb eine Anfärbung der Kerne mit PI unter hypoosmotischen Bedingungen aus. Die Behandlung der Zellen mit einer toxischen Konzentration von H_2O_2 (1 mmol/L) für 1 h steigerte hingegen die PI-Fluoreszenz deutlich. Auch eine Inkubation der Astrozyten mit dem Zinkchelator TPEN steigerte nach 9 h und 24 h die PI-Fluoreszenz.

Die Befunde legen nahe, dass eine Zn^{2+} -Depletion für Astrozyten toxisch ist. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass eine durch hypoosmotisches Medium induzierte Erhöhung von $[\text{Zn}^{2+}]_i$ *per se* nicht toxisch ist. Dies könnte auf einer gesteigerten Expression von MT 1/2 beruhen.

Eine langanhaltende hypoosmotische Behandlung von Astrozyten bis zu 24 Stunden führt trotz einer Erhöhung des mitochondrialen Zn^{2+} (Kapitel 3.2.6, Abb. 10) nicht zu einer Beeinträchtigung der Vitalität kultivierter Astrozyten (Kapitel 3.3, Abb. 11), während ein mitochondrialer $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Anstieg in Neuronen apoptotische Signalkaskaden aktiviert (Sensi *et al.*, 1999, 2002). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Zn^{2+} in hohen Konzentrationen toxisch auf Neurone wirkt und zu neuronaler Apoptose und Zelltod führt (Kim *et al.*, 1999; Lobner *et al.*, 2000).

Es wird angenommen, dass sich Neurone und Astrozyten hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber der toxischen Wirkung von Zn^{2+} unterscheiden. Dineley *et al.* konnten 2000 zeigen, dass Astrozyten weniger empfindlich auf die Toxizität eines $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -Anstiegs reagieren als Neurone. Die Gründe hierfür sind derzeit noch weitgehend ungeklärt, aber die hohe antioxidative Kapazität von Astrozyten (Knorpp *et al.*, 2006) könnte einen Einfluss auf die geringere toxische Wirkung von Zn^{2+} auf Astrozyten gegenüber Neuronen haben.

Mit Verweis auf Kapitel 4.2.1 weisen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass es sich bei der hypoosmotisch induzierten $[\text{Zn}^{2+}]_i$ -

Freisetzung in Astrozyten um einen reversiblen Prozess handelt (Kapitel 3.2.2, Abb. 7). Dies könnte mit der bereits erwähnten unter hypoosmotischer Stimulation beobachteten zinkabhängigen Induktion von MT zusammenhängen, welches in der Lage ist, erhöhte intrazelluläre Zn^{2+} -Konzentrationen ab zu puffern. In diesem Zusammenhang ist beschrieben, dass eine Zinkanreicherung im Gewebe ebenfalls mit einer *de novo* MT-Synthese korreliert (Richards und Cousins, 1975; McCormick *et al.*, 1981). MT verhindert so die Bildung von oxidativem Stress (Schwarz *et al.*, 1995) und damit Metalltoxizität (Aschner, 1996). Eine gesteigerte MT-Expression wird auch durch Inflammation und Zytokine vermittelt (De *et al.*, 1990). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Zn^{2+} -vermittelte Induktion von MT die MeHg-induzierte Astrozytenschwellung verhindert (Aschner *et al.*, 1998).

Metallothioneine sind ebenfalls in Gehirnen von Patienten mit Leberzirrhose und HE hochreguliert (Görg *et al.*, 2013), was die pathogenetische Relevanz von Zn^{2+} für die HE stützt.

Zusammenfassend könnte die schwellungsbedingte Zunahme der astrozytären MT-mRNA-Expression durch HE-präzipitierende Faktoren dem sich selbst verstärkenden Kreislauf zwischen Astrozytenschwellung und ROS/RNOS-Produktion schützend entgegenwirken. Der schwellungsbedingte Anstieg der astrozytären MT-mRNA-Expression könnte eine Bedeutung für die potentielle Reversibilität der HE haben.

4.4.2 Bedeutung einer durch hypoosmotisches Medium induzierten Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen für die Spezifitätsprotein 1 medierte Gentranskription des peripheren Benzodiazepinrezeptors

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der durch hypoosmotisches Medium induzierten $[\text{Zn}^{2+}]$ -Freisetzung in Astrozyten auf die Expression des Zinkfingertranskriptionsfaktors SP1 im Kern und dessen Bedeutung für die Expression der PBR-mRNA untersucht.

Die in Abb. 18 in Kapitel 3.5.2 dargestellten Ergebnisse zeigen bereits eine Stunde nach Inkubation mit hypoosmotischem Medium einen signifikanten Anstieg der SP1-Konzentration im Zellkern verglichen mit normoosmotischen Kontrollen. Diese nukleäre Akkumulation von SP1 konnte vollständig durch gleichzeitige Chelierung freier Zinkionen mittels TPEN signifikant gehemmt werden.

In weiteren Experimenten wurde mit dem selektiven cPKC-Inhibitor Gö6850 untersucht, welchen Einfluss die PKC auf die Zn^{2+} -abhängige SP1-Aktivierung hat. Gö6850 hemmt die PKC-Isoformen: PKC α , PKC β I, PKC β II, γ und δ (Martiny-Baron *et al.*, 1993). Die cPKC-Isoformen werden durch die *second messenger* Ca^{2+} und Diacylglycerin aktiviert. Die in Kapitel 3.5.2 in Abb. 18 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass Gö6850 die nukleäre Akkumulation von SP1 ähnlich wie TPEN hemmt, was vermuten lässt, dass der Zn^{2+} -abhängige Schritt, der die nukleäre Akkumulation von SP1 im Kern vermittelt, PKC-abhängig ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind im Einklang mit den Erkenntnissen früherer Studien, die zeigen, dass die Zinkfingerdomänen von SP1 eine andere

Affinität zu Zn^{2+} aufweisen als die Zinfingerdomäne I von MTF-1 (Bittel *et al.*, 2000). Unter den Bedingungen der beschriebenen Experimente ist es daher denkbar, dass SP1 nicht von einer Zinkfreisetzung selbst betroffen ist, so dass die Zinkfingerdomänen an die DNA binden können. Csermely *et al.* zeigten 1988, dass ein $[\text{Zn}^{2+}]$ -Anstieg tatsächlich die PKC aktivieren kann. You *et al.* beschrieben 2007 einen Zusammenhang zwischen der PKC und einer Aktivierung von SP1.

