

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

**Effekte HE-relevanter Faktoren auf die Morphologie und das Volumen der
Zellkerne und das Zytoskelett kultivierter Rattenastrozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von
Susanne Kubo
2020

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Andreas Reichert

Für meine Familie

Zusammenfassung

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein komplexes neuropsychiatrisches Syndrom mit kognitiven und motorischen Störungen als Folge von akutem oder chronischem Leberversagen. Durch die mangelnde Entgiftungsleistung der Leber kommt es zur Akkumulation ZNS-toxischer Substanzen, wie insbesondere Ammoniak, das zu einer Astrozytenschwellung mit Ausbildung eines geringgradigen Hirnödems führt. Infektionen und Sedativa können als präzipitierende Faktoren Episoden der HE auslösen. Neuere Arbeiten zeigen, dass Ammoniak, TNF α und Diazepam nicht nur zu einer astrozytären Zellschwellung führen, sondern kurzfristig - innerhalb von 20 Minuten - auch eine Kernvolumenzunahme in kultivierten Rattenastrozyten induzieren können. Des Weiteren ist bekannt, dass Ammoniak zu Expressionsänderungen von astrozytären Intermediär- und Aktinfilamenten führt, die über den sog. LINC-Komplex (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*), bestehend aus Nesprinen und Sun-Proteinen, mechanisch an den Zellkern gekoppelt sind. Durch diese physikalische Verbindung gehen Expressionsänderungen von Aktin- und Intermediärfilamenten mit morphologischen Zellkernveränderungen einher.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von Ammoniak, TNF α und Diazepam auf Volumen und Morphologie der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten im Langzeitverlauf bis 168 Stunden zu untersuchen. Zusätzlich wurden die Effekte von Ammoniak, Diazepam und TNF α auf F-Aktin und *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) untersucht. Des Weiteren wurden mögliche Wirkungen von Ammoniak auf Nesprin-2 analysiert, über welches F-Aktin an den Zellkern gekoppelt ist.

Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit den genannten HE-auslösenden Substanzen bis zu 168 Stunden inkubiert. Anschließend wurden mittels Immunfluoreszenz die Zellkerne, GFAP, F-Aktin und/oder Nesprin-2 angefärbt. Zur Untersuchung von Volumen- und Morphologieänderungen der Zellkerne wurde eine spezielle Volumenmikroskopiertechnik (VivaTome™ Mikroskopie) verwendet.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass eine Langzeitexposition mit Ammoniak in kultivierten Rattenastrozyten zu einer Abnahme des Zellkernvolumens führt und die Morphologie der Zellkerne verändert. Die Langzeitexposition mit Diazepam und TNF α führt nur zu geringen und transienten Veränderungen von Zellkernvolumen und -Morphologie. Die durch Ammoniak induzierten Effekte auf die Astrozytenzellkerne gehen einher mit einer verminderten Expression von GFAP und F-Aktin, sowie einer verstärkten zytoplasmatischen Lokalisation von Nesprin-2. Ähnliche Effekte werden durch Inkubation mit Methylammoniumchlorid beobachtet, was vermuten lässt, dass die Ammoniak-induzierten Effekte durch pH-Wertverschiebungen vermittelt werden.

Die Ammoniak-induzierten Veränderungen der astrozytären Zellkerne könnten für die in der HE beschriebenen Genexpressionsänderungen und der sich im Verlauf entwickelnden Astrozytenfunktionsstörung mitverantwortlich sein und über diese sekundär eine neuronale Funktionseinschränkung bedingen, aus der die Symptome der HE resultieren könnten.

Summary

Hepatic encephalopathy (HE) is a neuropsychiatric syndrome with cognitive and motor disturbances due to acute or chronic liver disease. Impaired liver function elevates systemic levels of CNS-toxic substances such as ammonia which causes astrocyte swelling and low-grade cerebral oedema. HE exacerbations can be triggered by infections or sedatives. Recent studies show that ammonia, TNF α and diazepam not only lead to an astrocyte swelling, but also induce a short-term nuclear swelling within 20 minutes in cultured rat astrocytes. Furthermore, it is known that ammonia leads to expression changes of astrocytic intermediate and actin filaments which are mechanically coupled to the cell nucleus via LINC complex (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) consisting of nesprins and Sun proteins. Through this mechanical connection, expression changes of actin and intermediate filaments are associated with changes in nuclear morphology.

The aim of the present study was to investigate the effects of ammonia, TNF α and diazepam on nuclear volume and morphology in cultured rat astrocytes following long-term exposure to ammonia up to 168 hours. In addition, effects of ammonia, diazepam and TNF α on F-actin and *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) were investigated. Furthermore, possible effects of ammonia on nesprin-2, which connects F-actin mechanically to the cell nucleus, were analyzed.

Cultured rat astrocytes were incubated with the above-mentioned HE-precipitating factors up to 168 hours. Subsequently, the nuclei, GFAP, F-actin and / or nesprin-2 were stained by immunofluorescence. To study volume and morphology changes of cell nuclei, a special volume microscopy technique (VivaTome™ microscopy) was used.

Our results show that long-term exposure to ammonia in cultured rat astrocytes leads to a decrease in nuclear volume and changes nuclear morphology. Long-term exposure to diazepam and TNF α results in only minor and transient changes in nuclear volume and morphology. Ammonia-induced effects on cell nuclei in cultured astrocytes are associated with a reduced expression of GFAP and F-actin, as well as an increased cytoplasmic localization of nesprin-2. Similar effects are observed by incubation with methylammonium chloride, suggesting that the ammonia-induced effects are mediated by pH shifts.

Ammonia-induced changes in astrocytic cell nuclei could be responsible for gene expression changes described in HE and following astrocytic dysfunction. Astrocytic dysfunction secondarily could cause a restricted neuronal function which might lead to symptoms of HE.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , Varianzanalyse
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserum
Ca ²⁺	Kalzium
CFF	<i>critical flicker frequency</i> , kritische Flimmerfrequenz
CH ₃ NH ₃ Cl	Methylammoniumchlorid
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP	evoziertes Potenzial
EPI	Epifluoreszenzmikroskopie
F-Aktin	filamentöses Aktin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GABA	γ -Amino-Buttersäure
G-Aktin	globuläres Aktin
GFAP	<i>glial fibrillary acid protein</i> , saures Gliafaserprotein
GS	Glutaminsynthetase
HE	Hepatische Enzephalopathie
¹ HMR	Protonen Magnet Resonanz Spektroskopie
LDH	Laktatdehydrogenase
LINC	<i>linker of nucleoskeleton and cytoskeleton</i>
mAb	<i>monoclonal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
MEG	Magnetenzephalographie
Mg ²⁺	Magnesium
mHE	minimale HE

IV

mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MSO	Methioninsulfoximin
NAD ⁺	oxidierte Form des Nikotinamidadenindinukleotids
NADPH	reduzierte Form des Nikotinamidadenindinukleotidphosphats
NH ₃	Ammoniak
NH ₄ ⁺	Ammonium
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
pAb	<i>polyclonal antibody</i> , polyklonaler Antikörper
PBR	peripherer Benzodiazepinrezeptor
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PHES-Score	<i>psychometric hepatic encephalopathy score</i> , Psychometrischer-Hepatische-Enzephalopathie-Summen- Score
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SR-SIM	<i>superresolution structured illumination microscopy</i>
TMS	Transkranielle Magnetstimulation
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRITC	Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat
w/o	<i>without</i>
WO	<i>washout</i>
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Hepatische Enzephalopathie.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie.....	1
1.1.3	Klinik.....	2
1.1.4	Diagnostik.....	3
1.1.5	Therapie.....	4
1.1.6	Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie.....	5
1.2	Astrozyten.....	6
1.2.1	Morphologie.....	6
1.2.2	Funktionen.....	6
1.2.3	Rolle in der Pathogenese der HE.....	7
1.3	HE-präzipitierende Faktoren.....	10
1.3.1	Ammoniak.....	10
1.3.2	Tumor Nekrose Faktor α	12
1.3.3	Diazepam.....	13
1.4	Zellkern.....	14
1.4.1	Aufbau und Funktion.....	14
1.4.2	Rolle in der Pathogenese der HE.....	15
1.5	Zytoskelett.....	15
1.5.1	Aufbau und Funktion.....	15
1.5.2	Rolle in der Pathogenese der HE.....	16
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	17
2.1	Materialien.....	18
2.1.2	Chemikalien.....	18
2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.4	Geräte.....	19
2.2.1	Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus dem zerebralen Rattenkortex.....	19
2.2.2	Zellkultur.....	20
2.2.3	Messung mittels VivaTome™ Mikroskopie.....	22
2.2.4	Auswertung der durch VivaTome™ Mikroskopie erhaltenen Bilder.....	23
2.2.5	Untersuchung des Zytoskeletts.....	23
2.2.6	ELYRA-Superhochauflösende Mikroskopie.....	24
2.2.7	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	25

2.2.8	Epifluoreszenzmikroskopie	25
2.2.9	Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität	26
2.2.10	Propidiumiodid-Färbung	26
2.2.11	Statistik.....	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Effekte HE-auslösender Faktoren auf Zellkernvolumen und Zellkernmorphologie ...	28
3.1.1	Effekte von Ammoniak.....	28
3.1.2	Effekte von TNF α auf Morphologie und Volumen des Zellkerns	33
3.1.3	Effekte von Diazepam auf Morphologie und Volumen des Zellkerns.....	35
3.1.4	Effekte von Ammoniak + TNF α auf Morphologie und Volumen des Zellkerns.....	37
3.1.5	Auswirkungen von Ammoniak + Diazepam auf Morphologie und Volumen des Zellkerns..	39
3.1.6	Effekte von Methylammoniumchlorid auf Morphologie und Volumen des Zellkerns ..	42
3.2	Effekte HE-auslösender Faktoren auf die Expression von F- Aktin und Nesprin-2	44
3.2.1	Effekte von Ammoniak auf die Expression von F-Aktin	44
3.2.2	Effekte von TNF α und Diazepam auf die Expression von F-Aktin	45
3.2.3	Effekte von Methylammoniumchlorid auf die Expression von F-Aktin	46
3.2.4	Quantifizierung der Phalloidin-TRITC Fluoreszenzintensität	47
3.2.5	Effekte von Ammoniak auf die Expression von F-Aktin und von Nesprin-2	48
3.2.6	Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von Phalloidin-TRITC	51
3.2.7	Auswirkungen von Methylammoniumchlorid auf die Expression von F-Aktin und Nesprin-2.....	53
3.3	Effekte HE-auslösender Faktoren auf die Expression von GFAP	53
3.3.1	Effekte von Ammoniak auf die GFAP-Expression.....	53
3.3.2	Effekte von TNF α und Diazepam auf die GFAP-Expression	55
3.3.3	Effekte von Methylammoniumchlorid auf die GFAP-Expression.....	55
3.3.4	Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von GFAP	56
3.4	Effekte von Ammoniak auf die Viabilität kultivierter Astrozyten	57
3.4.1	Bestimmung der LDH-Aktivität	58
3.4.2	Propidiumiodidfärbung.....	58
4	Diskussion.....	60
4.1	Effekte HE-auslösender Faktoren auf Zellkernvolumen- und Morphologie	60
4.1.1	Effekte von Ammoniak und Methylammoniumchlorid	60
4.1.2	Wirkungen von TNF α oder Diazepam und Koexposition mit Ammoniak.....	63
4.2	Auswirkungen HE-auslösender Faktoren auf das Zytoskelett	65

VII

4.3	Wirkungen von Ammoniak auf die Viabilität kultivierter Rattenastrozyten	69
4.4	Schlussfolgerung	70
5	Literaturverzeichnis.....	71
6	Anhang	80

1 Einleitung

1.1 Hepatische Enzephalopathie

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein neuropsychiatrisches Syndrom mit kognitiven und motorischen Störungen, das als Folge von akutem oder chronischem Leberversagen entstehen und in unterschiedlichen Schweregraden auftreten kann (Häussinger and Blei, 2007; Häussinger and Schliess, 2008; Hazell and Butterworth, 1999).

1.1.1 Epidemiologie

Etwa 30-45% aller Patienten mit Leberzirrhose entwickeln im Laufe der Erkrankung eine HE. (Elwir and Rahimi, 2017). Die hauptursächlichen Krankheiten, das akute und das chronische Leberversagen, weisen eine unterschiedliche Inzidenz auf: Das akute Leberversagen ist mit 200 Fällen pro Jahr in Deutschland eine eher seltene Erkrankung (Herold, 2016), wohingegen das chronische Leberversagen mit der Leberzirrhose als Endstadium eine häufige Erkrankung mit steigender Inzidenz darstellt. In Europa und den USA erkranken jährlich ca. 250 Menschen pro 100.000 Einwohner, in Deutschland liegt die Inzidenz bei ca. 15.000 – 30.000 Personen pro Jahr (Herold, 2016).

1.1.2 Ätiologie

Die HE entwickelt sich in Folge einer beeinträchtigten Leberfunktion bedingt durch Leberversagen unterschiedlicher Genese. Die Einteilung wird hierbei nach dem sog. Child Score in Typ A (durch akutes Leberversagen), Typ B (durch die Anlage portosystemischer Shunts) und Typ C (durch chronisches Leberversagen) vorgenommen (Ferenci et al., 2002).

Beim akuten Leberversagen kommt es bei einer Leber mit zuvor normaler Funktionalität zu einer raschen Verschlechterung der Leberfunktion mit verminderter Syntheseleistung (verminderte Synthese von Albumin, Cholinesterase und Gerinnungsfaktoren) und Ausbildung einer hepatischen Enzephalopathie (Gotthardt et al., 2007). Das akute Leberversagen wird weltweit meist durch akute Virushepatitiden, v.a. Hepatitis B, ausgelöst, wobei regional Unterschiede bestehen. So ist die akute Virushepatitis vor allem in Südeuropa, Asien und Afrika (50%) für das Auftreten des akuten Leberversagens verantwortlich, wohingegen in Industrienationen die Drogenintoxikation, v.a. die Paracetamolintoxikation, die häufigste Ursache darstellt. Die Vergiftung durch den Knollenblätterpilz tritt seltener auf, ist aber dennoch als Ursache des akuten Leberversagens relevant. Weitere seltene Ursachen sind z.B. andere Virusinfektionen (Ebstein-Barr-Virus, Zytomegalie-Virus, Herpes-simplex-Virus), die Autoimmunhepatitis, das HELLP-Syndrom (Hämolyse, erhöhte Leberwerte, verminderte Thrombozytenzahl), metabolische Speicherkrankheiten (Morbus Wilson), Graft vs. Host Disease oder kardiovaskuläre Erkrankungen. (Sowa et al., 2016). Das schwere, akute Leberversagen kann mit um

mindestens 50% verminderten Gerinnungsfaktoren, aber ohne Symptome der hepatischen Enzephalopathie definiert werden, wohingegen beim fulminanten Leberversagen zusätzlich eine hepatische Enzephalopathie auftritt (Bernuau et al., 1986).

Das chronische Leberversagen entsteht weltweit am häufigsten auf dem Boden chronischer Virushepatitiden. In den westlichen Industrienationen ist der chronische Alkoholabusus die häufigste Ursache. Weitere seltenere Auslöser sind zum Beispiel die Autoimmunhepatitis, primär cholestatische Lebererkrankungen, Speicherkrankheiten, die kardiale Zirrhose oder das Budd-Chiari-Syndrom. Als Spätfolge der verschiedenen Erkrankungen kommt es zu einer Leberzirrhose mit Fibrosierung und Zerstörung der Läppchen- und Gefäßstruktur. Daraus resultieren funktionelle Einschränkungen wie eine verminderte Synthese- und Entgiftungsleistung, eine portale Hypertension mit Shuntbildung, Aszites und Entstehung einer hepatischen Enzephalopathie. (Piper, 2012).

1.1.3 Klinik

Die HE äußert sich je nach Schweregrad von leichten subklinischen Erscheinungen bis hin zum Coma hepaticum (Gerber and Schomerus, 2000). Die Patienten zeigen Beeinträchtigungen der motorischen und kognitiven Funktionen, sowie Störungen von Emotion und Affekt (Häussinger and Blei, 2007; Häussinger and Sies, 2013). Die Einteilung der Schweregrade erfolgt nach den West Haven Kriterien (siehe Abb. 1). Man unterscheidet zwischen der manifesten HE (Grad I-IV), bei der die Patienten bereits klinisch symptomatisch sind und der sogenannten minimalen HE, bei der die Patienten klinisch noch unauffällig sind, aber bereits pathologische neuropsychologische und neurophysiologische Testergebnisse zeigen (Häussinger and Schliess, 2008). Je nach Symptomatik wird die HE dann in die verschiedenen Schweregrade nach den West-Haven-Kriterien eingeteilt.

West Haven Kriterien	
Grad I	Beeinträchtigungen des Bewusstseins Euphorie oder Ängstlichkeit Verkürzte Aufmerksamkeitsspanne
Grad II	Lethargie oder Apathie Leichte Desorientierung für Raum und Zeit Subtile Persönlichkeitsveränderungen Unangemessenes Verhalten
Grad III	Somnolenz bis Semistupor, aber Reaktion auf verbale Stimuli Verwirrtheit Massive Desorientierung
Grad IV	Koma (keine Antwort auf verbale oder schmerzhaft stimuli)

Abb. 1: West-Haven Kriterien (modifiziert nach Ferenci et al., 2002)

Diese Einteilung beinhaltet nicht die Schweregrade HE 0 und minimale HE (mHE), die durch keine offenkundigen klinischen Symptome charakterisiert werden können. Insbesondere die Diagnostik der minimalen HE ist äußerst problematisch, da sie nur durch neuropsychiatrische bzw. neurophysiologische Tests diagnostizierbar ist, die stark untersucherabhängig sind. Zudem existiert für viele Testverfahren weder eine ausreichende Validierung noch eine Standardisierung.

Daher wurde eine neuere Einteilung vorgeschlagen, bei der die Schweregrade HE 0, mHE, HE I und HE II mit einem kontinuierlichen Symptomspektrum als geringgradige HE und die Grade HE III – IV als hochgradige HE benannt wurden (Häussinger et al., 2006).

Patienten mit hochgradiger HE sind durch starke Bewusstseins Einschränkungen, sowie Kooperationsunfähigkeit charakterisiert und benötigen einen stationären Aufenthalt. Bei einer geringgradigen HE zeigen sich die Patienten kooperativ und es ist keine Hospitalisierung erforderlich (Häussinger and Schliess, 2008).

1.1.4 Diagnostik

Die manifeste HE kann anhand der Symptome in die oben beschriebenen 4 Stadien eingeteilt und dadurch diagnostiziert werden, wobei die Symptome der Grade I und II unspezifisch sind und daher nur subjektiv eingeschätzt werden können. Bei der minimalen HE haben die Patienten klinisch keine offenkundigen Symptome. Da sich aber gezeigt hat, dass bereits eine minimale HE die Lebensqualität der Patienten einschränken kann, ist es wichtig auch diese schon frühzeitig zu erkennen (Groeneweg et al., 1998; Wein et al., 2004). Dafür werden verschiedene psychometrische Test-Batterien angewendet, die aber durch Faktoren wie Training, Bildung und Alter des Patienten verfälscht werden können (Kircheis et al., 2007). Als validiertes Standard Testverfahren gilt zum Beispiel der Psychometrische-Hepatische-Enzephalopathie-Summenscore (PHES-Score), der die Zahlenverbindungstests A und B, den Zahlensymboltest, den Liniennachfahrttest, und den sogenannten Serial Dotting Test beinhaltet (Kircheis and Häussinger, 2012).

Eine weitere sensitive und gut validierte Methode zur objektiven Diagnose geringer HE-Schweregrade, einschließlich der HE 0 und der minimalen HE, ist die sogenannte kritische Flimmerfrequenz Analyse (*critical flimmer frequency*, CFF). Dabei handelt es sich um die Frequenz, bei der rasch aufeinanderfolgende Lichtimpulse als Flimmern wahrgenommen werden können (<39 Hz). Patienten mit hepatischer Enzephalopathie erkennen gegenüber Gesunden ein Flimmern des Lichts erst bei geringeren Frequenzen. Die CFF wird nur geringfügig durch Tageszeit, Übung, Bildung und Alter des Patienten beeinflusst und ist daher weniger fehleranfällig (Kircheis et al., 2002).

Des Weiteren werden als objektive diagnostische Verfahren die Elektroenzephalographie (EEG) und evozierte Potenziale (EP) verwendet. Das EEG spiegelt die kortikale neuronale Aktivität wieder und zeigt bei Patienten mit HE zunehmenden Schweregrades nacheinander folgende Veränderungen: eine Verlangsamung des EEGs, eine initiale Erhöhung mit darauffolgender Verminderung der EEG

Amplitude, ein diskontinuierliches EEG Muster und ein isoelektrisches EEG (Guerit et al., 2009). Bei Patienten mit Leberzirrhose ohne Zeichen einer hepatischen Enzephalopathie können ebenfalls EEG Veränderungen beobachtet werden. Diese haben prognostischen Wert sowohl für das Auftreten einer symptomatischen HE, als auch für die Mortalität der Zirrhosepatienten und können nach Ausschluss anderer Gründe auf eine minimale HE hinweisen (Amodio et al., 2001; Guerit et al., 2009). Evozierte Potenziale erfassen im Gegensatz zum EEG nicht nur Funktionen des zerebralen Kortex, sondern auch des Hirnstamms (Guerit et al., 2009). EP werden in somatosensorische (exogene), motorische und kognitive (endogene) evozierte Potenziale eingeteilt. Somatosensorische EP können selbst bei komatösen Patienten detektiert werden und sind daher zur Überwachung von Patienten mit HE 4 geeignet. Kognitive EP können hingegen nur unter Mitwirkung des Patienten erfasst werden. Sie können aber genutzt werden, um frühe Hirndysfunktionen oder kognitive Einschränkungen zu erkennen (Amodio and Montagnese, 2015).

Zwei weitere Verfahren, die in der Diagnostik der HE zur Anwendung kommen sind die Transkranielle Magnet-Stimulation (TMS) und die Magnetenzephalografie (MEG), wobei das MEG derzeitig unter anderem aus Kosten- und Kapazitätsgründen ausschließlich zu Forschungszwecken genutzt wird (Amodio and Montagnese, 2015).

1.1.5 Therapie

Die Therapie der HE besteht zunächst in der kausalen Behandlung der zugrundeliegenden Lebererkrankung. Gleichzeitig sollten diagnostisch andere Krankheiten, die ähnliche Symptome hervorrufen können (z.B. ein Schlaganfall), ausgeschlossen werden (Elwir and Rahimi, 2017).

Zur symptomatischen Therapie stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Zunächst sollte evaluiert werden, ob sogenannte HE-auslösende Faktoren (z.B. erhöhte Ammoniakspiegel, Gastrointestinale Blutungen, Einnahme von Sedativa oder Diuretika, Infektionen) vorliegen. Wenn HE-auslösende Faktoren vorhanden sind sollten diese nach Möglichkeit beseitigt und der Patient zusätzlich mit Laktulose therapiert werden (Leise et al., 2014). Bei einer akuten HE sollte Laktulose in Form von hohen Einläufen verabreicht werden, zur Sekundärprophylaxe ist die orale Einnahme möglich. Laktulose ist ein nichtresorbierbares Disaccharid, das durch Darmbakterien in kurzkettige organische Säuren umgewandelt wird und so ein saures Milieu schafft, durch das NH_3 in das nichtresorbierbare NH_4^+ umgewandelt wird und dadurch den Ammoniakspiegel im Blut senkt (Elwir and Rahimi, 2017). Laktulose kann zur Sekundärprophylaxe in Kombination mit dem gering resorbierbaren Antibiotikum Rifaximin gegeben werden, das über eine Veränderung der mikrobiotischen Zusammensetzung im Darm die Ammoniakbildung vermindert (Bass et al., 2010).

Da Patienten mit einer Leberzirrhose häufig an einer Malnutrition leiden, die einen Abbau der Muskelmasse bewirkt und dadurch den Blutammoniakspiegel erhöht, ist es wichtig den Ernährungsplan der Patienten auf ihre Erkrankung anzupassen. Empfohlen wird über den Tag verteilt

viele kleine Mahlzeiten und spät abends eine kohlenhydratreiche Mahlzeit einzunehmen, um dem Proteinabbau und einer damit verbundenen Erhöhung des Ammoniakspiegels vorzubeugen (Amodio et al., 2013). Eine zu starke Eiweißrestriktion führt bei Zirrhose Patienten zu einem starken Katabolismus und verstärkt die Malnutrition weiter. Hierbei hat sich als Therapie die Gabe pflanzlicher Eiweiße gegenüber tierischen Eiweißen als überlegen erwiesen (Kircheis and Häussinger, 2012). Zusätzlich sind bei Patienten mit Leberzirrhose die Spiegel verzweigtkettiger Aminosäuren im Blut erniedrigt, da der bei Zirrhose erhöhte Ammoniakspiegel den Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren in der Skelettmuskulatur verstärkt. Daher wird eine Zufuhr verzweigtkettiger Aminosäuren als Nahrungssupplement bei Patienten mit HE empfohlen. (Holecsek et al., 2011).

Die Ultima Ratio stellt die Lebertransplantation dar (Elwir and Rahimi, 2017).

1.1.6 Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

Die Pathogenese der HE ist bis heute nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass die HE die Folge eines geringgradigen glialen Ödems ist, welches vergesellschaftet ist mit der zerebralen Bildung von oxidativem Stress (Häussinger and Sies, 2013; Häussinger et al., 1994, 2000).

Bisher ist bekannt, dass es durch die mangelnde Entgiftungsleistung der Leber aufgrund der oben genannten Erkrankungen zu einer Akkumulation ZNS-toxischer Substanzen (Ammoniak, Mercaptane, Phenole, Fettsäuren, GABA, endogene Benzodiazepine u.a.) im Gehirn kommt (Herold, 2016; Piper, 2012). Durch HE-auslösende Faktoren (auch HE-präzipitierende Faktoren) (siehe 1.3) können Episoden der HE hervorgerufen werden. Hierbei gilt Ammoniak als ein Haupttoxin, welches das Gehirn für andere HE-auslösende Faktoren angreifbar macht (Butterworth et al., 1987; Norenberg, 1996; Ong et al., 2003).

Des Weiteren kommt es zu Veränderungen von Neurotransmittersystemen (Palomero-Gallagher et al., 2009) und der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Häussinger and Schliess, 2008). Durch die Blut-Hirn-Schranke wird das Gehirn beim Gesunden vor toxischen Substanzen geschützt. Im Gehirn benötigte Stoffe können mit Hilfe von Transportsystemen die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Ferenci et al., 1992). Sie wird von den Endothelzellen der zerebralen Kapillaren gebildet und durch die Astrozyten, welche eine zentrale Rolle in der Pathogenese der HE spielen, verstärkt (Ede and Williams, 1986). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass es nach akutem Leberversagen zu einer unspezifisch erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke kommt (Horowitz et al., 1983). Für die erhöhte Permeabilität wird die durch Leberversagen ausgelöste Akkumulation neurotoxischer Substanzen wie Ammoniak, Mercaptane und Phenole verantwortlich gemacht (Zaki et al., 1983). Durch die oben beschriebenen Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke können neurotoxische Substanzen diese passieren und ein Hirnödem auslösen (Ede and Williams, 1986).

Wird die hepatische Enzephalopathie durch akutes Leberversagen ausgelöst, zeigen sich klinisch offenkundig Zeichen eines Hirnödems (Schwindel, Übelkeit und Erbrechen, Kopfschmerz) (Vaquero et

al., 2003), wohingegen bei der HE aufgrund einer Leberzirrhose meist keine klinischen Zeichen eines Hirnödems erkennbar sind (Häussinger and Schliess, 2008). Mittels Magnet Resonanz Techniken konnte aber gezeigt werden, dass sich bei Zirrhosepatienten mit einer HE ein geringgradig gliales Ödem ausbildet, welches sich mit zunehmendem Schweregrad der HE weiter ausprägt (Häussinger et al., 1994). In der Entstehung des geringgradig glialen Ödems wird den Astrozyten eine Schlüsselrolle zugesprochen (siehe 1.2).

1.2 Astrozyten

Astrozyten sind Zellen des Zentralen Nervensystems (ZNS) und gehören zu den Gliazellen. Sie sind der häufigste Gliazelltyp und im Gehirn zahlenmäßig häufiger vertreten als Neurone (Drenckhahn, 2008; Welsch and Deller, 2010).

1.2.1 Morphologie

Astrozyten können nach ihrer Morphologie in vier Typen eingeteilt werden. Zum einen kann man zwischen den protoplasmatischen Astrozyten, die hauptsächlich in der grauen Substanz vorkommen, und den fibrillären Astrozyten (oder auch Faserastrozyten), die vorwiegend in der weißen Substanz zu finden sind, unterscheiden (Drenckhahn, 2008; Welsch and Deller, 2010). Beim Menschen konnten zusätzlich die sogenannten interlaminären Astrozyten und die Astrozyten mit varikösen Projektionen identifiziert werden, welche bei Nagetieren nicht vorkommen (Oberheim et al., 2009).

Astrozyten besitzen zahlreiche Fortsätze, die sternförmig vom Zellkörper ausgehend in die Peripherie ziehen. Ihre Fortsätze bedecken zum einen Blutgefäße und Kapillaren zum anderen stehen sie in engem Kontakt mit Nervenfasern und grenzen Synapsen ab, wodurch sie in der synaptischen Übertragung eine wichtige Rolle spielen. (Drenckhahn, 2008; Welsch and Deller, 2010)

1.2.2 Funktionen

Die Astrozyten besitzen vielfältige Funktionen im ZNS. Sie bilden gemeinsam mit den Endothelzellen der Kapillaren die Blut-Hirn-Schranke und verhindern dadurch das Eindringen neurotoxischer Substanzen ins Gehirn (Ede and Williams, 1986). Außerdem sind sie wichtig für die Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase und für die Narbenbildung nach Verletzungen im ZNS. Sie stehen in engem Kontakt mit Neuronen, indem sie zum einen in Stoffwechselinteraktionen mit Neuronen treten und zum anderen neurotrophe Substanzen und Zytokine sezernieren, die für den Schutz von Neuronen (durch Entwicklung und Stabilisierung von Neuronen und Synapsen) wichtig sind. Astrozyten besitzen an ihren Fortsätzen Neurotranstransporter, mit Hilfe derer sie Neurotransmitter aus dem synaptischen Spalt aufnehmen können. Dadurch sind sie in der Lage die synaptische Übertragung zu beeinflussen.

Im Gehirn wird Ammoniak über die nahezu ausschließlich in Astrozyten exprimierte Glutaminsynthetase (GS) entgiftet.

Astrozyten haben aber auch eine wichtige Bedeutung im Hinblick auf die räumliche Organisation des Gehirns und bilden eine Matrix in der sich Neurone positionieren. Im weiteren Sinne stabilisieren sie dadurch Zell-/Zellkontakte und besitzen damit eine „Stützfunktion“. Die Astrozytenmorphologie selbst wird dabei u.a. durch das im Gehirn für Astrozyten spezifische Intermediärfilament „saures Gliafaserprotein“ (GFAP) gefestigt.

1.2.3 Rolle in der Pathogenese der HE

Astrozyten sind im Gehirn für die Entgiftung von Ammoniak von zentraler Bedeutung. Sie exprimieren die GS durch die Ammoniak unter Bildung von Glutamin detoxifiziert wird (Martinez-Hernandez et al., 1977; Norenberg, 1996). Bei Gesunden wird systemisch anfallender Ammoniak in der Leber entweder durch die periportalen Hepatozyten für die Harnstoffsynthese verwendet oder durch perivenöse Scavenger Zellen mit Hilfe der GS zu Glutamin verstoffwechselt (Häussinger, 1990).

Bei Zirrhosepatienten kann die Erhöhung des Blutammoniakspiegels mehrere Ursachen haben. Durch eine portale Hypertension kommt es zu einem vermehrten Zufluss aus dem Splanchnikusgebiet und daraus resultierend zu einer erhöhten Ammoniakresorption aus dem Darmtrakt (Rikkers, 1983). Durch die Ausbildung portosystemischer Shunts wird der Ammoniakspiegel im Blut ebenfalls erhöht. Die Reduktion der Lebermasse bei Zirrhotikern vermindert die Ammoniak-Entgiftung, da hierdurch die Glutamin- und Harnstoff-Syntheseleistung herabgesetzt wird und vermehrt Ammoniak in der Zirkulation verbleibt (Häussinger and Blei, 2007). In der Muskulatur kann Ammoniak wie in der Leber durch die GS für die Glutaminbildung verwendet werden. Da Zirrhotiker häufig an einer Muskelatrophie leiden, ist die Kapazität dieses alternativen Abbauweges begrenzt, woraus wiederum ein Anstieg der Ammoniakkonzentration im Blut resultiert (Ferenci, 2017). Neben der Erhöhung der Ammoniakspiegel im Blut kommt es durch die vermehrte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu einem gesteigerten Übertritt von Ammoniak ins Gehirn (Ferenci et al., 1992). Im Gehirn wird Ammoniak dann durch die GS der Astrozyten in Glutamin umgewandelt (Martinez-Hernandez et al., 1977), woraus wiederum eine Akkumulation von Glutamin in den Astrozyten resultiert (Häussinger et al., 1994).

Wie unter 1.1.6 bereits beschrieben, entwickeln HE Patienten aufgrund eines akuten Leberversagen ein Hirnödem mit Hirndrucksymptomatik. Patienten bei denen eine Leberzirrhose für die HE verantwortlich ist bleiben dagegen meist ohne Hirndrucksymptomatik, entwickeln aber ein in Protonen Magnet Resonanz Spektroskopie (¹H-MRS) Studien nachgewiesenes geringgradig gliales Ödem (Häussinger et al., 1994; Shah et al., 2008). In diesen Studien wurde sowohl bei HE Patienten mit akutem Leberversagen als auch mit Leberzirrhose spektroskopisch ein erhöhtes Glutaminsignal im Gehirn nachgewiesen. Da die Glutaminakkumulation osmotisch wirksam ist, wird hierdurch eine

Störung der Hydratation der Astrozyten hervorgerufen (Häussinger and Blei, 2007). Bei Patienten mit Leberzirrhose konnte zusätzlich ein vermindertes *myo*-Inositol Signal gemessen werden wohingegen sich beim akuten Leberversagen ein unverändertes Signal zeigte (Häussinger and Blei, 2007). *Myo*-Inositol ist ein organisches Osmolyt, welches vermutlich zur Kompensation des durch die Glutaminakkumulation erhöhten osmotischen Drucks aus der Zelle freigesetzt wird (Córdoba et al., 1996; Häussinger et al., 1994). Die Befunde lassen darauf schließen, dass beim chronischen Leberversagen im Gegensatz zum akuten Leberversagen ein Kompensationsmechanismus aktiviert wird und so ein symptomatisches Hirnödem verhindert werden kann. Die osmotische Kompensation der Glutaminakkumulation durch *myo*-Inositolfreisetzung bewirkt eine Verarmung des Astrozyten an Osmolyten. Hierdurch kann der Astrozyt weitere Störungen des Wasserhaushalts wie sie durch andere HE-relevante Faktoren induziert werden nicht mehr kompensieren. Der Astrozyt wird dadurch empfindlich für die schwellungsinduzierende Wirkung von Benzodiazepinen, Hypoosmolarität und proinflammatorischen Zytokinen (Häussinger and Sies, 2013; Häussinger et al., 2000)

In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich die Astrozytenschwellung durch den GS – Hemmstoff Methionin Sulfoximin (MSO) verhindern lässt (Tanigami et al., 2005), was darauf hindeutet, dass die Zellschwellung durch die Ammoniak-induzierte Glutaminakkumulation und nicht durch andere vom Ammoniak ausgehende Effekte wie z.B. pH-Wert-Änderungen vermittelt wird (Norenberg and Bender, 1994). Diese Vermutung wird zusätzlich dadurch gestützt, dass der Schweregrad der HE nur gering mit den Blutammoniakspiegeln, aber gut mit der Stärke des Glutaminsignals in ¹H-MRS Studien korreliert (Laubenberger et al., 1997).

