

Aus der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Bedeutung der *kidney-type* Glutaminase für durch Ammoniak vermittelten
oxidativen Stress und Seneszenz in Astrozyten *in vitro*

Dissertation

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

vorgelegt von
Linda Tanja Czeszewski
2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Zweitgutachter: Professor Dr. rer. nat. Markus Butz

Teile der Arbeit wurden als Posterbeiträge veröffentlicht

Linda Czeszewski, Ayşe Karababa, Hans Jürgen Bidmon, Boris Görg und Dieter Häussinger. Wirkung von Ammoniak auf die Expression der *kidney-type* Glutaminase in Rattenastrozyten. Symposium der *Medical Research School of Düsseldorf* (medRSD), Düsseldorf 28.04.2017

Olivia Knappe, Ayşe Karababa, Linda Czeszewski, Alina Schrimpf, Hans Jürgen Bidmon, Tom Luedde, Dieter Häussinger, Boris Görg. *Ammonia triggers astrocyte senescence through glucosamine synthesis-dependent upregulation of ASCT2 and KGA*. 37. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber, Virtuelles Symposium 2021

I. Zusammenfassung

Ammoniak ist ein Haupttoxin bei der Hepatischen Enzephalopathie (HE) und dessen Entgiftung über die Bildung von Glutamin in Astrozyten spielt eine wichtige Rolle für die pathophysiologischen Veränderungen im Gehirn im Rahmen dieser Erkrankung. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind derzeit nicht vollständig verstanden, aber es wurde vermutet, dass dabei der Hydrolyse von Glutamin durch eine in Astrozyten exprimierte Glutaminase eine Bedeutung zukommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Immunfluoreszenzanalysen nachgewiesen, dass Rattenastrozyten *in vitro* und im Rattenhirn *in situ* die *kidney-type* Glutaminase (KGA) und die Glutaminsynthetase (GS) koexprimieren. Auch mittels Western-Blot-Analyse konnte das KGA-Protein in Astrozyten *in vitro* nachgewiesen und gezeigt werden, dass die Inkubation mit NH_4Cl (5 mmol/l) deren Proteinkonzentration zeitabhängig steigert. Dieser Effekt war reversibel und 24 Stunden nach Wegnahme von NH_4Cl waren die KGA-Proteinspiegel auf das Niveau der Kontrollen abgefallen. Weitere Immunfluoreszenzanalysen zeigten, dass die KGA u.a. in den Mitochondrien lokalisiert ist und dass NH_4Cl die KGA-Proteinkonzentration in den Mitochondrien steigert. Die NH_4Cl -induzierte Hochregulation des KGA-Proteins wurde durch die Glutaminsynthetasehemmstoffe Methionin-Sulfoximin (MSO) und Phosphinothricin (PPT) sowie durch siRNA-vermittelten *Knockdown* der Glutamin-Fruktose-Amido-Transferasen 1 und 2 (GFAT1/2) gehemmt. Eine Hemmung der GS durch MSO und PPT allein reduzierte bereits die KGA-Proteinspiegel. Im Gegensatz zum Protein wurde die mRNA-Konzentration der KGA durch NH_4Cl (5 mmol/l) in einem Beobachtungszeitraum von 72 Stunden nicht verändert. Der *Knockdown* der KGA hemmte außerdem die durch NH_4Cl -induzierte Hochregulation des endoplasmatisch-retikulären (ER) Stress-Marker Proteins GRP78 und der Hämoxygenase 1, die eine wichtige Rolle für durch Ammoniak induzierten oxidativen Stress spielt. Auch die Proliferationshemmung mit NH_4Cl inkubierter Astrozyten wurde durch einen siRNA-vermittelten *Knockdown* der KGA verhindert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine wichtige Rolle der KGA-vermittelten Hydrolyse von Glutamin für durch NH_4Cl induzierten und Glutaminsynthese-abhängigen oxidativen und ER-Stress sowie Seneszenz in kultivierten Rattenastrozyten hin.

II. Abstract

Ammonia is a major toxin in HE and its detoxification via the synthesis of glutamine in astrocytes plays an important role for pathophysiological changes in the brain in HE. The underlying mechanisms are currently not fully understood, but it has been suggested that glutamine, which becomes hydrolysed by a glutaminase which is expressed in astrocytes, may play an important role for astrocyte dysfunction in the pathogenesis of HE.

In the present work it was demonstrated by means of immunofluorescence analyses that rat astrocytes *in vitro* and in the rat brain *in situ* coexpress kidney-type glutaminase (KGA) and glutamine synthetase (GS). The KGA protein in astrocytes was also detected *in vitro* by means of Western blot analysis. Incubation with NH₄Cl (5 mmol/l) increased KGA protein expression in a time dependent way. This effect was reversible and 24 hours after removal of NH₄Cl KGA protein levels had fallen to the level of the controls. Further immunofluorescence analyses showed that the KGA is localized in the mitochondria and that NH₄Cl increases the KGA protein level in the mitochondria. The NH₄Cl-induced upregulation of the KGA protein was inhibited by the glutamine synthetase inhibitors methionine sulfoximine (MSO) and phosphinothricin (PPT) as well as by siRNA-mediated knockdown of glutamine fructose amido transferases 1 and 2 (GFAT1/2). Inhibition of GS by MSO and PPT alone already reduced the KGA protein level. In contrast to the protein, KGA mRNA levels were not changed by NH₄Cl (5 mmol/l) within an observation period of 72 hours. The knockdown of KGA also inhibited the NH₄Cl-induced upregulation of the endoplasmic-reticular (ER) stress marker protein GRP78 and of heme oxygenase 1, which play an important role for ammonia-induced oxidative stress. The ammonia-induced proliferation inhibition of the astrocytes was also prevented by an siRNA-mediated knockdown of KGA.

The results of the present work suggest an important role of KGA-mediated hydrolysis of glutamine for the ammonia-induced and glutamine synthesis-dependent induction of oxidative and ER stress and senescence in cultured rat astrocytes.

III. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ANOVA	<i>One-way analysis of variance</i>	EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure
ANT1	<i>Adenine Nucleotide Translocator 1</i>	ER	Endoplasmatisches Retikulum
APS	Ammoniumpersulfat	FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
BCAA	Verzweigt-kettige Aminosäuren	GADD45α	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible protein alpha</i>
BPTES	Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl-Sulfid	GAC	<i>Glutaminase C splice variant</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	GAM	<i>Glutaminase M splice variant</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
CFF	<i>critical flicker frequency</i>	GCS	<i>Glasgow-Coma-Scale</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	GFAT 1/2	Glucosamin-Fruktose-6-Phosphate Aminotransferasen
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>	GLS-1/2	Glutaminase-Gen 1/2
DNA	Desoxyribonukleinsäure	GRP78	<i>Glucose-Regulatory Protein, 78kDa</i>
DON	6-Diazo-5-oxo-L-Norleucin		
dsRNA	Doppelstrang-RNA		

GS	Glutaminsynthetase	NF-κB	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
HE	Hepatische Enzephalopathie	OGT	<i>N-acetylglucosaminyltransferase</i>
HO1	Hämoxygenase 1	O-GlcNAc	<i>O-linked β-N-acetylglucosamine</i>
HRPOD	<i>Horseradish-peroxidase</i>	PAA	Polyacrylamid
HPRT1	Hypoxanthin-Ribosyl-Transferase 1	pAB	Polyklonaler Antikörper
kb	Kilobasen	PAG	Phosphat-aktivierte Glutaminase
kDa	Kilodalton	PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
KGA	<i>kidney-type</i> Glutaminase	PFA	Paraformaldehydlösung
LGA	<i>liver-type</i> Glutaminase	PPT	Phosphinothricin
mHE	minimale HE	RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
mAB	monoklonaler Antikörper	RNA	Ribonukleinsäure
miR-23a/b	microRNA 23a/b	RNOS	oxidativer/nitrosativer Stress
MPT	<i>Mitochondrial Permeability Transition</i>	rt-PCR	<i>real-time-polymerase-chain-reaction</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
μmol/l	Mikromol pro Liter		
MSO	Methionin-Sulfoximin		

SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethylen-diamin
TIPS	Transjugulärer Intrahepatischer Portosystemischer Shunt
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tier-schutzaufgaben

IV. Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die hepatische Enzephalopathie.....	1
1.1.1	Definition, Epidemiologie und Klinik.....	1
1.1.2	Klassifizierung und Einteilung der HE.....	1
1.1.3	Diagnostik.....	3
1.1.4	Therapie.....	5
1.2	Erklärungsansätze zur Pathogenese der HE.....	7
1.2.1	Schwellungshypothese zur Pathogenese der HE.....	7
1.2.2	Die Trojan-Horse-Hypothese.....	10
1.3	Die Glutaminase.....	11
1.3.1	Isoformen.....	11
1.3.2	Organspezifische und zelluläre Expression der Glutaminase.....	12
1.3.3	Funktionen der Glutaminase im Gehirn.....	13
1.3.4	Regulation der Aktivität der KGA.....	14
1.4	Seneszenz.....	15
1.5	Ziele der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Material-Tabellen.....	18
2.1.1	Antikörper.....	18
2.1.2	Sekundärantikörper.....	19
2.1.3	Chemikalien.....	19
2.1.4	Reagenzien für die siRNA-Transfektion.....	22
2.1.5	Farbstoffe.....	22
2.1.6	Zellkulturreagenzien.....	22
2.1.7	Molekularbiologische Kits.....	23

2.1.8	Spezielle Lösungen für die Western-Blot-Analysen	23
2.1.9	Spezielle Lösungen für PCR.....	24
2.1.10	Materialien und Geräte	24
2.1.11	Primer für die Realtime-PCR.....	27
2.2	Methoden	28
2.2.1	Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus dem zerebralen Rattenkortex	28
2.2.2	Immunfluoreszenzanalysen	29
2.2.3	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	29
2.2.4	Nachweis der KGA und der GS in Rattenhirnschnitten.....	30
2.2.5	Nachweis der KGA und der GS in kultivierten Rattenastrozyten	31
2.2.6	Western-Blot-Analysen	32
2.2.7	Quantifizierung der KGA-mRNA mittels Real-Time-PCR.....	35
2.2.8	Knockdown der kidney-type Glutaminase und der Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferasen 1 und 2 mittels siRNA	37
2.2.9	Messung der Proliferation kultivierter Rattenastrozyten.....	38
2.2.10	Statistische Analyse	39
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Expression der <i>kidney-type</i> Glutaminase in unbehandelten kultivierten Rattenastrozyten	41
3.2	Nachweis der <i>kidney-type</i> Glutaminase im zerebralen Kortex der Ratte.....	43
3.3	Zeitabhängigkeit der durch NH ₄ Cl-vermittelten Steigerung der <i>kidney-type</i> Glutaminase-Proteinkonzentration in kultivierten Rattenastrozyten	44
3.4	Konzentrationsabhängigkeit der durch NH ₄ Cl-vermittelten Steigerung der <i>kidney-type</i> Glutaminase-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten	46
3.5	Effekte von NH ₄ Cl auf die KGA-mRNA-Konzentration	47
3.6	Nachweis der KGA und des mitochondrialen Marker-Proteins ANT in kultivierten Rattenastrozyten.....	48

3.7	Reversibilität der durch Ammoniak gesteigerten KGA-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten	50
3.8	Bedeutung von Glutamin für die durch NH ₄ Cl induzierte Steigerung der KGA-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten.....	51
3.9	Wirkung eines siRNA-vermittelten <i>Knockdowns</i> der KGA auf die Proteinexpression von Glutaminsynthetase, Hämoxygenase 1 und <i>Glucose-regulated-protein 78</i>	54
3.10	Rolle der Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferasen 1 und 2 für die durch Ammoniak herbeigeführte Steigerung des KGA-Proteins	56
3.11	Bedeutung der KGA für die durch NH ₄ Cl induzierte Astrozytenproliferationshemmung.....	57
4	Diskussion	59
4.1	Expression der KGA in kultivierten Rattenastrozyten <i>in vitro</i> und im Rattenhirn <i>in situ</i>	59
4.2	Effekte von Ammoniak auf die KGA-mRNA- und Proteinkonzentration in kultivierten Rattenastrozyten.....	61
4.3	Mechanismen der durch Ammoniak vermittelten Hochregulation des KGA-Proteins in kultivierten Rattenastrozyten	65
4.4	Bedeutung der KGA für durch Ammoniak induzierten oxidativen und ER-Stress und Seneszenz	66
4.5	Limitationen der Arbeit	68
4.6	Schlussfolgerungen.....	69
	Literaturverzeichnis	71
	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Die hepatische Enzephalopathie

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Klinik

Die „hepatische Enzephalopathie“ (HE) ist ein lebensbedrohliches neuropsychiatrisches Syndrom, welches als Folge eines akuten oder chronischen Leberversagens auftreten kann (Häussinger und Sies 2013; Häussinger 2018; Häussinger et al. 2022). Der HE liegt in 97 % der Fälle eine Leberzirrhose zugrunde (Häussinger und Sies 2013; Häussinger 2018) und ungefähr 30 bis 70 % aller Leberzirrhose-Patienten entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine HE (Schepke et al. 2001; Häussinger und Sies 2013).