Es ist bekannt, dass SP1 an der Regulation der PBR-Transkription beteiligt ist (Giatzakis und Papadopoulos, 2004). Dem PBR wurde eine bedeutsame Rolle in der Pathogenese der HE zugeschrieben (Butterworth, 2000, 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Hypoosmolarität innerhalb von vier Stunden einen signifikanten Anstieg der PBR-mRNA-Expression gegenüber mit normoosmotischem Medium behandelten Kontrollen induziert (Kapitel 3.6, Abb. 19.B). Für eine Zn^{2+} -Abhängigkeit der gesteigerten PBR-mRNA-Expression durch hypoosmotisches Medium spricht deren Hemmbarkeit durch den Zn^{2+} -Chelator TPEN. Inwieweit die Regulation der PBR-mRNA-Expression unter Hypoosmolarität durch SP1 bewirkt wird, wurde mit dem SP1-Inhibitor Mitramycin (Huang *et al.*, 2008) und durch *Knockdown* von SP1 untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Mitramycin die PBR-mRNA-Expressionssteigerung nach Inkubation der Astrozyten mit hypoosmotischem Medium komplett inhibiert. Ein SP1-*Knockdown* führt ebenfalls zu einer Verminderung der durch hypoosmotisches Medium induzierten Steigerung der PBR-mRNA-Expression (Kapitel 3.6, Abb. 19.B).

Die Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von SP1 bei der durch hypoosmotisches Medium gesteigerten PBR-mRNA-Expression.

Giatzakis und Papadopoulos beschrieben bereits 2004, dass SP1 an der Regulation der PBR-Transkription beteiligt ist. Frühere Untersuchungen haben eine in mit hypoosmotischem Medium behandelten Astrozyten induzierte Erhöhung der PBR-Liganden-Bindungsstellen gezeigt (Itzhak und Norenberg, 1994, Itzhak *et al.*, 1994). Weiterhin wurde sowohl in Tiermodellen zur hepatischen Enzephalopathie (Giguere *et al.*, 1992) als auch in *post mortem* Hirnbiopsien von verstorbenen Leberzirrhosepatienten mit HE eine erhöhte Anzahl von PBR-Liganden-Bindungsstellen nachgewiesen (Lavoie *et al.*, 1990).

4.5 HE-relevante Faktoren vermitteln wie eine experimentell herbeigeführte Astrozytenschwellung eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Zinkionen

Die HE wird von einem heterogenen Spektrum an Faktoren, wie Ammoniak, proinflammatorischen Zytokinen und Benzodiazepinen, ausgelöst (Häussinger, 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine durch hypoosmotisches Medium induzierte Zellschwellung, aber auch die HE-relevanten Faktoren Ammoniumchlorid, $\text{TNF}\alpha$ - und Diazepam die Konzentration freier Zinkionen in Astrozyten *in vitro* steigern (Kapitel 3.7, Abb. 20).

Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigen Arbeiten Anderer, dass Ammoniak, $\text{TNF}\alpha$ und Benzodiazepine eine Astrozytenschwellung hervorrufen (Bender *et al.*, 1992; Lachmann *et al.*, 2013; Norenberg *et al.*, 2007).

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass unterschiedliche HE-relevante Faktoren nicht nur auf der Ebene der Astrozytenschwellung und der Bildung von RNOS konvergieren (Häussinger, 2006; Häussinger *et al.*, 1994; Reinehr *et al.*, 2007; Schliess *et al.*, 2002, 2004, 2006), sondern auch die Freisetzung von Zinkionen in Astrozyten vermitteln, und dies eine gemeinsame Endstrecke in der pathogenetischen Wirkung darstellt.

4.6 Schlussfolgerung und Perspektive - Pathophysiologische Relevanz der durch Astrozytenschwellung vermittelten Freisetzung von proteingebundenem Zink für die HE

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer experimentell ausgelösten Astrozytenschwellung auf die intrazelluläre Konzentration freier Zinkionen in kultivierten Rattenastrozyten zu untersuchen und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen und daraus resultierende funktional bedeutsame Konsequenzen zu charakterisieren.

HE-Patienten weisen verminderte Zn^{2+} -Serum-Konzentrationen auf (Marchesini *et al.*, 1996), und Zinkmangel ist mit einer Störung der mentalen Leistungsfähigkeit assoziiert (Li *et al.*, 2001). Bisher wurde nicht untersucht, welchen Einfluss HE-relevante Faktoren auf die intrazerebrale und intrazelluläre Zinkhomöostase haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Zellschwellung ausreichend ist für eine Freisetzung von proteingebundenem Zink in Astrozyten *in vitro*. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine Ca^{2+} -abhängige nNOS-vermittelte NO-Synthese an der schwellungsbedingten astrozytären $[\text{Zn}^{2+}]$ -Freisetzung beteiligt ist.

Es konnte gezeigt werden, dass hypoosmotische Stimulation in kultivierten Rattenastrozyten nicht nur eine Zn^{2+} -abhängige Akkumulation von MTF-1 im Kern bewirkt, sondern auch einen Zn^{2+} -abhängigen Anstieg der MT-1/2-mRNA-Expression nach sich zieht.

Die Experimente der vorliegenden Arbeit legen weiterhin den bedeutenden Einfluss einer PKC-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors SP1 auf die gesteigerte PBR-mRNA-Expression als Antwort auf Astrozytenschwellung nahe.

Es konnte neben einer Freisetzung von proteingebundenem Zink in Astrozyten durch Schwellung/Hypoosmolarität auch eine Freisetzung von proteingebundenem Zink durch weitere HE-relevante Faktoren, wie Ammoniak, $\text{TNF}\alpha$ und Diazepam, gezeigt werden. Diese Befunde identifizieren Zinkfreisetzung als ein wichtiges Element in der durch HE-relevante Faktoren induzierten Dysfunktion von Astrozyten.

Der schwellungsbedingte $[\text{Zn}^{2+}]$ -Anstieg in Astrozyten ist mit einer gesteigerten Expression des PBR assoziiert, und diesem wird eine pathogenetische Bedeutung bei der HE beigemessen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen eine Relevanz der astrozytären Zinkhomöostase für die Pathogenese der HE insbesondere deshalb nahe, da eine 2013 erschienene Arbeit eine gesteigerte Expression von MT-Isoformen in Gehirnen von Leberzirrhosepatienten mit HE, aber nicht ohne HE zeigen konnte (Görg *et al.*, 2013).