Neben dem Schlüsseltoxin Ammoniak können andere HE-auslösende Faktoren wie Benzodiazepine, Infektionen und eine Hyponatriämie ebenfalls eine Astrozytenschwellung induzieren (Häussinger et al., 2000) oder mit Ammoniak zusammen synergistisch wirken (Häussinger and Schliess, 2008).

Fluktuationen im Wasserhaushalt beeinflussen in vielfältiger Weise den Metabolismus und die Genexpression in Zellen (Häussinger, 1996). Selbst aus geringgradigen Veränderungen des Astrozytenvolumens können weitreichende funktionelle Folgen resultieren (Häussinger and Blei, 2007). In kultivierten Rattenastrozyten konnte gezeigt werden, dass eine hypoosmotische Astrozytenschwellung nahezu sofortig oxidativen Stress in der Zelle auslöst (Schliess et al., 2004). Diese oxidative Stressantwort der Zelle wird nicht nur durch Hypoosmolarität, sondern auch durch Ammoniak (Kruczek et al., 2011; Murthy et al., 2001), Benzodiazepine und inflammatorische Zytokine, wie TNF α , ausgelöst (Lachmann et al., 2013). Neben der Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies kommt es durch die oben genannten Faktoren auch zur Bildung reaktiver Stickstoffspezies (Kruczek et al., 2011; Schliess et al., 2002). Vermittelt wird der oxidative/nitrosative Stress über eine durch Astrozytenschwellung induzierte Aktivierung des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptors und über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Schliess et al., 2004). Über welchen Mechanismus der NMDA-Rezeptor aktiviert wird ist noch nicht gänzlich geklärt. Es wird vermutet, dass

die Astrozytenschwellung eine Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat bedingt und dadurch die Rezeptoraktivität verstärkt wird. Zusätzlich führt die hypoosmotische Umgebung zu einer Depolarisation der Astrozytenmembran und daraus resultierend zur Entfernung der Mg^{2+} Blockade aus dem NMDA-Rezeptor (Häussinger and Schliess, 2008). Oxidativer/nitrosativer Stress und Astrozytenschwellung hängen eng miteinander zusammen und bedingen sich gegenseitig in einer selbstverstärkenden Art und Weise. Zum einen führt die Astrozytenschwellung über die Aktivierung des NMDA-Rezeptors und die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu einer oxidativ/nitrosativen Stress-Antwort der Astrozyten, zum anderen resultiert aus NMDA-Rezeptor-Aktivierung und oxidativem/nitrosativem Stress eine Astrozytenschwellung (Schliess et al., 2006).

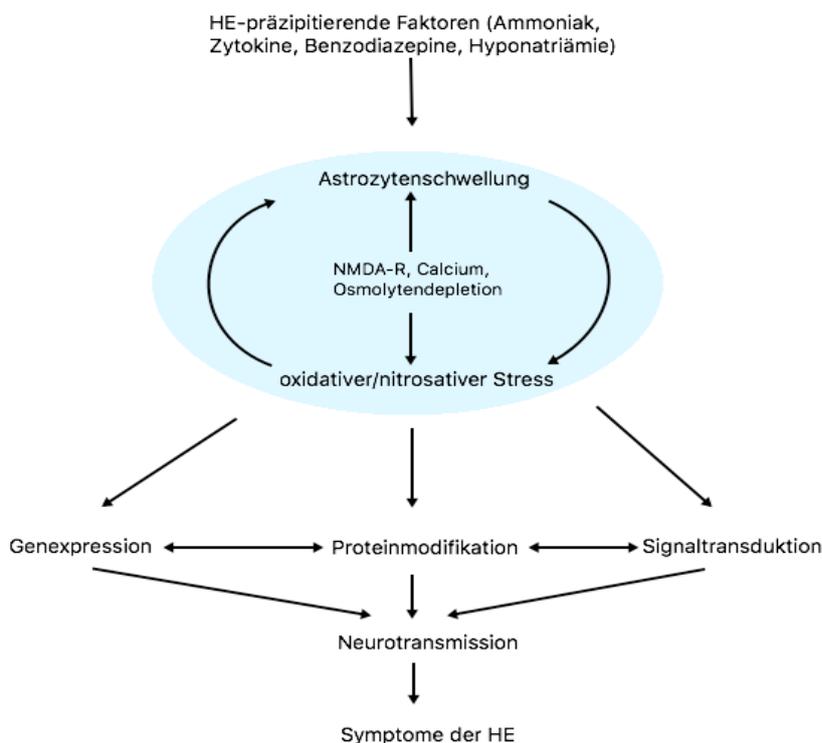


Abb. 2: Pathogenesemodell der hepatischen Enzephalopathie. HE-präzipitierende Faktoren führen über eine Störung der Astrozytenhydratation zu einer Astrozytenschwellung. Die Astrozytenschwellung löst in der Zelle oxidativen und nitrosativen Stress aus, der seinerseits wiederum die Astrozytenschwellung verstärkt. Zellschwellung und Freisetzung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies werden u.a. über eine Aktivierung des NMDA-Rezeptors, die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und Erschöpfung der volumenregulatorischen Kapazität vermittelt. Aus den Veränderungen resultiert eine Astrozytenfunktionsstörung, die sekundär neuronale Funktionen beeinträchtigt und letztlich für die Vielzahl der neurologischen HE-Symptome verantwortlich ist (modifiziert nach Kircheis and Häussinger, 2012).

Als Folge kommt es zu Genexpressionsveränderungen, Protein- und RNA-Modifikationen und Veränderungen der Signaltransduktion und dadurch zu einer Astrozytenfunktionsstörung. Die gestörte Astrozytenfunktion schränkt die Schutzfunktionen, die Astrozyten auf Neurone ausüben, stark ein, verändert die glioneuronale Kommunikation und führt zu Verschiebungen von Neurotransmittersystemen, weshalb es sekundär zu einer neuronalen Funktionsstörung kommt, aus der letztlich die Symptome der HE resultieren (Häussinger and Blei, 2007).

1.3 HE-präzipitierende Faktoren

Als HE-präzipitierende Faktoren wird eine äußerst heterogene Gruppe von Faktoren bezeichnet, die bei Zirrhosepatienten Episoden der hepatischen Enzephalopathie auslösen können. Dazu gehören einerseits Ammoniak, aber auch Sedativa (Benzodiazepine), Infektionen, gastrointestinale Blutungen, Traumata, eine erhöhte Proteinzufuhr, Elektrolytentgleisungen, eine metabolische Azidose und Diuretika (Häussinger and Sies, 2013).

Durch gastrointestinale Blutungen und eine erhöhte Proteinzufuhr kommt es zu einer vermehrten Ammoniakbildung im Darm und durch Resorption ebenfalls zu erhöhten Blutammoniakspiegeln. Fieberhafte Infektionen führen über einen verstärkten Eiweißkatabolismus ebenfalls zu einer vermehrten Ammoniakakkumulation (Herold, 2016), sowie zu einer Ausschüttung von Zytokinen. Diese wiederum induzieren eine Astrozytenschwellung, ebenso wie Benzodiazepine und eine Hyponatriämie (Lachmann et al., 2013). Eine Hyponatriämie wird durch eine von Leberzirrhosepatienten aufgrund hydropere Dekompensation oftmals benötigten intensivierten Diuretikatherapie weiter verstärkt.

Die Wirkung der HE-relevanten Faktoren (Ammoniak, inflammatorische Zytokine, Hyponatriämie und Benzodiazepine) konvergiert wiederum auf der Ebene der Induktion einer Astrozytenschwellung und der Ausbildung eines geringgradig glialen Ödems.

1.3.1 Ammoniak

1.3.1.1 Physiologie und Rolle in der Pathogenese der HE

Ammoniak spielt eine entscheidende Rolle im Stickstoffstoffwechsel und ist am Auf- und Abbau von Aminosäuren sowie an der Nukleinsäuresynthese beteiligt. In zu hohen Konzentrationen wirkt er neurotoxisch und trägt so nach heutigem Kenntnisstand maßgeblich zur Pathogenese der HE bei (Heinrich et al., 2014).

Ammoniak entsteht im Darm hauptsächlich durch zwei verschiedene Mechanismen. Zum einen durch die Verstoffwechslung von Harnstoff durch Darmbakterien und zum anderen durch die Metabolisierung von Glutamin zu Ammoniak und Glutamat an der Dünndarmschleimhaut (80%) und Dickdarmschleimhaut (20%) durch das Enzym Glutaminase (Wright et al., 2011). Wie in 1.2.3 bereits beschrieben, wird Ammoniak in der Leber in den periportalen Hepatozyten für die Harnstoffsynthese verwendet. Harnstoff dient dem Transport des Stickstoffes von der Leber zur Niere. Es stellt das Endprodukt des Aminosäurestoffwechsels dar und wird mit dem Urin ausgeschieden. In den perivenösen Scavenger Zellen wird Ammoniak in Glutamin fixiert. Glutamin wird für die Biosynthese von Purinen und Pyrimidinen benötigt und ist daher von großer Bedeutung für die Nukleinsäuresynthese. Außerdem transportiert Glutamin Stickstoff von der Peripherie zur Leber und von der Leber zur Niere. In der Niere wird Glutamin zu Ammoniak abgebaut, welches dann mit dem

Urin ausgeschieden wird und den pH-Wert des Urins reguliert. In geringem Maß trägt auch die Skelettmuskulatur durch Expression der GS zur Ammoniakdetoxifikation durch Glutaminbildung bei (Ganda and Ruderman, 1976). Ammoniak kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und wird dort von der GS der Astrozyten zu Glutamin metabolisiert. Glutamin wird in den Extrazellularraum freigesetzt, wo es in Neuronen für die Synthese von Glutamat und γ -Amino-Buttersäure (GABA), einem wichtigen hemmenden Neurotransmitter, verwendet wird (Norenberg, 1996).

Wie in 1.2.3 beschrieben, tragen verschiedene Mechanismen bei Patienten mit akutem Leberversagen oder mit Leberzirrhose zur Ausbildung einer Hyperammonämie bei. Durch die erhöhten Ammoniakspiegel und zusätzlich aufgrund der erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke gelangt vermehrt Ammoniak ins Gehirn wo es schädliche Effekte ausübt (Cooper and Plum, 1987). Ammoniak hat sowohl direkte Auswirkungen auf Neurone und Astrozyten als auch auf die Kommunikation der beiden Zelltypen untereinander. Dies führt letztendlich zu Veränderungen von synaptischer Plastizität, oszillatorischen Netzwerken und Neurotransmittersystemen (Häussinger and Blei, 2007).

Glutamat, ein wichtiger exzitatorischer Neurotransmitter, liegt in seiner Gesamtkonzentration im Gehirn bei Hyperammonämie aufgrund des vermehrten Glutamatverbrauchs für die Synthese von Glutamin aus Glutamat und Ammoniak vermindert vor (Matheson and van den Berg, 1975). In Tiermodellen konnten allerdings erhöhte Glutamatkonzentrationen im Extrazellularraum festgestellt werden (de Knecht et al., 1994), was zum einen durch eine Schwellungs-induzierte Freisetzung aus den Astrozyten (Häussinger and Görg, 2010; Schliess et al., 1996) und zum anderen durch eine Ammoniak-vermittelte Inhibition der Glutamat-Wiederaufnahme in die Zelle erklärt werden kann (Butterworth, 2002). Gesteigerte Glutamatkonzentrationen im Extrazellularraum könnten für die neuronale Übererregung bei akutem Leberversagen und Ammoniakintoxikation verantwortlich sein (Häussinger and Blei, 2007).

Das inhibitorische Neurotransmittersystem wird über Veränderungen der GABAergen Neurotransmission ebenfalls durch Ammoniak beeinflusst, indem Ammoniak eine Hochregulation des peripheren Benzodiazepinrezeptors (PBR) induziert und die Affinität seiner Liganden erhöht (siehe 1.3.3).

Ammoniak führt außerdem über eine Astrozytenschwellung zu einer Freisetzung von zellulärem Taurin, das antioxidative Eigenschaften besitzt (Häussinger and Schliess, 2008) und eine langanhaltende Verbesserung der kortikostriatalen Neurotransmission induziert (Chepkova et al., 2002). Eine Ammoniak-induzierte Taurin-Erschöpfung beeinträchtigt die synaptische Plastizität und erhöht den GABAergen Tonus im Gehirn von HE-Patienten (Oermann et al., 2005).

Neben einer Hydratationsstörung der Astrozyten kommt es zu Ammoniak-induzierten Veränderungen der Zellmorphologie (Alzheimer Typ-II Astrozyten) und zur Auslösung von oxidativem und nitrosativem Stress in der Zelle. Die Astrozytenhydratationsstörung wiederum bewirkt eine Aktivierung Mitogen-aktivierter extrazellulär-regulierter Proteinkinasen (MAPK) (Schliess et al., 1996), eine Hochregulation

des PBR (Itzhak et al., 1994), eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Fischer et al., 1997), Veränderungen von Ionen Kanälen und Aminosäuretransportern (Isaacks et al., 1999) und eine Aktivierung des NMDA-Rezeptors (Butterworth, 2016). Vermutlich werden diese Effekte über eine Ammoniak-induzierte Glutaminbildung vermittelt, da sich die Astrozytenschwellung durch Inhibition der GS hemmen lässt (Lachmann et al., 2013). Aus erhöhten Ammoniakspiegeln resultieren zudem Genexpressionsänderungen mit potentiellen Auswirkungen auf Signaltransduktionsprozesse, Apoptose, oxidativen Stress und verschiedene Rezeptoren und Transportsysteme der Zelle (Song et al., 2002).

1.3.2 Tumor Nekrose Faktor α

1.3.2.1 Physiologie und Rolle in der Pathogenese der HE

Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das zur Gruppe der Interleukine gehört. Bei Entzündungsreaktionen wird es in großen Mengen von Makrophagen und Monozyten sezerniert. TNF α induziert in der Leber die Bildung von Akute-Phase-Proteinen und hat eine pyogene Wirkung im Hypothalamus. Es lenkt Immunzellen wie neutrophile Granulozyten zum Entzündungsherd (Chemotaxis) und stimuliert Makrophagen zur Phagozytose und Produktion weiterer Chemokine. (Heinrich et al., 2014).

TNF α wird nach heutigem Kenntnisstand als HE-präzipitierender Faktor verstanden. Patienten mit symptomatischer oder minimaler HE sind anfälliger für Infektionen (Butterworth, 2008). Durch entzündliche Prozesse und durch Leberzelltod kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, darunter auch TNF α . Als Antwort auf erhöhte Spiegel pro-inflammatorischer Zytokine kann das sogenannte *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) ausgelöst werden (Butterworth, 2008) und bei Patienten mit Lebererkrankungen HE-Episoden auslösen (Merli et al., 2013). In HE-Tiermodellen konnte nach pharmakologisch und operativ herbeigeführtem akuten Leberversagen eine erhöhte Expression von TNF α im Gehirn nachgewiesen werden (Jiang et al., 2009). Außerdem wurde in Tierexperimenten gezeigt, dass pro-inflammatorische Zytokine synergistisch mit Ammoniak das GABAerge und das glutamaterge Neurotransmittersystem, wie unter 1.3.1. erläutert, modulieren (Hernández-Rabaza et al., 2016). Über die erhöhten Glutamatkonzentrationen im Extrazellularraum kommt es wiederum zur Aktivierung des NMDA Rezeptors und darüber zu oxidativem und nitrosativem Stress mit den unter 1.2.3 beschriebenen Folgen.

Demgegenüber wurden in post mortem Gewebe von Leberzirrhosepatienten mit HE weder erhöhte Protein- (Zemtsova et al., 2011) noch mRNA-Level (Görg et al., 2013a; Zemtsova et al., 2011) von TNF α gefunden. In diesen Arbeiten wurde post mortem Hirngewebe analysiert, welches aus dem zerebralen Kortex stammt. Daher kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, dass in anderen Hirnregionen die Expression von TNF α verändert ist.

1.3.3 Diazepam

1.3.3.1 Wirkmechanismus und Rolle in der Pathogenese der HE

Diazepam ist ein Sedativum aus der Gruppe der Benzodiazepine. Diese besitzen eine anxiolytische, sedative, antikonvulsive und zentral muskelrelaxierende Wirkung und werden daher z.B. bei Angstzuständen, Panikattacken, Schlafstörungen, epileptischen Anfällen, zentralen Spastiken oder als Prämedikation in der Anästhesie verwendet (Karow and Lang-Roth, 2008). Bislang sind zwei Typen von Benzodiazepinrezeptoren bekannt. Zum einen der zentrale Benzodiazepinrezeptor ($GABA_A$ -Rezeptor), der im ZNS in der Zellmembran von Neuronen exprimiert wird (Zisterer and Williams, 1997), und zum anderen der periphere Benzodiazepinrezeptor (PBR), der in peripheren Zellen sowie im ZNS in den Astrozyten vorwiegend in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (Itzhak et al., 1993). Die oben beschriebenen Wirkungen werden hauptsächlich über eine agonistische Wirkung am zentralen Benzodiazepinrezeptor vermittelt. Die Bindung von Benzodiazepinen an den zentralen Benzodiazepinrezeptor verlängert die Öffnung von Chlorid-Kanälen und verstärkt hierüber die Wirkung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA (Karow and Lang-Roth, 2008). Die Funktion des PBR ist noch nicht vollständig verstanden. Es ist aber bekannt, dass er den Transport von Cholesterol ins Mitochondrium reguliert und damit eine Bedeutung für die Steroidbiosynthese hat. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass die Neurosteroidkonzentration im Liquor von HE-Patienten gegenüber Patienten ohne HE erhöht ist (Keitel et al., 2010)

Daneben ist er auch an der Hämbiosynthese beteiligt und beeinflusst Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose (Zisterer and Williams, 1997)

Bei Patienten mit Leberzirrhose konnte ein verstärktes sedatives Ansprechen, sowie eine Verschlechterung kognitiver Funktionen nach Gabe von Benzodiazepinen im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden (Bakti et al., 1987). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Flumazenil, einem Benzodiazepinrezeptor-Antagonisten, die neurologischen Symptome von HE Patienten verbessern kann (Pomier-Layrargues et al., 1994). Beide Erkenntnisse deuten darauf hin, dass der Aktivierung von Benzodiazepinrezeptoren in der Pathogenese der HE eine bedeutsame Rolle zukommt. Hierbei scheint insbesondere der PBR von besonderer Bedeutung zu sein. Frühere Forschungsergebnisse zeigen, dass sowohl in Gehirnen von Zirrhosepatienten, die im hepatischen Koma verstorben sind, als auch von Tieren mit experimentell erzeugten portosystemischen Shunts eine erhöhte Dichte der Bindungsstellen für $H^3PK11195$, einem endogenen Liganden des PBR vorhanden ist (Giguère et al., 1992; Lavoie and Butterworth, 1993). In Tierversuchen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass es nach portosystemischen Shunts nicht nur zu einer erhöhten Dichte der Bindungsstellen, sondern auch zu einer erhöhten Genexpression des PBR und damit zu einer Hochregulierung dieses Rezeptors kommt (Desjardins et al., 1999).

Der PBR spielt eine wichtige Rolle in der Steroidbiosynthese. Cholesterol wird für die Synthese von Neurosteroiden verwendet, von denen einige als allosterische Modulatoren des $GABA_A$ -Rezeptors

wirken und somit die neuronale Erregbarkeit beeinflussen (Butterworth, 2000). Dies könnte eine mögliche Erklärung für den erhöhten GABAergen Tonus sein, wie er charakteristischerweise bei Patienten mit einer HE auftritt.

Neuere Untersuchungen zeigen zudem, dass Neurosteroidoide potente Liganden des Gallensalzrezeptors TGR5 sind, der im Gehirn von Astrozyten und Neuronen exprimiert wird. Die Aktivierung des TGR5 über Neurosteroidoide erhöht die intrazelluläre Kalziumionenkonzentration, triggert die Synthese von cAMP und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Daher könnte die HE-auslösende Wirkung von Benzodiazepinen auch darauf zurück zu führen sein, dass sie TGR5-vermittelt die Bildung von ROS aktiviert und dadurch wiederum eine Astrozytenschwellung vermittelt. (Keitel et al., 2010).

1.4 Zellkern

Jede eukaryotische Zelle enthält typischerweise einen Zellkern. Ausnahmen sind unter anderem die Erythrozyten, die keinen Zellkern besitzen, oder Skelettmuskelzellen, die mehrere Zellkerne haben.

1.4.1 Aufbau und Funktion

Der Zellkern enthält das genetische Material in Form der DNA, die in Chromosomen organisiert ist. Die Chromosomen liegen zwischen der Zellteilung dekondensiert als Chromatin vor. Der Kern ist von einer Kernhülle umgeben, die Nukleoplasma und Zytosol voneinander trennt. Sie besteht aus einer inneren Membran, der die Kernlamina anliegt, und einer äußeren Membran, die mit dem endoplasmatischen Retikulum der Zelle in Verbindung steht. Die Kernlamina besteht aus fibrillären Proteinen (Laminen), die zu den Intermediärfilamenten gezählt werden. Die Kernhülle enthält Kernporen, über die der Stoffaustausch zwischen Zellkern und Zytosol stattfinden kann. Der Zellkern ist die Steuerungszentrale der Zelle und essentiell für die Weitergabe der DNA bei der Zellteilung und für die Genexpression in verschiedenen Gewebetypen. Um die DNA vollständig an Tochterzellen weitergeben zu können, findet im Zellkern die DNA-Replikation statt. Durch Fehler bei der Replikation und Einwirkungen von Noxen können hierbei Mutationen entstehen, die das genetische Material verändern und Ursache für Erkrankungen sein können. Um in verschiedenen Geweben spezifische Gene exprimieren zu können, werden im Zellkern Teile der DNA in verschiedene RNA-Typen umgeschrieben (Transkription). Hierbei entsteht unter anderem die ribosomale-RNA (rRNA), die einen Baustein der Ribosomen bildet. Die Transkription der rRNA findet im Nukleolus (Kernkörperchen) statt, einer kugeligen membranlosen Struktur im Zellkern. Hier werden neben der Transkription der rRNA die ribosomalen Untereinheiten gebildet. Ein weiterer RNA-Typ ist die sogenannte messenger RNA (mRNA). Sie enthält eine Nukleotidsequenz, die für die spezifische Aminosäuresequenz eines bestimmten Proteins codiert. Nach der Transkription gelangt die mRNA über die Kernporen vom Zellkern ins Zytosol. Hier findet die Translation statt, bei der die Nukleotidsequenz abgelesen und in das jeweilige Protein übersetzt wird. Mutationen der mRNA können daher zu veränderten oder auch funktionsunfähigen Proteinen führen

und damit in der Pathogenese von Krankheiten eine Rolle spielen. (Heinrich et al., 2014; Welsch and Deller, 2010).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass der Zellkern über das Zytoskelett mit der Zellmembran assoziiert ist (Crisp et al., 2006). Auf diese Weise wird der Zellkern innerhalb der Zelle positioniert. Andererseits können über diese physische Verbindung auch mechanische Kräfte, die primär auf die Zellmembran wirken, auf den Zellkern übertragen werden (Stewart et al., 2007).

1.4.2 Rolle in der Pathogenese der HE

Wie in 1.2 und 1.3 bereits erläutert, ist die Pathogenese der HE mit spezifischen Genexpressionsänderungen vergesellschaftet. Bisher ist bekannt, dass sich die Morphologie von Astrozyten im Gehirn bei Leberzirrhosepatienten mit HE in charakteristischer Weise verändert. Interessanterweise zeigen diese sogenannten Alzheimer Typ II Astrozyten auch eine veränderte Zellkernmorphologie (Butterworth, 2010). Die Exposition kultivierter Astrozyten mit HE-relevanten Faktoren induziert nahezu sofortig eine Volumenzunahme der Zellkerne (Lachmann et al., 2013). Demgegenüber sind die Konsequenzen einer längeren Exposition mit HE-relevanten Faktoren im Hinblick auf das Volumen und die Morphologie der Zellkerne völlig unbekannt.

1.5 Zytoskelett

1.5.1 Aufbau und Funktion

Eukaryotische Zellen besitzen ein Gerüst, das aus spezifischen Proteinen gebildet wird, die sich faserartig verbinden und der Zelle Struktur und Stabilität verleihen. Dieses Gerüst wird als Zytoskelett bezeichnet und besteht aus drei verschiedenen Komponenten: den Makrofilamenten (z.B. Aktin), den Intermediärfilamenten (z.B. GFAP) und den Mikrotubuli. Das Zytoskelett erfüllt vielfältige Aufgaben und ist unter anderem an der Erhaltung der Zellform, der Fortbewegung der Zelle, dem intrazellulären Transport, der Zellteilung und der Zelladhäsion beteiligt.

Die Aktinfilamente bestehen aus globulärem (G)-Aktin, welches durch Polymerisation das filamentöse (F)-Aktin bilden. Aktinfilamente polymerisieren und depolymerisieren permanent um dynamisch Umbauprozesse ermöglichen zu können. Aktinfilamente geben der Zelle ihre Form, beteiligen sich an der Ausbildung des kontraktilen Rings bei der Zellteilung, stabilisieren Zellmembranausstülpungen wie z.B. Mikrovilli und wirken bei der Zellkontraktion und dem intrazellulären Vesikeltransport mit.

Die Intermediärfilamente sind vor allem für die Stabilität der Zellen verantwortlich und verleihen ihnen Zugfähigkeit und Elastizität. Im Gegensatz zu den Aktinfilamenten unterliegen sie keinem dynamischen Auf- und Abbau, sondern bleiben nach Ausdifferenzierung weitestgehend stabil. Eine Ausnahme sind die unter 1.4.1 bereits erwähnten Lamine, die bei jeder Zellteilung ab und wieder neu aufgebaut

werden. Intermediärfilamente werden oft gewebsspezifisch exprimiert. In den Astrozyten wird beispielsweise das GFAP exprimiert.

Die dritte Gruppe des Zytoskeletts bilden die Mikrotubuli. Sie verleihen der Zelle ebenfalls Stabilität und sind für die Motilität von Zellen bedeutsam. Mikrotubuli treten unter anderem als Hauptbestandteil von Kinozilien auf, die beispielsweise im Respirationstrakt vorkommen. Ähnlich wie die Aktinfilamente unterliegen auch sie einem dynamischen Umbau. Während der Zellteilung wird aus ihnen der Spindelapparat aufgebaut, der für die Trennung der Schwesterchromatiden verantwortlich ist. (Heinrich et al., 2014; Müller-Esterl, 2010; Welsch and Deller, 2010).

1.5.2 Rolle in der Pathogenese der HE

Bisherige Forschungsergebnisse belegen, dass eine mechanische Kopplung zwischen Zellkern und Zytoskelett existiert (siehe Abb.3) (Stewart et al., 2007). Die aus Laminen bestehende Kernlamina ist über den sogenannten LINC-Komplex (*linker of nucleoskeleton and cytoskeleton*) mit den Aktin- und Intermediärfilamenten der Zelle verbunden (siehe Abb. 3). Der LINC-Komplex wird aus Proteinen der Inneren Kernmembran (Sun-Proteinen) und Proteinen der äußeren Kernmembran (Nesprine) gebildet (Haque et al., 2006; Padmakumar et al., 2005). Die Sun-Proteine interagieren auf der einen Seite mit A-Typ Laminen und auf der anderen Seite mit den Nesprinen, die wiederum mit Aktin- bzw. Intermediärfilamenten verbunden sind (Crisp et al., 2006).

Bereits bekannt ist, dass eine akute Hyperammonämie zu einer verminderten Genexpression von GFAP in kultivierten Rattenastrozyten führt (Norenberg et al., 1990) und dies in Ratten mit portosystemischen Shunts zusätzlich mit einem erhöhten Hirnwassergehalt einhergeht (Bélanger et al., 2002). Letzteres deutet darauf hin, dass das Zytoskelett der Astrozyten möglicherweise deren volumenregulatorische Kapazität beeinflusst und Expressionsänderungen von GFAP an der Ammoniak-induzierten Astrozytenschwellung mitbeteiligt sind (Bélanger et al., 2002). Des Weiteren wurde in einer vorherigen Studien gezeigt, dass eine Hyperammonämie eine verminderte Expression von F-Aktin zur Folge haben kann (Bodega et al., 2006). In wie weit erhöhte Ammoniakspiegel neben ihrem Einfluss auf die Expression der Intermediär- und Aktinfilamente die Zellkernmorphologie kultivierter Astrozyten modulieren und ob Veränderungen des Zytoskeletts und des Zellkerns über den LINC-Komplex miteinander zusammenhängen ist derzeit noch nicht erforscht.

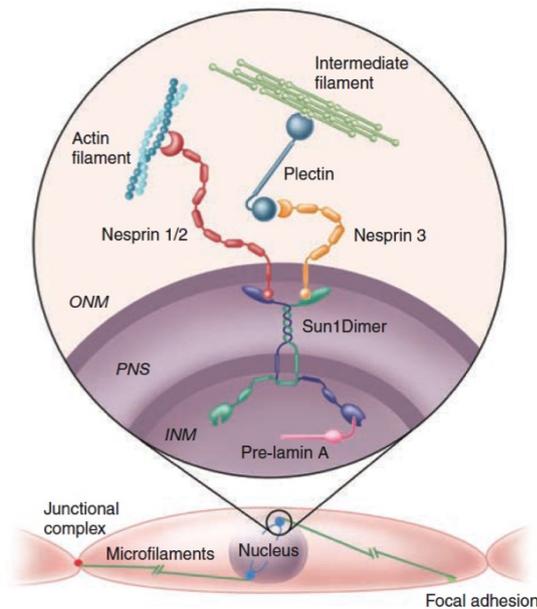


Abb. 3: Mechanische Kopplung von Zellkern und Zytoskelett. Über den LINC-Komplex, bestehend aus Nesprinen (Proteinen der äußeren Kernmembran (ONM)) und Sun-Proteinen (Proteinen der Inneren Kernmembran (INM)) ist der Zellkern physikalisch an die Aktin- und Intermediärfilamente des Zytoskeletts gekoppelt (aus Stewart et al., 2007). Gedruckt mit der Erlaubnis von AAAS.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war, Effekte einer Langzeitexposition kultivierter Rattenastrozyten mit HE-präzipitierenden Faktoren (Ammoniak, TNF α und Diazepam) auf das Zellkernvolumen und die Zellkernmorphologie der Astrozyten zu untersuchen. Des Weiteren sollten die den Volumen- und Morphologieänderungen des Zellkerns zugrundeliegenden Mechanismen identifiziert werden. Hierfür sollte insbesondere untersucht werden, ob Zellkernmorphologie- und Volumenänderungen mit einer veränderten Expression des Makrofilaments Aktin und des Intermediärfilaments GFAP einhergehen. Zum anderen sollte analysiert werden, ob die Ammoniak-induzierten Effekte auf Zytoskelett und Zellkern Glutaminsynthese-abhängig sind, oder durch pH-Wert Änderungen vermittelt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper

<u>Primärantikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
Anti-GFAP, monoklonal	Maus	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	1:100
Anti-GFAP, polyklonal	Kaninchen	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	1:200

<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Spezies</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
Anti-Maus, FITC-konjugiert	Esel	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:100
Anti-Kaninchen, FITC-konjugiert	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland	1:200
Hoechst34580	-	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland	1:5000
Phalloidin, TRITC-konjugiert	-	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	1:200 (Latrunculin B) oder 1:400 (NH ₄ Cl)

2.1.2 Chemikalien

<u>Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA	PAA-Laboratories, Linz, Deutschland
Digitonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
FCS	PAA, Linz, Deutschland
Hoechst34580	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Immersionsöl (F518)	Zeiss, Jena, Deutschland
Latrunculin B	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland

Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	Cytogen, Sinn, Deutschland
Penizillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Syto11	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton-X 100	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

<u>Verbrauchsmaterial</u>	<u>Hersteller</u>
Ibidi-Schale (35mm, Plastik)	Ibidi, Planegg, Deutschland
Glaspipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg, Deutschland
Stripetten (5, 10, 25ml)	Corning Costar GmbH, Bodenheim, Deutschland
Zellkulturflasche (Cellstar)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen (100mm)	Falcon, Heidelberg, Deutschland

2.1.4 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller</u>
Brutschrank (Heracell150)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Cell Observer (Z1)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
ELYRA (PS1)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
VivaTome™ Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
konfokales Laserscanning Mikroskop (LSM880)	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus dem zerebralen Rattenkortex

Die Astrozyten wurden aus den Großhirnhemisphären neugeborener Wistar-Ratten gewonnen (Aktenzeichen des Organentnahmeprojekts der ZETT: O78/08). Nach der Dekapitation wurde der Schädel für 10 Sekunden in eine 70%ige Ethanollösung gelegt und nachfolgend die Kopfhaut entfernt.

Nach Eröffnung des Schädels erfolgte die Gehirnentnahme. Die beiden Großhirnhemisphären wurden mit Hilfe einer Stereolupe entlang der Sagittallinie getrennt und die Meningen mit zwei Pinzetten entfernt. Anschließend wurden die beiden Hemisphären mit einem Skalpell und einer gebogenen Pinzette zerkleinert, in 10ml DMEM + 10% Penicillin/Streptomycin + 10% FCS gegeben und 1 min bei 1500 U/min zentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Gewebepellet sowie die Zellsuspension in 2ml frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Das Zellmedium wurde anschließend mehrmals mit sterilen Pasteurpipetten trituiert.