Die häufigsten Ursachen der Leberzirrhose sind in den Industrieländern chronischer Alkoholabusus, virale Hepatitiden und die nichtalkoholische Steatohepatitis. Zu den selteneren Ursachen zählen unter anderem die Autoimmunhepatitis, die primär biliäre Cholangitis, die primär sklerosierende Cholangitis, Stoffwechselerkrankungen, eine sekundäre Eisenüberladung und kardiale Erkrankungen (Häussinger 2018).

Klinisch manifestiert sich die HE in Folge einer akuten Leberschädigung vorwiegend durch eine Hirndrucksymptomatik (Wettstein et al. 2003).

Bei chronischen Lebererkrankungen manifestiert sich die HE durch Vigilanzstörungen, neurologische und psychiatrische sowie motorische Symptome. Die Vigilanzstörungen variieren zwischen mentaler Verlangsamung (Grad I) bis Koma (Grad IV) (Ferenci et al. 2002; Häussinger und Blei 2008). Zu den motorischen Symptomen der HE zählen Ataxie, Mini-Asterixis und Asterixis (Butz et al. 2010).

1.1.2 Klassifizierung und Einteilung der HE

Die manifeste HE kann mit Hilfe der *West-Haven*-Kriterien in die Schweregrade I bis IV eingeteilt werden (Atterburry et al. 1978; Vilstrup et al. 2014). Bei HE-Patienten, die klinisch unauffällig sind, kann eine sog. „minimale HE“ (mHE) vorliegen. Diese ist nicht durch spezifische klinische Symptome definiert (Groeneweg et al. 1998; Ferenci et al. 2002), sondern kann nur mittels neuropsychiatrischer oder neurophysiologischer Tests diagnostiziert werden (Kircheis et al. 2002). Damit wird die mHE durch den jeweiligen verwendeten Test definiert (Kircheis et al. 2014). Die Testverfahren sind dabei weder

standardisiert noch validiert und häufig korrelieren die Ergebnisse der verschiedenen Tests nicht miteinander (Amodio et al. 1996; Montagnese et al. 2011; Vilstrup et al. 2014; Häussinger 2018). Derzeitig existiert kein Goldstandard in der Diagnostik der mHE.

Bei ungefähr 20 bis 84% aller Leberzirrhosepatienten ist nach Literaturangaben eine mHE diagnostizierbar (Zeegen et al. 1970; Gilberstadt et al. 1980; Marchesini et al. 1980; Gitlin et al. 1986; Joelsson et al. 1986; Sood et al. 1989; Moore et al. 1989; Koch et al. 1990; Schomerus und Schreiegg 1993; Yang et al. 1998; Groeneweg et al. 2000; Das et al. 2001; Saxena et al. 2001; Romero-Gómez et al. 2007; Sharma et al. 2007). Dabei ist die Prävalenz abhängig von Art und Anzahl der zur Diagnosestellung angewandten Tests, der getesteten Population und der Definition der mHE (Quero und Schalm 1996).

Auf der 12. ISHEN Konferenz 2005 auf Schloss Burg in Deutschland wurde daher eine neue Einteilung der HE in geringgradige (HE0, mHE, HE I und HE II) und hochgradige (HE III und HE IV) HE vorgeschlagen, um eine klarere Trennung zwischen den HE-Graden 0-II, die klinisch unauffällig und damit schwer definierbar sein können, und der höhergradigen HE zu ermöglichen (**Tabelle 1**) (Häussinger 2006).

Schweregrad	Symptome
HE0	Klinisch unauffällig
Geringgradige HE	
-minimale HE (mHE)	Keine sichtbaren Symptome, nur über psychometrische/ neurologische Tests detektierbar
-manifeste HE	
Grad I (HE I)	Persönlichkeitsveränderungen, verkürzte Konzentrationszeit, Verwirrung, gestörter Schlaf-Wach-Rhythmus, Mini-Asterixis
Grad II (HE II)	Lethargie, Fatigue, Desorientiertheit, Asterixis, Vergesslichkeit
Hochgradige HE	
Grad III (HE III)	Somnolenz, Stupor
Grad IV (HE IV)	Koma

Tabelle 1: Schweregradeinteilung der HE nach West-Haven-Kriterien und Einordnung in die Klassifikation des 12. ISHEN Kongresses 2005 in Schloss Burg (Häussinger und Sies 2013). Reprinted from *Archives of Biochemistry and Biophysics*; Vol. 536; Häussinger, D.; Sies, H.; p. 98, *Hepatic Encephalopathy. Clinical Aspects and Pathogenetic Concept* (2013) with permission from Elsevier (Häussinger und Sies 2013).

Des Weiteren können entsprechend ihrer Ätiologie drei verschiedene HE-Typen unterschieden werden. Typ A ist eine Enzephalopathie infolge eines akuten Leberversagens. Typ B beschreibt eine Form der Enzephalopathie bei portosystemischem Bypass ohne Lebererkrankung. Typ C ist Folge einer portalen Hypertonie bzw. chronischer Lebererkrankung und kann nach Dauer und Charakteristik der neurologischen Symptome noch weiter in eine episodische, persistierende oder minimale HE unterteilt werden (Ferenci et al. 2002).

Auch hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs kann die HE eingeteilt werden: So können die Symptome episodisch auftreten, rezidivieren (Intervall zwischen den Symptomen sechs Monate oder weniger) oder persistieren (anhaltenden Symptome) (Vilstrup et al. 2014).

1.1.3 Diagnostik

Grundlage der Diagnosestellung der HE sind die *West-Haven*-Kriterien sowie für die Beurteilung der Vigilanz in den Graden III und IV die *Glasgow-Coma-Scale* (GCS) (Ferenci et al. 2002; Häussinger 2018). Nach der *Glasgow-Coma-Scale* wird die Vigilanz des Patienten mit einer Punktzahl von 3 (Koma) bis 15 (unauffällig) bewertet. Grundlage dieser Bewertung sind das Augenöffnen sowie die Art der verbalen und motorischen Reaktionen auf bestimmte Reize (Teasdale, G, Jennett, B 1974).

In der Anamnese wird insbesondere eruiert, ob bereits vorherige HE-Episoden aufgetreten sind und ob HE-präzipitierende Faktoren vorliegen (Romero-Gómez et al. 2015). Hier kann der Ammoniakspiegel erste Hinweise auf das Vorliegen einer HE geben. Der normale Serumammoniakspiegel liegt unterhalb von 35 µmol/l (Khan et al. 2016). Jedoch können HE-Patienten auch normale Ammoniakspiegel aufweisen und Menschen mit erhöhten Ammoniakspiegeln gesund sein (Ninan und Feldman 2017). In einer Studie von Gundling et al. wurde für Ammoniakspiegel von über 55 µmol/l eine Sensitivität von 47,2 % und eine Spezifität von 78,3 % zur Diagnose der HE angegeben (Gundling et al. 2013). Beim akuten, aber nicht beim chronischen Leberversagen korrelieren die Serumammoniakspiegel mit den HE-Schweregraden (Abou-Assi und Vlahcevic 2001; Weissenborn et al. 2007). Dennoch sind hohe Ammoniakspiegel mit einer schlechteren Prognose in Hinblick auf die Mortalität und das Transplantationsrisiko von Zirrhose-Patienten assoziiert (Mallet et al. 2018).