Weitere *post mortem* Untersuchungen müssen die Relevanz von intrazellulärem Zink für die Pathogenese der HE weiterführend charakterisieren. Welche Bedeutung ein $[Zn^{2+}]_i$ -Anstieg in Astrozyten durch HE-relevante Faktoren wie Ammoniumchlorid, $TNF\alpha$ und Diazepam für die Astrozytenschwellung hat, bleibt ebenfalls derzeitig unklar. Auch eine mögliche Beteiligung des astrozytären $[Zn^{2+}]_i$ -Anstiegs an der durch Hypoosmolarität induzierbaren Protein-Tyrosin-Nitrierung und RNA-Oxidation (Görg *et al.*, 2003, 2006, 2008; Kosenko *et al.*, 2004; Schliess *et al.*, 2002, 2004; Vaquero *et al.*, 2003) ist denkbar.

5 Literaturverzeichnis

- Aizenman E, Stout AK, Hartnett KA, Dineley KA, McLaughlin B, Reynolds IJ. 2000.** Induction of neuronal apoptosis by thiol oxidation: Putative role of intracellular zinc release. *J Neurochem* 75:1878-1888
- Als-Nielsen B, Gluud LL, Gluud C. 2004.** Non-absorbable disaccharides for hepatic encephalopathy: systemic review of randomized trials. *BMJ* 328:1046
- Alturi DK, Aggeri M, Mullen KD. 2010.** Reversibility of hepatic encephalopathy after liver transplantation. *Metab Brain Dis* 25:111-113
- Amodio P, Ridola L, Schiff S, Montagnese S, Pasquale C, Nardelli S, Pentassuglio I, Trezza M, Marzano C, Flaiban C, Angeli P, Cona G, Bisiacchi P, Gatta A, Riggio O. 2010.** Improving the inhibitory control task to detect minimal hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 139: 510-518
- Anderson CM, Swanson RA. 2000.** Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation and physiological function. *Glia* 32:1-14
- Anderson EJ, McFarland D, Kimelberg HK. 1992.** Serotonin uptake by astrocytes in situ. *Glia* 6:154-158
- Anholt RR, Pedersen PL, De Souza EB, Snyder SH. 1986.** The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem* 261:576-583
- Arslan P, Di VF, Beltrame M, Tsien RY, Pozzan T. 1985.** Cytosolic Ca^{2+} homeostasis in Ehrlich and Yoshida carcinomas. A new, membrane-permeant chelator of heavy metals reveals that these ascites tumor cell lines have normal cytosolic free Ca^{2+} . *J Biol Chem* 260:2719-2727
- Aschner M. 1996.** The functional significance of brain metallothioneins. *FASEB J* 10:1129-1136
- Aschner M, Conklin DR, Yao CP, Allen JW, Tan KH. 1998.** Induction of astrocyte metallothioneins (MTs) by zinc confers resistance against the acute cytotoxic effects of methylmercury on cell swelling, Na^+ uptake and K^+ release. *Brain Res* 813:254-261
- Atterbury CE, Maddrey WC, Conn HO. 1978.** Neomycin-sorbitol and lactulose in the treatment of acute portal-systemic encephalopathy: a controlled, double-blind clinical trial. *Am J Dig Dis* 23:389-406
- Bachetti T, Comini L, Curello S, Bastianon D, Palmieri M, Bresciani G, Callea F, Ferrari R. 2004.** Co-expression and modulation of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 37:939-945
- Bajaj JS, Schubert CM, Heuman DM, Wade JB, Gibson DP, Topaz A, Saeian K, Hafeezullah M, Bell DE, Sterling RK, Stravitz RT, Luketic V, White MB, Sanyal AJ. 2010.** Persistence of cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 138:2332-2340

Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, Sigal S, Sheikh MY, Beavers K, Frederick T, Teperman L, Hillebrand D, Huang S, Merchant K, Shaw A, Bortey E, Forbes WP. 2010. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Eng J Med* 362:1071-1081

Bender AS, Rivera IV, Norenberg MD. 1992. Tumor necrosis factor alpha induces astrocyte swelling. *Trans Am Soc Neurochem* 23:113

Benters J, Flögel U, Schäfer T, Leibfritz D, Hechtenberg S, Beyersmann D. 1997. Study of the interactions of cadmium and zinc ions with cellular calcium homeostasis using ¹⁹F-NMR spectroscopy. *Biochem J* 322:793-799

Beyersmann D, Haase H. 2001. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* 14:331-341

Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, Seifert G, Steinhäuser C, Pilati E, Volterra A. 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 7:613-620

Bittel DC, Smirnova IV, Andrews GK. 2000. Functional heterogeneity in the zinc fingers of metalloreulatory protein metal response element-binding transcription factor-1. *J Biol Chem* 275:37194-37201

Bodega G, Suarez I, Lopez-Fernandez LA, Almonacid L, Zaballos A, Fernandez B. 2006. Possible implication of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and beta-synuclein in the ammonia effect on cultured rat astroglial cells: A study using DNA and protein microarrays. *Neurochem Int* 48:729-738

Booher J, Sensenbrenner M. 1972. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 2:97-105

Bresci G, Parisi G, Banti S. 1993. Management of hepatic encephalopathy with oral zinc supplementation: a long term treatment. *Eur J Med* 2:414-416

Bröer S, Rahman B, Pellegrini G, Pellerin L, Martin JL, Verleysdonk S, Hamprecht B, Magistretti PJ. 1997. Comparison of lactate transport in astroglial cells and monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. Expression of two different monocarboxylate transporters in astroglial cells and neurons. *J Biol Chem* 272:30096-30102

Butterworth RF. 2000. The astrocytic («peripheral-type») benzodiazepine receptor: role in the pathogenesis of portal-systemic encephalopathy. *Neurochem Int* 36:411-416

Butterworth RF. 2003. Molecular neurobiology of acute liver failure. *Semin Liver Dis* 23:251-258

Butterworth RF, Giguere JF. 1986. Cerebral aminoacids in portal-systemic encephalopathy: lack of evidence for altered gamma-aminobutyric acid (GABA) function. *Metab Brain Dis* 1:221-228

Butterworth RF, Lavoie J, Giguere JF, Layrangués GP, Bergeron M. 1987. Cerebral GABA-ergic and glutamatergic function in hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol* 6:131-144