Nach der Zugabe von 8ml DMEM (1000mg/l D-Glucose, 10% FCS) wurde die Suspension durch eine Nylongaze mit 60µm Maschenweite filtriert und das Filtrat auf zwei Gewebeflaschen verteilt. Die beiden Gewebeflaschen wurden mit Zellkulturmedium auf 20ml aufgefüllt und 7 Tage im Brutschrank bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 10% und einer Wasserdampfsättigung von 95% kultiviert.

Zur Entfernung von Fremdzellen wie Mikroglia, Oligodendrozyten und Neuronen wurden die Flaschen 24 Stunden bei 200U/min geschüttelt.

Nachdem sich auf der Wachstumsfläche eine konfluente Astrozytenkultur gebildet hatte, wurden die Zellen durch Inkubation mit einer EDTA/Trypsin Lösung abgelöst und auf zwei neue Flaschen gesplittet. Das Zellkulturmedium wurde dreimal die Woche gewechselt und das Zellwachstum am Phasenkontrastmikroskop kontrolliert.

Die Astrozyten wurden durch Mitarbeiter des Instituts präpariert.

2.2.2 Zellkultur

Zur Messung des Volumens und der Morphologie der Zellkerne wurden Astrozyten auf Ibidi-Schalen ausgesät und für weitere 5 bis 7 Tage kultiviert.

2.2.2.1 Stimulation der Astrozyten

Nach Kultivierung wurden die Astrozyten mit verschiedenen Substanzen (s.u.) inkubiert. Für die unterschiedlichen Versuchsreihen wurden 3 bis 4 verschiedene Präparationen verwendet. Zur Vorbereitung für die Stimulation wurden die Zellen dreimal mit 2ml Zellmedium (DMEM (1000mg/l D-Glucose + Pyruvat) ohne FCS) gewaschen und anschließend 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen.

2.2.2.2 Experimentelle Behandlung der Zellen mit HE-präzipitierenden Faktoren

Um die Auswirkungen HE-präzipitierender Faktoren auf Zellkernvolumen und Morphologie zu untersuchen wurden Astrozyten mit den nachfolgenden Substanzen für jeweils 24, 48, 72, 120 und 168 Stunden inkubiert:

1. NH_4Cl (5mM)
2. $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml)
3. Diazepam (10 μM)

Als Kontrollgruppe wurde eine Ibidi-Schale unbehandelt belassen. Im Fall von Diazepam, welches in DMSO gelöst wurde, wurde die Kontrollgruppe mit der gleichen Menge DMSO behandelt, um einen Eigeneffekt des Vehikels auszuschließen.

Um zu untersuchen, ob eine simultane Stimulation von NH_4Cl mit $\text{TNF}\alpha$ bzw. Diazepam spezifische Veränderungen des Zellkernvolumens und der Morphologie vermittelt, wurden Astrozyten für 72 Stunden mit folgenden Substanzen inkubiert:

1. $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) + NH_4Cl (5mM)
2. Diazepam (10 μM) + NH_4Cl (5mM)

Eine unbehandelte bzw. eine mit DMSO behandelte Kontrollgruppe wurden mituntersucht. Zusätzlich wurde eine Gruppe mit NH_4Cl (5mM) bzw. NH_4Cl (5mM) + DMSO inkubiert.

Methylammoniumchlorid ($\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$) induziert in kultivierten Astrozyten Veränderungen des intrazellulären pH-Werts, wie sie auch durch NH_4Cl vermittelt werden. $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ wird aber im Gegensatz zu NH_4Cl nur in sehr geringem Maß in Glutamin umgewandelt. Um zu untersuchen, ob es sich bei Ammoniak-induzierten Veränderungen von Zellkernvolumen- und Morphologie um Folgen von pH-Wert-Verschiebungen oder der Glutaminbildung handelt, wurden die Astrozyten für 168 Stunden mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) behandelt, oder blieben unbehandelt (Kontrolle).

2.2.2.3 Konzentrationsabhängigkeit Ammoniak-vermittelter Änderungen von Zellkernvolumen- und Morphologie

Die Konzentrationsabhängigkeit der durch NH_4Cl induzierten Volumen- und Morphologieänderungen der Zellkerne wurde an Astrozyten untersucht, die mit 1, 2,5 oder 5mM NH_4Cl für 168h inkubiert wurden. Die Kontrollen wurden für den gleichen Zeitraum unbehandelt gelassen.

2.2.2.4 Anfärbung der Zellkerne

Nach Ablauf des jeweiligen Inkubationszeitraums wurden die Zellen mit dem Zellkernfarbstoff Syto11 (5µM) für 10 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend durch dreimaliges Waschen mit 2ml Zellkulturmedium (DMEM, 1000mg/l D-Glucose + Pyruvat, ohne FCS) entfernt. Nachfolgend wurde wieder 2ml Syto11-freies und das jeweilige Stimulans enthaltende Zellkulturmedium (DMEM, 1000mg/l D-Glucose + Pyruvat, ohne FCS) auf die Zellen gegeben.

2.2.3 Messung mittels VivaTome™ Mikroskopie

2.2.3.1 Prinzip

Die Aufnahmen der Zellkerne wurden mittels VivaTome™ Mikroskopie erstellt. Hierbei handelt es sich um eine Mikroskopiertechnik mit der sich dynamische Prozesse an lebenden Organismen mit hoher zeitlicher Auflösung darstellen lassen. Mit dieser Methode können Schnittbilder mit einer Aufnahmefrequenz von bis zu 30 Bildern pro Sekunde aufgenommen werden. Das VivaTome™ Mikroskop verwendet eine Kaltlichtquelle und kann somit die Proben besonders schonend anregen. Die hohe Anregungs- und Emissionseffizienz wird bei der VivaTome™ Mikroskopie durch eine sich schnell drehende Scheibe, auf der ein Gittermuster angebracht ist, möglich. Durch die Scheibe gelangt sowohl das Anregungslicht als auch das Emissionslicht. Das Emissionslicht der Fokusebene und 50 Prozent des Lichts, welches von außerhalb der Fokusebene stammt, passieren die Scheibe und werden detektiert. Die anderen 50 Prozent der außerhalb der Fokusebene liegenden Emission werden an der Unterseite der Scheibe reflektiert und separat detektiert. Die Emissionsintensitäten der einzelnen Pixel in beiden Bildern werden voneinander subtrahiert und hierdurch wird ein optischer Schnitt erzeugt. Durch die oben beschriebenen Eigenschaften ist die Viva Tome Mikroskopie ideal geeignet um dynamische Prozesse auf zellulärer Ebene, wie z.B. Zellkernvolumenänderungen, zu erfassen.

2.2.3.2 Durchführung

Während der Messungen wurden Bilderstapel der auf Ibidi-Schalen ausgesäten, stimulierten und angefärbten Zellkerne aufgenommen. Pro Ibidi-Schale wurden 10 – 12 verschiedene Bereiche aufgenommen, und dadurch pro Schale Bilderstapel von etwa 20 – 40 Zellkernen gewonnen. Sowohl für die Kontrollgruppe, als auch die experimentell behandelte Gruppe wurden drei bis vier unterschiedliche Präparationen verwendet, sodass pro Versuchsreihe ca. 60 bis 120 Zellkerne für die jeweilige experimentelle Bedingung aufgenommen wurden.

2.2.4 Auswertung der durch VivaTome™ Mikroskopie erhaltenen Bilder

2.2.4.1 Volumenberechnung und Erfassung der Zellkernmorphologie

Die Volumenberechnung und Erfassung der Zellkernmorphologie wurden mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogrammes ImageJ (Wayne Rasband, NIH, USA) vorgenommen. Hierbei wurden computerassistent das Zellkernvolumen und zweidimensionale Parameter zur Untersuchung der Zellkernmorphologie (maximale Fläche, maximaler Umfang und Zirkularität) jedes einzelnen Kernes berechnet.

2.2.5 Untersuchung des Zytoskeletts

Um die Auswirkungen HE-auslösender Faktoren auf das Zytoskelett der Zelle zu untersuchen wurden Astrozyten für 168 Stunden nach unter 2.2.2.1 beschriebenem Protokoll mit folgenden Substanzen experimentell behandelt:

1. NH_4Cl (1mM) 168h, 192h
2. NH_4Cl (5mM) 72h, 96h, 168h, 192h
3. NH_4Cl (1mM) 168h + 24h Washout (WO)
4. NH_4Cl (5mM) 168h + 24h Washout (WO)
5. $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) 168h
6. Diazepam (10 μM) 168h
7. $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) 168h

Zusätzlich wurden eine unbehandelte Kontrolle und eine mit DMSO behandelte Gruppe mituntersucht. Für den Washout- (WO) Versuch wurden die Astrozyten nach 168 Stunden dreimal mit Zellmedium (DMEM (1000mg/l D-Glucose + Pyruvat) ohne FCS) gewaschen und für weitere 24 Stunden inkubiert.

2.2.5.1 Anfärbung von polymerisiertem Aktin mittels Phalloidin-TRITC

Phalloidin ist ein Toxin aus dem Knollenblätterpilz *Amanita phalloides*. Es bindet irreversibel an polymerisierte Aktinfilamente (F-Aktin) und verhindert deren Depolymerisierung (Welsch and Deller, 2010). Fluoreszenzmarkierte Phalloidinderivate können genutzt werden, um das F-Aktin des Zytoskeletts in fixierten Zellen zu visualisieren.

Zur Validierung der Methode wurden Astrozyten zunächst für 2 Stunden mit Latrunculin B (10 μM), das die Polymerisierung des monomeren G-Aktins zum filamentösen F-Aktin hemmt (Welsch and Deller, 2010) und somit die Reorganisation des Zytoskeletts in der Zelle inhibiert, stimuliert. Das

Aktinzytoskelett der mit Latrunculin B (10 μ M), NH₄Cl (5mM), TNF α (10ng/ml), Diazepam (10 μ M) oder CH₃NH₃Cl (5mM) inkubierten Zellen, sowie unbehandelter Astrozyten wurde wie folgt angefärbt:

Die Zellen wurden am Ende des Experiments mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Für die Fixierung wurden die Zellen für 5 min mit frisch hergestelltem PFA (4%) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend dreimal mit PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Phalloidin-TRITC (Tetramethylrhodamin B Isothiocyanat) (1:200 für Latrunculin B und 1:400 für die übrigen Zellen) und dem Zellkernfarbstoff Hoechst34580 (1:5000) (in PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺) + 0,1% Triton X angesetzt) inkubiert und 20 Minuten in Aluminiumfolie lichtgeschützt bei RT inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit 2ml PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen. Für diese Färbung und jede experimentelle Bedingung wurden jeweils drei verschiedene Präparationen verwendet.

2.2.5.2 Immunfluoreszenzanalyse

Mittels Immunfluoreszenzanalysen können Proteine in Zellen und Geweben visualisiert und lokalisiert werden. Dazu werden ein Primär- und ein Sekundärantikörper verwendet. In Abhängigkeit davon, ob ein mono- oder polyklonaler Antikörper verwendet wird, bindet der Primärantikörper ein Epitop oder mehrere Epitope das/die spezifisch für das jeweilige Protein ist/sind. Der Sekundärantikörper, der mit einem Fluorochrom markiert ist, bindet an spezifische Epitope des Primärantikörpers. Werden die Fluorochrome mit einer für sie charakteristischen Wellenlänge angeregt, kann das emittierte Licht bei einer für den Farbstoff spezifischen Wellenlänge als Fluoreszenz detektiert werden.

Zur Anfärbung astrozytärer Intermediärfilamente wurden die unter 2.2.5 beschriebenen behandelten und unbehandelten Astrozyten nach Ablauf des Experiments mit 4% PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Primärantikörper gegen GFAP (in 10%iger BSA + 0,1% Triton X in PBS w/o Ca²⁺/Mg²⁺ angesetzt) behandelt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Nach Inkubation wurden die Astrozyten dreimal mit PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺) gewaschen, um den Primärantikörper auszuwaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper und dem Zellkernfarbstoff Hoechst34580 (in oben genannter 10%iger BSA Lösung angesetzt) behandelt und in Aluminiumfolie bei RT zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Sekundärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS (w/o Ca²⁺/Mg²⁺) ausgewaschen. Für die Färbungen wurden pro Versuchsreihe drei bis sechs verschiedene Präparationen verwendet.

Pro Präparation wurden 1-3 repräsentative Aufnahmen mittels Epifluoreszenzmikroskopie angefertigt. Die Fluoreszenzintensität der Bilder wurde mit Hilfe des Bildverarbeitungsprogramms ImageJ gemessen und auf die Anzahl der Kerne normiert.

2.2.6 ELYRA-Superhochauflösende Mikroskopie

In der vorliegenden Arbeit wurde die „*super resolution structured illumination microscopy*“ (SR-SIM) Mikroskopiertechnik angewendet. Mit der superhochauflösenden strukturierten Beleuchtung kann die

optische Auflösung im Vergleich zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie verdoppelt werden. Hierfür wurden Astrozyten verwendet, die auf Ibidi-Schalen (ibidi μ -dishes, \varnothing 35mm, high, plastic polymer coverslip, ibidi Corporation, Martinsried, Germany) ausgesät wurden. Die Aufnahmen wurden mit einem ELYRA-Mikroskop (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) unter Verwendung eines alpha „Plan-Fluar“ 100x/1,45 Oil M27 Objektivs und Immersionsöl vom Typ 518F/30°C (ZEISS, Oberkochen, Germany) angefertigt. Als Anregungswellenlängen wurden Laser der Wellenlängen 488, 561 und 405nm verwendet. Die Emission der Fluorochrome wurde in den Welllängenbereichen 495-575nm+LP750nm, 570-650nm+LP750nm, 420-480nm+LP750nm gesammelt. Die Rohbilder wurden nachfolgend mittels ZEN-Software (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers prozessiert. Die Aufnahmen mittels ELYRA-Superhochauflösender Mikroskopie wurden von Dr. Boris Görg angefertigt.

2.2.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Das konfokale Mikroskop benutzt zur Anregung des Fluorochroms einen Laser, der auf eine Anregungslochblende fokussiert wird. Der Strahl trifft über einen Farbteiler auf zwei Scanspiegel, die ihn durch das Objektiv auf das Objekt abbilden. Das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht wird wieder durch das Objektiv gesammelt und über die Scanspiegel und den Farbteiler auf eine Detektionslochblende abgebildet. Hinter der Detektionslochblende befindet sich ein Lichtdetektor, der das emittierte Licht farbselektiv und punktweise abbildet. Um die gesamte Probenebene abbilden zu können, wird der Laserstrahl mit Hilfe der Scanspiegel über die Probe geführt. Es werden nur die Signale detektiert, die sich innerhalb der Bildebene des Laserstrahls befinden, da nur sie ihren Brennpunkt an der Detektionslochblende haben. Auf diese Weise werden Strahlen aus höheren oder tieferen Schichten ausgeblendet. Dadurch wird verhindert, dass die Fokusebene wie beim Lichtmikroskop von anderen Ebenen überlagert wird. (Carl Zeiss Microscopy GmbH). In der vorliegenden Arbeit wurden Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop LSM880 der Firma ZEISS (Oberkochen, Deutschland) unter Verwendung eines alpha „Plan-Apochromat“ 63x/1,40 M27 Öl und Immersionsöl vom Typ 518F (ZEISS, Oberkochen, Germany) erstellt. Die Anregung der Fluorochrome erfolgte unter Verwendung von Lasern der Wellenlängen 405, 488 und 543nm. Die Emission der Fluorochrome wurde in den Welllängenbereichen 410-503nm, 493-529nm und 548-669nm detektiert. Die Aufnahmen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Boris Görtg angefertigt.

2.2.8 Epifluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe des Epifluoreszenzmikroskops CellObserver Z.1 (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) wurden mit Fluorochromen markierte Zellbestandteile visualisiert. Als Lichtquelle wurde eine Quecksilber-

Kurzbogen-Reflektor-Lampe genutzt (HXP120, Osram), welche Licht über das gesamte sichtbare Spektrum, sowie im UV-Bereich emittiert. Über optische Filter wurde der Bereich des Lichtspektrums selektiert, mit dem das jeweilige Fluorochrom angeregt und die Emission gesammelt wurde. Die Exzitation und Detektion der Emission der Fluorochrome erfolgte in den Welllängenbereichen 335-383/420-470nm, 488-512/520-550nm und 538-562/570-640nm. Die Detektion erfolgte unter Verwendung der Objektive EC PlnN 10x/0,3 Ph1 DIC und LD LCI PlnApo 25x/0,8 (ZEISS, Oberkochen, Germany).

2.2.9 Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das bei Zellschädigung vermehrt freigesetzt wird. Da erhöhte LDH-Werte auf einen vermehrten Zelluntergang hinweisen, wird die LDH-Messung als Toxizitätstest verwendet.

Für die LDH-Bestimmung wurden Astrozyten auf Ibidi-Schalen nach unter 2.2.2.1 beschriebenem Schema für 168h mit NH_4Cl (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Am Ende des Inkubationszeitraums wurde das Zellmedium jeder einzelnen Ibidi-Schale abgenommen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und dieses auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur Überprüfung der Funktionalität des Assays wurde die LDH-Aktivität im Astrozytenlysate gemessen.

Das Testprinzip beruht dabei auf der enzymatischen Umsetzung von Pyruvat nach Laktat, die proportional zur Umsetzung von NADH nach NAD^+ ist. Die LDH-Aktivität wurde photometrisch durch Messen der NAD^+ -Absorption bei einer Wellenlänge von 366nm bestimmt. Die Messung der LDH-Aktivität wurde freundlicherweise von Nicole Eichhorst (biologisch/technische Assistentin) durchgeführt.

2.2.10 Propidiumiodid-Färbung

Propidiumiodid (PI) ist ein rotfluoreszierender Zellkernfarbstoff, der die Zellmembran von sterbenden oder toten Zellen durchdringen kann und so die Zellkerne anfärbt. Digitonin gehört zur Gruppe der Saponine. Es permeabilisiert die Zellmembran und macht sie für PI durchlässig. Intakte Zellmembranen können von PI nicht passiert werden. Durch die gleichzeitige Anfärbung der Zellkerne mit Hoechst34580 können auf diese Weise lebende von toten Zellen unterschieden werden.

Für den Versuch wurden Astrozyten auf Ibidi-Schalen wie unter 2.2.2.1 beschriebenen für 168h mit NH_4Cl (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Am Ende des Experiments wurden die Zellen mit den Zellkernfarbstoffen Hoechst34580 (1:5000) und PI (50 μM) für 20 Minuten im Brutschrank

inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen dreimal mit 2ml PBS (w/o $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen. Anschließend wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie repräsentative Aufnahmen angefertigt. Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, deren Zellmembran durch Inkubation mit Digitonin (60mg/ml) in Gegenwart von Hoechst34580 (1:5000) und Propidiumiodid (50 μM) permeabilisiert wurde.

2.2.11 Statistik

Für den Vergleich von Volumen und Morphologie der Zellkerne zwischen der jeweiligen Kontrollgruppe und den mit HE-auslösenden Faktoren inkubierten Astrozyten wurden zweiseitige, ungepaarte t-Tests, bzw. der one way-ANOVA verwendet (GraphPad Prism 5.01.336). Mit Hilfe des Grubbs Outlier Tools (GraphPad, La Jolla, USA) wurden Zellkerne, die signifikant ($p < 0,05$) vom Mittelwert der jeweiligen Gruppe abwichen ausgeschlossen. Die statistische Analyse der Immunfluoreszenzintensitäten und der LDH-Aktivität erfolgte mittels zweiseitigem t-Test für ungepaarte Stichproben (GraphPad Prism 5.01.336, La Jolla, USA).

Ab einem Signifikanzniveau kleiner 5% ($p < 0,05$) wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen als statistisch signifikant bewertet. Jedes Experiment wurde mit Astrozyten aus mindestens drei unabhängigen Präparationen durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Effekte HE-auslösender Faktoren auf Zellkernvolumen und Zellkernmorphologie

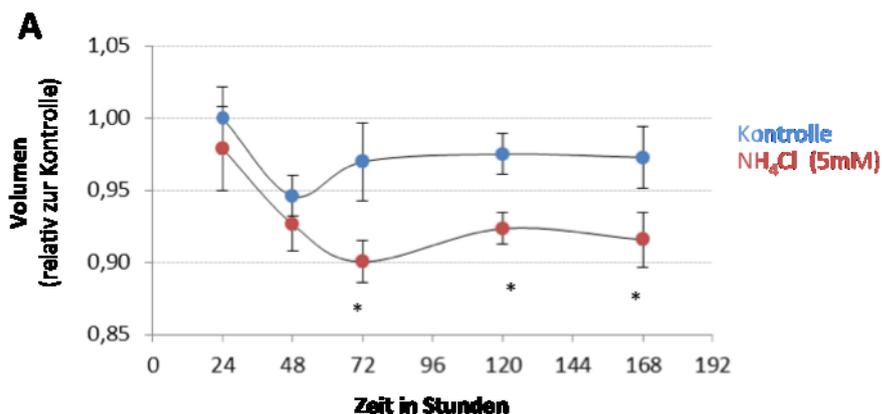
Die Wirkungen der in dieser Arbeit verwendeten HE-auslösenden Faktoren (NH_4Cl , $\text{TNF}\alpha$, Diazepam) ergaben unterschiedliche Einflüsse auf das Zellkernvolumen und die Zellkernmorphologie kultivierter Rattenastrozyten.

3.1.1 Effekte von Ammoniak

3.1.1.1 Zellkernvolumen

Wie in Abb. 4 dargestellt wurden in den mit NH_4Cl (5mM) inkubierten Astrozyten nach 24 und 48 Stunden keine signifikanten Unterschiede im Zellkernvolumen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet. Nach 72 Stunden wurde eine signifikante Volumenabnahme der Zellkerne um ca. 7,2% in den mit NH_4Cl (5mM) inkubierten Zellen gegenüber der Kontrollgruppe gemessen ($p < 0,05$). Nach 120 Stunden zeigte sich ebenfalls eine signifikante Volumenabnahme der Zellkerne der mit NH_4Cl (5mM) inkubierten Astrozyten. Diese lag bei ca. 5,3% ($p < 0,01$) gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Nach 168 Stunden wurde eine signifikante Volumenabnahme der Kerne der NH_4Cl -exponierten Astrozyten um 5,9% gemessen ($p < 0,05$).

Die Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit der durch NH_4Cl -induzierten Zellkernvolumenänderungen zeigte nach 168 Stunden signifikante Zellkernvolumenabnahmen in den mit 2,5 und 5mM NH_4Cl inkubierten Astrozyten um 7,6% bzw. 5,9%.



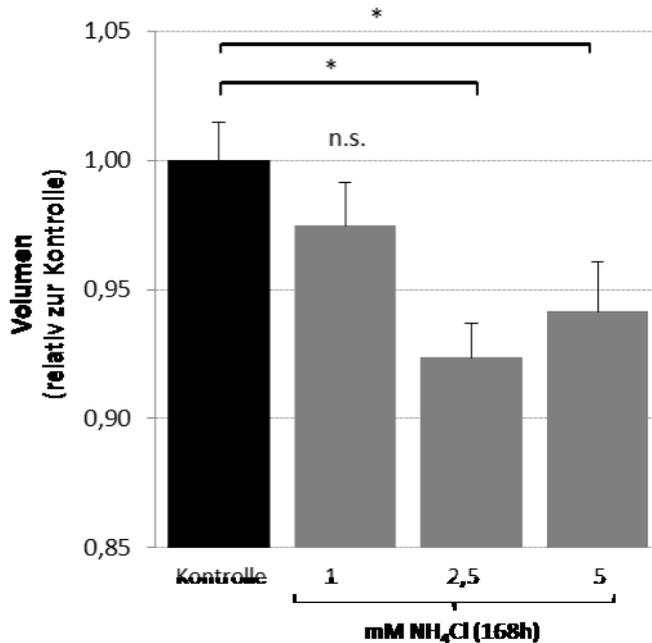
B

Abb. 4 Effekte von NH₄Cl auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten. (A) Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 24, 48, 72, 120 oder 168h mit NH₄Cl (5mM) behandelt oder blieben unbehandelt. Das Zellkernvolumen unbehandelter Astrozyten zum Zeitpunkt 24h wurde gleich 1 gesetzt und die Volumenänderungen in Relation dazu ausgedrückt. **(B)** Kultivierte Astrozyten wurden mit NH₄Cl in den angegebenen Konzentrationen für 168h behandelt oder blieben unbehandelt. Das Zellkernvolumen der Kontrolle zum Zeitpunkt 168h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen in den mit NH₄Cl inkubierten Astrozyten in Relation dazu ausgedrückt. Die verschiedenen Konzentrationen wurden jeweils mit der Kontrollgruppe verglichen. * Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$). n.s.: Nicht signifikant gegenüber der Kontrolle. n=3-4

3.1.1.2 Fläche

Gemessen wurde, als zweidimensionaler Parameter, der Flächeninhalt im Bereich der maximalen Fläche der Zellkerne.

Wie in Abb. 5 dargestellt wurde an jedem gemessenen Zeitpunkt (24, 48, 72, 120 und 168 Stunden) eine signifikante Verminderung der maximalen Fläche der Zellkerne in mit NH₄Cl (5mM) inkubierten Astrozyten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Nach 24 Stunden lag die Flächenabnahme bei 9,4% ($p < 0,05$), nach 48 Stunden bei 10,1% ($p < 0,001$) und nach 72 Stunden bei 17,0% ($p < 0,001$). Zum Zeitpunkt 120 Stunden wurde eine erniedrigte maximale Fläche um 6,7% ($p < 0,001$) gemessen. Nach 168 Stunden zeigte sich mit 20,4% ($p < 0,001$) im Beobachtungszeitraum das Maximum der Flächenabnahme im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Die Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit der durch NH₄Cl-induzierten Veränderungen der maximalen Fläche der Zellkerne zeigte nach 168 Stunden signifikante Abnahmen der maximalen Zellkernfläche in den mit 1, 2,5 und 5mM NH₄Cl inkubierten Astrozyten um 4,9% ($p < 0,05$) bzw. 10,3% ($p < 0,001$) bzw. 20,4% ($p < 0,001$).

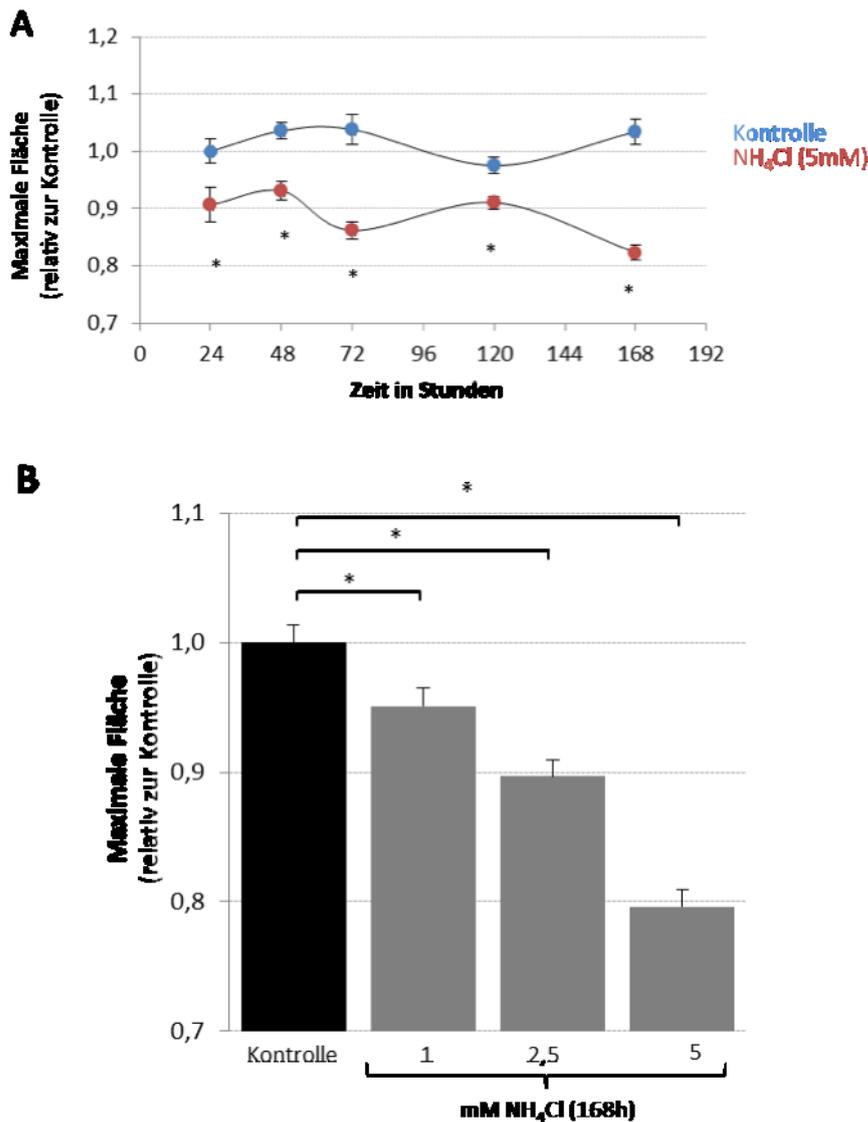


Abb. 5 Effekte von NH₄Cl auf die maximale Zellkernfläche kultivierter Rattenastrozyten. **(A)** Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 24, 48, 72, 120 oder 168h mit NH₄Cl (5mM) behandelt oder blieben unbehandelt. Die maximale Fläche der Zellkerne unbehandelter Astrozyten zum Zeitpunkt 24h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen der maximalen Fläche der Zellkerne in den mit NH₄Cl inkubierten Astrozyten in Relation dazu ausgedrückt. **(B)** Kultivierte Astrozyten wurden mit den angegebenen NH₄Cl-Konzentrationen für 168h inkubiert oder blieben unbehandelt. Die maximale Zellkernfläche in den Kontrollen zum Zeitpunkt 168h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen in den mit NH₄Cl inkubierten Astrozyten in Relation dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle (p<0,05). n=3-4

3.1.1.3 Umfang

Gemessen wurde der Umfang im Bereich der maximalen Fläche der Zellkerne.

Wie in Abb. 6 dargestellt wurde 48, 72, 120 und 168 Stunden nach NH₄Cl-Exposition eine signifikante Verminderung des größten Umfangs der Zellkerne der mit NH₄Cl (5mM) inkubierten Astrozyten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gemessen. Nach 24 Stunden zeigte sich bereits eine deutliche tendenzielle Abnahme des Kernumfangs (p=0,052). Nach 48 Stunden war der Kernumfang um 4,4% (p<0,001), nach 72 Stunden um 8,4% (p<0,001), nach 120 Stunden um 3,9% (p<0,001) und nach 168 Stunden um 11,9% (p<0,001) gegenüber unbehandelten Kontrollen verringert.

Die Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit der durch NH_4Cl -induzierten Veränderungen des maximalen Umfangs der Zellkerne zeigte nach 168 Stunden signifikante Abnahmen des maximalen Zellkernumfangs in den mit 1, 2,5 und 5mM NH_4Cl inkubierten Astrozyten um 2,4% ($p < 0,05$) bzw. 5,6% ($p < 0,001$) bzw. 11,9% ($p < 0,001$).

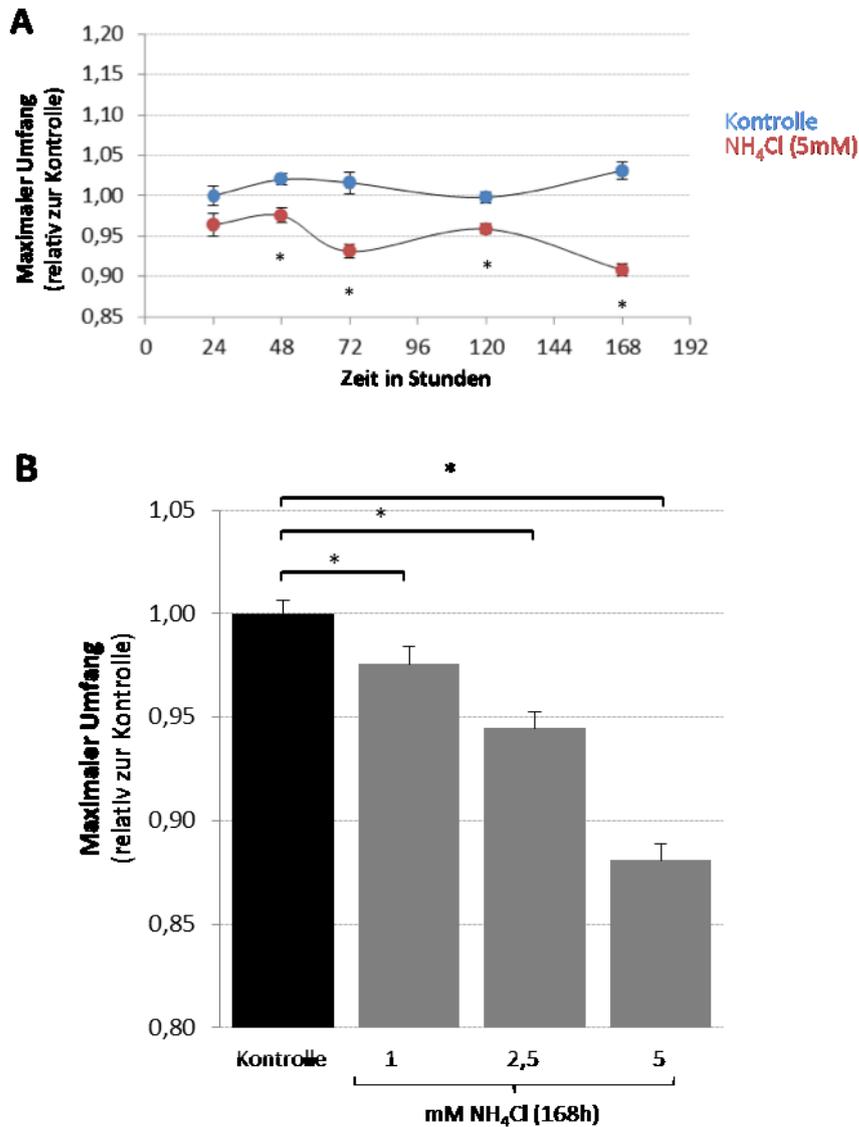


Abb. 6 Effekte von NH_4Cl auf den maximalen Zellkernumfang kultivierter Rattenastrozyten. **(A)** Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 24, 48, 72, 120 oder 168h mit NH_4Cl (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Der maximale Umfang der Zellkerne unbehandelter Astrozyten zum Zeitpunkt 24h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen des maximalen Umfangs der Zellkerne in den mit NH_4Cl inkubierten Astrozyten in Relation dazu ausgedrückt. **(B)** Kultivierte Astrozyten wurden mit NH_4Cl in den angegebenen Konzentrationen für 168h inkubiert oder blieben unbehandelt. Der maximale Umfang der Kontrolle zum Zeitpunkt 168h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen in den mit NH_4Cl inkubierten Astrozyten in Relation dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$). n=3-4

3.1.1.4 Zirkularität

Die Zirkularität beschreibt als zweidimensionaler Parameter die Kreisförmigkeit des Zellkerns, wobei der Wert 1 einem Kreis entspricht.