Bei der Diagnose der HE ist es wichtig, mögliche andere Ursachen der Symptomatik auszuschließen, da diese einer spezifischen Therapie bedürfen. Dazu gehören eine Hypoglykämie, Hypothyreose, Hypoxie oder unerwünschte Arzneimittelwirkungen (Montagnese et al. 2012; Romero-Gómez et al. 2015). Bildgebende Verfahren werden hauptsächlich zum Ausschluss der Differentialdiagnosen genutzt, wie beispielsweise zerebrale oder subdurale Blutungen (Wettstein et al. 2003; Romero-Gómez et al. 2015; Häussinger 2018). HE-spezifische morphologische CT-Veränderungen sind nicht bekannt (Wettstein et al. 2003), in wenigen Fällen sind eine Atrophie im frontalen Kortex oder ein mildes Hirnödem nachweisbar (McPhail et al. 2012). Daher wird eine generelle CT-Diagnostik bei Verdacht auf HE nicht empfohlen. In einer Studie von Kumar et al. wiesen nur 4 % der mit HE-Verdacht vorgestellten Patienten Auffälligkeiten in der CT auf (Kumar et al. 2018).

Mit Hilfe einer speziellen MRT-Technik, dem sog. „*Quantitative Water Imaging*“, kann das geringgradige Hirnödem bei Patienten mit HE nachgewiesen werden (Shah et al. 2008). Diese Technik wird jedoch noch nicht in der Routine-Diagnostik angewendet.

Ein international etabliertes, in der Klinik angewendetes diagnostisches Verfahren ist die kritische Flimmerfrequenz-Analyse (*Critical Flicker Frequency, CFF*). Diese hat sich unter den neurophysiologischen Tests zur HE-Diagnostik als sensitive, einfach durchführbare, objektive und kostengünstige Methode durchgesetzt (Häussinger 2018). Bei diesem Verfahren wird eine Lichtquelle wechselseitig ein- und ausgeschaltet. Die Frequenz dieses Vorgangs wird schrittweise abgesenkt bis der Patient erkennt, dass die Lichtquelle nicht permanent leuchtet, sondern flackert (Kircheis et al. 2002). Dieser kritische Punkt bestimmt den CFF-Wert, der in Hertz angegeben wird. Seine Bestimmung ist reproduzierbar und weitestgehend unabhängig vom Alter, Zeitpunkt der Untersuchung, Bildungsstand oder von Trainingseffekten der Patienten. Mit einem Schwellenwert von 39 Hertz kann mittels der *CFF* zwischen Gesunden (HE0) und Patienten mit manifester HE differenziert werden (Kircheis et al. 2014). Dabei beträgt die Sensitivität 98 % und die Spezifität 94 % (Häussinger 2018). Die *CFF* ermöglicht außerdem Aussagen hinsichtlich der Prognose des Patienten nach Anlage eines Transjugulären Intrahepatischen Portosystemischen Shunts (TIPS) und des Auftretens erneuter HE-Episoden und erlaubt eine Verlaufsbeurteilung (Kircheis et al. 2014; Häussinger 2018).

1.1.4 Therapie

Die Therapie der HE bei akutem oder chronischem Leberversagen unterscheidet sich grundsätzlich.

Bei akutem Leberversagen stehen neben der Reduktion der systemischen Ammoniakspiegel insbesondere die Wiederherstellung der Leberfunktion und hirndrucksenkende Maßnahmen im Vordergrund (Wettstein und Häussinger 2003).

Bei chronischem Leberversagen unterscheidet man die Therapie einer akuten HE-Episode von sekundärprophylaktischen Maßnahmen. Das wichtigste Ziel der Therapie ist es, HE-auslösende Faktoren zu eliminieren (Häussinger und Blei 2008; Häussinger und Sies 2013). Dazu zählen Strategien zur Senkung der Ammoniakspiegel, die antibiotische Behandlung von Infektionen, die Normalisierung von Elektrolyt- und Blutzuckerspiegeln, das Stillen von Blutungen sowie das Vermeiden HE-Episoden-auslösender Medikamente, wie beispielsweise Diuretika (Häussinger und Sies 2013).

Als Akuttherapie einer HE-Episode beispielsweise im Rahmen einer gastrointestinalen Blutung, aber auch sekundärprophylaktisch, kommen nicht-resorbierbare Dissaccharide (Laktulose, Laktitol) zum Einsatz (Häussinger 2018). Diese beschleunigen die Darmpassage und vermindern dadurch die Proteolyse-vermittelte Erhöhung der Ammoniakspiegel (Wettstein und Häussinger 2003; Vilstrup et al. 2014).

Daneben werden nicht-resorbierbare Antibiotika wie insbesondere Rifaximin für die Eradikation der Darmflora eingesetzt (Häussinger 2018; Bajaj et al. 2020). Rifaximin senkt das Risiko einer HE-Episode und der Hospitalisierung (Wettstein und Häussinger 2003; Vilstrup et al. 2014; Bajaj et al. 2020).

Zur medikamentösen Therapie einer refraktären HE werden verzweigt-kettige Aminosäuren (BCAA) eingesetzt, da die BCAA-Spiegel im Serum von HE-Patienten erniedrigt sind. Jedoch hat dieser Therapieansatz keinen Effekt auf Lebensqualität und Mortalität (Holeček 2017), die Therapiekosten sind hoch und die *Compliance* ist gering (Bajaj et al. 2020).

Obwohl die Zinkspiegel im Serum von HE-Patienten erniedrigt sind (Marchesini et al. 1996; Katayama et al. 2018), ist der therapeutische Nutzen einer Supplementation von Zink umstritten (Reding et al. 1984; Riggio et al. 1992; Himoto et al. 2007). Belegt ist

hingegen, dass sie therapeutisch wirksam ist bei Dunkeladaptationsstörung bei Patienten mit Leberzirrhose (Häussinger 2018).

L-Ornithin-L-Aspartat, welches die Ammoniakspiegel senkt, wird sowohl zur Behandlung einer manifesten HE-Episode als auch prophylaktisch eingesetzt (Häussinger 2018).

Aktuell befinden sich weitere medikamentöse Therapieansätze im klinischen (Polyethylenglykol, Albumin, Ornithinphenylacetat, Glycerolphenylbutyrat, Stuhltransplantation) oder präklinischen Stadium (Liposom-unterstützte Peritonealdialyse, GABA-Rezeptor-modulierende-Steroid-Antagonisten, GS-Ersatz) (Romero-Gómez et al. 2015; Bajaj et al. 2020). Durch den Einsatz der rekombinanten GS *AM-535* konnten im Tiermodell effektiv die Ammoniakspiegel bei Leberzirrhose und Enzymdefekten des Citratzyklus reduziert werden (Bajaj et al. 2020).