- Butz M, Timmermann L, Braun M, Groiss SJ, Wojtecki L, Ostrowski S, Krause H, Pollok B, Gross J, Südmeyer M, Kircheis G, Häussinger D, Schnitzler A. 2010.** Motor impairment in liver cirrhosis without and with minimal hepatic encephalopathy. *Acta Neurol Scand* 122:27-35
- Caccamo D, Campisi A, Curro M, Bramanti V, Tringali M, Li Volti G, Vanella A, Ientile R. 2005.** Antioxidant treatment inhibited glutamate-evoked NF-kappaB activation in primary astroglial cell cultures. *Neurotoxicology* 26:915-921
- Canzoniero LM, Turetsky DM, Choi DW. 1999.** Measurement of intracellular free zinc concentrations accompanying zinc-induced neuronal death. *J Neurosci* 19:RC31
- Chan H, Butterworth RF. 2005.** Alterations in glutamate trafficking and signal transduction pathways in hyperammonemia. In: Zempleni J, Dakshinamurti K. *Nutrients and Cell Signaling: Oxidative Stress and Disease*. CRC Press 381-409
- Chan H, Hazell AS, Desjardins P, Butterworth RF. 2000.** Effects of ammonia on glutamate transporter (GLAST) protein and mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neurochem Int* 37:243-248
- Chan MM, Fong D, Ho CT, Huang HI. 1997.** Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product of green tea. *Biochem Pharmacol* 54:1281-1286
- Chen HJ, Zhu XQ, Shu H, Yang M, Zhang Y, Ding J, Wang Y, Teng GJ. 2012.** Structural and functional cerebral impairments in cirrhotic patients with a history of overt hepatic encephalopathy. *Eur J Radiol* 81:2463-2469
- Choi DW, Koh JY. 1998.** Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci* 21:347-375
- Coles J, Deitmer J. 2005.** Extracellular potassium and pH: homeostasis and signaling. In: Kettenmann H, Ransom B. *Neuroglia*. Oxford. Oxford University Press 334-345
- Conn HO. 1993.** Quantifying the severity of hepatic encephalopathy. In: Conn HO, Bircher J, Hrsg. *Hepatic Encephalopathy: Syndromes and Therapies*. East Lansing, MI: Medi-Ed Press, 1993:13-26
- Conn HO, Leevy CM, Vlahcevic ZR, Rodgers J, Maddrey WC, Seef L, Levy LL. 1977.** Comparison of lactulose and neomycin in the treatment of chronic portal-systemic encephalopathy. a double blind controlled trial. *Gastroenterology* 72:573-583
- Cope EC, Levenson CW. 2010.** Role of zinc in the development and treatment of mood disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:685-689
- Cordoba J, Lopez-Hellin J, Planas M, Sabin P, Sanpedro F, Castro F, Esteban R, Guardia J. 2004.** Normal protein diet for episodic hepatic encephalopathy: results of a randomized study. *J Hepatol* 41:38-43
- Csermely P, Sandor P, Radics L, Somogyi J. 1989.** Zinc forms complexes with higher kinetical stability than calcium, 5-F-BAPTA as a good example. *Biochem Biophys Res Commun* 165:838-844
- Csermely P, Szamel M, Resch K, Somogyi J. 1988.** Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. *J Biol Chem* 263:6487-6490

- de Knecht RJ, Schalm SW, van der Rijt CC, Fekkes D, Dalm E, Hekking-Weyma I. 1994.** Extracellular brain glutamate during acute liver failure and during acute hyperammonemia simulating acute liver failure: an experimental study based on in vivo brain dialysis. *J Hepatol* 20:19-26
- De SK, McMaster MT, Andrews GK. 1990.** Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. *J Biol Chem* 265:15267-15274
- Dineley KE, Malaiyandi LM, Reynolds IJ. 2002.** A reevaluation of neuronal zinc measurements: artifacts associated with high intracellular dye concentration. *Mol Pharmacol* 62:618-627
- Dineley KE, Scanlon JM, Kress GJ, Stout AK, Reynolds IJ. 2000.** Astrocytes are more resistant than neurons to the cytotoxic effects of increased $[Zn^{2+}]$. *Neurobiol Dis* 7:310-320
- DiPiazza S, Gabriella Filippazzo M, Valenza LM, Morello S, Pastore L, Conti A, Cottone S, Pagliaro L. 1991.** Rifaximin versus neomycin in the treatment of portosystemic encephalopathy. *Ital J Gastroenterol* 23:403-407
- Ducis I, Norenberg LO, Norenberg MD. 1989.** Effect of ammonium chloride on the astrocyte benzodiazepine receptor. *Brain Res* 493:362-365
- Eng LF, Ghirnikar RS. 1994.** GFAP and astrogliosis. *Brain Pathol* 4:229-237
- Fennell DA, Corbo M, Pallaska A, Cotter FE. 2001.** Bcl-2 resistant mitochondrial toxicity mediated by the isoquinoline carboxamide PK11195 involves de novo generation of reactive oxygen species. *Br J Cancer* 84:1397-1404
- Fischer R, Schliess F, Häussinger D. 1997.** Characterization of the hypo-osmolarity-induced Ca^{2+} response in cultured rat astrocytes. *Glia* 20:51-58
- Fonseca LL, Monteiro MA, Alves PM, Carrondo MJ, Santos H. 2005.** Cultures of rat astrocytes challenged with a steady supply of glutamate: new model to study flux distribution in the glutamate-glutamine cycle. *Glia* 51:286-296
- Fraker PJ, King LE, Laakko T, Vollmer TL. 2000.** The dynamic link between the integrity of the immune system and zinc status. *J Nutr* 130:1399-1406
- Frazzini V, Rockabrand E, Mocchegiani E, Sensi SL. 2006.** Oxidative stress and brain aging: Is zinc the link? *Biogerontology* 7:307-314
- Frederick RT. 2012.** Extent of reversibility of hepatic encephalopathy following liver transplantation. *Clin Liver Dis* 16:147-158
- Giatzakis C, Papadopoulos V. 2004.** Differential utilization of the promoter of peripheral-type benzodiazepine receptor by steroidogenic versus non-steroidogenic cell lines and the role of Sp1 and Sp3 in the regulation of basal activity. *Endocrinology* 145:1113-1123
- Giguere JF, Hamel E, Butterworth RF. 1992.** Increased densities of binding sites for the 'peripheral-type' benzodiazepine receptor ligand $[3H]PK 11195$ in rat brain following portacaval anastomosis. *Brain Res* 585:295-298