Wie in Abb. 7 dargestellt wurde bei den mit NH_4Cl (5mM) inkubierten Zellen nach 24 Stunden eine signifikante Abnahme der Zirkularität der Zellkerne um 3,4% ($p < 0,01$) und nach 48 Stunden eine deutliche Tendenz zu einer Abnahme ($p = 0,057$) im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen beobachtet.

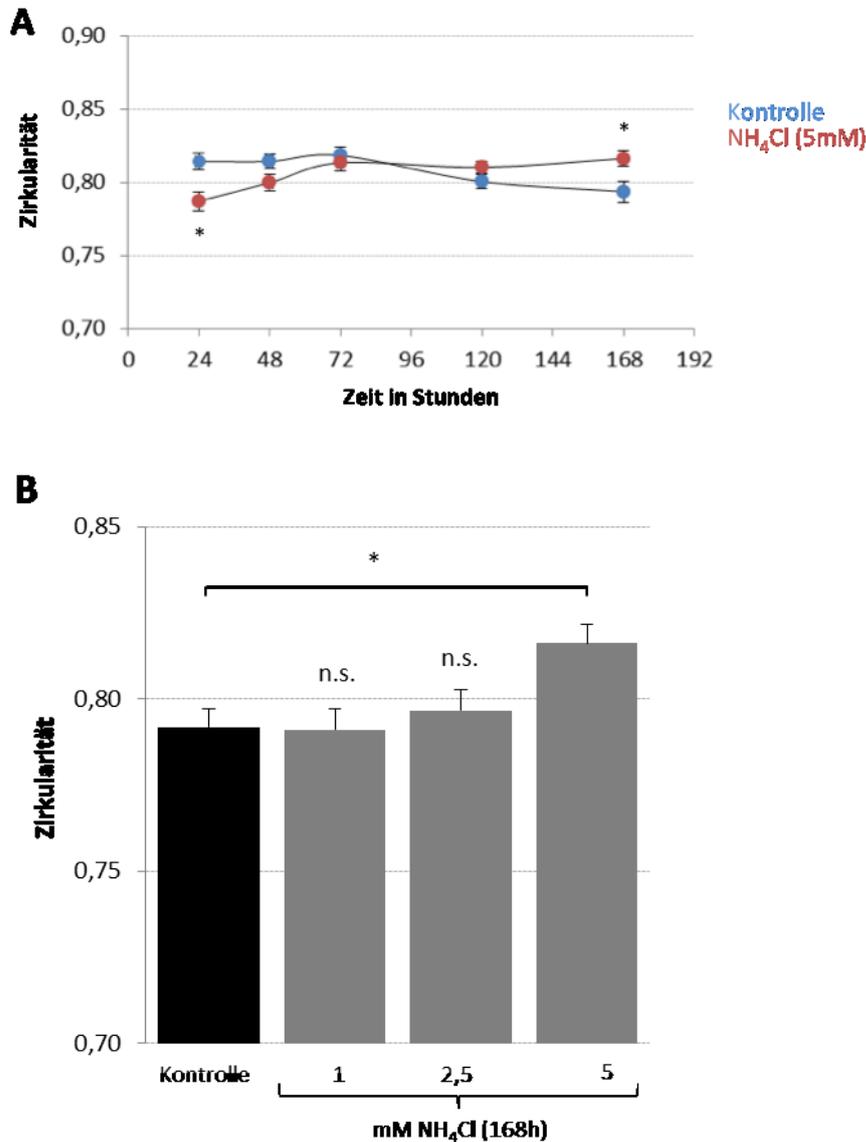


Abb. 7 Effekte von NH_4Cl auf die Zirkularität der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten. **(A)** Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 24, 48, 72, 120 oder 168h mit NH_4Cl (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Zirkularität der Zellkerne unbehandelter Astrozyten zum Zeitpunkt 24h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen der Zirkularität der Zellkerne in den mit NH_4Cl inkubierten Astrozyten in Relation dazu ausgedrückt. **(B)** Kultivierte Astrozyten wurden mit NH_4Cl in den angegebenen Konzentrationen für 168h inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Zirkularität der Zellkerne in den Kontrollen zum Zeitpunkt 168h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen in den mit NH_4Cl inkubierten Astrozyten in Relation dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$). n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrolle. $n = 3-4$

In den für 72 und 120 Stunden mit NH_4Cl inkubierten Astrozyten wurden keine signifikanten oder tendenziellen Änderungen der Zellkernzirkularität beobachtet. 168 Stunden nach NH_4Cl -Exposition wurde eine signifikant erhöhte Zirkularität um 2,8% gemessen ($p < 0,05$).

Die Überprüfung der Konzentrationsabhängigkeit der durch NH_4Cl -induzierten Veränderungen der Zellkernzirkularität zeigte nach 168 Stunden eine signifikante Zunahme der Zellkernzirkularität in den mit 5mM NH_4Cl inkubierten Astrozyten um 2,8% ($p < 0,05$). Die NH_4Cl -Exposition mit 1 und 2,5mM führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Zellkernzirkularität gegenüber der Kontrollgruppe.

3.1.2 Effekte von $\text{TNF}\alpha$ auf Morphologie und Volumen des Zellkerns

3.1.2.1 Volumen

Wie in Abb. 8 dargestellt zeigte sich nach Inkubation der kultivierten Astrozyten mit $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) nach 24 Stunden eine signifikante Volumenzunahme der Zellkerne um 6,4% ($p < 0,05$). Zum Zeitpunkt 48, 72, 120 und 168 Stunden nach NH_4Cl -Exposition konnte kein signifikanter Unterschied im Zellkernvolumen unbehandelter Kontrollen und mit NH_4Cl inkubierter Astrozyten gemessen werden.

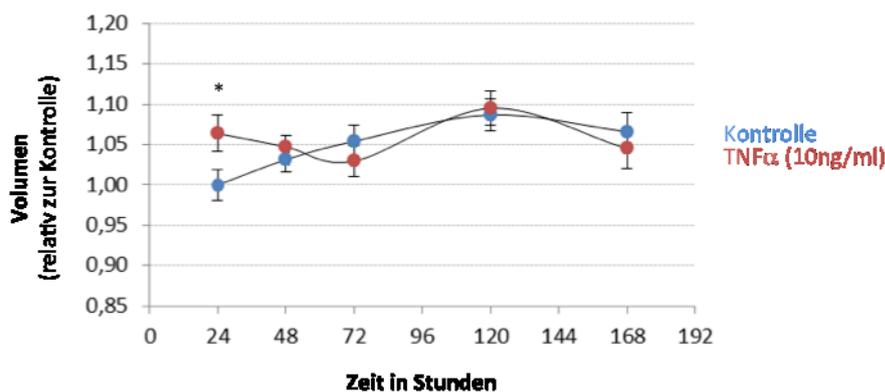


Abb. 8 Effekte von $\text{TNF}\alpha$ auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 24, 48, 72, 120 und 168h mit $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) inkubiert oder blieben unbehandelt. Das Zellkernvolumen der Kontrollen zum Zeitpunkt 24h wurden gleich 1 gesetzt und die Volumenänderungen in mit $\text{TNF}\alpha$ inkubierten Astrozyten in Relation dazu angegeben. * Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$). $n=3$

3.1.2.2 Fläche und Umfang

Wie in Abb. 9 dargestellt waren die Zellkerne der mit $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) inkubierten Astrozyten zu keinem der gemessenen Zeitpunkte signifikant unterschiedlich im Hinblick auf deren Fläche oder deren Umfang im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

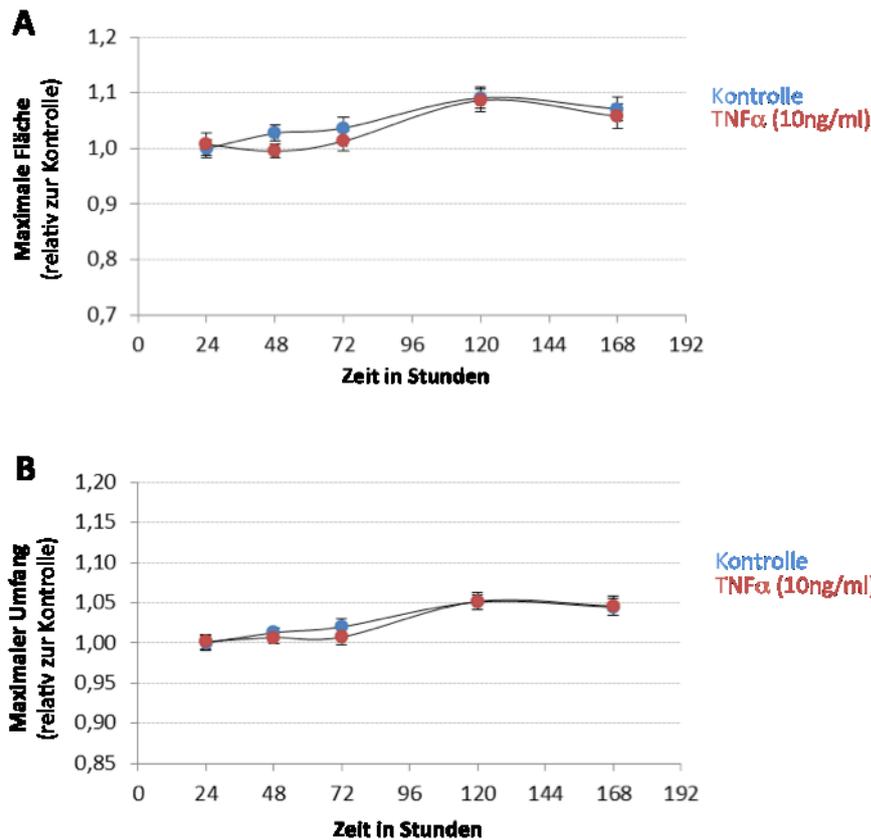


Abb. 9 Effekte von TNF α auf maximale Fläche und Umfang der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 24, 48, 72, 120 und 168h mit TNF α (10ng/ml) inkubiert oder blieben unbehandelt. **(A)** Die maximale Fläche der Kontrolle zum Zeitpunkt 24h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen der maximalen Fläche der Zellkerne in den mit TNF α inkubierten Zellen in Relation dazu angegeben. **(B)** Der maximale Umfang der Kontrolle zum Zeitpunkt 24h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen des maximalen Umfangs der Zellkerne in den mit TNF α inkubierten Astrozyten in Relation dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$). n=3

3.1.2.3 Zirkularität

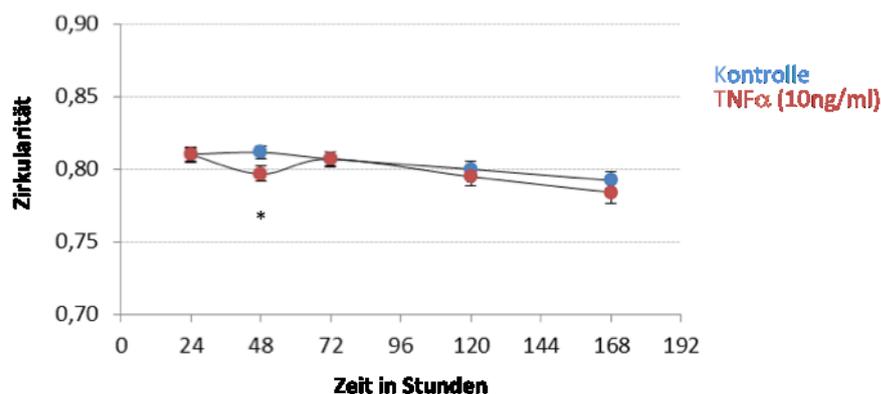


Abb. 10 Effekte von TNF α auf die Zirkularität der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 24, 48, 72, 120 und 168h mit TNF α (10ng/ml) behandelt oder blieben unbehandelt. Die Zirkularität der Kontrolle zum Zeitpunkt 24h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen der Zirkularität der Zellkerne in den mit TNF α inkubierten Astrozyten in Relation dazu angegeben. * Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$). n=3

Wie in Abb. 10 dargestellt war nach 48 Stunden in den mit TNF α (10ng/ml) inkubierten Astrozyten die Zirkularität der Zellkerne signifikant um 1,8% im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ($p < 0,05$) verringert. Für die anderen Zeitpunkte (24, 72, 120 und 168h) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen mit TNF α inkubierten oder unbehandelten Astrozyten beobachtet werden.

3.1.3 Effekte von Diazepam auf Morphologie und Volumen des Zellkerns

3.1.3.1 Volumen

Wie in Abb. 11 dargestellt führte die Inkubation der Astrozyten mit Diazepam (10 μ M) im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keinen signifikanten Unterschieden im Zellkernvolumen innerhalb des Beobachtungszeitraums von 24-168h.

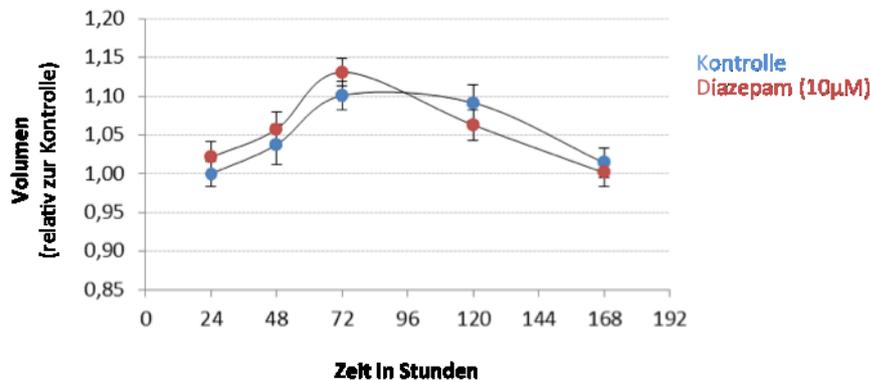


Abb. 11 Effekte von Diazepam auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 24, 48, 72, 120 und 168h mit Diazepam (10 μ M) oder als Kontrolle mit DMSO inkubiert. Das Zellkernvolumen der Kontrolle zum Zeitpunkt 24h wurde gleich 1 gesetzt und die Zellkernvolumenänderungen in den mit Diazepam inkubierten Astrozyten in Relation dazu angegeben. * Signifikant unterschiedlich gegenüber den mit DMSO inkubierten Kontrollen ($p < 0,05$). n=3

3.1.3.2 Fläche und Umfang

Wie in Abb. 12 dargestellt verringerte sich die Zellkernfläche der mit Diazepam (10 μ M) inkubierten Astrozyten signifikant gegenüber den mit DMSO behandelten Kontrollen nach 168 Stunden um 5,3% ($p < 0,05$). Zu keinem anderen Zeitpunkt (24, 72, 120 und 168 Stunden) wurde eine signifikante Veränderung der Zellkernfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet.

Der Zellkernumfang der mit Diazepam (10 μ M) inkubierten Astrozyten verringerte sich nach 120 Stunden signifikant um 2,7% ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle. Zu keinem anderen Zeitpunkt (24, 48, 72 und 168 Stunden) wurde eine signifikante Veränderung des Zellkernumfangs im Vergleich zur Kontrolle beobachtet.

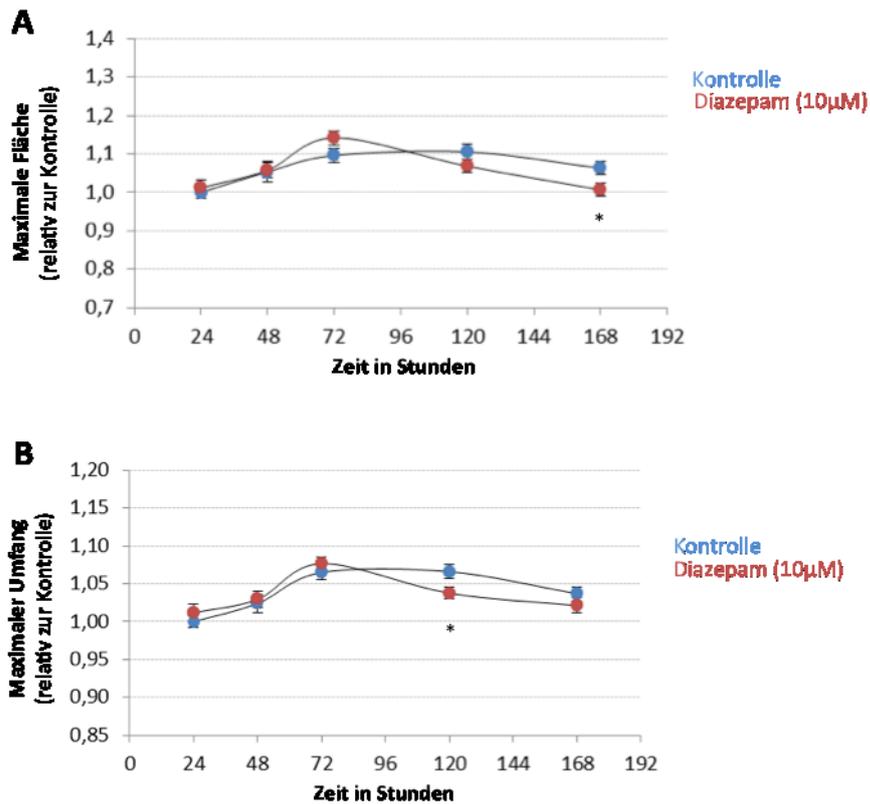


Abb. 12 Effekte von Diazepam auf maximale Fläche und Umfang der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 24, 48, 72, 120 und 168h mit Diazepam (10µM) oder als Kontrolle mit DMSO inkubiert. **(A)** Die maximale Fläche der Kontrolle zum Zeitpunkt 24h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen der maximalen Fläche der Zellkerne in dem mit Diazepam inkubierten Astrozyten in Relation dazu angegeben. **(B)** Der maximale Umfang der Kontrolle zum Zeitpunkt 24h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen des maximalen Umfangs der Zellkerne in den mit Diazepam inkubierten Zellen in Relation dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich gegenüber den mit DMSO inkubierten Kontrollen ($p < 0,05$). $n=3$

3.1.3.3 Zirkularität

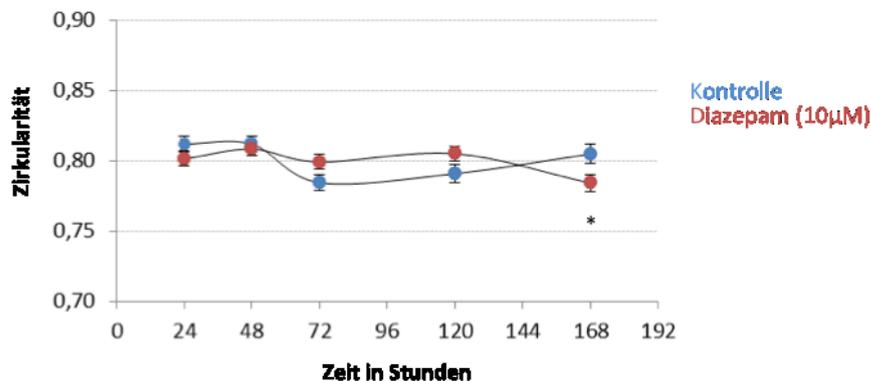


Abb. 13 Effekte von Diazepam auf die Zirkularität der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 24, 48, 72, 120 und 168h mit Diazepam (10µM) oder als Kontrolle mit DMSO inkubiert. Die Zirkularität der Zellkerne in den Kontrollen zum Zeitpunkt 24h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen der Zirkularität in mit Diazepam inkubierten Zellen in Relation dazu angegeben. * Signifikant unterschiedlich zur mit DMSO behandelten Kontrolle ($p < 0,05$). $n=3$

Wie in Abb. 13 dargestellt war die Zirkularität der Zellkerne in mit Diazepam (10 μ M) inkubierten Astrozyten nach 168 Stunden signifikant um 2,6% im Vergleich zu Kontrollgruppe ($p < 0,05$) vermindert. An allen anderen untersuchten Zeitpunkten (24, 48, 72 und 120 Stunden) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede verglichen mit den Kontrollen.

3.1.4 Effekte von Ammoniak + TNF α auf Morphologie und Volumen des Zellkerns

3.1.4.1 Volumen

Wie in Abb. 14 dargestellt war das Zellkernvolumen der mit NH₄Cl (5mM) + TNF α (10ng/ml) inkubierten Astrozyten gegenüber den unbehandelten Kontrollen und den mit NH₄Cl (5mM) inkubierten Zellen nicht signifikant verändert. Das Kernvolumen in den mit NH₄Cl (5mM) inkubierten Zellen verringerte sich hingegen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen um 7,7% ($p < 0,01$).

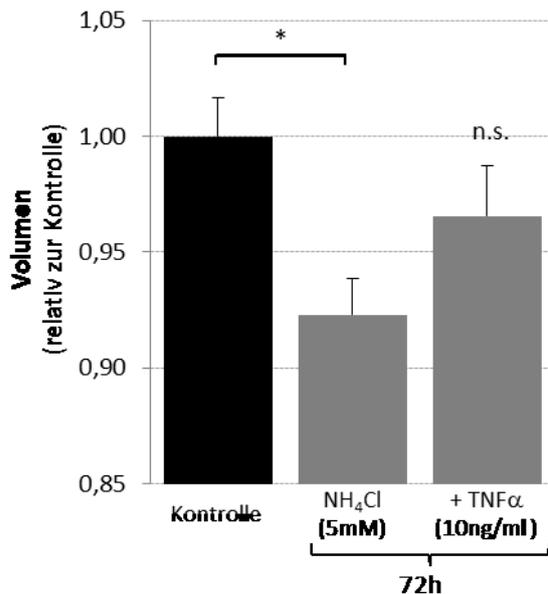


Abb. 14 Effekte von NH₄Cl und NH₄Cl+TNF α auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 72h mit NH₄Cl (5mM) oder mit NH₄Cl (5mM) und TNF α (10ng/ml) inkubiert oder blieben unbehandelt. Das Zellkernvolumen der Kontrolle zum Zeitpunkt 72h wurde gleich 1 gesetzt und die Zellkernvolumenänderungen in den experimentell behandelten Zellen in Relation dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). n.s.: nicht signifikant unterschiedlich. n=3

3.1.4.2 Fläche

Wie in Abb. 15 dargestellt war die Zellkernfläche in den gleichzeitig mit NH₄Cl (5mM) und TNF α (10ng/ml) inkubierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant um 15,7% verringert ($p < 0,001$). Die Fläche der Zellkerne der mit NH₄Cl (5mM) inkubierten Astrozyten war gegenüber den Kontrollen signifikant um 16,0% vermindert ($p < 0,001$). Verglichen mit den mit NH₄Cl (5mM) inkubierten

Astrozyten war die relative Zellkernfläche in den gleichzeitig mit NH_4Cl (5mM) und $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) inkubierten Astrozyten nicht signifikant unterschiedlich.

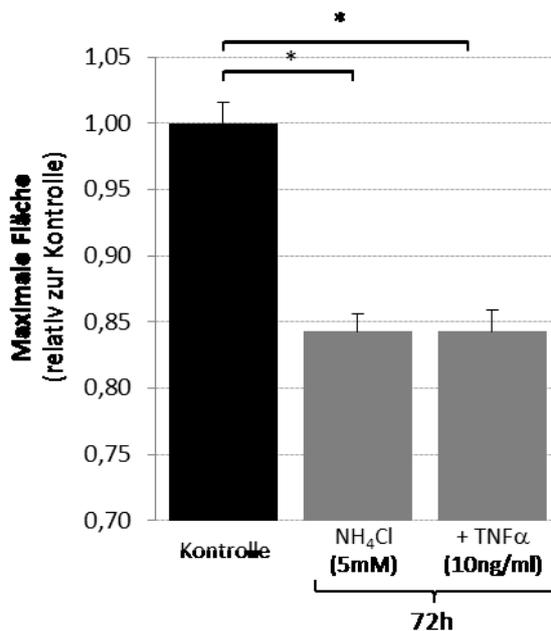


Abb. 15 Effekte von NH_4Cl und $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{TNF}\alpha$ auf die maximale Fläche der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 72h mit NH_4Cl (5mM) oder NH_4Cl (5mM)+ $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) inkubiert oder blieben unbehandelt. Die maximale Fläche der Kerne in den Kontrollen wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen in den experimentell behandelten Zellen in Relation dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich ($p<0,05$). $n=3$

3.1.4.3 Umfang

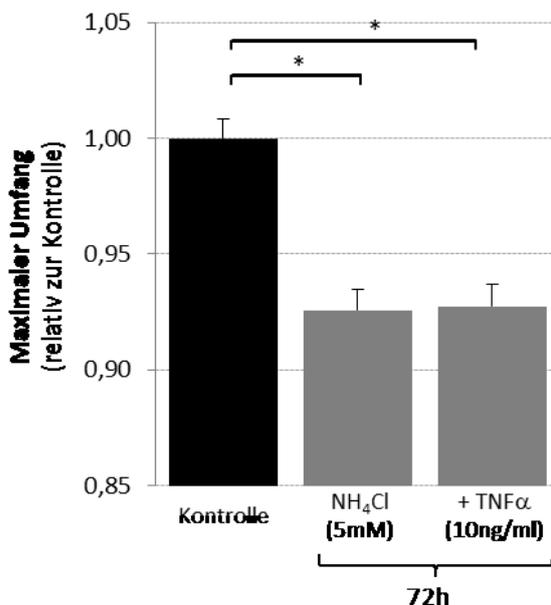


Abb. 16 Effekte von NH_4Cl und $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{TNF}\alpha$ auf den maximalen Umfang der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 72h mit NH_4Cl (5mM) oder NH_4Cl (5mM)+ $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) inkubiert oder blieben unbehandelt. Der maximale Umfang der Kontrolle zum Zeitpunkt 72h wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen des maximalen Umfangs der Zellkerne in den experimentell behandelten Astrozyten dazu relativ ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich ($p<0,05$). $n=3$

Wie in Abb. 16 dargestellt verringerte die Koinkubation der Astrozyten mit $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{TNF}\alpha$ bzw. die alleinige Inkubation mit NH_4Cl (5mM) den Umfang der Zellkerne um 7,3% bzw. 7,4% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ($p<0,001$). Der Zellkernumfang in den mit NH_4Cl (5mM) inkubierten Astrozyten war gegenüber den mit NH_4Cl (5mM) und $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) inkubierten Astrozyten nicht signifikant unterschiedlich.

3.1.4.4 Zirkularität

Wie in Abbildung 17 dargestellt war die Zirkularität der Zellkerne weder in den mit NH_4Cl noch in den mit $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{TNF}\alpha$ für 72h inkubierten Astrozyten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant unterschiedlich. Die Zirkularität der Zellkerne in den mit NH_4Cl inkubierten Astrozyten unterschied sich auch nicht von der in den mit $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{TNF}\alpha$ für 72h inkubierten Astrozyten.

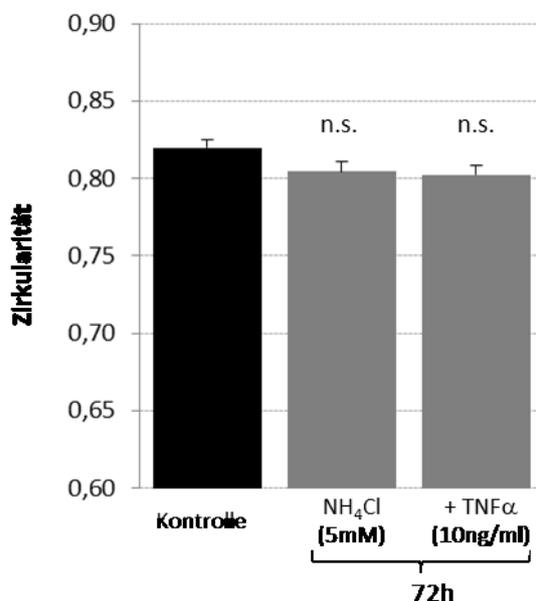


Abb. 17 Effekte von NH_4Cl und $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{TNF}\alpha$ auf die Zirkularität der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 72h mit NH_4Cl (5mM) oder NH_4Cl (5mM)+ $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Zirkularität der Kerne der Kontrollen wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen in den experimentell behandelten Gruppen in Relation dazu ausgedrückt. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich. n=3

3.1.5 Auswirkungen von Ammoniak + Diazepam auf Morphologie und Volumen des Zellkerns

3.1.5.1 Volumen

Wie in Abb. 18 dargestellt verringerte die Koinkubation der Astrozyten mit NH_4Cl (5mM) und Diazepam (10 μM) für 72h das Zellkernvolumen um 7,6% verglichen mit den Kontrollen ($p<0,01$). Das Kernvolumen der mit NH_4Cl (5mM) inkubierten Astrozyten war um 9,9% gegenüber den Kontrollen vermindert ($p<0,001$). Das Zellkernvolumen zwischen den mit NH_4Cl (5mM) und den zusätzlich mit Diazepam inkubierten Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied.

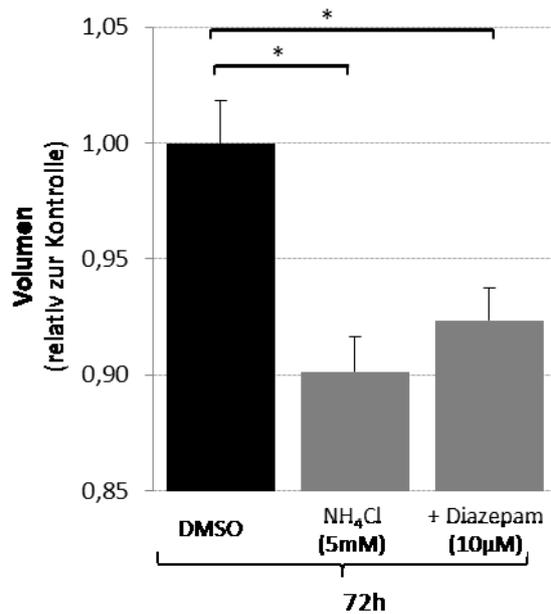


Abb. 18 Effekte von NH₄Cl und NH₄Cl+Diazepam auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 72h mit NH₄Cl (5mM)+DMSO oder NH₄Cl (5mM)+Diazepam (10µM) oder als Kontrolle nur mit DMSO inkubiert. Das Zellkernvolumen der Kontrollen zum Zeitpunkt 72h wurde gleich 1 gesetzt und Veränderung nach experimenteller Behandlung dazu in Relation ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich (p<0,05). n=3

3.1.5.2 Fläche

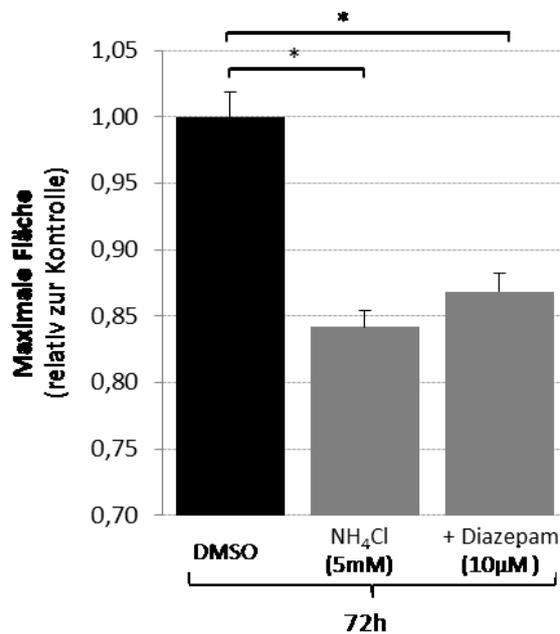


Abb. 19 Effekte von NH₄Cl und NH₄Cl+Diazepam auf die Zellkernfläche in kultivierten Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 72h mit NH₄Cl (5mM)+DMSO oder NH₄Cl (5mM)+Diazepam (10µM) oder als Kontrolle nur mit DMSO inkubiert. Die maximale Fläche der Zellkerne der Kontrolle zum Zeitpunkt 72h wurde gleich 1 gesetzt und Veränderungen in den experimentell behandelten Zellen in Relation dazu angegeben. * Signifikant unterschiedlich (p<0,05). n=3

Wie in Abb. 19 dargestellt verringerte die Koinkubation der Rattenastrozyten mit NH_4Cl (5mM) und Diazepam (10 μM) die Zellkernfläche um 13,1% im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen ($p < 0,001$). Die Zellkernfläche der alleinig mit NH_4Cl (5mM) behandelten Astrozyten verringerte sich gegenüber den unbehandelten Kontrollen um 15,8% ($p < 0,001$). Die Zellkernfläche der mit NH_4Cl und der gleichzeitig mit NH_4Cl und Diazepam inkubierten Astrozyten war hingegen nicht signifikant unterschiedlich.

3.1.5.3 Umfang

Wie in Abb. 20 dargestellt verringerte Die Koinkubation der Rattenastrozyten mit NH_4Cl (5mM) und Diazepam (10 μM) für 72 Stunden den Umfang der Zellkerne um 7,4% im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$). Die Inkubation der Astrozyten mit NH_4Cl (5mM) verringerte den Zellkernumfang gegenüber den Kontrollen um 9,3% ($p < 0,001$). Verglichen mit den ausschließlich mit NH_4Cl -inkubierten Astrozyten führte die Koinkubation mit NH_4Cl und Diazepam zu keiner signifikanten Veränderung des Umfangs der Zellkerne.