Eine weitere Möglichkeit der Sekundärprophylaxe liegt darin, insbesondere bei proteinintoleranten Zirrhose-Patienten, die Eiweiße aus pflanzlichen Quellen oder Milchprodukten zu beziehen (Häussinger 2018). Gleichzeitig sollte eine ausreichende Proteinzufuhr gewährleistet sein, da eine exzessive Proteinaufnahme zu einem Anstieg der Blut-Ammoniakkonzentration führt, eine zu geringe Proteinaufnahme aber eine Abnahme der Muskelmasse und damit des extrahepatischen Ammoniakabbaus bewirkt (Zhan und Stremmel 2012). Eine eiweißfreie Ernährung wird nur nach gastrointestinalen Blutungen und zeitlich sehr begrenzt empfohlen (Häussinger 2018). Insgesamt sind 75 % der HE-Patienten von einer Proteinmangelernährung betroffen (Vilstrup et al. 2014). Weitere Ernährungsempfehlungen beziehen sich unter anderem auf die tägliche Energiezufuhr und die Häufigkeit der Nahrungsaufnahme (Vilstrup et al. 2014).

Bislang existieren keine spezifischen Therapieansätze im klinischen Alltag, die auf die Beseitigung des geringgradigen Hirnödems und den zerebralen oxidativ/ nitrosativen Stress abzielen. Insbesondere bei der Verwendung von Antioxidantien ist jedoch Vorsicht geboten, da reaktive Stick- und Sauerstoffspezies auch Signalmetabolite im Stoffwechsel des Gesunden sind und z.B. eine Bedeutung haben für die Regulation des Blutdrucks (Stauss und Persson 2000).

Derzeitig ist die Lebertransplantation die einzige kurative Therapiemaßnahme bei Leberzirrhose und folglich bei der HE (Wettstein und Häussinger 2003).

1.2 Erklärungsansätze zur Pathogenese der HE

Die Pathogenese der HE ist bislang nicht vollständig verstanden und es wurden eine Reihe von Erklärungen in der Literatur diskutiert (für eine Übersicht sei der Leser auf die nachfolgenden Übersichtsarbeiten verwiesen: Häussinger et al. 2002; Ciećko-Michalska et al. 2012; Häussinger und Sies 2013; Butterworth 2014; Liu et al. 2021). Es ist jedoch allgemein anerkannt, dass Astrozyten eine bedeutende Rolle für die Pathogenese der HE spielen. Die HE wird daher auch als primäre Gliopathie bezeichnet, bei der die neurologischen Beeinträchtigungen als Folge der initialen Astrozytenfunktionsstörung gesehen werden (Norenberg 1987; Norenberg 1996; Hazell und Butterworth 1999; Häussinger und Schliess 2008). Die Bedeutung der Astrozyten für die Pathogenese der HE wurde in Arbeiten deutlich, die in HE-Tiermodellen morphologische Veränderungen der Astrozyten im Gehirn zeigten, die man als Alzheimer Typ II Astrozyten bezeichnet (Norenberg 1977; Norenberg 1998). Gregorios und Kollegen fanden ähnliche morphologische Veränderungen in kultivierten Rattenastrozyten, die mit Ammoniak inkubiert wurden (Gregorios et al. 1985).

Es herrscht weiterhin Einigkeit darüber, dass der Anstieg der Ammoniakspiegel im Blut maßgeblich für die Pathogenese der HE ist (Butterworth et al. 1987). Dabei sind die Mechanismen der Ammoniak-Toxizität weiterhin nicht vollständig verstanden (Hazell und Butterworth 1999; Norenberg et al. 2004; Häussinger und Görg 2019; Häussinger et al. 2022).

Zur Aufklärung des Pathomechanismus wurden MR-spektroskopische Untersuchungen am Patienten sowie eine Vielzahl von molekularbiologischen Analysen an kultivierten Hirnzellen und Tiermodellen zur HE, an kultivierten Rattenastrozyten, sowie an *post mortem* Hirnproben von Leberzirrhose-Patienten mit HE durchgeführt. Die hier erhobenen Befunde begründen und stärken die sog. Schwellungshypothese zur Pathogenese der HE. Nach dieser ist die HE Folge einer Astrozytenschwellung und der Bildung von zerebralem oxidativen Stress (Häussinger et al. 1994; Häussinger et al. 2000; Häussinger und Sies 2013; Häussinger und Görg 2019; Häussinger et al. 2022).

1.2.1 Schwellungshypothese zur Pathogenese der HE

Nach der sog. Schwellungshypothese ist die HE die klinische Manifestation eines geringgradigen Hirnödems, welches begleitet wird von zerebralem oxidativ/ nitrosativem

Stress (Häussinger und Sies 2013; Häussinger 2018). Im Jahr 1994 gelang es erstmalig mittels MR-spektroskopischer Untersuchungen die Ausbildung eines geringgradigen Hirnödems bei HE-Patienten durch Häussinger und Kollegen nachzuweisen (Häussinger et al. 1994). Diese Befunde wurden durch Shah und Kollegen im Jahr 2008 (Shah et al. 2008) unter Verwendung der sog. „*Quantitative Water Imaging*“ Technik bestätigt. Häussinger und Kollegen vermuteten bereits 1994, dass es bei Leberzirrhose-Patienten mit HE im Gehirn zu einer Glutaminakkumulation in den Astrozyten kommt, die diese anfänglich noch durch Freisetzung des Osmolyts *myo*-Inositol kompensieren können (Häussinger et al. 1994). Im weiteren Verlauf der Ammoniakentgiftung erschöpft sich aber die volumenregulatorische Kapazität der Astrozyten. In der Folge bildet sich durch eine osmotische Schwellung der Astrozyten ein geringgradiges Hirnödem aus (Häussinger et al. 2000; Häussinger und Sies 2013) (siehe **Abb. 1**). In dieser Situation ist der Astrozyt vulnerabel gegenüber der schwellungsauslösenden Wirkung weiterer HE-relevanter Faktoren. Die Bedeutung der Glutaminbildung für die Astrozytenschwellung wurde auch im HE-Tiermodell (WISTAR-Ratten) unter Verwendung des Glutaminsynthetasehemmstoffs Methionin-Sulfoximin (MSO) von Takahashi und Kollegen gezeigt und in der sog. „*glutamine osmotic hypothesis*“ beschrieben (Takahashi et al. 1991).