- Görg B, Bidmon HJ, Häussinger D. 2013.** Gene expression profiling in the cerebral cortex of patients with cirrhosis with and without hepatic encephalopathy. *Hepatology* 57:2436-2447
- Görg B, Bidmon HJ, Keitel V, Foster N, Görlich R, Schliess F, Häussinger D. 2006.** Inflammatory cytokines induce protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Arch Biochem Biophys* 449:104-114
- Görg B, Foster N, Reinehr RM, Bidmon HJ, Höngen A, Häussinger D, Schliess F. 2003.** Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Hepatology* 37:334-342
- Görg B, Karababa A, Shafigullina A, Bidmon HJ, Häussinger D. 2015.** Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Glia* 63:37-50
- Görg B, Morwinsky A, Keitel V, Qvartrkhava N, Schrör K, Häussinger D. 2010.** Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. *Glia* 58:691-705
- Görg B, Qvartrkhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, Häussinger D. 2010.** Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology* 52:256-265
- Görg B, Qvartrkhava N, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, Schliess F, Häussinger D. 2008.** Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* 48:567-579
- Görg B, Qvartrkhava N, Voss P, Grune T, Häussinger D, Schliess F. 2007.** Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration. *FEBS Lett.* 581:84-90
- Groeneweg M, Quero JC, De Bruijn I, Hartmann IJ, Essink-Bot ML, Hop WC, Schalm SW. 1998.** Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* 28:45-49
- Hamberger A, Lindroth P, Nyström B. 1982.** Regulation of glutamate biosynthesis and release in vitro by low levels of ammonium ions. *Brain Res* 237:339-350
- Häussinger D. 2006.** Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 43:1187-1190
- Häussinger D. 2006.** Hepatic Encephalopathy, Praxis (Bern 1994) 95:1543-1549
- Häussinger D, Cordoba J, Kircheis G, Vilstrup H, Fleig W, Jones EA, Schliess F, Blei AT. 2006.** In: Häussinger D, Kircheis G, Schliess F, Editors. *Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism*. Dordrecht: Springer Verlag 423-432
- Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Hennig J. 1994.** Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolality and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 107:1475-1480
- Häussinger D, Sies H. 2013.** Hepatic encephalopathy: clinical aspects and pathogenetic concept. *Arch Biochem Biophys* 536:97-100

- Hazell AS, Butterworth RF. 1999.** Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med* 222:99-112
- Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Minana MD, Felipo V. 1996.** NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity in mice. *Neurochem Res* 21:1237-1244
- Horst D, Grace ND, Conn HO, Schiff E, Schenker S, Viteri A, Law D, Atterbury CE. 1984.** Comparison of dietary protein with an oral, branched chain-enriched amino acid supplement in chronic portal-systemic encephalopathy: a randomized controlled trial. *Hepatology* 4:279-287
- Huang CS, Ho WL, Lee WS, Sheu MT, Wang YJ, Tu SH, Chen RJ, Chu JS, Chen LC, Lee CH, Tseng H, Ho YS, Wu CH. 2008.** SP1-regulated p27/Kip1 gene expression is involved in terbinafine-induced human A431 cancer cell differentiation: An in vitro and in vivo study. *Biochem Pharmacol* 75:1783-1796
- Itzhak Y, Baker L, Norenberg MD. 1993.** Characterization of the peripheral-type benzodiazepine receptor in cultured astrocytes: evidence for multiplicity. *Glia* 9:211-218
- Itzhak Y, Bender AS, Norenberg MD. 1994.** Effect of hypoosmotic stress on peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes. *Brain Res* 644:221-225
- Itzhak Y, Norenberg MD. 1994.** Ammonia-induced upregulation of peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes labeled with [3H]PK 11195. *Neurosci Lett* 177:35-38
- Jayakumar AR, Panickar K, Norenberg MD. 2002.** Effects on free radical generation by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor in cultured neural cells. *J Neurochem* 83:1226-1234
- Jefcoate CR, McNamara BC, Artemenko I, Yamazaki T. 1992.** Regulation of cholesterol movement to mitochondrial cytochrome P450_{ssc} in steroid hormone synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43:751-767
- Kagi JH, Kojima Y. 1987.** Chemistry and biochemistry of metallothionein. *Experientia Suppl* 52:25-61
- Karababa A, Görg B, Schliess F, Häussinger D. 2014.** O-GlcNAcylation as a novel ammonia-induced posttranslational protein modification in cultured rat astrocytes. *Metab Brain Dis.* 29:975-982
- Kim YH, Kim EY, Gwag BJ, Sohn S, Koh JY. 1999.** Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals. *Neuroscience* 89:175-182
- Kimelberg HK. 1995.** Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg* 83:1051-1059
- Kimelberg HK. 2005.** Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia* 50:389-397

Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA. 1990. Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 10:1583-1591

King JC, Shames DM, Woodhouse LR. 2000. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr* 130:1360-1366

Kircheis G, Häussinger D. 2008. Quantifying the severity of hepatic encephalopathy. In: Romero-Gomez M, Editor. *Hepatic Encephalopathy*. Barcelona: Permanyer Press 111-128

Kircheis G, Nilius R, Held C, Berndt H, Buchner M, Görtelmeyer R, Hendricks R, Krüger B, Kuklinski B, Meister H, Otto HJ, Rink C, Rösch W, Stauch S. 1997. Therapeutic efficacy of L-ornithin-L-aspartate infusion concentrate in patients with liver cirrhosis and hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled, double-blind study. *Hepatology* 25:1351-1360

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

Knecht K, Michalak A, Rose C, Rothstein JD, Butterworth RF. 1997. Decreased glutamate transporter (GLT-1) expression in frontal cortex of rats with acute liver failure. *Neurosci Lett* 229:201-203

Knorpp T, Robinson SR, Crack PJ, Dringen R. 2006. Glutathione peroxidase-1 contributes to the protection of glutamine synthetase in astrocytes during oxidative stress. *J Neural Transm* 113:1145-1155

Knowles RG, Moncada S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 298:249-258

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

Kramer L, Tribl B, Gendo A, Zauner C, Schneider B, Ferenci B, Madl C. 2000. Partial pressure of ammonia versus ammonia in hepatic encephalopathy. *Hepatology* 31:30-34

Krezel A, Hao Q, Maret W. 2007. The zinc/thiolate redox biochemistry of metallothionein and the control of zinc ion fluctuations in cell signaling. *Arch Biochem Biophys* 463:188-200