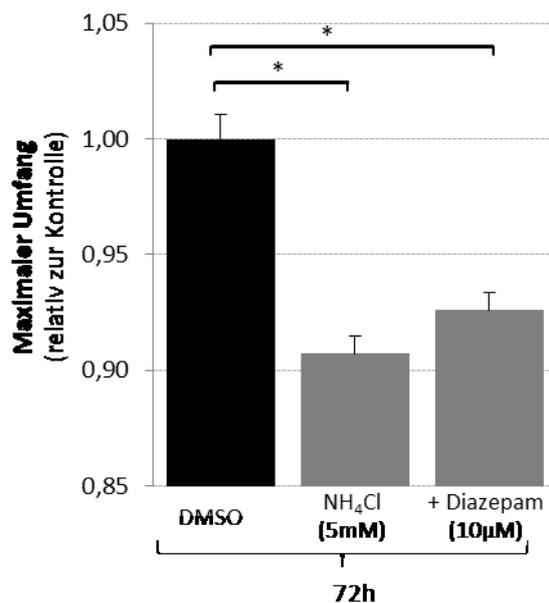


Abb. 20 Effekte von NH_4Cl und NH_4Cl +Diazepam auf den Zellkernumfang kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 72h mit NH_4Cl (5mM)+DMSO oder NH_4Cl (5mM)+Diazepam (10 μM) oder als Kontrolle nur mit DMSO inkubiert. Der maximale Umfang der Zellkern in den Kontrollen zum Zeitpunkt 72h wurde gleich 1 gesetzt und Veränderungen nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). $n=3$

3.1.5.4 Zirkularität

Wie in Abb. 21 dargestellt war weder in den alleinig mit NH_4Cl (5mM) inkubierten noch in den mit NH_4Cl (5mM) und Diazepam (10 μM) koinkubierten Astrozyten die Zellkernzirkularität signifikant

unterschiedlich gegenüber der Zirkularität der Zellkerne der Kontrollen. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Zirkularität der Kerne zwischen den mit NH_4Cl und den gleichzeitig mit NH_4Cl und Diazepam inkubierten Astrozyten.

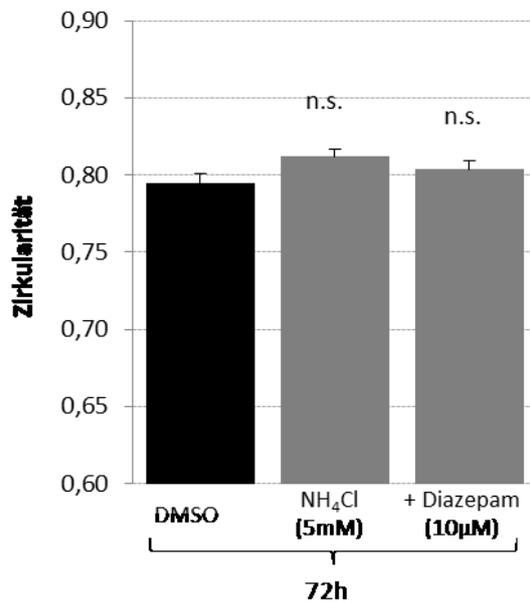


Abb. 21 Effekte von NH_4Cl und NH_4Cl +Diazepam auf die Zirkularität der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 72h mit NH_4Cl (5mM)+DMSO oder NH_4Cl (5mM)+Diazepam (10µM) oder als Kontrolle nur mit DMSO inkubiert. Die Zirkularität der Kontrolle zum Zeitpunkt 72h wurde gleich 1 gesetzt und Veränderungen in den mit NH_4Cl und NH_4Cl +Diazepam inkubierten Astrozyten in Relation dazu ausgedrückt. n.s. nicht signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). $n=3$

3.1.6 Effekte von Methylammoniumchlorid auf Morphologie und Volumen des Zellkerns

Wie in Abbildung 22 dargestellt wurde nach Inkubation mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) für 168 Stunden eine signifikante Volumenabnahme der Zellkerne um 16,9% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet ($p < 0,001$). Die Fläche der Zellkerne in den mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ -inkubierten Astrozyten nahm nach 168 Stunden verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant um 23,0% ab ($p < 0,001$). Der Umfang der Zellkerne der mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) inkubierten Astrozyten verkleinerte sich nach 168 Stunden um 13,1% im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,001$). Die mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) inkubierten Zellen zeigten nach 168 Stunden eine deutliche tendenzielle Zunahme der Zirkularität, die aber nicht statistisch signifikant war ($p=0,069$).

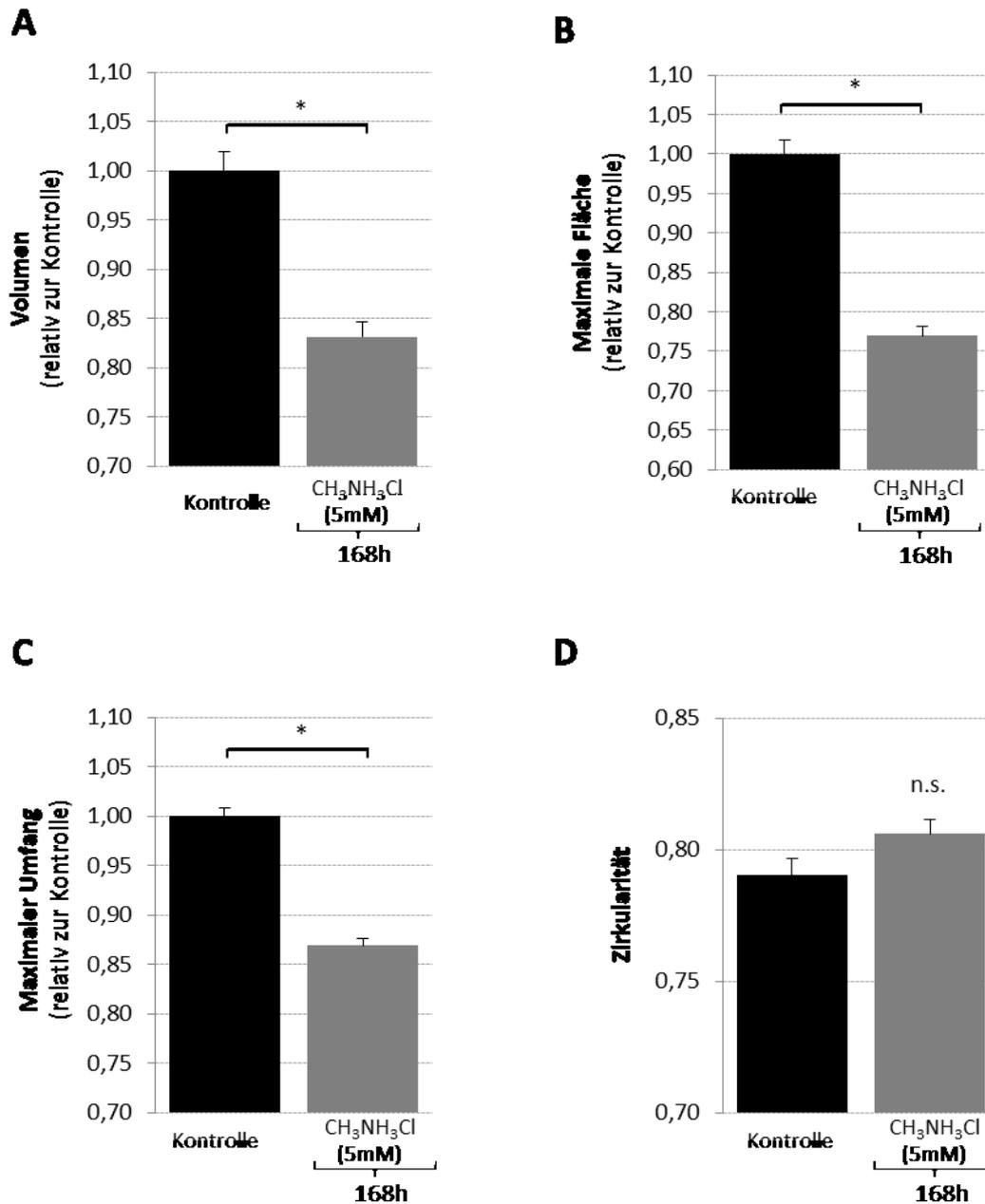


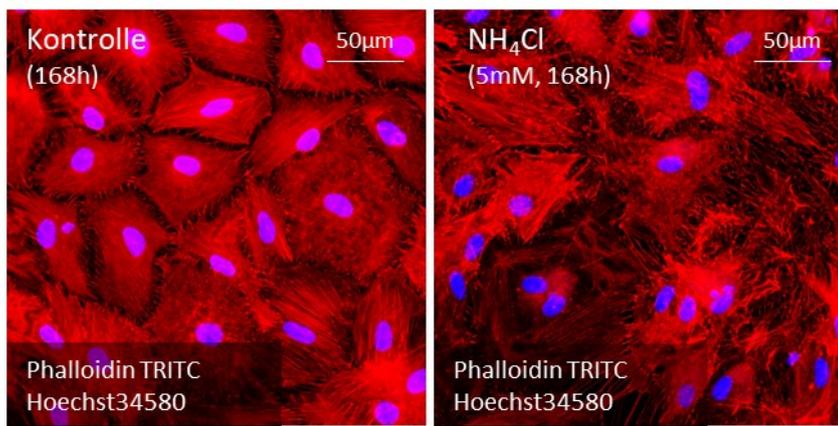
Abb. 22 Effekte von CH₃NH₃Cl auf Volumen, Fläche, Umfang und Zirkularität kultivierter Rattenastrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit CH₃NH₃Cl (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Volumen, Fläche, Umfang und Zirkularität der Zellkerne in den Kontrollen wurden gleich 1 gesetzt und die Veränderungen von (A) Volumen, (B) Fläche, (C) Umfang und (D) Zirkularität nach experimenteller Behandlung in Relation dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich (p<0,05). n.s.: nicht signifikant unterschiedlich. n=3

3.2 Effekte HE-auslösender Faktoren auf die Expression von F-Aktin und Nesprin-2

3.2.1 Effekte von Ammoniak auf die Expression von F-Aktin

Wie in Abb. 23 dargestellt war nach Inkubation der Astrozyten mit NH_4Cl (5mM) für 168 Stunden und Anfärbung des F-Aktins mit Phalloidin TRITC eine signifikant verringerte Immunoreaktivität gegenüber den Kontrollen in den NH_4Cl -exponierten Astrozyten sichtbar. Die in den Kontrollen gefundene charakteristische Anordnung der F-Aktin-Filamente wurde durch die NH_4Cl -Exposition deutlich beeinträchtigt.

A



B

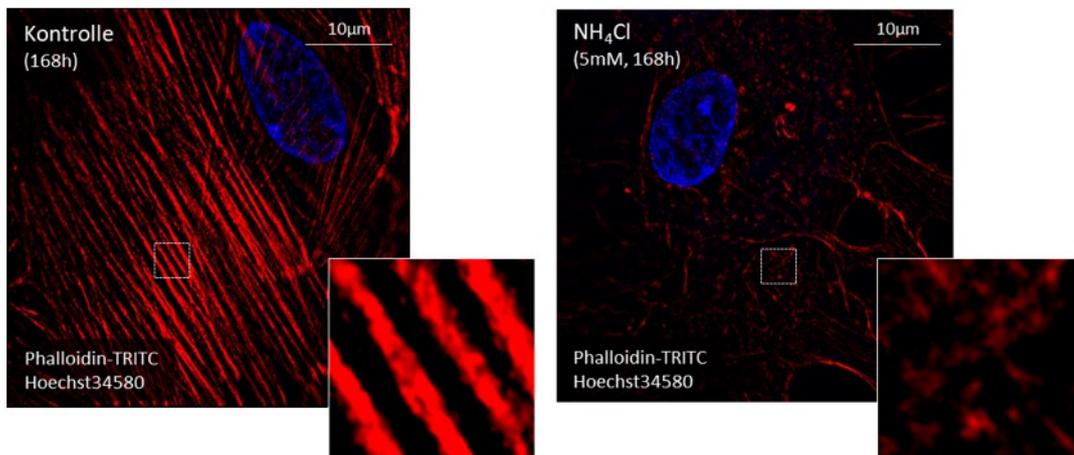


Abb. 23 Effekte von NH_4Cl auf die Expression von F-Aktin in kultivierten Astrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit NH_4Cl (5mM) behandelt oder blieben unbehandelt. Das F-Aktin des Zytoskeletts wurde mit Phalloidin-TRITC markiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. **(A)** Aufnahmen mittels Epifluoreszenzmikroskopie; (Vergrößerung: 250-fach). **(B)** Aufnahmen mittels Superresolutionmikroskopie; (Vergrößerung 1000-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Versuchen.

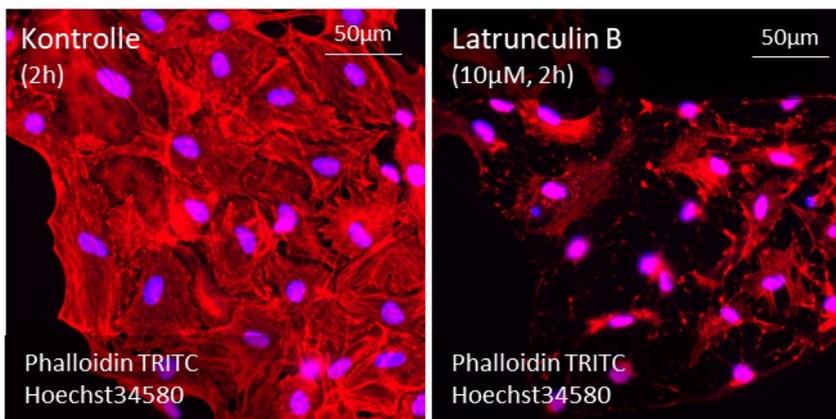
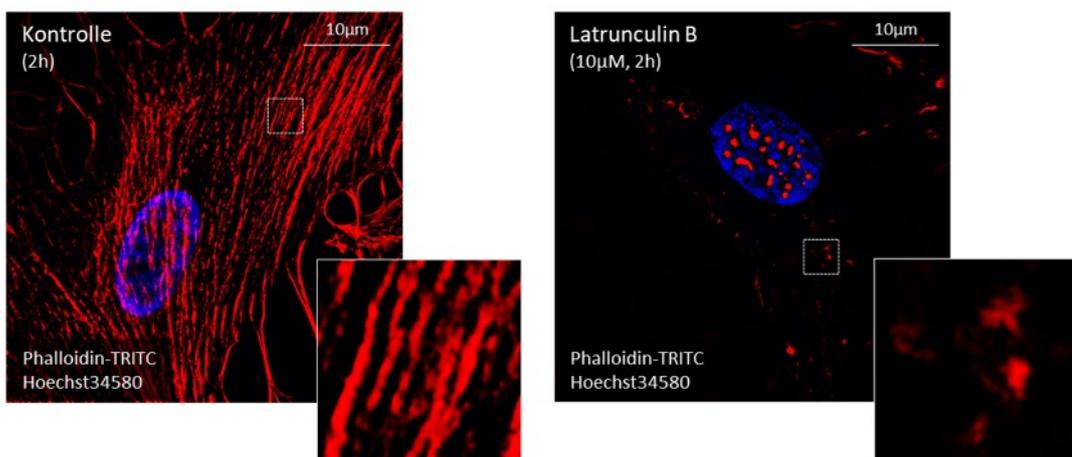
A**B**

Abb. 24 Effekte von Latrunculin B auf das Aktinzytoskelett kultivierter Astrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 2h mit Latrunculin B (10µM) inkubiert oder blieben unbehandelt. F-Aktin wurde mittels Phalloidin-TRITC markiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. **(A)** Aufnahmen mittels Epifluoreszenzmikroskopie; (Vergrößerung: 250-fach). **(B)** Aufnahmen mittels Superresolutionmikroskopie; (Vergrößerung 1000-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Versuchen.

Wie in Abb. 24 dargestellt verringerte erwartungsgemäß auch eine Hemmung der Aktinpolymerisation mit Latrunculin-B die Phalloidin-TRITC Immunreaktivität gegenüber den Kontrollen signifikant und hob die Ausbildung von F-Aktin-Filamenten nahezu gänzlich auf.

3.2.2 Effekte von TNF α und Diazepam auf die Expression von F-Aktin

Wie in Abb. 25 dargestellt zeigte sich nach Inkubation der Astrozyten mit TNF α (10ng/ml) für 168 Stunden kein Unterschied in der Stärke der F-Aktin-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Inkubation der Astrozyten mit Diazepam (10µM) für 168 Stunden führte ebenfalls zu keiner Veränderung der Stärke der F-Aktin-Expression im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrolle.

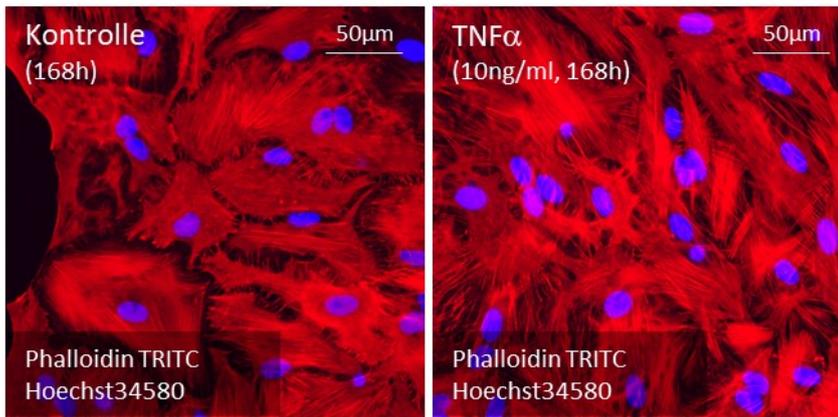
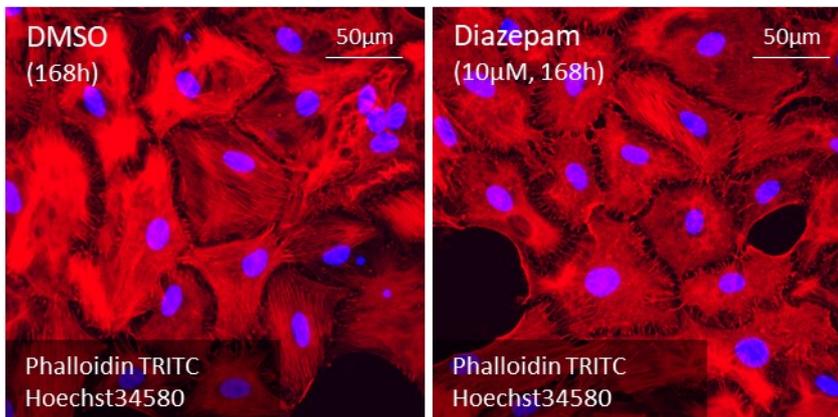
A**B**

Abb. 25 Effekte von TNF α und Diazepam auf Expression vom F-Aktin in kultivierten Astrozyten. (A) Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit TNF α (10ng/ml) inkubiert oder blieben unbehandelt (Kontrolle). (B) Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit Diazepam (10 μ M) oder mit DMSO (Kontrolle) inkubiert. F-Aktin wurde mit Phalloidin-TRITC markiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie angefertigt. (Vergrößerung: 250-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Versuchen.

3.2.3 Effekte von Methylammoniumchlorid auf die Expression von F-Aktin

Wie in Abb. 26 dargestellt zeigte sich nach Inkubation der Astrozyten mit CH₃NH₃Cl (5mM) für 168 Stunden und Anfärbung von F-Aktin mit Phalloidin-TRITC gegenüber den Kontrollen eine deutlich verringerte Immunoreaktivität.

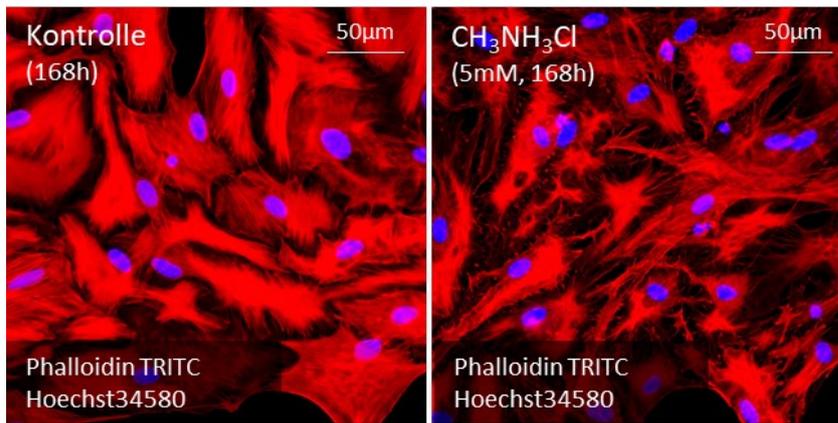


Abb. 26 Effekte von $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ auf die Expression von F-Aktin in kultivierten Astrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. F-Aktin wurde mittels Phalloidin-TRITC markiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie angefertigt. (Vergrößerung: 250-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Versuchen.

3.2.4 Quantifizierung der Phalloidin-TRITC Fluoreszenzintensität

Wie in Abb. 27 dargestellt ergab die Messung der Fluoreszenzintensität des angefärbten F-Aktins eine signifikante Abnahme der Intensität der für 168 Stunden mit NH_4Cl (5mM) inkubierten Astrozyten um 31,94% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$). Die mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) inkubierten Zellen zeigten eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität um 23,11% im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Die mit NH_4Cl (1mM), $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) oder Diazepam (10 μM) inkubierten Astrozyten zeigten keinen Unterschied in der Fluoreszenzintensität von F-Aktin im Vergleich zur unbehandelten bzw. mit DMSO behandelten Kontrolle.

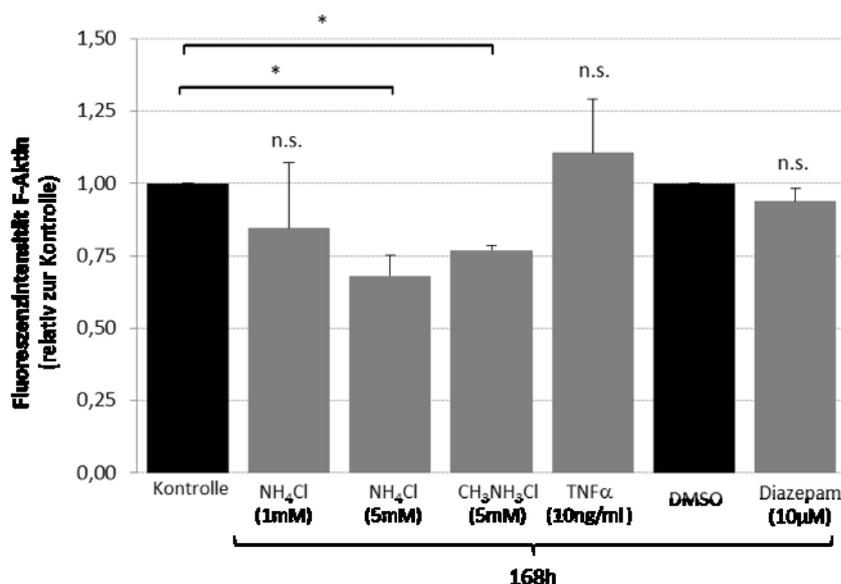


Abb. 27 Quantifizierung der Phalloidin-TRITC Fluoreszenzintensität. Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit NH_4Cl (1mM und 5mM), $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM), $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) oder Diazepam (10 μM) inkubiert. Die Kontrollen blieben unbehandelt oder wurden mit DMSO inkubiert. Die Fluoreszenzintensität der Kontrollen wurde gleich 1 gesetzt und Veränderungen in den experimentell behandelten Astrozyten relativ dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrolle. n=3-4

3.2.5 Effekte von Ammoniak auf die Expression von F-Aktin und von Nesprin-2

Wie in Abb. 29 dargestellt beeinflusste die 168-stündige Inkubation der Astrozyten mit NH_4Cl (1mM) weder die Expressionsstärke noch die intrazelluläre Struktur des F-Aktins oder die intrazelluläre Lokalisation von Nesprin-2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Die Inkubation der Astrozyten mit 5mM NH_4Cl beeinträchtigte die Ordnung der F-Aktin-Filamente und verringerte die Expression von F-Aktin deutlich. Im Gegensatz zur Kontrolle änderte sich die Lokalisation von Nesprin-2 in den mit 5mM NH_4Cl -inkubierten Astrozyten von einer vornehmlich nukleären zu einer überwiegend zytosolischen Expression.

Wie in Abb. 28 dargestellt waren diese strukturellen Veränderungen des F-Aktins und die Lokalisationsänderung des Nesprins-2 zum Zeitpunkt 72 und 96 Stunden nach Inkubation der Astrozyten mit NH_4Cl (5mM) hingegen noch nicht sicher erkennbar.

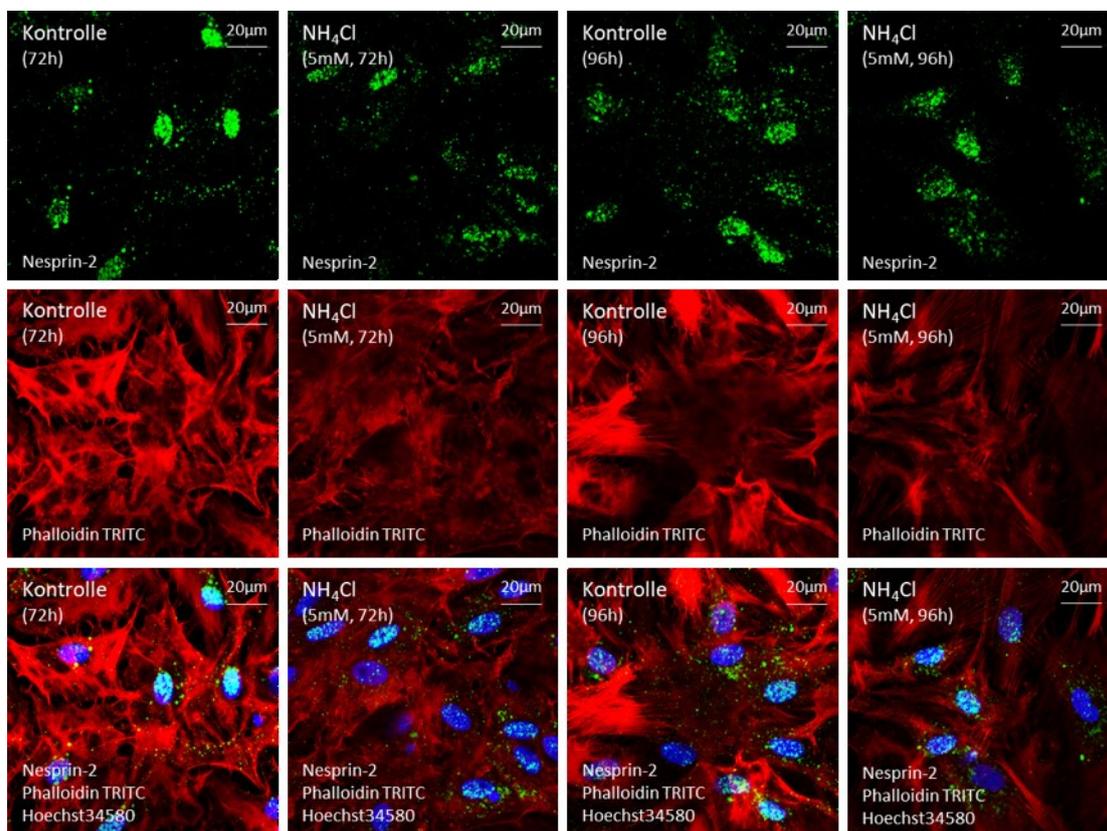


Abb. 28 Effekte von NH_4Cl auf die Expression von F-Aktin und Nesprin-2 in kultivierten Astrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 72 oder 96h mit NH_4Cl (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Nesprin-2 wurde mittels Immunfluoreszenz durch einen spezifischen Antikörper markiert. F-Aktin wurde mit Phalloidin-TRITC markiert und Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Mikroskopie mit einem Plan-Apochromat 63x/1,4 Öl-Immersionsobjektiv (M27) angefertigt. (Vergrößerung: 630-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 4 unabhängigen Versuchen.

Die Inkubation der Astrozyten mit 1 (Abb.31) und 5mM (Abb.30) NH_4Cl für 192 Stunden induzierte sowohl strukturelle Veränderungen des F-Aktins, als auch eine vermehrte zytosolische Expression des

Nesprin-2. Die für 168 Stunden mit 5mM NH_4Cl inkubierten Astrozyten zeigten nach einer nachfolgenden Inkubation in NH_4Cl -freiem Medium für 24 Stunden („Washout“) keine Wiederherstellung der Struktur des F-Aktins und auch keine eindeutige Aufhebung der vermehrt zytosolischen Nesprin-2 Lokalisation im Vergleich zur für 192 Stunden unbehandelten Kontrolle.

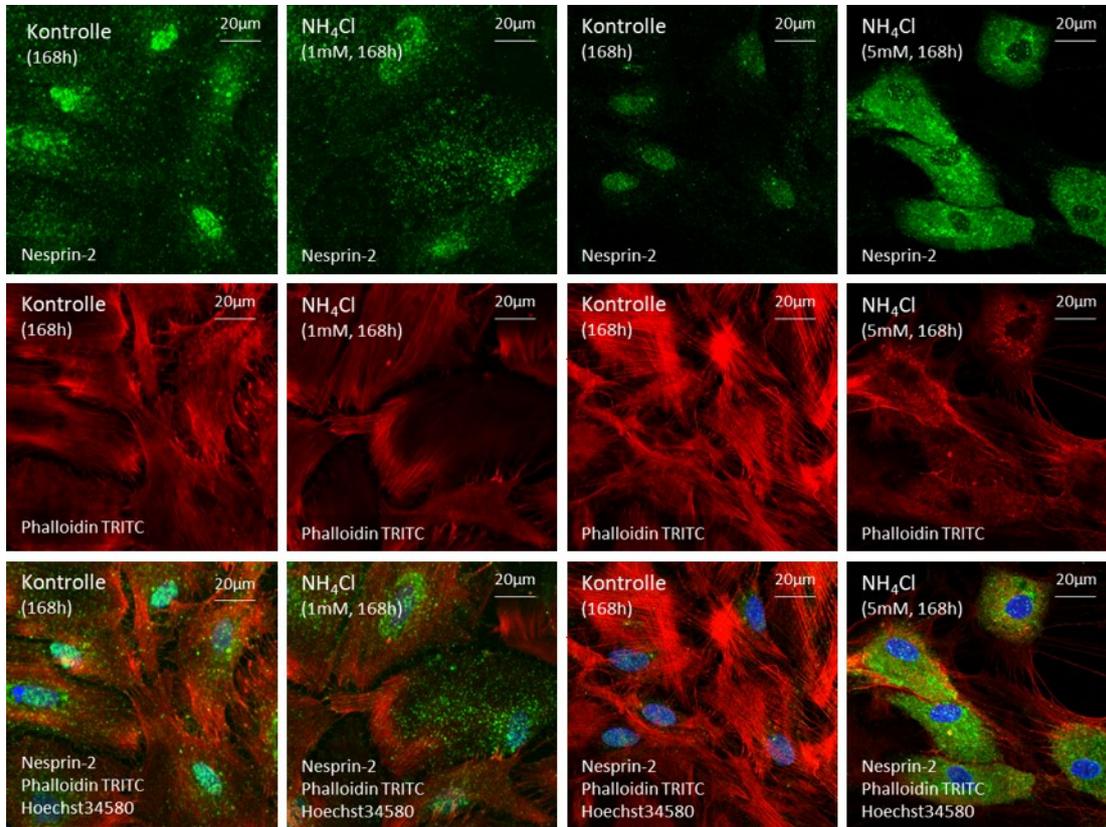


Abb. 29 Effekte von NH_4Cl auf die Expression von F-Aktin und Nesprin-2 in kultivierten Astrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit NH_4Cl (1 oder 5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Nesprin-2 wurde mittels Immunfluoreszenz durch einen spezifischen Antikörper markiert. F-Aktin wurde mit Phalloidin-TRITC markiert und Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Mikroskopie angefertigt. (Vergrößerung: 630-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 5 unabhängigen Versuchen.

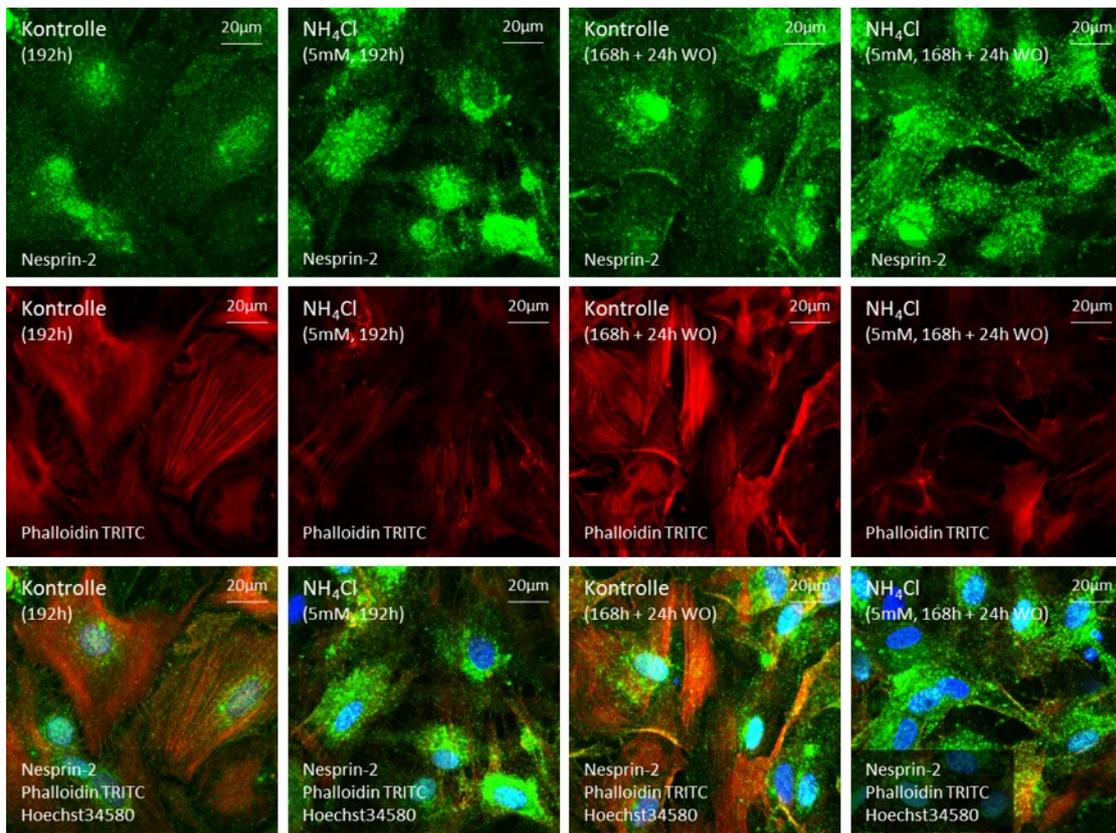


Abb. 30 Reversibilität der durch 5mM NH₄Cl-induzierten Änderungen der Expression von F-Aktin und Nesprin-2 in kultivierten Astrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 192h mit 5mM NH₄Cl inkubiert oder für 168h mit 5mM NH₄Cl und nachfolgend für weitere 24h in NH₄Cl-freiem Medium inkubiert (Washout (WO)) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Nesprin-2 wurde mittels Immunfluoreszenz durch einen spezifischen Antikörper markiert. F-Aktin wurde mit Phalloidin-TRITC markiert und Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Mikroskopie mit einem Plan-Apochromat 63x/1,4 Öl-Immersionsobjektiv (M27) angefertigt. (Vergrößerung: 630-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 4 unabhängigen Versuchen.