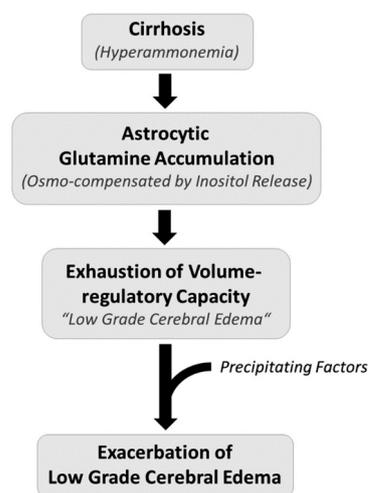


Abb. 1: Ausbildung und Exazerbation des Hirnödems bei der hepatischen Enzephalopathie. Die HE ist die klinische Manifestation eines geringgradigen Hirnödems, welches unter dem Einfluss HE-präzipitierender Faktoren exazerbiert. *Reprinted from Archives of Biochemistry and Biophysics; Vol. 536; Häussinger, D.; Sies, H.; p. 98, Hepatic Encephalopathy. Clinical Aspects and Pathogenetic Concept (2013) with permission from Elsevier (Häussinger und Sies 2013).*

Zu den HE-relevanten Faktoren gehören Ammoniak, Benzodiazepine vom Diazepam-Typ, Hyponatriämie und pro-inflammatorische Proteine (siehe **Abb. 2**). HE-relevante Faktoren können aus HE-präzipitierenden Faktoren hervorgehen: So ist eine gastrointestinale Blutung und die nachfolgende Eiweißverwertung mit einer Erhöhung der Ammoniakspiegel im Blut assoziiert. Dies erklärt, warum stark heterogene HE-präzipitierende Faktoren eine HE auslösen können (siehe **Abb. 2**). Unter dem gemeinsamen Einfluss weiterer HE-relevanter Faktoren, die ebenfalls eine Astrozytenschwellung induzieren, kann das geringgradige Hirnödem exazerbieren und eine HE-Episode ausgelöst werden (Häussinger und Sies 2013).

Zu den HE-präzipitierenden Faktoren zählen gastrointestinale Blutungen, Weichteilblutungen, Traumata, Infektionen/Sepsis, Medikamente wie Diuretika oder Sedativa, Elektrolytentgleisungen, metabolische Azidose, spontanbakterielle Peritonitis, übermäßige Proteinzufuhr oder Nierenfunktionseinschränkungen (Häussinger 2018).



Abb. 2: HE-präzipitierende und -relevante Faktoren. Die heterogene Gruppe HE-präzipitierender Faktoren induziert über die Bildung HE-relevanter Faktoren eine Astrozytenschwellung und oxidativ/nitrosativen Stress (Abbildung erstellt auf Grundlage von Häussinger und Schliess 2008).

Weitere Untersuchungen zeigen, dass eine Astrozytenschwellung oxidativ/ nitrosativen Stress induziert und dieser wiederum eine Astrozytenschwellung triggern kann (Lachmann et al. 2013). Die durch HE-relevante Faktoren ausgelöste Astrozytenschwellung sowie die Bildung von oxidativ/ nitrosativem Stress verstärken sich dabei wechselseitig und induzieren hierüber einen *circulus vitiosus* (Häussinger 2006; Häussinger und Sies 2013). In der Folge kommt es zu Veränderungen der Genexpression (Görg et al. 2013a) und Signalübertragung (Keitel et al. 2010), zu verstärkter RNA-Oxidation (Görg et al. 2008), Protein-Tyrosin-Nitrierung (Montoliu et al. 2011) und der Mobilisierung von Zink, welche ebenfalls die Genexpression beeinflusst (Kruczek et al. 2009; Görg et al. 2013b). In der Gesamtheit beeinträchtigt dies astrozytäre und in der

Folge neuronale Funktionen. Die Kommunikation von Astrozyten und Neuronen wird gestört und die synaptische Plastizität beeinträchtigt. Die dadurch herbeigeführte Störung oszillatorischer Netzwerke spiegelt sich in den Symptome wider (Häussinger und Sies 2013) (siehe **Abb. 3**).

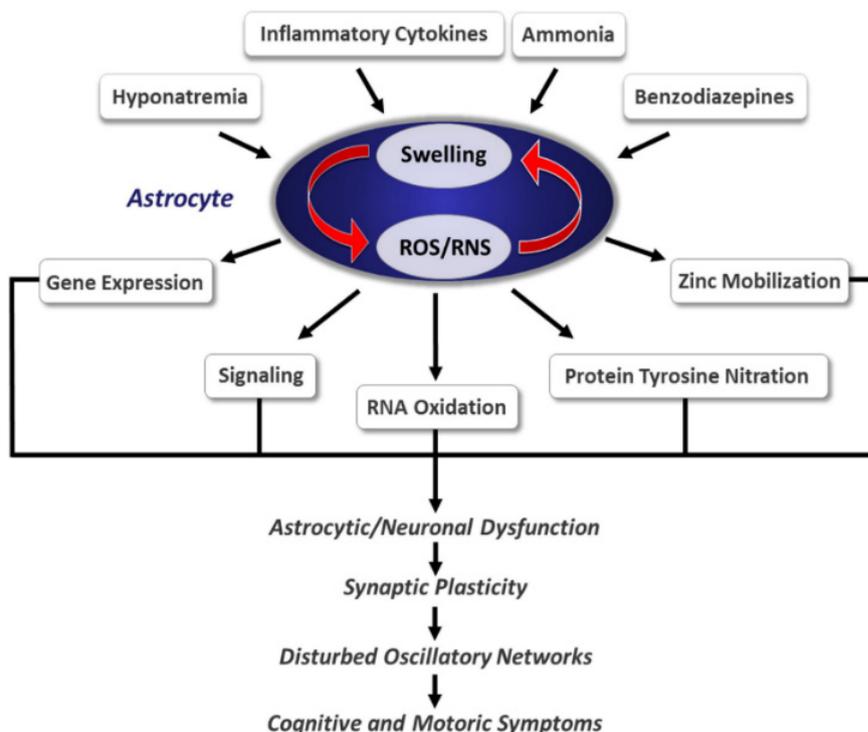


Abb. 3: Schwellungshypothese zur Pathogenese der HE. Die Schwellungshypothese postuliert, dass die verschiedenen HE-relevanten Faktoren zu einer Astrozytenschwellung und oxidativ/nitrosativem Stress führen. Astrozytenschwellung und oxidativ/nitrosativer Stress verstärken sich dabei wechselseitig und triggern über verschiedene Mechanismen die kognitiven und motorischen Symptome der HE. *Reprinted from Archives of Biochemistry and Biophysics; Vol. 536; Häussinger, D.; Sies, H.; p. 99, Hepatic Encephalopathy. Clinical Aspects and Pathogenetic Concept (2013) with permission from Elsevier (Häussinger und Sies 2013).*

1.2.2 Die Trojan-Horse-Hypothese

Die besondere Bedeutung von oxidativ/nitrosativem Stress für die Pathogenese der HE ist unbestritten. Die Mechanismen der Bildung werden derzeit intensiv beforscht und in diesem Zusammenhang sind auch Mitochondrien als wichtige Quelle der ROS-Bildung beschrieben worden (Norenberg et al. 2004; Görg et al. 2015).