Krezel A, Maret W. 2006. Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological pZn. *J Biol Inorg Chem* 11:1049-1062

Kröncke KD. 1998. Über die Rolle von Stickstoffmonoxid bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes. In: Kröncke KD. Shaker-Verlag

Kröncke KD. 2001a. Cysteine-Zn²⁺ complexes: unique molecular switches for inducible nitric oxide synthase-derived NO. *FASEB J* 15:2503-2507

- Kröncke KD. 2001b.** Zinc finger proteins as molecular targets for nitric oxide-mediated gene regulation. *Antioxid Redox Signal* 3:565-575
- Kröncke KD. 2003.** Nitrosative Stress and Transcription. *Biol Chem* 384:1365-1377
- Kröncke KD. 2007.** Cellular stress and intracellular zinc dyshomeostasis. *Arch Biochem Biophys* 463:183-187
- Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. 1995.** Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376:327-343
- Kröncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD, Kolb-Bachofen V. 1994.** Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun* 200:1105-1110
- Kröncke KD, Klotz LO, Suschek CV, Sies H. 2002.** Comparing nitrosative versus oxidative stress toward zinc finger-dependent transcription. Unique role for NO. *J Biol Chem* 277:13294-13301
- Kröncke KD, Kolb-Bachofen V. 1996.** Detection of nitric oxide interaction with zinc finger proteins. *Methods Enzymol* 269:279-284
- Lachmann V, Görg B, Bidmon HJ, Keitel V, Häussinger D. 2013.** Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an oxidative stress dependent manner. *Arch Biochem Biophys*. 536:143-151
- Laity JH, Andrews GK. 2007.** Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1). *Arch Biochem Biophys* 463:201-210
- Larsen FS, Gottstein J, Blei AT. 2001.** Cerebral hyperemia and nitric oxide synthetase in rats with ammonia-induced brain edema. *J Hepatol* 34:548-554
- Lavoie J, Giguere J-F, Layrargues GP, Butterworth RF. 1987.** Amino acid changes in autopsied brain tissue from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *J Neurochem* 49:692-697
- Lavoie J, Layrargues GP, Butterworth RF. 1990.** Increased densities of peripheral-type benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology* 11:874-878
- Li Y, Hough CJ, Suh SW, Sarvey JM, Frederickson CJ. 2001.** Rapid translocation of Zn²⁺ from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation. *J Neurophysiol* 86:2597-2604
- Lichter-Konecki U, Mangin JM, Gordish-Dressman H, Hoffman EP, Gallo V. 2008.** Gene expression profiling of astrocytes from hyperammonemic mice reveals altered pathways for water and potassium homeostasis in vivo. *Glia* 56:365-377
- Liu S, Kawai K, Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Fabisiak JP, Quinn PJ, Pitt BR, Kagan VE. 2001.** Nitric oxide-dependent pro-oxidant and pro-apoptotic effect of metallothioneins in HL-60 cells challenged with cupric nitrilotriacetate. *Biochem J* 354:397-406

Lobner D, Canzoniero LM, Manzerra P, Gottron F, Ying H, Knudson M, Tian M, Dugan LL, Kerchner GA, Sheline CT, Korsmeyer SJ, Choi DW. 2000. Zinc-induced neuronal death in cortical neurons. *Cell Mol Biol* 46:797-806

Lohrer H, Robson T. 1989. Overexpression of metallothionein in CHO cells and its effect on cell killing by ionizing radiation and alkylating agents. *Carcinogenesis* 10:2279-2284

MacDonald RS. 2000. The role of zinc in growth and cell proliferation. *J Nutr* 130:1500-1508

Marchesini G, Fabbri A, Bianchi G, Brizi M, Zoli M. 1996. Zinc supplementation and amino acid-nitrogen metabolism in patients with advanced cirrhosis. *Hepatology* 23:1084-1092

Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D, Schächtele G. 1993. Selective inhibition of protein kinase C isoenzymes by the indolocarbazole Gö 6976. *J Biol Chem* 268:9194-9197

Mattarozzi K, Cretella L, Guarino M, Stracciari A. 2012. Minimal hepatic encephalopathy: follow-up 10 years after successful liver transplantation. *Transplantation* 93:639-643

Matthiessen HP, Schmalenbach C, Müller HW. 1989. Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin. *Glia* 2:177-188

McCormick CC, Menard MP, Cousins RJ. 1981. Induction of hepatic metallothionein by feeding zinc to rats of depleted zinc status. *Am J Physiol* 240:414-421

Misra RR, Hochadel JF, Smith GT, Cook JC, Waalkes MP, Wink DA. 1996. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chem Res Toxicol* 9:326-332

Moffatt P, Denizeau F. 1997. Metallothionein in physiological and physiopathological processes. *Drug Metab Rev* 29:261-307

Montoliu C, Monfort P, Carrasco J, Palacios O, Capdevila M, Hidalgo J, Felipe V. 2000. Metallothionein-III prevents glutamate and nitric oxide neurotoxicity in primary cultures of cerebellar neurons. *J Neurochem* 75:266-273

Muijsers RB, van Den WE, Folkerts G, Beukelman CJ, Koster AS, Postma DS, Nijkamp FP. 2000. Apocynin inhibits peroxynitrite formation by murine macrophages. *Br J Pharmacol* 130:932-936

Mulligan SJ, MacVicar BA. 2004. Calcium transients in astrocyte endfeet cause cerebrovascular constrictions. *Nature* 431:195-199

Norenberg MD. 1998. Astroglial dysfunction in hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 13:319-335

Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV. 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 19:313-329

Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV, Panickar KS. 2007. New concepts in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis* 22:219-234

Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. 2004. Serum level of tumor necrosis factor-alpha correlate with severity of hepatic encephalopathy due to chronic liver failure. *Liver Int* 24:110-116

Olverman HJ, Jones AW, Watkins JC. 1984. L-glutamate has higher affinity than other amino acids for [3H]-D-AP5 binding sites in rat brain membranes. *Nature* 307:460-462

Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van LF, Arroliga AC, Mullen KD. 2003. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med* 114:188-193

Orkand PM, Bracho H, Orkand RK. 1973. Glial metabolism: alteration by potassium levels comparable to those during neural activity. *Brain Res* 55:467-471

Palmiter RD, Findley SD. 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J* 14:639-649

Papadopoulos V, Guarneri P, Krueger KE, Guidotti A, Costa E. 1992. Pregnenolone biosynthesis in C6-2B glioma cell mitochondria: regulation by a mitochondrial diazepam binding inhibitor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5113-5117