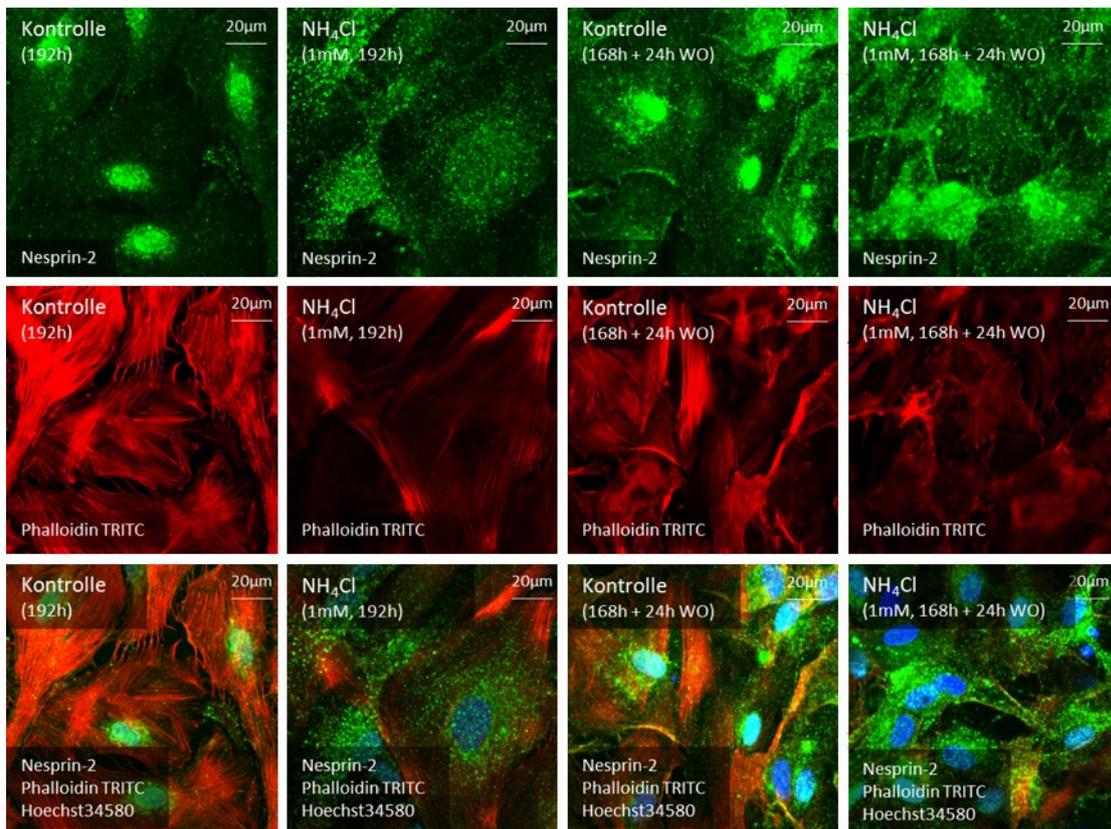


Abb. 31 Effekte von 1mM NH_4Cl auf die Expression vom F-Aktin- und Nesprin-2 in kultivierten Astrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 192h mit 1mM NH_4Cl inkubiert oder für 168h mit 1mM NH_4Cl und nachfolgend für weitere 24h in NH_4Cl -freiem Medium inkubiert („Wash Out“ (WO)) oder blieben unbehandelt (Kontrolle). Nesprin-2 wurde mittels Immunfluoreszenz durch einen spezifischen Antikörper markiert. F-Aktin wurde mit Phalloidin-TRITC markiert und Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Mikroskopie angefertigt. (Vergrößerung: 630-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 4 unabhängigen Versuchen.

3.2.6 Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von Phalloidin-TRITC

Wie in Abb. 32 dargestellt induzierte die 72-stündige und die 96-stündige Inkubation der Astrozyten mit NH_4Cl (5mM) keine signifikant veränderte Fluoreszenzintensität von Phalloidin-TRITC im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Es zeigte sich jedoch bereits eine tendenzielle Abnahme der Fluoreszenzintensität um 41% ($p=0,06$) nach 72 Stunden bzw. um 24,3 % ($p=0,1$) nach 96 Stunden. Nach 168 Stunden verringerte sich die Fluoreszenzintensität signifikant um 32,0% ($p<0,05$) und nach 192h signifikant stärker um 55,3% ($p<0,05$).

Im Gegensatz zu 5mM induzierte die Inkubation der Astrozyten mit 1mM NH_4Cl noch keine Abnahme der Fluoreszenzintensität von Phalloidin-TRITC nach 168, aber nach 192 Stunden und zu diesem Zeitpunkt um 51,0% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p<0,05$). Nach 168-stündiger Inkubation mit NH_4Cl (1mM) und anschließender Inkubation in NH_4Cl -freiem Medium für 24h war die Phalloidin- TRITC Fluoreszenzintensität tendenziell um 54% im Vergleich zur Kontrollgruppe vermindert ($p=0,06$).

Die Inkubation der Astrozyten mit NH_4Cl (5mM) für 168 Stunden ergab eine signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität um 32% und nach 192 Stunden um 55,3% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p < 0,05$). Nach 168-stündiger Inkubation mit 5mM NH_4Cl und anschließender Inkubation in NH_4Cl -freiem Medium für 24h war die Phalloidin- TRITC Fluoreszenzintensität um 57,8% gegenüber der Kontrollgruppe vermindert ($p < 0,01$).

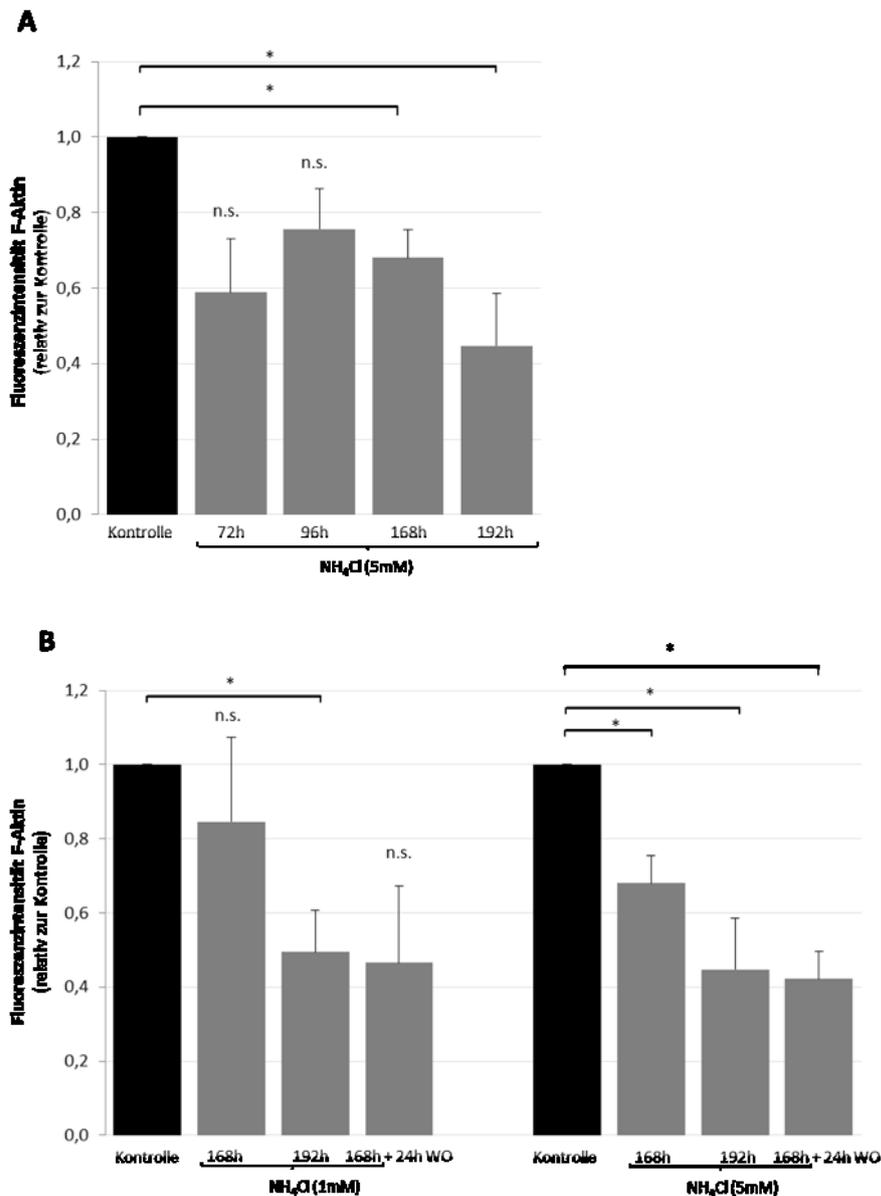


Abb. 32 Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von F-Aktin. Kultivierte Astrozyten wurden für 72, 96, 168 und 192h mit NH_4Cl (1 oder 5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt (**A, B**) oder wurden für 168h mit NH_4Cl und nachfolgend für weitere 24h mit NH_4Cl -freiem Medium inkubiert (**B**). Die Fluoreszenzintensität der Kontrollen wurde gleich 1 gesetzt und Veränderungen in den experimentell behandelten Gruppen in Relation dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrolle. n=4.

3.2.7 Auswirkungen von Methylammoniumchlorid auf die Expression von F-Aktin und Nesprin-2

Wie in Abb. 33 dargestellt veränderte die Inkubation der Astrozyten für 168 Stunden mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) die Lokalisation von Nesprin-2 in den kultivierten Astrozyten von einer nukleären hin zu einer zytoplasmatischen Lokalisation und beeinträchtigte Struktur und Intensität des polymerisierten Aktins.

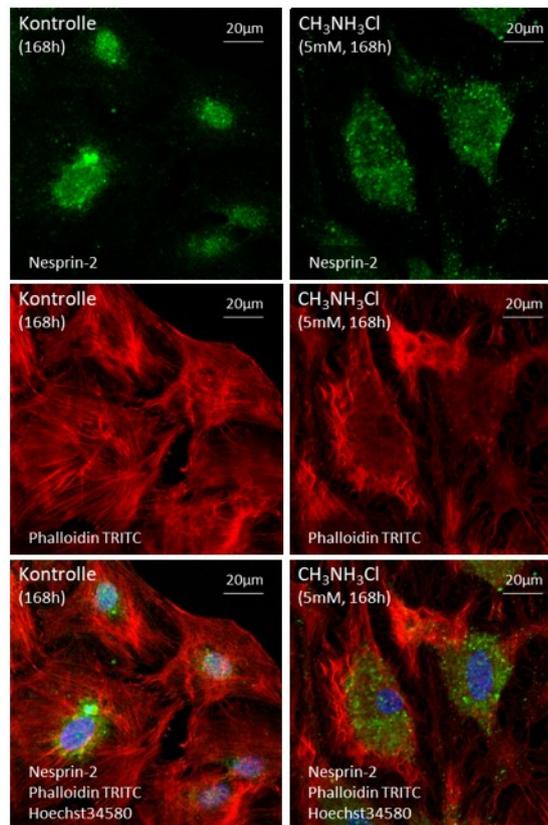


Abb. 33 Effekt von $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ auf die Expression von F-Aktin und Nesprin-2 in kultivierten Astrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Nesprin-2 wurde mittels Immunfluoreszenz durch einen spezifischen Antikörper markiert. F-Aktin wurde mit Phalloidin-TRITC markiert und Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels konfokaler Mikroskopie (Vergrößerung: 630-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Versuchen.

3.3 Effekte HE-auslösender Faktoren auf die Expression von GFAP

3.3.1 Effekte von Ammoniak auf die GFAP-Expression

Wie in Abb. 34 dargestellt zeigte sich nach Inkubation mit NH_4Cl (5mM) für 168 Stunden und Anfärbung des Intermediärfilaments GFAP mittels Immunfluoreszenz eine veränderte Struktur der GFAP-Filamente in den mit NH_4Cl (5mM) inkubierten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

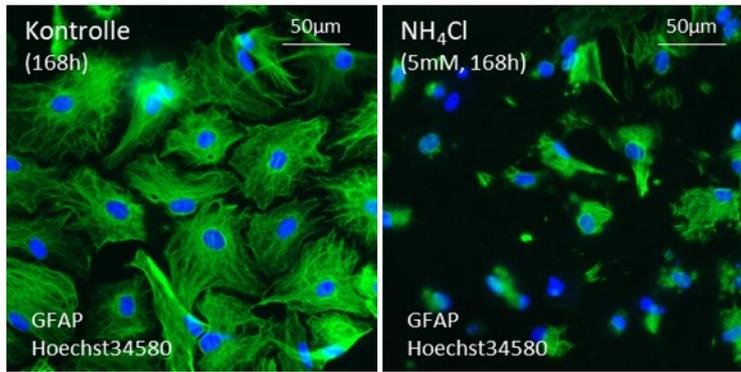
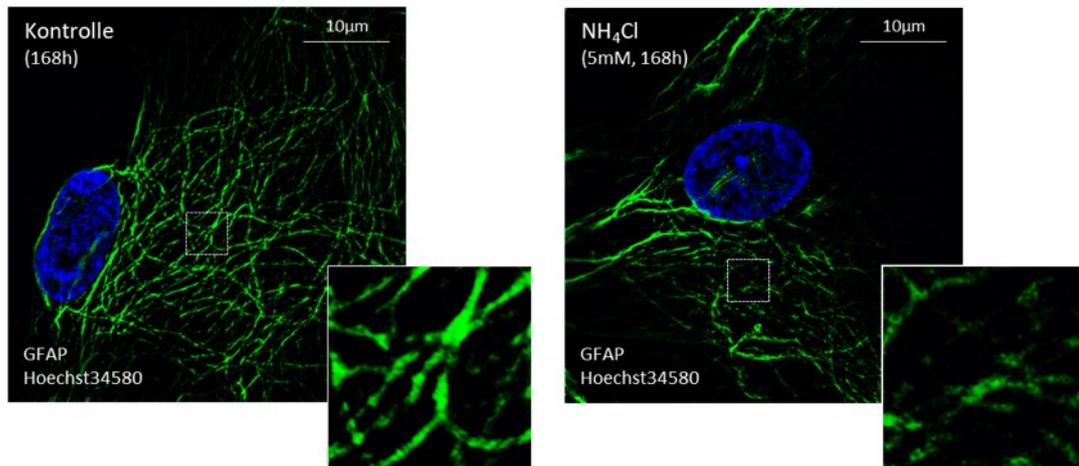
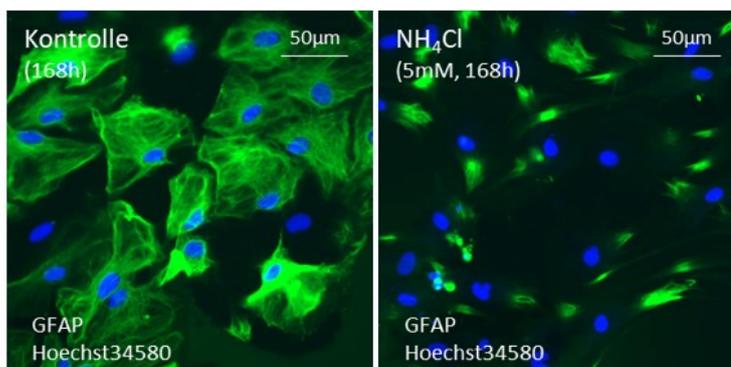
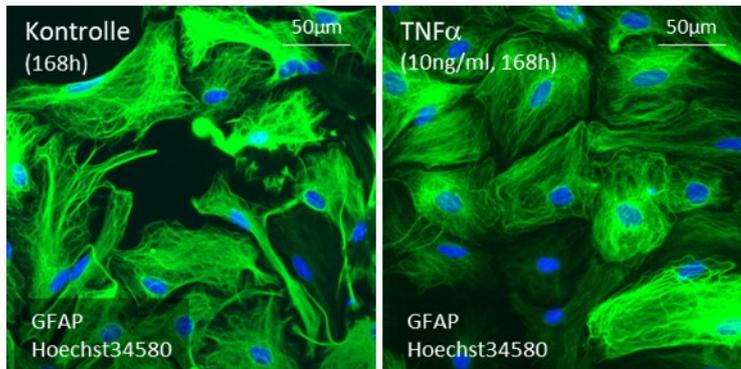
A**B****C**

Abb. 34 Effekte von NH₄Cl auf die Expression von GFAP in kultivierten Astrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit NH₄Cl (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Das Intermediärfilament GFAP wurden mittels Immunfluoreszenz durch einen **(A und B)** monoklonalen oder einen **(C)** polyklonalen Antikörper markiert. Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. **(A und C)** Aufnahmen mittels Epifluoreszenzmikroskopie; (Vergrößerung: 250-fach). **(B)** Aufnahmen mittels Superresolutionmikroskopie; (Vergrößerung 1000-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 3 (pAb) bzw. 6 (mAb) unabhängigen Versuchen.

3.3.2 Effekte von TNF α und Diazepam auf die GFAP-Expression

Wie in Abb. 35 dargestellt beeinflusste die Stimulation kultivierter Astrozyten mit TNF α (10ng/ml) oder Diazepam (10 μ M) für 168 Stunden weder die Struktur der GFAP-Filamente noch die GFAP-Fluoreszenzintensität im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (unbehandelt oder DMSO).

A



B

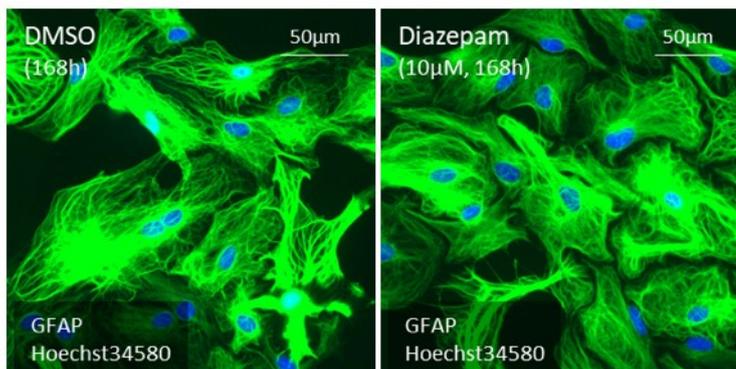


Abb. 35 Effekte von TNF α und Diazepam auf die Expression von GFAP in kultivierten Astrozyten. (A) Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit TNF α (10ng/ml) behandelt oder blieben unbehandelt. **(B)** Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit Diazepam (10 μ M) oder zur Kontrolle mit DMSO behandelt. Das Intermediärfilament GFAP wurde mittels Immunfluoreszenz durch einen spezifischen Antikörper markiert. Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie angefertigt. (Vergrößerung: 250-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Versuchen.

3.3.3 Effekte von Methylammoniumchlorid auf die GFAP-Expression

Wie in Abb. 36 dargestellt zeigten die Zellen nach Inkubation mit CH₃NH₃Cl (5mM) für 168 Stunden und Anfärbung des Intermediärfilaments GFAP mittels Immunfluoreszenz eine deutlich verminderte Dichte der GFAP-Filamente und insgesamt eine verminderte Fluoreszenzintensität, jedoch mit einzelnen dichten Inseln mit erhöhter Fluoreszenzintensität verglichen mit der Kontrollgruppe.

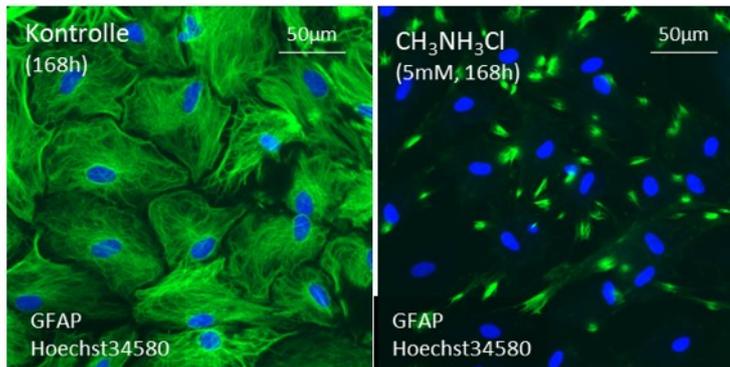
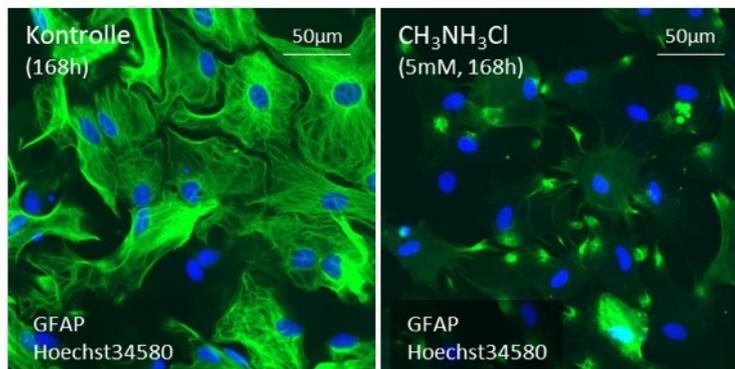
A**B**

Abb. 36 Effekte von $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ auf die Expression von GFAP in kultivierten Astrozyten. Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Das Intermediärfilament GFAP wurde mittels Immunfluoreszenz durch einen **(A)** monoklonalen oder **(B)** polyklonalen Antikörper markiert. Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie angefertigt. (Vergrößerung: 250-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Versuchen.

3.3.4 Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von GFAP

Wie in Abb. 37 dargestellt zeigte die Messung der Fluoreszenzintensität des mit dem monoklonalen Antikörper markierten GFAP, dass die Inkubation der Astrozyten für 168 Stunden mit NH_4Cl (5mM) die Fluoreszenzintensität tendenziell um 21,7% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verringerte ($p=0,21$). Obwohl der Effekt in 5 unabhängigen Versuchen deutlich sichtbar war, konnte aufgrund eines Experiments in dem kein Effekt gemessen werden konnte, keine Signifikanz erreicht werden. Die mit $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) inkubierten Zellen zeigten eine signifikante Abnahme der anti-GFAP-Fluoreszenzintensität um 56,5% im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p<0,01$). Die mit $\text{TNF}\alpha$ (10ng/ml) oder Diazepam (10 μM) inkubierten Astrozyten zeigten keinen Unterschied in der anti-GFAP-Fluoreszenzintensität im Vergleich zur unbehandelten bzw. mit DMSO inkubierten Kontrolle.

Die mit NH_4Cl (5mM) oder $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5mM) inkubierten Zellen zeigten nach Markierung des GFAPs mit den polyklonalen Antikörpern keine signifikante aber eine tendenzielle Abnahme um 26,4% bzw. 23,2% der Immunfluoreszenz im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Aufgrund der geringen Anzahl

unabhängiger Experimente von n=3 und der hohen Streuung der Werte wurde keine statistische Signifikanz erreicht (NH₄Cl p=0,18; CH₃NH₃Cl p=0,11).

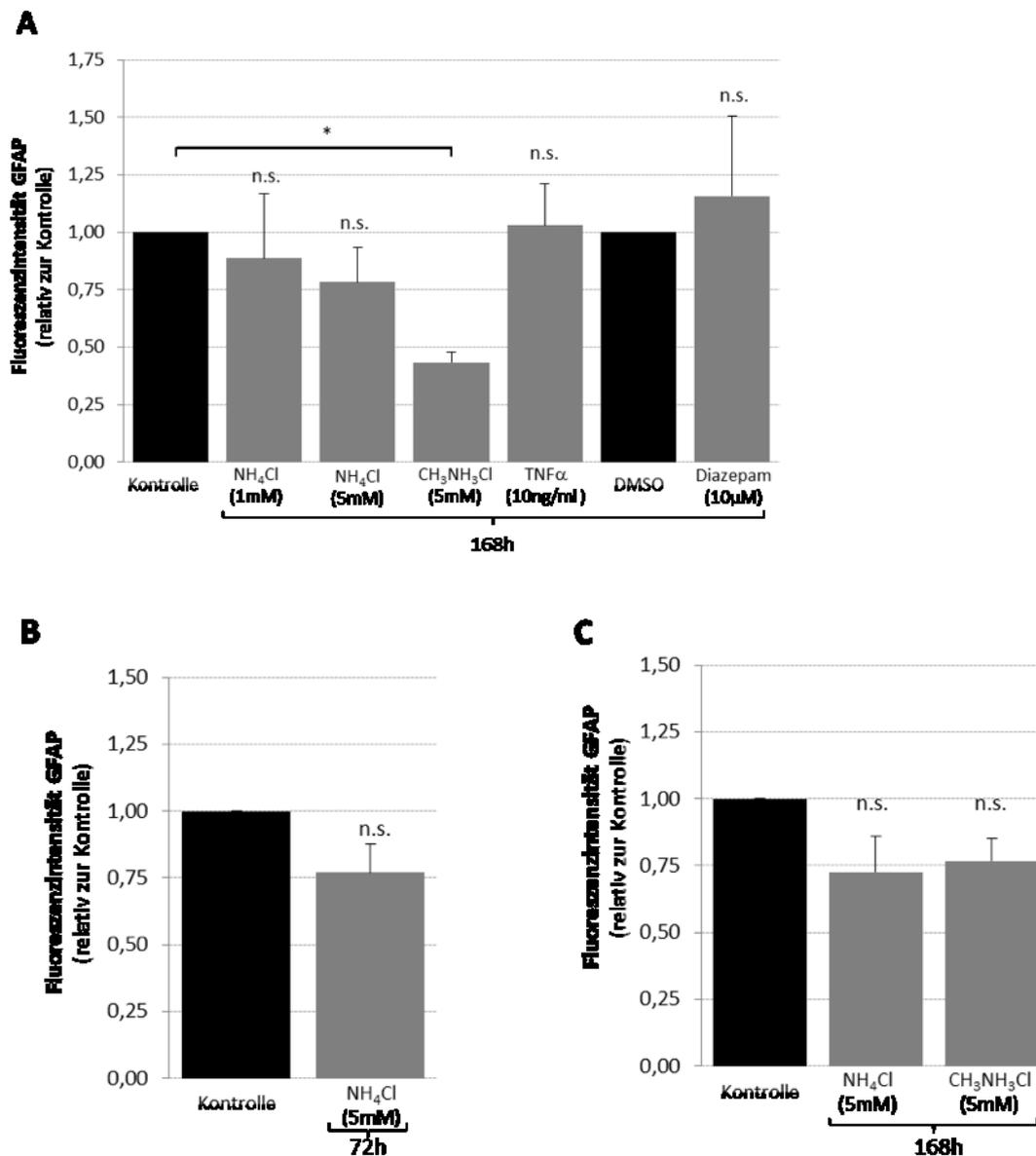


Abb. 37 Quantifizierung der anti-GFAP-Immunoreaktivität. Kultivierte Astrozyten wurden für **(A)** 168h mit NH₄Cl (5mM), CH₃NH₃Cl (5mM), TNFα (10ng/ml) oder Diazepam (10μM) oder **(B)** für 72h mit NH₄Cl (5mM) inkubiert und GFAP mit dem monoklonalen anti-GFAP Antikörper detektiert. **(C)** Inkubation der Astrozyten für 168h mit NH₄Cl (5mM), CH₃NH₃Cl (5mM) und Detektion von GFAP mit den polyklonalen anti-GFAP Antikörpern. Die Kontrollen blieben entweder unbehandelt oder wurden mit DMSO inkubiert. Die in den Kontrollen gefundene Fluoreszenzintensität wurde gleich 1 gesetzt und Veränderungen in den mit NH₄Cl, CH₃NH₃Cl, TNFα oder Diazepam inkubierten Zellen in Relation dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich (p<0,05). n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrolle. n=3-6.

3.4 Effekte von Ammoniak auf die Viabilität kultivierter Astrozyten

Der Einfluss von Ammoniak auf die Viabilität wurde durch Erfassung der Laktatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung im Zellkulturüberstand und durch Anfärbung toter oder sterbender Zellen mittels Propidiumiodid nachgewiesen.

3.4.1 Bestimmung der LDH-Aktivität

Wie in Abb. 38 erkennbar ist, konnte mittels photometrischer Bestimmung der LDH-Aktivität kein signifikanter Unterschied zwischen den für 168 Stunden mit NH_4Cl (5mM) inkubierten und den unbehandelten Astrozyten festgestellt werden. Zur Überprüfung der Assay-Funktionalität wurde als Positivkontrolle die LDH-Aktivität in reinem Astrozytenlysat gemessen. Erwartungsgemäß konnte in dieser Probe eine deutliche LDH-Aktivität nachgewiesen werden.

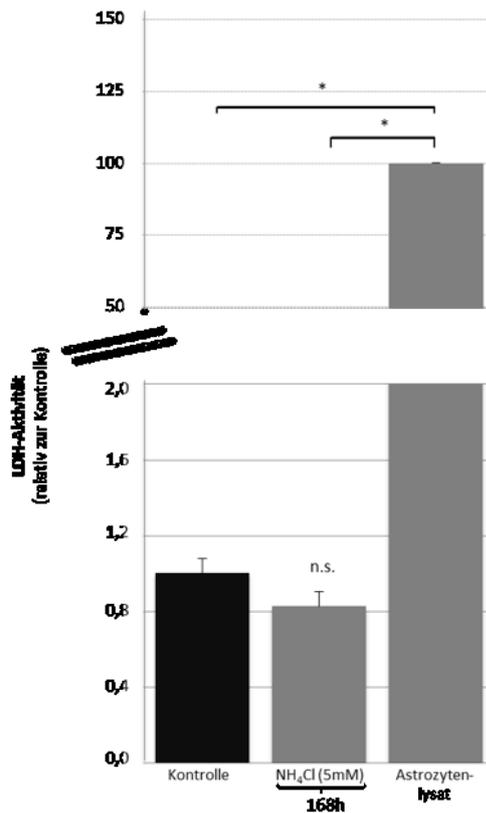


Abb. 38 Effekte von NH_4Cl auf die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand kultivierter Rattenastrozyten. Astrozyten wurden für 168h mit NH_4Cl (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Die LDH-Aktivität der Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt und die Veränderungen der LDH-Aktivität in den anderen Proben relativ dazu ausgedrückt. * Signifikant unterschiedlich. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der Kontrolle. n=3

3.4.2 Propidiumiodidfärbung

Wie in Abb. 39 dargestellt wurden tote bzw. sterbende Zellen mittels Propidiumiodidfärbung und Immunfluoreszenz nachgewiesen. Sowohl die unbehandelte Kontrolle, als auch die für 168 Stunden mit NH_4Cl (5mM) inkubierten Astrozyten zeigten keine Anfärbung der Zellkerne durch PI. Somit wurde die Viabilität der Astrozyten durch die Inkubation der Astrozyten mit NH_4Cl (5mM) für 168 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht beeinträchtigt. Die Permeabilisierung der Zellmembran mit Digitonin induzierte hingegen eine Anfärbung mit PI in jeder Zelle und belegt die Funktionalität des Nachweises.

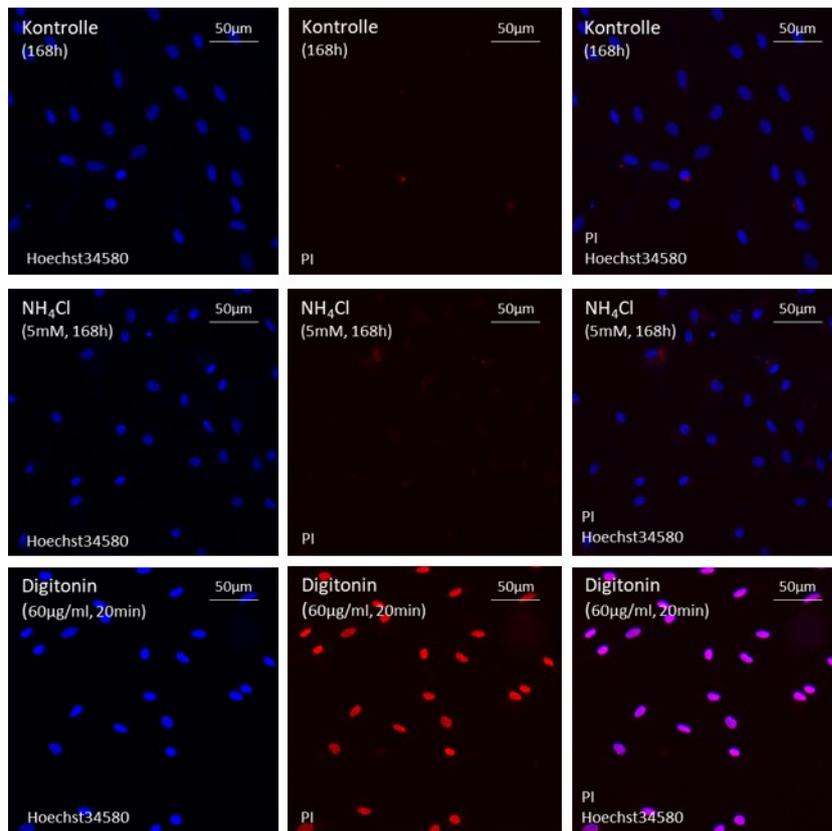


Abb. 39 Überprüfung der Zellviabilität mittels Propidiumiodidfärbung. Kultivierte Astrozyten wurden für 168h mit NH₄Cl (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Als technische Kontrolle wurden die Astrozyten für 20 min mit Digitonin inkubiert. Zellkerne wurden mit Hoechst34580 und Propidiumiodid (PI) angefärbt. Die Aufnahmen wurden mittels Epifluoreszenzmikroskopie aufgenommen (Vergrößerung: 250-fach). Die Abbildungen zeigen repräsentative Aufnahmen von 3 unabhängigen Versuchen.

4 Diskussion

4.1 Effekte HE-auslösender Faktoren auf Zellkernvolumen- und Morphologie

4.1.1 Effekte von Ammoniak und Methylammoniumchlorid

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es nur wenige detaillierte Untersuchungen zum Einfluss von Ammoniak auf das Zellkernvolumen und die Zellkernmorphologie von Astrozyten. 1912 beschrieben von Hösslin und Alzheimer erstmals morphologische Veränderungen von Astrozyten in der Westphal-Strümpell-Pseudesklerose, einer Erkrankung die sich später als identisch mit der Kupferspeicherkrankheit Morbus Wilson herausstellte. 1933 wurde von Scherer ein Zusammenhang zwischen den astrozytären Veränderungen und Lebererkrankungen festgestellt. 1942 beschrieben Waggoner und Malamund diese veränderten Astrozyten, die einen vergrößerten, gut abgrenzbaren Kern, sowie einen vergrößerten Nucleolus hatten und bezeichneten sie als Alzheimer Typ II Astrozyten. (Cavanagh and Kyu, 1971).