Die sog. *Trojan-Horse-Hypothese* nach Albrecht und Norenberg postuliert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien in mit Ammoniak behandelten Astrozyten als Folge einer Glutaminase-vermittelten Hydrolyse von Glutamin. Danach soll im Rahmen der Ammoniakentgiftung gebildetes Glutamin nach Transport in die Mitochondrien

über die dort lokalisierte mitochondriale Phosphat-aktivierte Glutaminase (PAG) zu Glutamat und Ammoniak hydrolysiert werden. Über den dadurch bedingten Anstieg der mitochondrialen Ammoniakkonzentration sollen die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, die *Mitochondrial Permeability Transition* (MPT) und mitochondriale Dysfunktion induziert werden (Albrecht und Norenberg 2006; Albrecht et al. 2010; Rama Rao und Norenberg 2014). Albrecht und Norenberg vertreten die Ansicht, dass Ammoniak über mitochondrialen ROS und MPT-Induktion eine Astrozytenschwellung induziert (siehe **Abb. 4**) (Albrecht und Norenberg 2006). Diese Annahmen beruhen auf Untersuchungen an kultivierten Rattenastrozyten, in denen der Glutaminase-Hemmstoff 6-Diazo-5-oxo-L-Norleucin (DON) (Shapiro et al. 1979) eingesetzt wurde.

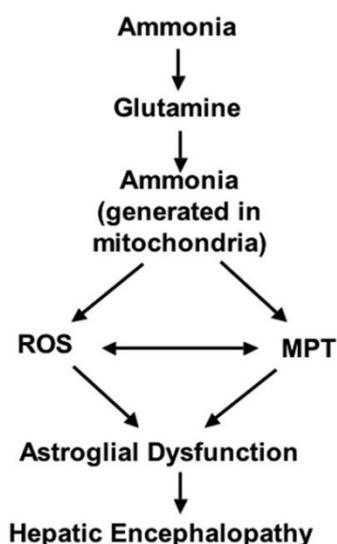


Abb. 4: Trojan Horse-Hypothese. Ammoniak, welches in Form von Glutamin in die Mitochondrien transportiert wird, vermittelt über die Bildung von ROS in den Mitochondrien und die Induktion der MPT eine Störung der Astrozytenfunktion. In der Folge kommt es zur Ausbildung einer HE. *Reprinted from Hepatology, Vol. 44, Albrecht, J.; Norenberg, M. D., Glutamine: A Trojan Horse in Ammonia Neurotoxicity, p.792 (2006) with permission from John Wiley and Sons (Albrecht und Norenberg 2006).*

1.3 Die Glutaminase

1.3.1 Isoformen

In Säugetieren werden die Glutaminase-Isoformen von zwei paralogen Genen, GLS-1 (auch als GLS bezeichnet) und GLS-2, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind, kodiert (Curthoys 1995; Aledo et al. 2000). Das GLS-1-Gen, welches sich auf Chromosom 2 befindet und aus 19 Exonen über 82 kb (Kilobasen) besteht (Porter et al. 2002), kodiert für die GLS-Transkripte KGA und *Glutaminase C splice variant*

(GAC) (*kidney/K-Typ-Isoenzym*), welche posttranskriptionell durch *gene-splicing* gebildet werden (Curthoys 1995; Elgadi et al. 1999) sowie für *Glutaminase M splice variant* (GAM), welches durch Einschluss der Introne 2-3 in die mRNA gebildet wird und keine katalytische Aktivität besitzt (Elgadi et al. 1999). Das KGA-Transkript wird aus den Exonen 1-14 sowie 16-19 und das GAC-Transkript aus den Exonen 1-15 gebildet. Damit ist das GAC-Transkript mit Ausnahme der C-terminalen Region identisch zum KGA-Transkript (Katt et al. 2017). Die Auswirkungen der Unterschiede in der C-terminalen Region auf die Funktion und Aktivität der Glutaminase-Isoformen ist nicht bekannt (Elgadi et al. 1999).

Das durch das GLS-Gen kodierte KGA-Transkript macht in Mäuse- und Rattengehirnen über 90% der Glutaminase-Transkripte aus (Martín-Rufián et al. 2012).

Das KGA-Protein der Ratte besteht aus 674 Aminosäuren und bildet ein Heterotetramer, das aus einem 65- und einem 68-kDa-Peptid im Verhältnis 3:1 besteht (Shapiro et al. 1987; Shapiro et al. 1991). Diese Peptide werden aus einem 74-kDa-Vorläufer in den Mitochondrien gebildet (Perera et al. 1990; Katt et al. 2017).

Das GLS-2-Gen auf Chromosom 12 (Aledo et al. 2000) enthält Informationen für die zwei GLS-2-Transkripte, GAB und LGA (*liver/L-Typ-Isoformen*), die durch unterschiedliche Transkriptionsinitiation und Nutzung alternativer Promotoren entstehen (Martín-Rufián et al. 2012).

1.3.2 Organspezifische und zelluläre Expression der Glutaminase

Die unterschiedlichen Glutaminase-Isoformen werden nicht ubiquitär, sondern organspezifisch exprimiert: Die GLS-1-Genprodukte werden hauptsächlich in extrahepatischen Geweben wie der Niere und dem Gehirn exprimiert, wohingegen die GLS-2-Genprodukte in der Leber, im Gehirn (Olalla et al. 2002), im Pankreas und in Immun- sowie Tumorzellen lokalisiert sind (Aledo et al. 2000; Gómez-Fabre et al. 2000; Pérez-Gómez et al. 2003; Castell et al. 2004; Campos-Sandoval et al. 2015). Die Glutaminase-Isoformen werden somit teilweise in denselben Organen (Aledo et al. 1998), wie beispielsweise dem Gehirn (Aledo et al. 2000; Gómez-Fabre et al. 2000; Olalla et al. 2002) und teilweise in denselben Zelltypen koexprimiert (Porter et al. 1995; Porter et al. 2002; Cardona et al. 2015).