Papadopoulos V. 1993. Peripheral-type benzodiazepine/diazepam binding inhibitor receptor: biological role in steroidogenic cell function. *Endocr Rev* 14:222-240

Parpura V, Scemes E, Spray DC. 2004. Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction 'hemichannels', purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochem Int* 45:259-264

Pearce LL, Gandley RE, Han W, Wasserloos K, Stitt M, Kanai AJ, McLaughlin MK, Pitt BR, Levitan ES. 2000. Role of metallothionein in nitric oxide signaling as revealed by a green fluorescent fusion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:477-482

Pellerin L, Magistretti P. 2005. The central role of astrocytes in neuroenergetics. In: Kettenmann H, Ransom B, editors. *Neuroglia*. Oxford. Oxford University Press 367-376

Pereg D, Kotliroff A, Gadoth N, Hadary R, Iishner M, Kitay-Cohen Y. 2011. Probiotics for patients with compensated liver cirrhosis: a double-blind placebo-controlled study. *Nutrition* 27:177-181

Powell SR. 2000. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr* 130:1447-1454

Radtke F, Georgiev O, Müller HP, Brugnera E, Schaffner W. 1995. Functional domains of the heavy metal responsive transcription regulator MTF-1. *Nucleic Acids Res* 23:2277-2286

Ransom B, Behar T, Nedergaard M. 2003. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci* 26:520-522

Reding P, Duchateau J, Bataille C. 1984. Oral zinc supplementation improves hepatic encephalopathy. Results of a randomised controlled trial. *Lancet* 2:493-495

- Reinehr R, Görg B, Becker S, Quartskhava N, Bidmon HJ, Selbach O, Haas HL, Schliess F, Häussinger D. 2007.** Hypoosmotic swelling and ammonia increase oxidative stress by NADPH oxidase in cultured astrocytes and vital brain slices. *Glia* 55:758-771
- Richards MP, Cousins RJ. 1975.** Mammalian zinc homeostasis: requirement for RNA and metallothionein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 64:1215-1223
- Riek R, Precheur B, Wang Y, Mackay EA, Wilder G, Güntert P, Liu A, Kägi JH, Wüthrich K. 1999.** NMR structure of the sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) metallothionein MTA. *J Mol Biol* 291:417-428
- Riggio O, Merli M, Capocaccia L, Caschera M, Zullo A, Pinto G, Gaudio E, Franchitto A, Spagnoli R, D'Aquilino E. 1992.** Zinc supplementation reduces blood ammonia and increases liver ornithine transcarbamylase activity in experimental cirrhosis. *Hepatology* 16:785-789
- Riggio O, Ridola L, Pasquale C, Nardelli S, Pentassuglio I, Moscucci F, Merli M. 2011.** Evidence of persistent cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 9:181-183
- Rodriguez J, Specian V, Maloney R, Jourde`heuil D, Feelish M. 2005.** Performance of diamino fluorophores for the localization of sources and targets of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 38:356-368
- Romero-Gomez M, Cordoba J, Jover R, del Olmo JA, Ramirez M, Rey R, de Madaria E, Montoliu C, Nunez D, Flavia M, Company L, Rodrigo JM, Felipo V. 2007.** Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology* 45:879-885
- Rose C, Kresse W, Kettenmann H. 2005.** Acute insult of ammonia leads to calcium-dependent glutamate release from cultured astrocytes, an effect of pH. *J Biol Chem* 280:20937-20944.
- Saffari Y, Sadrzadeh SM. 2004.** Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sci* 74:1513-1518
- Schiebler TH, Schmidt W, Zilles K, Arnold G, Beier HM, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann HJ, Kühnel W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E. 1999.** Neuroglia. Astrozyten sind die größten Gliazellen. In: Schiebeler TH, Schmidt W, Zilles K, Hrsg. *Anatomie*. 8te Aufl. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. 91-94
- Schliess F, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D. 2004.** Astrocyte swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia* 47:21-29
- Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D. 2002.** Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J* 16:739-741
- Schliess F, Görg B, Häussinger D. 2006.** Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: The hepatic encephalopathy paradigm. *Biol Chem* 387:1363-1370

- Schliess F, Reinehr R, Häussinger D. 2007.** Osmosensing and signaling in the regulation of mammalian cell function. *FEBS J* 274:5799-5803
- Schliess F, Sinning R, Fischer R, Schmalenbach C, Häussinger D. 1996.** Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 after hypo-osmotic astrocyte swelling. *Biochem J* 320:167-171
- Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JC, Allen WP, Whitmore M, Bergonia HA, Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Lancaster JR Jr. 1995.** Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4452-4456
- Sensi SL, Ton-That D, Weiss JH. 2002.** Mitochondrial sequestration and Ca^{2+} -dependent release of cytosolic Zn^{2+} loads in cortical neurons. *Neurobiol Dis.* 10:100-108
- Sensi SL, Ton-That D, Weiss JH, Rothe A, Gee KR. 2003.** A new mitochondrial fluorescent zinc sensor. *Cell Calcium* 34:281-284
- Sensi SL, Yin HZ, Carriedo SG, Rao SS, Weiss JH. 1999.** Preferential Zn^{2+} influx through Ca^{2+} -permeable AMPA/kainate channels triggers prolonged mitochondrial superoxide production. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:2414-2419
- Sharma BC, Sharma P, Agrawal A, Sarin SK. 2009.** Secondary prophylaxis of hepatic encephalopathy: an open-label randomized controlled trial of lactulose versus placebo. *Gastroenterology* 137:885-891
- Sharma P, Agrawal A, Sharma BC, Sarin SK. 2011.** Prophylaxis of hepatic encephalopathy in acute variceal bleed: a randomized controlled trial of lactulose versus no lactulose. *J Gastroenterol Hepatol* 26:996-1003
- Sharma P, Sharma BC. 2010.** Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Eng J Med* 362:2423-2424
- Simard M, Nedergaard M. 2004.** The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129:877-896
- Simpson ER, Waterman MR. 1983.** Regulation by ACTH of steroid hormone biosynthesis in the adrenal cortex. *Can J Biochem Cell Biol* 61:692-707
- Smart TG, Xie X, Krishek BJ. 1994.** Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog Neurobiol* 42:393-441
- Song G, Dhodda VK, Blei AT, Dempsey RJ, Rao VLR. 2002.** GeneChip analysis shows altered mRNA expression of transcripts of neurotransmitter and signal transduction pathways in the cerebral cortex of portacaval shunted rats. *J Neurosci Res* 68:730-737
- Stauch S, Kircheis G, Adler G, Beckh K, Ditschuneit H, Görtelmeyer R, Hendricks R, Heuser A, Karoff C, Malfertheiner P, Mayer D, Rösch W, Steffens J. 1998.** Oral L-ornithin-L-aspartate therapy of chronic hepatic encephalopathy: results of a placebo-controlled double-blind study. *J Hepatol* 28:856-864