In HE-Tiermodellen, bei denen operativ portokavale Shunts in der Ratte angelegt wurden, wurden die Auswirkungen eines Leberversagens auf die Kerne der Astrozyten genauer untersucht (Cavanagh and Kyu, 1971). In der Arbeit von Pilbeam et al., 1983 wurden frühere Studien zusammengefasst, die eine Größenzunahme der Zellkerne im Gehirn von Ratten mit portokavalen Shunts (Hasson and Leech, 1967) beschrieben. Diese Größenzunahme konnte in anderen Arbeiten wie zum Beispiel von Cavanagh and Kyu, 1971 in perfusionsfixierten Tieren nur bei massiv unphysiologisch erhöhten Ammoniakspiegeln (bis zu ca. 520µg/dl) festgestellt werden, sodass sie bei der früher beschriebenen Größenzunahme von einem möglichen Artefakt der Immersionsfixierung ausgingen. Ein weiteres HE-Tiermodell mit operativ angelegten portosystemischen Shunts in der Ratte ergab eine initiale Volumenzunahme der Zellkerne in Astrozyten (2 Wochen nach Anlage des Shunts). Nach 4 Wochen normalisierte sich das Zellkernvolumen wieder auf den Ausgangswert und blieb konstant bis zur 16. Woche nach der Operation (letztgemessener Zeitpunkt) (Pilbeam et al., 1983). In derselben Studie wurden die Plasmaspiegel von Ammoniak nach Anlage der portokavalen Shunts gemessen. Diese Untersuchung ergab, dass die Ammoniakspiegel kurz nach der Operation am höchsten sind und im Verlauf wieder abfallen, sodass sich vermuten lässt, dass eine Volumenzunahme der Zellkerne abhängig ist von der Höhe des Ammoniakspiegels (Pilbeam et al., 1983). In weiteren Tiermodellen mit operativ angelegten portosystemischen Shunts zeigten sich bei Astrozyten in elektronenmikroskopischen Untersuchungen häufig in Paaren vorliegende Zellkerne ohne Anzeichen einer Mitose. Gelegentlich waren prominente, randständige Nucleoli und vermehrt kondensiertes Chromatin zu sehen (Norenberg and Lapham, 1974).

In Zellkulturstudien wurden an fixierten Astrozyten nach Ammoniakexposition nur in vereinzelten Astrozyten Zellkernveränderungen beobachtet, die als „nukleäre Irregularität“ mit erhöhter Chromatin

Kondensation und vergrößerten Nukleoli beschrieben wurden (Gregorios et al., 1985). Neuere Untersuchungen an vitalen mit Ammoniak behandelten Astrozyten zeigten eine rasch einsetzende Zellkernvolumenzunahme innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 20 Minuten (Lachmann et al., 2013). In der vorliegenden Studie wurden Effekte von Ammoniak auf das Zellkernvolumen und die Zellkernmorphologie an vitalen Astrozyten nach 24 bis 168 Stunden quantitativ gemessen. Nach 24 und 48 Stunden fanden sich ähnlich wie auch bei den Untersuchungen von Gregorios et al., 1985 beschrieben, keine signifikanten Veränderungen des Zellkernvolumens zwischen Kontrollen und Ammoniak-exponierten Zellen (Gregorios et al., 1985). Diese Beobachtung deckt sich ebenfalls mit den Erkenntnissen der oben beschriebenen Tiermodelle (Cavanagh and Kyu, 1971; Norenberg and Lapham, 1974). Nach 72 und bis zu 168 Stunden Inkubation mit NH_4Cl nahm das Zellkernvolumen der Astrozyten hingegen signifikant ab.

In Studien, in denen die Wirkung von Ammoniak auf Mitochondrien untersucht wurde, wurde sowohl im Tiermodell mit Hyperammonämie (Norenberg and Lapham, 1974) als auch an mit Ammoniak exponierten Astrozyten (Gregorios et al., 1985) ein gemeinsames Auftreten geschwollener und geschrumpfter Mitochondrien beschrieben. In den Zellkulturuntersuchungen zeigte sich die Mitochondrienschwellung vor allem in der Frühphase nach Ammoniakexposition, die Mitochondrienkontraktion erst ab dem vierten Tag nach Exposition. Die Zellkerne zeigen ähnlich wie die Mitochondrien eine rasche Schwellung nach Hyperammonämie (Lachmann et al., 2013), auf die nach Langzeitexposition mit Ammoniak, wie in der vorliegenden Studie gezeigt, eine Schrumpfung der Zellkerne erfolgt.

Norenberg beschrieb die Frühphase (bis zum vierten Tag nach Ammoniakexposition) als „reaktive Phase“ auf die akut einsetzende Hyperammonämie, die das morphologische Korrelat der Ammoniakdetoxifikation sein könnte und die späte Phase (ab dem 4. Tag nach Ammoniakexposition) als „degenerative Phase“, die Ausdruck des funktionellen Versagens der Astrozyten sein könnte (Norenberg, 1987). Die an kultivierten Astrozyten beschriebene initiale Zellkernschwellung nach Ammoniakexposition (Lachmann et al., 2013) könnte somit der Reaktion des Zellkerns innerhalb dieser „reaktiven Phase“ entsprechen. Die in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit beobachteten nicht signifikanten Veränderungen der Zellkernvolumina 24 und 48 Stunden nach Ammoniakexposition könnten für ein ausgewogenes Nebeneinander von „reaktiv“ und „degenerativ“ veränderten Zellkernen sprechen. Die Zellkernvolumenabnahme zwischen 72 und 168 Stunden könnte somit für ein anschließendes Überwiegen der „degenerativ“ veränderten Zellkerne sprechen.

Die bisherigen Untersuchungen zum Einfluss von Ammoniak auf die Zellkernmorphologie haben größtenteils qualitativen Charakter und erfassen die Veränderungen der Zellkerne im Gegensatz zu der vorliegenden Studie nicht quantitativ.

In Tiermodellen bei denen eine Hyperammonämie durch Verabreichung von MSO induziert wurde, wurden im zerebralen Kortex Alzheimer Typ II Astrozyten gefunden, deren Zellkerne einen leicht

unregelmäßigen Kernumriss zeigten (Gutierrez and Norenberg, 1977). Im HE-Tiermodell bei dem operativ portokavale Shunts angelegt wurden, fanden sich morphologische Zellkernveränderungen in Abhängigkeit der untersuchten Hirnregion. Im zerebralen Kortex wurden vorwiegend runde und ovale Zellkerne beobachtet, in den Basalganglien zeigten sich überwiegend ovale und deformierte Zellkerne, die von Cavanagh and Kyu, 1971 als „gefaltet“ beschrieben wurden. Im Gyrus dentatus wurde die Form der Zellkerne als „gefaltet und verlängert“ beschrieben, runde Zellkerne wurden nur vereinzelt beobachtet. Fünf Wochen nach der Operation wurde ein Anstieg der deformierten Zellkerne (von Cavanagh und Kyu als „gefaltet und verdreht beschrieben“), vor allem im Gyrus dentatus beobachtet. Im Kortex zeigten sich hingegen keine Veränderungen (Cavanagh and Kyu, 1971).

In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte bereits ab 24 Stunden eine Verminderung der Zellkernfläche und ab 48 Stunden eine Abnahme des Zellkernumfangs beobachtet werden. Zusätzlich nahm die Zirkularität der Zellkerne nach 24 Stunden zunächst ab, im Zeitverlauf bis 168 Stunden nahm die Zirkularität zu.

Im Tiermodell von Cavanagh and Kyu, 1971 wurden im zerebralen Kortex keine Veränderungen der Zellkernmorphologie beschrieben, allerdings wurde im Gegensatz zu dieser Arbeit in der vorliegenden Untersuchung zum einen mit unfixierten, vitalen Zellen gearbeitet und zum anderen wurden die Parameter der Zellkernmorphologie quantitativ erfasst. Darüber hinaus sind die von uns gemessenen Unterschiede zwar signifikant, aber sehr gering, sodass man davon ausgehen kann, dass sie ohne eine Quantifizierung, also rein qualitativ visuell, nicht erfasst werden können.

In einer anderen Studie wurde die Auswirkung einer ammoniakreichen Ernährung auf die Zellkernfläche von Neuronen im entorhinalen Kortex untersucht (Insausti et al., 1997). Hierfür wurden Ratten für zwei oder acht Wochen mit einer Ammoniumazetat-haltigen Diät gefüttert. Die quantitative Auswertung ergab eine zeitabhängige signifikante Reduktion der Zellkernfläche der Neuronen nach zwei bzw. acht Wochen verglichen mit einer Kontrollgruppe (Insausti et al., 1997).

Es gibt Indizien dafür, dass die Zellkerngröße ein Indikator für die transkriptionelle Aktivität von Zellen sein könnte und eine Reduktion der Zellkerngröße somit für eine eingeschränkte Transkription sprechen könnte (Smiałowska et al., 1988). Da es sich bei Neuronen und Astrozyten um unterschiedliche Zellarten handelt, können Auswirkungen von Veränderungen der Zellkernmorphologie und -Größe auf die Transkription unterschiedlich sein. Da es sich aber in beiden Fällen um eine Verkleinerung der Zellkernfläche handelt, könnten diese Daten und unsere Ergebnisse darauf hindeuten, dass es sich in unseren Untersuchungen um „degenerativ“ veränderte Astrozyten handeln könnte, die in der Ausübung ihrer Funktion bereits eingeschränkt sind und dadurch für die Symptome der hepatischen Enzephalopathie mitverantwortlich sein könnten.

Die Inkubation von Astrozyten mit Methylammoniumchlorid erniedrigt, ähnlich wie die Inkubation mit Ammoniak, den pH-Wert und erhöht den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels (Nagaraja and Brookes, 1998). Im Gegensatz zu Ammoniak kann Methylammoniumchlorid quantitativ nur unbedeutend für die

Synthese von Glutamin herangezogen werden (Nakamura and Hagen, 2002; Seglen et al., 1979). Daher wird Methylammoniumchlorid insbesondere dafür verwendet, pH-Wert-Verschiebungen herbeizuführen, die auch durch NH_4Cl induziert werden.

Bislang sind die Mechanismen, die den Ammoniak-induzierten Veränderungen von Zellkernvolumen und Zellkernmorphologie zugrunde liegen noch nicht beschrieben worden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Inkubation mit Methylammoniumchlorid nach 168 Stunden Veränderungen von Zellkernfläche und Zellkernumfang (Verringerung der Fläche um 23,04%, Umfang um 13,11%) in ähnlicher Größenordnung wie nach Inkubation mit Ammoniak (Verringerung der Fläche um 20,38%, Umfang um 11,93%) hervorruft. Wie auch nach Inkubation mit Ammoniak verkleinerte sich das Volumen der Zellkerne nach 168-stündiger Inkubation mit Methylammoniumchlorid. Interessanterweise verringert sich das Zellkernvolumen nach Methylammoniumchloridexposition nahezu dreifach stärker als nach Ammoniakexposition (16,88% vs. 5,9% Zellkernvolumenabnahme). Der geringere Effekt von Ammoniak auf das Zellkernvolumen könnte darauf zurückzuführen sein, dass Ammoniak im Gegensatz zu Methylammoniumchlorid quantitativ bedeutsam in Glutamin umgewandelt und dadurch besser entgiftet werden kann.

Methylammoniumchlorid erhöhte nach 168 Stunden ähnlich wie Ammoniak die Zirkularität der Zellkerne. Allerdings war dieser Effekt statistisch nicht signifikant, zeigte aber eine deutliche Tendenz. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Ammoniak und Methylammoniumchlorid ähnliche Wirkungen auf das Zellkernvolumen und die Zellkernmorphologie haben, das Ausmaß der Veränderungen aber unterschiedlich ausgeprägt ist. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Ammoniak-induzierten Zellkernveränderungen über Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes vermittelt werden könnten. Zusätzlich könnten aber noch weitere unbekannte Mechanismen involviert sein.

4.1.2 Wirkungen von $\text{TNF}\alpha$ oder Diazepam und Koexposition mit Ammoniak

Die HE-präzipitierenden Faktoren $\text{TNF}\alpha$ und Diazepam induzieren teilweise ähnliche Veränderungen in Astrozyten wie Ammoniak. Bereits bekannt ist unter anderem, dass Ammoniak, $\text{TNF}\alpha$ und Diazepam eine Astrozytenschwellung und die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffmetabolite induzieren (Häussinger, 2006). Zusätzlich initiiert die Astrozytenschwellung eine vermehrte Protein-Tyrosin-Nitrierung (Häussinger and Schliess, 2005) und RNA-Oxidation (Görg et al., 2008), was zu Veränderungen in der Proteinsynthese und Genexpression führen könnte. Der Zellkern einer Zelle ist maßgeblich für die Genexpression verantwortlich und beeinflusst die Proteinsynthese. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es kaum Daten zum Einfluss von HE-auslösenden Faktoren wie $\text{TNF}\alpha$ und Diazepam auf das Zellkernvolumen. Bisher wurde an kultivierten Rattenastrozyten gezeigt, dass $\text{TNF}\alpha$ und Diazepam

nicht nur innerhalb von 20 Minuten eine Astrozytenschwellung hervorrufen, sondern auch zu einer Zellkernvolumenzunahme in ähnlichem Ausmaß wie durch Ammoniak ausgelöst (um ca. 20%) führen (Lachmann et al., 2013). Die Versuche der vorliegenden Arbeit zeigen 24 Stunden nach Inkubation mit TNF α ebenfalls eine Volumenzunahme der Zellkerne, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß als die, die nach 20 Minuten gemessen wurden (20% vs. 6,4%). An den anderen untersuchten Zeitpunkten (48, 72, 120 und 168 Stunden) zeigte sich hingegen kein Unterschied zwischen dem Zellkernvolumen der mit TNF α inkubierten Astrozyten und den Kontrollen. Die Inkubation mit Diazepam induzierte hingegen an keinem der Untersuchungszeitpunkte eine Veränderung des Zellkernvolumens. In der Studie von Lachmann et al., 2013 wurde das Zellkernvolumen nach Kurzzeitexposition mit TNF α und Diazepam untersucht, wohingegen in der vorliegenden Arbeit die Effekte einer Langzeitexposition mit TNF α und Diazepam betrachtet wurden. Die initiale Schwellung der Zellkerne könnte wie auch schon für Ammoniak vermutet, eine frühe „reaktive Phase“ der Zellen widerspiegeln, die nach Inkubation mit TNF α bis zu 24 Stunden, nach Inkubation mit Diazepam bis zu einem früheren, in unseren Experimenten nicht untersuchten Zeitpunkt anhält. Die darauffolgenden gleichbleibenden Zellkernvolumina zu späteren Zeitpunkten könnte Ausdruck des ausgeglichenen Vorliegens „reaktiver“ und „degenerativer“ Zellen sein.

Die Auswirkungen von TNF α und Diazepam auf die Zellkernmorphologie wurden bislang noch nicht untersucht. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergaben sich für beide HE-relevanten Faktoren nur transiente, quantitativ geringfügige Veränderungen im Hinblick auf die Zellkernmorphologie. Nach 48 Stunden Inkubation mit TNF α zeigte sich eine Abnahme der Zirkularität. Die mit Ammoniak inkubierten Zellkerne zeigten diese Reaktion nach 24 Stunden. Diese Ergebnisse könnten auf eine verzögerte Wirkung von TNF α im Vergleich zu Ammoniak hindeuten. Im Gegensatz dazu konnten wir nach Inkubation mit Diazepam erst nach 168 Stunden eine Abnahme der Zirkularität feststellen. 168 Stunden nach Ammoniakexposition nahm die Zirkularität bereits zu. Diese Untersuchungen zeigen, dass die Exposition kultivierter Astrozyten mit TNF α und Diazepam die Zirkularität der Zellkerne verändert, jedoch nicht auf identische Art und Weise wie Ammoniak. Ob die Veränderungen durch gleiche oder unterschiedliche Mechanismen vermittelt werden, kann derzeit nicht beantwortet werden.

Nach Inkubation mit Diazepam für 120 Stunden zeigte sich eine Abnahme des Zellkernumfangs und darauffolgend nach 168 Stunden eine Flächenabnahme der Zellkerne. Die Inkubation der Astrozyten mit Ammoniak führte ebenfalls erst zu einer Abnahme von Zellkernfläche- und Umfang und zeitverzögert zu einer Zellkernvolumenabnahme. Die im Vergleich zu Ammoniak später einsetzende Abnahme von Zellkernfläche- und Umfang nach Inkubation mit Diazepam könnte auf eine verzögert beginnende „degenerative Phase“ hindeuten. Um diese These zu überprüfen, müssten in weiteren Experimenten spätere Zeitpunkte untersucht werden.

Des Weiteren ist bekannt, dass TNF α und Diazepam synergistisch mit Ammoniak in Astrozyten wirken. In einer Studie von Bender and Norenberg, 1998 zeigte sich, dass die Inkubation kultivierter Astrozyten mit Diazepam für 6 bis 72 Stunden das Zellvolumen nicht veränderte. Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Diazepam und Ammoniak dagegen konnte die Ammoniak-induzierte Zellschwellung sogar weiter verstärken. Eine Astrozytenschwellung wiederum führt wie bereits erwähnt zum einen zu RNA-Oxidation (Görg et al., 2008) und zum anderen zur Protein-Tyrosin-Nitrierung, die ebenfalls durch eine simultane Inkubation von TNF α bzw. Diazepam mit Ammoniak verstärkt wird (Görg et al., 2003; Häussinger and Schliess, 2008). Die Auswirkungen einer simultanen Inkubation kultivierter Astrozyten mit Ammoniak und TNF α bzw. Diazepam auf das Zellkernvolumen und die Zellkernmorphologie wurden bisher noch nicht untersucht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass nach 72 Stunden für keinen der untersuchten Parameter (Zellkernvolumen, Zellkernfläche, Zellkernumfang und Zellkernzirkularität) ein signifikanter Unterschied zwischen den alleinig mit Ammoniak inkubierten und den simultan inkubierten Astrozyten besteht. Die für die Zellvolumenänderungen gezeigte synergistische Wirkung von Ammoniak und Diazepam (Bender and Norenberg, 1998; Rama Rao et al., 2010) konnte in den vorliegenden Untersuchungen für das Zellkernvolumen und die Zellkernmorphologie nicht gezeigt werden. Da wie oben erwähnt auch die alleinige Inkubation mit TNF α bzw. Diazepam nur zu quantitativ geringen und transienten Veränderungen des Zellkernvolumens und der Zellkernmorphologie geführt hat, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass TNF α und Diazepam ihre Hauptwirkungen, die zur Auslösung von Episoden der HE führen, nicht durch Veränderungen des Zellkernvolumens und der Zellkernmorphologie der Astrozyten ausüben, sondern diese über andere Mechanismen vermittelt werden. Des Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich kultivierte Zellen untersucht, sodass eine Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen derzeit noch nicht vorgenommen werden kann.

4.2 Auswirkungen HE-auslösender Faktoren auf das Zytoskelett

Für die Aufrechterhaltung der Größe und Morphologie des Zellkerns, sowie dessen Positionierung innerhalb der Zelle ist ein intaktes Zytoskelett essentiell. Über den sogenannten LINC-Komplex, bestehend aus Nesprinen (Proteinen der äußeren Kernmembran (ONM)) und Sun-Proteinen (Proteinen der Inneren Kernmembran (INM)) werden Aktin- und Intermediärfilamente mechanisch mit dem Zellkern verbunden (Stewart et al., 2007). Die Kopplung der Aktinfilamente wird dabei über Nesprin 1/2 und Sun-Proteine (Padmakumar et al., 2005), die der Intermediärfilamente über Plectin, Nesprin 3 und Sun-Proteine vermittelt (Stewart et al., 2007). Eine Zerstörung des Aktinzytoskeletts durch Latrunculin B führte in Zellkulturexperimenten zu einer Verkleinerung der Kerngröße, was auf eine Bedeutung des Aktinzytoskeletts für die Aufrechterhaltung der Kerngröße schließen lässt (Lu et al., 2012). Zugleich ist ein intakter LINC-Komplex für die Kerngröße, Kernform und Kernstruktur von Bedeutung (Anno et al., 2012). In Brustkrebsgewebe, in dem sich Kerndeformitäten zeigten, konnte

beispielsweise eine verminderte Expression des LINC-Komplexes festgestellt werden (Matsumoto et al., 2015). In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass Mutationen verschiedener Nesprindomänen die Kerngröße modulieren (Lu et al., 2012), was darauf hinweist, dass Mutationen in Nesprindomänen deren Funktionalität verändern, bzw. zu einem Funktionsverlust führen können. Ebenfalls wurden bereits eine Vielzahl an Erkrankungen beschrieben, die mit Nesprinmutationen in Verbindung stehen, beispielsweise die Emery-Dreifuss Muskeldystrophie, die dilatative Kardiomyopathie oder die zerebelläre Ataxie (Isermann and Lammerding, 2013). Da die Intermediärfilamente genau wie das Aktinzytoskelett über Nesprine mit dem Zellkern verbunden sind, könnte auch ihnen eine Rolle in der Form- und Größenerhaltung der Zellkerne zukommen. Die Inkubation kultivierter Astrozyten mit Ammoniak für 15 min induziert bereits morphologische Veränderungen des F-Aktins, beschrieben als „diffuse Ringstrukturen“ (Andersson et al., 2009) und verringert die Expression sowohl von F-Aktin, als auch von GFAP auf Proteinebene nach 5 und 7-tägiger, bzw. nach 5-tägiger Ammoniakexposition im Vergleich zur Kontrolle (Bodega et al., 2006). Im Einklang mit diesen Daten zeigt die vorliegende Arbeit, dass Ammoniak in kultivierten Astrozyten nach 168 Stunden sowohl die Quantität der Aktinfilamente vermindert, als auch deren Struktur beeinträchtigt.

Die Inkubation der Astrozyten mit Ammoniak führte in der hier vorliegenden Arbeit außerdem zu einer Verringerung der GFAP-Filamente und einer veränderten strukturellen Anordnung. Dabei konzentrierten sich die verbliebenen Filamente lokal innerhalb der Zelle. Die Fluoreszenzintensität war dabei sowohl nach Markierung mit einem monoklonalen als auch mit einem polyklonalen Antikörper tendenziell verringert. Aufgrund der geringen n-Zahl bei Verwendung des polyklonalen gegen GFAP gerichteten Antikörpers und einer Präparation in der eine erhöhte GFAP-Fluoreszenzintensität nach Markierung mit dem monoklonalen Antikörper gefunden wurde, war die Fluoreszenzintensitätsabnahme statistisch nicht signifikant. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass Ammoniak die Expression und Polymerisation der Intermediärfilamente in Astrozyten stark beeinträchtigt. Ein Hinweis darauf, dass eine Veränderung der GFAP-Expression zu einer Astrozytenfunktionsstörung beiträgt ist die Parallele zu der Alexander-Krankheit, einer degenerativen Erkrankung, die durch Mutationen im GFAP Gen hervorgerufen wird. Frühere Zellkulturstudien und Studien an menschlichen Hirnschnitten haben gezeigt, dass Astrozyten mit Mutationen, die in der Alexander-Krankheit vorkommen, sowohl morphologische Veränderungen (vergrößerte Zellen und große, rund/ovale Zellkerne) zeigen, als auch vermehrt oxidativem und nitrosativem Stress ausgesetzt sind (Sosunov et al., 2018). Ähnliche Beobachtungen in Astrozyten konnten in Tiermodell- und Zellkulturstudien zur HE gemacht werden (Görg et al., 2013b; Lachmann et al., 2013).

Eine Vielzahl früherer Untersuchungen ergab, dass eine Hyperammonämie sowohl im Tiermodell (Bélanger et al., 2002; Mani et al., 2017; Suárez et al., 2005), als auch in der Zellkultur (Bodega et al., 2006; Leite et al., 2006; Norenberg et al., 1990) die GFAP Expression vermindert. Demgegenüber konnte dies in anderen Arbeiten nicht gezeigt werden. Beispielsweise wurde Hasen in einem

Tiermodell entweder durch Ammoniumacetatinfusion oder durch Leberdevaskularisierung eine schwere HE hinzugefügt. Diese entwickelte sich bei den Tieren, die eine Ammoniumacetatinfusion erhielten nach etwa 20 Stunden, bei denen die einer Leberdevaskularisierung unterzogen wurden nach etwa 14 Stunden. Nach der Tötung der Tiere und Bestimmung der Konzentration an GFAP konnte weder im zerebralen Kortex, noch im Zerebellum, im Hippocampus oder im Hirnstamm eine Veränderung der GFAP-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Groeneweg et al., 1993). Hiba et al., 2016 beschrieben, dass Veränderungen der GFAP-Expression abhängig seien vom gewählten Tiermodell, der Hirnregion und dem Stadium der HE. So wurde in dieser Studie an gallengangslegierten Ratten im Stadium einer milden HE vier Wochen nach Anlage einer Gallengansligatur im Open-Field-Test eine signifikant verringerte Aktivität der motorischen Leistung gezeigt. Die GFAP-Expression war im Kortex erhöht, im Hippocampus, der Substantia nigra und im dorsalen Striatum hingegen erniedrigt. In zerebellären Hirnschnitten von verstorbenen HE-Patienten zeigten sich in den Bergmann-Glia keine Veränderungen der GFAP-Expression (Kril et al., 1997). Dieser Befund stimmt nicht überein mit einer tierexperimentellen Studie, in der an Ratten mit portokavaler Anastomosierung eine vermehrte GFAP-Expression in Bergmann-Glia beschrieben wurde (Suárez et al., 1992). Zusammengefasst divergieren die Daten von Tiermodellen zur GFAP-Expression im Zerebellum bei Hyperammonämie zu Befunden an post mortem Hirnproben an HE-Patienten, was zeigt, dass Ergebnisse, die aus Tiermodellen erhalten wurden, nicht auf den Menschen übertragen werden können. Des Weiteren ist es denkbar, dass die in den oben genannten Studien beschriebenen Immunfluoreszenzunterschiede auf eine veränderte Bindung des Antikörpers und nicht auf eine verringerte GFAP-Expression zurückzuführen sind. In der vorliegenden Arbeit wurde ein monoklonaler und ein polyklonaler gegen GFAP gerichteter Antikörper verwendet. In beiden Versuchen ergab sich eine tendenziell verminderte GFAP-Expression, sodass wir hier eher nicht von einer veränderten Bindung des Antikörpers ausgehen.

Da Methylammoniumchlorid ähnliche Kernveränderungen in kultivierten Astrozyten hervorgerufen hat wie Ammoniak, haben wir die Wirkungen von Methylammoniumchlorid auf die Expression von F-Aktin und GFAP untersucht. Methylammoniumchlorid führte wie Ammoniak zu Veränderungen des F-Aktins, ähnlich wie nach Inkubation mit Latrunculin B. Die charakteristische Anordnung der F-Aktinfilamente war deutlich beeinträchtigt und die Fluoreszenzintensität vermindert. Die GFAP-Expression war nach Inkubation mit Methylammoniumchlorid ebenfalls beeinträchtigt: Die fibrilläre Struktur des GFAP, wie auch die Stärke der Immunfluoreszenz waren nach Markierung mit einem monoklonalen Antikörper vermindert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach Markierung mit einem polyklonalen Antikörper erhalten. Diazepam und $\text{TNF}\alpha$, die nur quantitativ geringfügig und transient das Zellkernvolumen und die Morphologie der Zellkerne veränderten, induzierten im Gegensatz zu Ammoniak und Methylammoniumchlorid weder strukturelle Veränderungen des F-Aktins noch des GFAPs, noch Veränderungen der jeweiligen Fluoreszenzintensitäten. Diese Ergebnisse deuten darauf

hin, dass die Ammoniak-induzierten Veränderungen des Zellkernvolumens und der Zellkernmorphologie auf eine Dysregulierung des Aktinzytoskeletts und des Intermediärfilaments GFAP zurückzuführen sein könnten. Die dem Ammoniak ähnliche Wirkung von Methylammoniumchlorid auf die Morphologie und das Volumen der Zellkerne lässt vermuten, dass die Veränderungen des Zytoskeletts auf pH-Wert Verschiebungen und nicht auf eine vermehrte Glutaminbildung zurückzuführen sein könnten.

Da das Aktinzytoskelett u.a. über Nesprin-2 an die Zellkernmembran gekoppelt ist (Padmakumar et al., 2005), wurden in der vorliegenden Arbeit auch die Auswirkungen von Ammoniak und Methylammoniumchlorid auf die Expression und Lokalisation von Nesprin-2 in kultivierten Rattenastrozyten untersucht. Sowohl Ammoniak als auch Methylammoniumchlorid veränderten die intrazelluläre Lokalisation von Nesprin-2 von einer prädominant nukleären zu einer verstärkt zytosolischen. Eine verminderte Kernlokalisation von Nesprin-2 konnte in Fibroblasten und Myoblasten von Patienten mit Emery Dreifuss Muskeldystrophie mit einer Nesprinmutation festgestellt werden. In diesen Zellen konnten zusätzlich Veränderungen der nukleären Morphologie festgestellt werden (sowohl kleine, als auch außergewöhnlich große Zellkerne, die in ihrer Form als „gewunden“ beschrieben wurden) (Zhang et al., 2007). Diese Erkenntnisse geben Hinweise darauf, dass eine veränderte Nesprinlokalisation mit morphologischen Kernveränderungen zusammenhängen könnte. Die in unseren Untersuchungen gezeigten Lokalisationsänderungen von Nesprin-2, als auch die qualitativen und quantitativen Veränderungen des F-Aktins könnten gemeinsam zu einer mechanischen Entkopplung von Zellkern und Zytoskelett und darüber zu Größen- und Formänderungen der Zellkerne führen. Lu et al., 2012 zeigten in ihrer Arbeit, dass Nesprin-2 über das N-terminale Ende nicht nur mit Aktin, sondern auch mit Nesprin-3 interagiert, welches wiederum für die mechanische Verbindung zwischen Intermediärfilamenten und dem Zellkern verantwortlich ist. Auf diese Weise könnte die Lokalisationsänderung von Nesprin-2 in mit Ammoniak behandelten Astrozyten die Kopplung der Intermediärfilamente mit der Kernhülle beeinflussen und über diesen Mechanismus ebenfalls die Zellkernmorphologie modulieren.

Eine intakte Kernarchitektur ist für die Organisation und Regulierung funktioneller Prozesse in der Zelle notwendig (Matsumoto et al., 2015; Starr and Han, 2002). Die durch Ammoniak veränderte Kerngröße und Kernmorphologie könnte in einer gestörten Funktionalität des Zellkerns resultieren und dadurch möglicherweise zu Genexpressionsänderungen führen. Bekannt ist zum Beispiel, dass eine durch portokavale Anastomosen herbeigeführte Hyperammonämie mit einer Hochregulierung der PBR-mRNA im Gehirn verbunden ist (Desjardins et al., 1999), welche für das vermehrte Ansprechen auf Benzodiazepine von Patienten mit HE verantwortlich sein könnte (Bakti et al., 1987). Zusätzlich wurde an kultivierten Astrozyten gezeigt, dass die Expression der Glutamattransporter GLAST und GLT-1 auf Protein- und RNA-Ebene, die für die Wiederaufnahme von Glutamat in die Zelle zuständig sind (Butterworth, 2002), nach Ammoniakexposition vermindert ist. Gegenwärtig wird davon ausgegangen,

dass diese Genexpressionsänderungen sekundär zur Ausbildung neuronaler Funktionsstörungen und der Symptome der HE beitragen. In wie weit die in unseren Untersuchungen festgestellten Wirkungen von Ammoniak auf Zytoskelett und Zellkern für die Genexpressionänderungen in der HE verantwortlich sein könnten muss in weiteren Studien genauer untersucht werden.

4.3 Wirkungen von Ammoniak auf die Viabilität kultivierter Rattenastrozyten

Wie schon in früheren Studien gezeigt, wird die Morphologie von Astrozyten durch eine Hyperammonämie im Gehirn von HE-Tiermodellen stark beeinflusst (Cavanagh and Kyu, 1971), wohingegen Neurone keine deutlich erkennbaren morphologischen Veränderungen zeigen (Gutierrez and Norenberg, 1977). Dies könnte Ausdruck einer beeinträchtigten Viabilität sein. Im Gegensatz zu dieser Annahme konnte in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass die morphologischen Veränderungen der Astrozyten nicht mit einem vermehrten Zelluntergang einhergehen. Jayakumar et al., 2004 und Schliess et al., 2002 zeigten, dass eine Ammoniakexposition (NH_4Cl 5mM für 24 Stunden) in kultivierten Astrozyten keine vermehrte LDH-Freisetzung induziert. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnten Widmer et al., 2007 ebenfalls keine verminderte Viabilität kultivierter Astrozyten nach Ammoniakexposition (NH_4Cl 5mM für 4-24 Stunden) feststellen. Auch die Langzeitexposition über bis zu 72 Stunden erhöhte weder die LDH-Aktivität oder die Membranpermeabilität für PI, noch die TUNEL-Immunoreaktivität (Oenarto et al., 2016). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden die kultivierten Astrozyten über einen deutlich längeren Zeitraum (bis zu 168 Stunden) mit Ammoniak inkubiert und zeigten zu diesem Zeitpunkt einen signifikant verkleinerten Zellkern. Da eine Schrumpfung des Zellkerns Ausdruck von nekrotischem Zelltod sein kann, haben wir mittels LDH-Aktivitätsmessung und Propidiumiodidfärbung untersucht, ob die Ammoniakexposition für 168 Stunden zu einem vermehrten Zelluntergang der Astrozyten führt. Unsere Untersuchungen ergaben, dass die Langzeitinkubation mit NH_4Cl für bis zu 168 Stunden die Viabilität kultivierter Astrozyten nicht verminderte. Daraus lässt sich ableiten, dass Ammoniak die Morphologie und das Volumen der Zellkerne zwar verändert, dies aber nicht Folge einer verringerten Viabilität ist.

Interessanterweise konnte aber gezeigt werden, dass Ammoniak in monokultivierten Neuronen gemessen mittels des MTT-Assays im Gegensatz zu monokultivierten Astrozyten Zelluntergang induziert (Klejman et al., 2005), obwohl im *in situ* Tiermodell keine morphologischen Veränderungen von Neuronen beschrieben wurden (Gutierrez and Norenberg, 1977). Möglicherweise werden die Neurone *in situ* durch die Anwesenheit der Astrozyten vor der Ammoniaktoxizität geschützt. Ein Wegfall dieser Schutzfunktion könnte eine Erklärung für den erhöhten Zelluntergang in den Ammoniak exponierten monokultivierten Neuronen sein. Diese These wird durch eine Studie von Rao et al., 2005 unterstützt, in der eine erhöhte LDH-Aktivität nach 48 stündiger Ammoniakexposition für monokultivierte Neurone, nicht aber für die mit Astrozyten kokultivierten Neurone festgestellt wurde.

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Neurone vor der Ammoniaktoxizität geschützt werden können, solange sie in ausreichendem Maß von funktionsfähigen Astrozyten umgeben sind.

4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass eine langanhaltende Ammoniak-Exposition in kultivierten Rattenastrozyten das Zellkernvolumen verringert und die Zellkernmorphologie verändert. Diese Veränderungen gehen einher mit einer verminderten Expression von GFAP und F-Aktin, sowie einer verstärkten zytoplasmatischen Lokalisation von Nesprin-2. Die Wirkungen von Ammoniak auf die Zellkerne der Astrozyten könnten für die in der HE beschriebenen Genexpressionsänderungen und der sich im Verlauf entwickelnden Astrozytenfunktionsstörung mitverantwortlich sein. Die eingeschränkte Astrozytenfunktion könnte sekundär eine neuronale Funktionseinschränkung bedingen, aus der die Symptome der HE resultieren könnten.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Bedeutung der in dieser Arbeit gefundenen Änderungen der Kernmorphologie, des Kernvolumens und der Expression von zytoskelettalen Proteinen für die bei der HE beobachteten Genexpressionsänderungen zu überprüfen.

5 Literaturverzeichnis

Amodio, P., and Montagnese, S. (2015). Clinical Neurophysiology of Hepatic Encephalopathy. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 5, S60–S68.

Amodio, P., Del Piccolo, F., Pettenò, E., Mapelli, D., Angeli, P., Iemmolo, R., Muraca, M., Musto, C., Gerunda, G., Rizzo, C., et al. (2001). Prevalence and prognostic value of quantified electroencephalogram (EEG) alterations in cirrhotic patients. *J. Hepatol.* 35, 37–45.

Amodio, P., Bemeur, C., Butterworth, R., Cordoba, J., Kato, A., Montagnese, S., Uribe, M., Vilstrup, H., and Morgan, M.Y. (2013). The nutritional management of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: International society for hepatic encephalopathy and nitrogen metabolism consensus. *Hepatology* 58, 325–336.

Andersson, A.K., Adermark, L., Persson, M., Westerlund, A., Olsson, T., and Hansson, E. (2009). Lactate Contributes to Ammonia-Mediated Astroglial Dysfunction During Hyperammonemia. *Neurochem. Res.* 34, 556.

Anno, T., Sakamoto, N., and Sato, M. (2012). Role of nesprin-1 in nuclear deformation in endothelial cells under static and uniaxial stretching conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 424, 94–99.

Bakti, G., Fisch, H.U., Karlaganis, G., Minder, C., and Bircher, J. (1987). Mechanism of the excessive sedative response of cirrhotics to benzodiazepines: Model experiments with triazolam. *Hepatology* 7, 629–638.

Bass, N.M., Mullen, K.D., Sanyal, A., Poordad, F., Neff, G., Leevy, C.B., Sigal, S., Sheikh, M.Y., Beavers, K., Frederick, T., et al. (2010). Rifaximin Treatment in Hepatic Encephalopathy. *N. Engl. J. Med.* 362, 1071–1081.

Bélanger, M., Desjardins, P., Chatauret, N., and Butterworth, R.F. (2002). Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute hyperammonemia. *Neurochem. Int.* 41, 155–160.

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

Bernuau, J., Rueff, B., and Benhamou, J.-P. (1986). Fulminant and Subfulminant Liver Failure: Definitions and Causes. *Semin. Liver Dis.* 6, 97–106.

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

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

Butterworth, R.F. (2002). Glutamate transporters in hyperammonemia. *Neurochem. Int.* 41, 81–85.

Butterworth, R.F. (2008). Pathophysiology of hepatic encephalopathy: The concept of synergism. *Hepatol. Res.* 38, S116–S121.

Butterworth, R.F. (2010). Altered glial–neuronal crosstalk: Cornerstone in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem. Int.* 57, 383–388.

Butterworth, R.F. (2016). Pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis: the concept of synergism revisited. *Metab. Brain Dis.* 31, 1211–1215.

- Butterworth, R.F., Giguère, J.F., Michaud, J., Lavoie, J., and Layrargues, G.P. (1987). Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem. Pathol.* 6, 1–12.
- Cagnon, L., and Braissant, O. (2008). Role of caspases, calpain and cdk5 in ammonia-induced cell death in developing brain cells. *Neurobiol. Dis.* 32, 281–292.
- Cavanagh, J.B., and Kyu, M.H. (1971). Type II Alzheimer change experimentally produced in astrocytes in the rat. *J. Neurol. Sci.* 12, 63–75.
- Chepkova, A.N., Doreulee, N., Yanovsky, Y., Mukhopadhyay, D., Haas, H.L., and Sergeeva, O.A. (2002). Long-lasting enhancement of corticostriatal neurotransmission by taurine. *Eur. J. Neurosci.* 16, 1523–1530.
- Cooper, A.J., and Plum, F. (1987). Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.* 67, 440–519.
- Córdoba, J., Gottstein, J., and Blei, A.T. (1996). Glutamine, myo-inositol, and organic brain osmolytes after portocaval anastomosis in the rat: Implications for ammonia-induced brain edema. *Hepatology* 24, 919–923.
- Crisp, M., Liu, Q., Roux, K., Rattner, J.B., Shanahan, C., Burke, B., Stahl, P.D., and Hodzic, D. (2006). Coupling of the nucleus and cytoplasm: Role of the LINC complex. *J Cell Biol* 172, 41–53.
- Desjardins, P., Bandeira, P., Raghavendra Rao, V.L., and Butterworth, R.F. (1999). Portacaval anastomosis causes selective alterations of peripheral-type benzodiazepine receptor expression in rat brain and peripheral tissues. *Neurochem. Int.* 35, 293–299.
- Drenckhahn, D. (2008). Benninghoff, Drenckhahn, *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. Band 1: Zelle, Gewebe, Entwicklung, Skelett- und ... Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem* (München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH).
- Ede, R.J., and Williams, R. (1986). Hepatic Encephalopathy and Cerebral Edema. *Semin. Liver Dis.* 6, 107–118.
- Elwir, S., and Rahimi, R.S. (2017). Hepatic Encephalopathy: An Update on the Pathophysiology and Therapeutic Options. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 5, 142–151.
- Ferenci, P. (2017). Hepatic encephalopathy. *Gastroenterol. Rep.* 5, 138–147.
- Ferenci, P., Püspök, A., and Steindl, P. (1992). Current concepts in the pathophysiology of hepatic encephalopathy. *Eur. J. Clin. Invest.* 22, 573–581.
- Ferenci, P., Lockwood, A., Mullen, K., Tarter, R., Weissenborn, K., and Blei, A.T. (2002). Hepatic encephalopathy—Definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: Final report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 35, 716–721.
- Fischer, R., Schliess, F., and Häussinger, D. (1997). Characterization of the hypo-osmolarity-induced Ca²⁺ response in cultured rat astrocytes. *Glia* 20, 51–58.
- Ganda, O.P., and Ruderman, N.B. (1976). Muscle nitrogen metabolism in chronic hepatic insufficiency. *Metabolism* 25, 427–435.
- Gerber, T., and Schomerus, H. (2000). Hepatic encephalopathy in liver cirrhosis: pathogenesis, diagnosis and management. *Drugs* 60, 1353–1370.

- Giguère, J.-F., Hamel, E., and Butterworth, R.F. (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., Foster, N., Reinehr, R., Bidmon, H.J., Höngen, A., Häussinger, D., and Schliess, F. (2003). Benzodiazepine-induced protein tyrosine nitration in rat astrocytes. *Hepatology* 37, 334–342.
- Görg, B., Qvarskhava, N., Keitel, V., Bidmon, H.J., Selbach, O., Schliess, F., and Häussinger, D. (2008). Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* 48, 567–579.
- Görg, B., Bidmon, H.-J., and Häussinger, D. (2013a). Gene expression profiling in the cerebral cortex of patients with cirrhosis with and without hepatic encephalopathy. *Hepatology* 57, 2436–2447.
- Görg, B., Schliess, F., and Häussinger, D. (2013b). Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Arch. Biochem. Biophys.* 536, 158–163.
- Gotthardt, D., Riediger, C., Weiss, K.H., Encke, J., Schemmer, P., Schmidt, J., and Sauer, P. (2007). Fulminant hepatic failure: etiology and indications for liver transplantation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 22, viii5–viii8.
- Gregorios, J.B., Mozes, L.W., and Norenberg, M.D. (1985). Morphologic effects of ammonia on primary astrocyte cultures. II. Electron microscopic studies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 44, 404–414.
- Groeneweg, M., de Knecht, R.J., Hamberger, A., Ding, M., Wang, S., Schalm, S.W., and Haglid, K.G. (1993). Neuronal and glial marker proteins in encephalopathy associated with acute liver failure and acute hyperammonemia in the rabbit. *Metab. Brain Dis.* 8, 95–106.
- Groeneweg, M., Quero, J.C., De Bruijn, I., Hartmann, I.J., Essink-bot, M.L., Hop, W.C., and Schalm, S.W. (1998). Subclinical hepatic encephalopathy impairs daily functioning. *Hepatology* 28, 45–49.
- Guerit, J.-M., Amantini, A., Fischer, C., Kaplan, P.W., Mecarelli, O., Schnitzler, A., Ubiali, E., Amodio, P., and the members of the ISHEN commission on Neurophysiological Investigations (2009). Neurophysiological investigations of hepatic encephalopathy: ISHEN practice guidelines. *Liver Int.* 29, 789–796.
- Gutierrez, J.A., and Norenberg, M.D. (1977). Ultrastructural study of methionine sulfoximine-induced Alzheimer type II astrocytosis. *Am. J. Pathol.* 86, 285–300.
- Haque, F., Lloyd, D.J., Smallwood, D.T., Dent, C.L., Shanahan, C.M., Fry, A.M., Trembath, R.C., and Shackleton, S. (2006). SUN1 Interacts with Nuclear Lamin A and Cytoplasmic Nesprins To Provide a Physical Connection between the Nuclear Lamina and the Cytoskeleton. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3738–3751.
- Hasson, J., and Leech, R.W. (1967). Experimental hepatocerebral disease. Astrocytic changes in the globus pallidus of rats with carbon tetrachloride induced cirrhosis. *Arch. Pathol.* 84, 286–289.
- Häussinger, D. (1990). Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. *Biochem. J.* 267, 281–290.
- Häussinger, D. (1996). The role of cellular hydration in the regulation of cell function. *Biochem. J.* 313, 697–710.
- Häussinger, D. (2006). Low grade cerebral edema and the pathogenesis of hepatic encephalopathy in cirrhosis. *Hepatology* 43, 1187–1190.

- Häussinger, D., and Blei, A.T. (2007). Hepatic Encephalopathy. In *Textbook of Hepatology: From Basic Science to Clinical Practice*, J. Rodés, ed. (Malden, Mass: Blackwell), pp. 728–760.
- Häussinger, D., and Görg, B. (2010). Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *13*, 87–92.
- Häussinger, D., and Schliess, F. (2005). Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochem. Int.* *47*, 64–70.
- Häussinger, D., and Schliess, F. (2008). Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* *57*, 1156–1165.
- Häussinger, D., and Sies, H. (2013). Hepatic encephalopathy: Clinical aspects and pathogenetic concept. *Arch. Biochem. Biophys.* *536*, 97–100.
- Häussinger, D., Laubenberger, J., vom Dahl, S., Ernst, T., Bayer, S., Langer, M., Gerok, W., and Hennig, J. (1994). Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* *107*, 1475–1480.
- Häussinger, D., Kircheis, G., Fischer, R., Schliess, F., and vom Dahl, S. (2000). Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J. Hepatol.* *32*, 1035–1038.
- Häussinger, D., Kirchels, G., and Schliess, F. (2006). *Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism* (Berlin: Springer).
- Hazell, A.S., and Butterworth, R.F. (1999). Hepatic encephalopathy: An update of pathophysiologic mechanisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* *222*, 99–112.
- Heinrich, P.C., Müller, M., and Graeve, L. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (Berlin Heidelberg: Springer).
- Hernández-Rabaza, V., Cabrera-Pastor, A., Taoro-González, L., Malaguarnera, M., Agustí, A., Llansola, M., and Felipo, V. (2016). Hyperammonemia induces glial activation, neuroinflammation and alters neurotransmitter receptors in hippocampus, impairing spatial learning: reversal by sulforaphane. *J. Neuroinflammation* *13*, 41.
- Herold, G. (2016). *Innere Medizin 2017* (Köln: Herold, Gerd).
- Hiba, O.E., Elgot, A., Ahboucha, S., and Gamrani, H. (2016). Differential regional responsiveness of astroglia in mild hepatic encephalopathy: An immunohistochemical approach in bile duct ligated rat. *Acta Histochem.* *118*, 338–346.
- Holecek, M., Kandar, R., Sispara, L., and Kovarik, M. (2011). Acute hyperammonemia activates branched-chain amino acid catabolism and decreases their extracellular concentrations: different sensitivity of red and white muscle. *Amino Acids* *40*, 575–584.
- Horowitz, M.E., Schafer, D.F., Molnar, P., Jones, E.A., Blasberg, R.G., Patlak, C.S., Waggoner, J., and Fenstermacher, J.D. (1983). Increased blood-brain transfer in a rabbit model of acute liver failure. *Gastroenterology* *84*, 1003–1011.
- Insausti, A.M., Gaztelu, J.M., Gonzalo, L.M., Romero-Vives, M., Barrenechea, C., Felipo, V., and Insausti, R. (1997). Diet induced hyperammonemia decreases neuronal nuclear size in rat entorhinal cortex. *Neurosci. Lett.* *231*, 179–181.

- Isaacs, R.E., Bender, A.S., Kim, C.Y., Shi, Y.F., and Norenberg, M.D. (1999). Effect of osmolality and anion channel inhibitors on myo-inositol efflux in cultured astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 57, 866–871.
- Isermann, P., and Lammerding, J. (2013). Nuclear Mechanics and Mechanotransduction in Health and Disease. *Curr. Biol.* CB 23.
- Itzhak, Y., Baker, L., and Norenberg, M.D. (1993). Characterization of the peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes: Evidence for multiplicity. *Glia* 9, 211–218.
- Itzhak, Y., Bender, A.S., and Norenberg, M.D. (1994). Effect of hypoosmotic stress on peripheral-type benzodiazepine receptors in cultured astrocytes. *Brain Res.* 644, 221–225.
- Jayakumar, A.R., Rama Rao, K.V., Kalaiselvi, P., and Norenberg, M.D. (2004). Combined effects of ammonia and manganese on astrocytes in culture. *Neurochem. Res.* 29, 2051–2056.
- Jiang, W., Desjardins, P., and Butterworth, R.F. (2009). Cerebral inflammation contributes to encephalopathy and brain edema in acute liver failure: protective effect of minocycline. *J. Neurochem.* 109, 485–493.
- Karow, T., and Lang-Roth, R. (2008). *Pharmakologie Thomas Karow 2008* (Karow).
- Keitel, V., Görg, B., Bidmon, H.J., Zemtsova, I., Spomer, L., Zilles, K., and Häussinger, D. (2010). The bile acid receptor TGR5 (Gpbar-1) acts as a neurosteroid receptor in brain. *Glia* 58, 1794–1805.
- Kircheis, G., and Häussinger, D. (2012). Hepatische Enzephalopathie. *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.* 137, 1582–1585.
- Kircheis, G., Wettstein, M., Timmermann, L., Schnitzler, A., and Häussinger, D. (2002). Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology* 35, 357–366.
- Kircheis, G., Fleig, W.E., Görtelmeyer, R., Grafe, S., and Häussinger, D. (2007). Assessment of low-grade hepatic encephalopathy: A critical analysis. *J. Hepatol.* 47, 642–650.
- Klejman, A., Węgrzynowicz, M., Szatmari, E.M., Mioduszezewska, B., Hetman, M., and Albrecht, J. (2005). Mechanisms of ammonia-induced cell death in rat cortical neurons: Roles of NMDA receptors and glutathione. *Neurochem. Int.* 47, 51–57.
- de Kneegt, R.J., Schalm, S.W., van der Rijt, C.C., Fekkes, D., Dalm, E., and 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.
- Kril, J.J., Flowers, D., and Butterworth, R.F. (1997). Distinctive pattern of Bergmann glial pathology in human hepatic encephalopathy. *Mol. Chem. Neuropathol.* 31, 279–287.
- Kruczek, C., Görg, B., Keitel, V., Bidmon, H.J., Schliess, F., and Häussinger, D. (2011). Ammonia increases nitric oxide, free Zn(2+), and metallothionein mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Biol. Chem.* 392, 1155–1165.
- Lachmann, V., Görg, B., Bidmon, H.J., Keitel, V., and Häussinger, D. (2013). Precipitants of hepatic encephalopathy induce rapid astrocyte swelling in an oxidative stress dependent manner. *Arch. Biochem. Biophys.* 536, 143–151.
- Laubenberger, J., Häussinger, D., Bayer, S., Gufler, H., Hennig, J., and Langer, M. (1997). Proton magnetic resonance spectroscopy of the brain in symptomatic and asymptomatic patients with liver cirrhosis. *Gastroenterology* 112, 1610–1616.

- Lavoie, J., and Butterworth, R.F. (1993). "Peripheral-type" (mitochondrial) benzodiazepine receptors in hepatic encephalopathy. *Alcohol Alcohol. Oxf. Oxf. Suppl.* 2, 181–185.
- Leise, M.D., Poterucha, J.J., Kamath, P.S., and Kim, W.R. (2014). Management of Hepatic Encephalopathy in the Hospital. *Mayo Clin. Proc.* 89, 241–253.
- Leite, M.C., Brolese, G., de Almeida, L.M.V., Piñero, C.C., Gottfried, C., and Gonçalves, C.-A. (2006). Ammonia-induced alteration in S100B secretion in astrocytes is not reverted by creatine addition. *Brain Res. Bull.* 70, 179–185.
- Lu, W., Schneider, M., Neumann, S., Jaeger, V.-M., Taranum, S., Munck, M., Cartwright, S., Richardson, C., Carthew, J., Noh, K., et al. (2012). Nesprin interchain associations control nuclear size. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3493–3509.
- Mani, R., Natesan, V., and Arumugam, R. (2017). Neuroprotective effect of chrysin on hyperammonemia mediated neuroinflammatory responses and altered expression of astrocytic protein in the hippocampus. *Biomed. Pharmacother.* 88, 762–769.
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P., and Norenberg, M.D. (1977). Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195, 1356–1358.
- Matheson, D.F., and van den Berg, C.J. (1975). Ammonia and brain glutamine: inhibition of glutamine degradation by ammonia. *Biochem. Soc. Trans.* 3, 525–528.
- Matsumoto, A., Hieda, M., Yokoyama, Y., Nishioka, Y., Yoshidome, K., Tsujimoto, M., and Matsuura, N. (2015). Global loss of a nuclear lamina component, lamin A/C, and LINC complex components SUN1, SUN2, and nesprin-2 in breast cancer. *Cancer Med.* 4, 1547–1557.
- Merli, M., Lucidi, C., Pentassuglio, I., Giannelli, V., Giusto, M., Di Gregorio, V., Pasquale, C., Nardelli, S., Lattanzi, B., Venditti, M., et al. (2013). Increased risk of cognitive impairment in cirrhotic patients with bacterial infections. *J. Hepatol.* 59, 243–250.
- Müller-Esterl, W. (2010). *Biochemie: Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).*
- Murthy, C. r. k., Rama Rao, K. v., Bai, G., and Norenberg, M.D. (2001). Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 66, 282–288.
- Nagaraja, T.N., and Brookes, N. (1998). Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 274, C883–C891.
- Nakamura, E., and Hagen, S.J. (2002). Role of glutamine and arginase in protection against ammonia-induced cell death in gastric epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G1264–1275.
- Norenberg, M.D. (1987). The role of astrocytes in hepatic encephalopathy. *Neurochem. Pathol.* 6, 13–33.
- Norenberg, M.D. (1996). Astrocytic-Ammonia Interactions in Hepatic Encephalopathy. *Semin. Liver Dis.* 16, 245–253.
- Norenberg, M.D., and Bender, A.S. (1994). Astrocyte swelling in liver failure: role of glutamine and benzodiazepines. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* 60, 24–27.

- Norenberg, M.D., and Lapham, L.W. (1974). The astrocyte response in experimental portal-systemic encephalopathy: an electron microscopic study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *33*, 422–435.
- Norenberg, M.D., Neary, J.T., Norenberg, L.O., and McCarthy, M. (1990). Ammonia induced decrease in glial fibrillary acidic protein in cultured astrocytes. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *49*, 399–405.
- Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H.C., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., et al. (2009). Uniquely Hominid Features of Adult Human Astrocytes. *J. Neurosci.* *29*, 3276–3287.
- Oenarto, J., Karababa, A., Castoldi, M., Bidmon, H.J., Görg, B., and Häussinger, D. (2016). Ammonia-induced miRNA expression changes in cultured rat astrocytes. *Sci. Rep.* *6*.
- Oermann, E., Warskulat, U., Heller-Stilb, B., Häussinger, D., and Zilles, K. (2005). Taurine-transporter gene knockout-induced changes in GABAA, kainate and AMPA but not NMDA receptor binding in mouse brain. *Anat. Embryol. (Berl.)* *210*, 363–372.
- Ong, J.P., Aggarwal, A., Krieger, D., Easley, K.A., Karafa, M.T., Van Lente, F., Arroliga, A.C., and Mullen, K.D. (2003). Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am. J. Med.* *114*, 188–193.
- Padmakumar, V.C., Libotte, T., Lu, W., Zaim, H., Abraham, S., Noegel, A.A., Gotzmann, J., Foisner, R., and Karakesisoglou, I. (2005). The inner nuclear membrane protein Sun1 mediates the anchorage of Nesprin-2 to the nuclear envelope. *J Cell Sci* *118*, 3419–3430.
- Palomero-Gallagher, N., Bidmon, H.-J., Cremer, M., Schleicher, A., Kircheis, G., Reifenberger, G., Kostopoulos, G., Häussinger, D., and Zilles, K. (2009). Neurotransmitter receptor imbalances in motor cortex and basal ganglia in hepatic encephalopathy. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *24*, 291–306.
- Pilbeam, C.M., Anderson, R.M., and Bhathal, P.S. (1983). The brain in experimental portal-systemic encephalopathy. I. Morphological changes in three animal models. *J. Pathol.* *140*, 331–345.
- Piper, W. (2012). *Innere Medizin* (Berlin: Springer).
- Pomier-Layrargues, G., Giguère, J.F., Lavoie, J., Perney, P., Gagnon, S., D'Amour, M., Wells, J., and Butterworth, R.F. (1994). Flumazenil in cirrhotic patients in hepatic coma: A randomized double-blind placebo-controlled crossover trial. *Hepatology* *19*, 32–37.
- Rama Rao, K.V., Jayakumar, A.R., Tong, X., Alvarez, V.M., and Norenberg, M.D. (2010). Marked potentiation of cell swelling by cytokines in ammonia-sensitized cultured astrocytes. *J. Neuroinflammation* *7*, 66.
- Rao, K.V.R., Panickar, K.S., Jayakumar, A.R., and Norenberg, M.D. (2005). Astrocytes Protect Neurons from Ammonia Toxicity. *Neurochem. Res.* *30*, 1311–1318.
- Rikkers, L.F. (1983). Portal hemodynamics, intestinal absorption, and postshunt encephalopathy. *Surgery* *94*, 126–133.
- Schliess, F., Sinning, R., Fischer, R., Schmalenbach, C., and Häussinger, D. (1996). Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 after hypo-osmotic astrocyte swelling. *Biochem. J.* *320*, 167–171.
- Schliess, F., Görg, B., Fischer, R., Desjardins, P., Bidmon, H.J., Herrmann, A., Butterworth, R.F., Zilles, K., and Häussinger, D. (2002). Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *16*, 739–741.

- Schliess, F., Foster, N., Görg, B., Reinehr, R., and Häussinger, D. (2004). Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia* 47, 21–29.
- Schliess, F., Görg, B., and Häussinger, D. (2006). Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biol. Chem.* 387, 1363–1370.
- Seglen, P.O., Grinde, B., and Solheim, A.E. (1979). Inhibition of the lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes by ammonia, methylamine, chloroquine and leupeptin. *Eur. J. Biochem.* 95, 215–225.
- Shah, N.J., Neeb, H., Kircheis, G., Engels, P., Häussinger, D., and Zilles, K. (2008). Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. *NeuroImage* 41, 706–717.
- Smiałowska, M., Bal-Klara, A., and Smiałowski, A. (1988). Chronic imipramine diminishes the nuclear size of neurons in the locus coeruleus and cingular cortex but not in the hippocampus of the rat brain. *Neuroscience* 26, 803–807.
- Song, G., Dhodda, V.K., Blei, A.T., Dempsey, R.J., and Rao, V.L.R. (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.
- Sosunov, A., Olabarria, M., and Goldman, J.E. (2018). Alexander disease: an astrocytopathy that produces a leukodystrophy. *Brain Pathol.* 28, 388–398.
- Sowa, J.-P., Gerken, G., and Canbay, A. (2016). Acute Liver Failure - It's Just a Matter of Cell Death. *Dig. Dis.* 34, 423–428.
- Starr, D.A., and Han, M. (2002). Role of ANC-1 in Tethering Nuclei to the Actin Cytoskeleton. *Science* 298, 406–409.
- Stewart, C.L., Roux, K.J., and Burke, B. (2007). Blurring the Boundary: The Nuclear Envelope Extends Its Reach. *Science* 318, 1408–1412.
- Suárez, I., Bodega, G., Arilla, E., Rubio, M., Villalba, R., and Fernández, B. (1992). Different response of astrocytes and bergmann glial cells to portacaval shunt: An immunohistochemical study in the rat cerebellum. *Glia* 6, 172–179.
- Suárez, I., Bodega, G., Rubio, M., and Fernández, B. (2005). Down-regulation of astroglial proteins in the rat cerebellum after portacaval anastomosis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 31, 163–169.
- Tanigami, H., Rebel, A., Martin, L.J., Chen, T.-Y., Brusilow, S.W., Traystman, R.J., and Koehler, R.C. (2005). Effect of glutamine synthetase inhibition on astrocyte swelling and altered astroglial protein expression during hyperammonemia in rats. *Neuroscience* 131, 437–449.
- Vaquero, J., Chung, C., Cahill, M.E., and Blei, A.T. (2003). Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy in Acute Liver Failure. *Semin. Liver Dis.* 23, 259–270.
- Wein, C., Koch, H., Popp, B., Oehler, G., and Schauder, P. (2004). Minimal hepatic encephalopathy impairs fitness to drive. *Hepatology* 39, 739–745.
- Welsch, U., and Deller, T. (2010). *Sobotta Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit von Thomas Deller* (München: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH).

Widmer, R., Kaiser, B., Engels, M., Jung, T., and Grune, T. (2007). Hyperammonemia causes protein oxidation and enhanced proteasomal activity in response to mitochondria-mediated oxidative stress in rat primary astrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* *464*, 1–11.

Wright, G., Noiret, L., Olde Damink, S.W.M., and Jalan, R. (2011). Interorgan ammonia metabolism in liver failure: the basis of current and future therapies. *Liver Int.* *31*, 163–175.

Zaki, A.E., Wardle, E.N., Canalese, J., Ede, R.J., and Williams, R. (1983). Potential toxins of acute liver failure and their effects on blood-brain barrier permeability. *Experientia* *39*, 988–991.

Zemtsova, I., Görg, B., Keitel, V., Bidmon, H.-J., Schrör, K., and Häussinger, D. (2011). Microglia activation in hepatic encephalopathy in rats and humans. *Hepatology* *54*, 204–215.

Zhang, Q., Bethmann, C., Worth, N.F., Davies, J.D., Wasner, C., Feuer, A., Ragnauth, C.D., Yi, Q., Mellad, J.A., Warren, D.T., et al. (2007). Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery–Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum. Mol. Genet.* *16*, 2816–2833.

Zisterer, D.M., and Williams, D.C. (1997). Peripheral-type benzodiazepine receptors. *Gen. Pharmacol. Vasc. Syst.* *29*, 305–314.

6 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: West-Haven Kriterien.....	2
Abb. 2: Pathogenesemodell der hepatischen Enzephalopathie.....	9
Abb. 3: Mechanische Kopplung von Zellkern und Zytoskelett	17
Abb. 4 Effekte von NH_4Cl auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten	29
Abb. 5 Effekte von NH_4Cl auf die maximale Zellkernfläche kultivierter Rattenastrozyten	30
Abb. 6 Effekte von NH_4Cl auf den maximalen Zellkernumfang kultivierter Rattenastrozyten.....	31
Abb. 7 Effekte von NH_4Cl auf die Zirkularität der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten	32
Abb. 8 Effekte von $\text{TNF}\alpha$ auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten.....	33
Abb. 9 Effekte von $\text{TNF}\alpha$ auf maximale Fläche und Umfang der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten	34
Abb. 10 Effekte von $\text{TNF}\alpha$ auf die Zirkularität der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten	34
Abb. 11 Effekte von Diazepam auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten.....	35
Abb. 12 Effekte von Diazepam auf maximale Fläche und Umfang der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten ..	36
Abb. 13 Effekte von Diazepam auf die Zirkularität der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten	36
Abb. 14 Effekte von NH_4Cl und $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{TNF}\alpha$ auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten	37
Abb. 15 Effekte von NH_4Cl und $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{TNF}\alpha$ auf die maximale Fläche der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten.....	38
Abb. 16 Effekte von NH_4Cl und $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{TNF}\alpha$ auf den maximalen Umfang der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten	38
Abb. 17 Effekte von NH_4Cl und $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{TNF}\alpha$ auf die Zirkularität der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten.....	39
Abb. 18 Effekte von NH_4Cl und $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{Diazepam}$ auf das Zellkernvolumen kultivierter Rattenastrozyten.....	40
Abb. 19 Effekte von NH_4Cl und $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{Diazepam}$ auf die Zellkernfläche in kultivierten Rattenastrozyten	40
Abb. 20 Effekte von NH_4Cl und $\text{NH}_4\text{Cl}+\text{Diazepam}$ auf den Zellkernumfang kultivierter Rattenastrozyten	41

Abb. 21 Effekte von NH ₄ Cl und NH ₄ Cl+Diazepam auf die Zirkularität der Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten.....	42
Abb. 22 Effekte von CH ₃ NH ₃ Cl auf Volumen, Fläche, Umfang und Zirkularität kultivierter Rattenastrozyten	43
Abb. 23 Effekte von NH ₄ Cl auf die Expression von F-Aktin in kultivierten Astrozyten	44
Abb. 24 Effekte von Latrunculin B auf das Aktinzytoskelett kultivierter Astrozyten.....	45
Abb. 25 Effekte von TNF α und Diazepam auf Expression vom F-Aktin in kultivierten Astrozyten	46
Abb. 26 Effekte von CH ₃ NH ₃ Cl auf die Expression von F-Aktin in kultivierten Astrozyten	47
Abb. 27 Quantifizierung der Phalloidin-TRITC Fluoreszenzintensität.....	47
Abb. 28 Effekte von NH ₄ Cl auf die Expression von F-Aktin und Nesprin-2 in kultivierten Astrozyten	48
Abb. 29 Effekte von NH ₄ Cl auf die Expression von F-Aktin und Nesprin-2 in kultivierten Astrozyten.	49
Abb. 30 Reversibilität der durch 5mM NH ₄ Cl-induzierten Änderungen der Expression von F-Aktin und Nesprin-2 in kultivierten Astrozyten	50
Abb. 31 Effekte von 1mM NH ₄ Cl auf die Expression vom F-Aktin- und Nesprin-2 in kultivierten Astrozyten.....	51
Abb. 32 Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von F-Aktin.....	52
Abb. 33 Effekt von CH ₃ NH ₃ Cl auf die Expression von F-Aktin und Nesprin-2 in kultivierten Astrozyten	53
Abb. 34 Effekte von NH ₄ Cl auf die Expression von GFAP in kultivierten Astrozyten.....	54
Abb. 35 Effekte von TNF α und Diazepam auf die Expression von GFAP in kultivierten Astrozyten	55
Abb. 36 Effekte von CH ₃ NH ₃ Cl auf die Expression von GFAP in kultivierten Astrozyten.....	56
Abb. 37 Quantifizierung der anti-GFAP-Immunoreaktivität.....	57
Abb. 38 Effekte von NH ₄ Cl auf die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand kultivierter Rattenastrozyten.....	58
Abb. 39 Überprüfung der Zellviabilität mittels Propidiumiodidfärbung	59

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Häussinger für die Möglichkeit, meine Promotion in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können. Ich bin sehr dankbar für seine engagierte und hervorragende Betreuung, seine Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik während der Dissertation.

Zudem bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Boris Görg für die gute Betreuung vor Ort, sowie für seine Anregungen und Ratschläge. Bei Rückschlägen und unverhofften Schwierigkeiten hatte er stets eine Lösung parat.

Vielen Dank an Frau Dr. Ayse Karababa für die tolle Einarbeitung im Labor, die tatkräftige Unterstützung bei meinen Versuchen und die gute Zusammenarbeit, die immer mit viel Freude verbunden war. Vor allem aber bedanke ich mich für ihre Freundschaft.

Mein Dank gilt auch Herrn Torsten Janssen, auf dessen Hilfe und Unterstützung ich mich jederzeit verlassen konnte.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Labors, die mich während der Zeit meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben. Besonderer Dank gilt an dieser Stelle Kerstin Rufinatscha und Jochen Dobner, die für mich zu wahren Freunden geworden sind.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich während meiner Dissertation stets unterstützt und aufgebaut hat und auf die ich mich immer verlassen konnte. Ganz besonders danke ich meinen lieben Eltern Alfons und Irmtraud Schnitzler, die immer an mich glauben und immer für mich da sind. Genauso möchte ich mich bei meiner Schwester Sarah Schnitzler bedanken, mit der ich schon immer durch dick und dünn gegangen bin. Vielen Dank auch an Matthias Sure, meinen Schwager in spe, für seine Hilfsbereitschaft, Verlässlichkeit und Freundschaft.

Mein besonderer Dank gilt meinem Ehemann und Seelenverwandten Hannes Kubo für seine Geduld, sein Vertrauen und seine Liebe.