- St Croix CM, Wasserloos KJ, Dineley KE, Reynolds IJ, Levitan ES, Pitt BR. 2002.** Nitric oxide-induced changes in intracellular zinc homeostasis are mediated by metallothionein/thionein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:185-192
- Stitt MS, Wasserloos KJ, Tang X, Liu X, Pitt BR, St Croix CM. 2006.** Nitric oxide-induced nuclear translocation of the metal responsive transcription factor, MTF-1 is mediated by zinc release from metallothionein. *Vascul Pharmacol* 44:149-155
- Strauss E, Tramote R, Silva EP, Caly WR, Honain NZ, Maffei RA, de Sa MF. 1992.** Double-blind randomized clinical trial comparing neomycin and placebo in the treatment of exogenous hepatic encephalopathy. *Hepatogastroenterology* 39:542-545
- Suarez I, Bodega G, Fernandez B. 2000.** Modulation of glutamate transporters (GLAST, GLT-1 and EAAC1) in the rat cerebellum following portocaval anastomosis. *Brain Res* 859:293-302
- Takeda A. 2001.** Zinc homeostasis and functions of zinc in the brain. *Biometals* 14:343-351
- Takeda A, Takefuta S, Okada S, Oku N. 2000.** Relationship between brain zinc and transient learning impairment of adult rats fed zinc-deficient diet. *Brain Res* 859:352-357
- Thiel G, Lietz M. 2004.** Regulator neuronaler Gene: Zinkfingerprotein REST. In: Thiel G, Lietz M, Hrsg. *Biologie in unserer Zeit*. 34te Aufl. Weinheim: Wiley-VCH Verlag. 96-101
- Uribe M, Campollo O, Vargas F, Ravelli GP, Mundo F, Zapata L, Gil S, Garcia-Ramos G. 1987.** Acidifying enemas (lactitol and lactose) versus nonacidifying enemas (tap water) to treat acute portal-systemic encephalopathy: a double-blind randomized clinical trial. *Hepatology* 7:639-643
- Vallee BL, Falchuk KH. 1993.** The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73:79-118
- Vaquero J, Chung C, Cahill ME, Blei AT. 2003.** Pathogenesis of hepatic encephalopathy in acute liver failure. *Semin Liver Dis* 23:259-269
- Vogels BA, Maas MA, Daalhuisen J, Quack G, Chamuleau RA. 1997.** Memantine a non-competitive NMDA-receptor antagonist improves hyperammonemia-induced encephalopathy and acute hepatic encephalopathy in rats. *Hepatology* 25:820-827
- Warskulat U, Görg B, Bidmon HJ, Müller HW, Schliess F, Häussinger D. 2002.** Ammonia-induced heme oxygenase-1 expression in cultured rat astrocytes and rat brain in vivo. *Glia* 40:324-336
- Warskulat U, Kreuels S, Müller HW, Häussinger D. 2001.** Identification of osmosensitive and ammonia-regulated genes in rat astrocytes by Northern blotting and differential display reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Hepatol* 35:358-366
- Wei G, Hough CJ, Li Y, Sarvey JM. 2004.** Characterization of extracellular accumulation of Zn²⁺ during ischemia and reperfusion of hippocampus slices in rat. *Neuroscience* 125:867-877

- Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Rückert N, Hecker H. 2001.** Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 34:768-773
- Wong EH, Kemp JA, Priestley AR, Knight AR, Woodruff GN, Iversen LL. 1986.** The anticonvulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7104-7108
- Xie X, Hider RC, Smart TG. 1994.** Modulation of GABA-mediated synaptic transmission by endogenous zinc in the immature rat hippocampus in vitro. *J Physiol* 478:75-86
- You HL, Eng HL, Hsu SF, Chen CM, Ye TC; Liao WT, Huang MY, Baer R, Cheng JT. 2007.** A PKC-Sp1 signaling pathway induces early differentiation of human keratinocytes through upregulation of TSG101. *Cell Signal* 19:1201-1211
- Zalewski PD, Forbes IJ, Seamark RF, Borlinghaus R, Betts WH, Lincoln SF, Ward AD. 1994.** Flux of intracellular labile zinc during apoptosis (gene-directed cell death) revealed by a specific chemical probe, Zinquin. *Chem Biol* 1:153-161
- Zangger K, Oz G, Haslinger E, Kunert O, Armitage IM. 2001.** Nitric oxide selectively releases metals from the amino-terminal domain of metallothioneins: potential role at inflammatory sites. *FASEB J* 15:1303-1305

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Dieter Häussinger danke ich für die Überlassung des hochinteressanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit der experimentellen Arbeit, die intensive Betreuung und stete Unterstützung während der experimentellen Arbeit sowie die rege Diskussion der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. oec. troph. Boris Görg für die exzellente fachliche Betreuung, stetige Motivation und Unterstützung hinsichtlich der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Freimut Schliess danke ich für die wertvolle fachliche Betreuung und Unterstützung.

Torsten Janssen danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und für die ausgezeichnete und kompetente technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente.

Bei dem gesamten Laborteam der experimentellen Hepatologie bedanke ich mich für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Prof. Dr. med. Verena Keitel für die freundliche Durchführung der *Realtime* PCR-Analysen.

Frau Brigida Ziegler danke ich herzlich für die Präparation der primären Astrozytenkulturen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Klaus-Dietrich Kröncke und Herrn Dr. med. Elvis Pirev danke ich für die technische und wissenschaftliche Expertise zum Nachweis freier Zinkionen mittels Zinquin und für die wissenschaftliche Diskussion.

Meinen Freunden danke ich für die Motivation und dafür, dass sie immer an mich glauben.

Meinem Ehemann Sebastian danke ich für seine Geduld, Motivation, für sein Verständnis und seine Liebe.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen für alles. Danke für das Vertrauen, die Geduld, für die unermüdliche Motivation und liebevolle Unterstützung. Ohne meine geliebten Eltern und meine Schwester Maria wäre das alles nicht möglich.