Auch in kultivierten Rattenastrozyten wurden GLS-1- und -2-Genprodukte nachgewiesen (Schousboe et al. 1979; Kvamme et al. 1982). Die Arbeiten von Cardona und Kollegen zeigen, dass beide Glutaminase-Isoformen auf mRNA- und Proteinebene in Astrozyten *in vitro*, sowie im Ratten- und humanen Gehirn exprimiert und katalytisch aktiv sind (Cardona et al. 2015) (siehe **Abb. 5**). Dabei wurden Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation der Isoformen deutlich: Während die KGA nur in den Mitochondrien (innere mitochondriale Membran) exprimiert wird, konnten die GLS-2-Genprodukte sowohl in den Zellkernen (GAB) als auch in den Mitochondrien nachgewiesen werden (Shapiro et al. 1985; Kvamme et al. 2001; Olalla et al. 2002; Campos-Sandoval et al. 2015; Cardona et al. 2015). Dies überschneidet sich mit Untersuchungen an Neuronen des Ratten- und Affenkortex, in denen die LGA in den Nuklei und die KGA in den Mitochondrien der Neurone nachgewiesen wurde (Olalla et al. 2002).

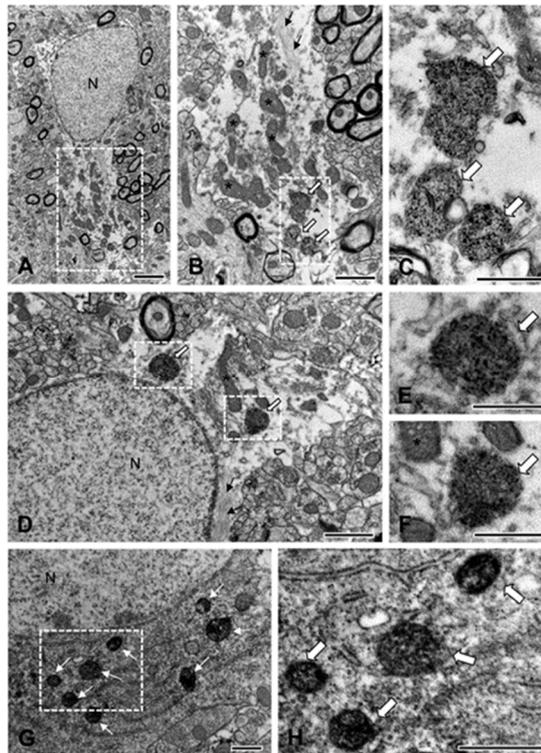


Abb. 5: Elektronenmikroskopischer Nachweis der KGA-mRNA (Pfeile) in den Mitochondrien von Astrozyten (A-F) und Neuronen (G-H) im Rattenhirn. Reprinted from *GLIA*, Vol. 63, Cardona, C. et al., *Expression of Gls and Gls2 Glutaminase Isoforms in Astrocytes*, p.372 (2015) with permission from John Wiley and Sons (Cardona et al. 2015).

1.3.3 Funktionen der Glutaminase im Gehirn

Die Glutaminase vermittelt die hydrolytische Desaminierung von Glutamin zu Glutamat unter Freisetzung von Ammoniak (Krebs 1935; Curthoys 1995). Sie ist im Gehirn an

wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt (Wang et al. 2017), wie z.B. der Energiesynthese oder der Synthese der Neurotransmitter Glutamat und GABA (Hertz 1979; Hertz 2004; Schousboe et al. 2013). Wang und Kollegen postulierten eine Funktion der GLS-1-Genprodukte für die Differenzierung, Proliferation und die Vitalität von Neuronen (Wang et al. 2014). Ihre Untersuchungen an Mäusen, welche die Glutaminase C (GAC) überexprimieren, zeigen jedoch auch, dass eine Überexpression der GAC strukturelle (Dichteverlust der Synapsen) und funktionelle Veränderungen im Gehirn bewirkt (Neuroinflammation und Beeinträchtigung von Kognition und Lernen) (Wang et al. 2017).

1.3.4 Regulation der Aktivität der KGA

Derzeitig ist nicht vollständig geklärt, über welche Mechanismen die Aktivität des KGA-Proteins reguliert wird.

In vitro wurde eine Regulation der KGA durch die zytosolischen Phosphatspiegel beobachtet (Errera und Greenstein 1949; Curthoys 1995; Kvamme et al. 2001), jedoch sind dazu wesentlich höhere Phosphat-Konzentrationen notwendig als sie im Serum vorkommen (Katt und Cerione 2014). Auch Kvamme und Kollegen gehen davon aus, dass die Phosphatkonzentration selbst nicht der Hauptregulator der Glutaminase *in vivo* sein kann, da die zellulären Phosphatspiegel relativ konstant sind (Kvamme et al. 2001).

Auf Ebene der Transkription konnten Gao und Kollegen zeigen, dass der onkogene Transkriptionsfaktor c-Myc die miRNA-23a und -23b inhibiert und hierüber die Expression der Glutaminase-mRNA gesteigert wird (Gao et al. 2009). Wang et al. beobachteten an humanen Brustkrebszellen, dass auch der Transkriptionsfaktor NF- κ B in die Transkription von GLS-1 involviert sein kann (Wang et al. 2010). Die Aktivität des KGA-Proteins kann vermutlich auch durch Phosphorylierung beeinflusst werden. Thangavelu und Kollegen konnten zeigen, dass die Phosphorylierung und Aktivität der KGA durch Aktivierung des Raf-MEK-Erk-Signalwegs über den epidermalen Wachstumsfaktor gesteigert wird (Thangavelu et al. 2012).

Die KGA-Aktivität kann auch über synthetische Inhibitoren gehemmt werden. Dazu zählt das Glutamin-Analogon DON (Shapiro et al. 1979), welches an das aktive Zentrum des Enzyms bindet und dieses irreversibel und kompetitiv hemmt (Katt und Cerione 2014). Die Spezifität der Hemmwirkung von DON ist allerdings äußerst gering

(Ortlund et al. 2000). So hemmt DON nicht nur die KGA, sondern auch andere Glutamin-verwendende Enzyme (Pinkus 1977; Shapiro et al. 1979; Ortlund et al. 2000) und kann Apoptose hervorrufen (Hiramoto et al. 1996) durch DNA-Einzelstrangbrüche bzw. Schädigung der inneren mitochondrialen Membran (Wu et al. 1999). Ein weiterer Hemmstoff der KGA, der deutlich spezifischer wirkt und die KGA allosterisch und nicht-kompetitiv hemmt, ist Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl)ethyl-Sulfid (BPTES) (Thangavelu et al. 2012). Weitere nicht-kompetitive Hemmstoffe mit hoher Spezifität sind „968“ (Wang et al. 2010; Katt und Cerione 2014) und CB-839 (Zimmermann et al. 2019).

1.4 Seneszenz

Ein charakteristisches Merkmal seneszenten Zellen ist, dass sie das Proliferationspotenzial verlieren (Herranz und Gil 2018). Seneszenz wurde initial als Austritt von Zellen aus dem Zellzyklus als Folge einer begrenzten Proliferationskapazität kultivierter humaner Fibroblasten beschrieben (Hayflick und Moorhead 1961; Hayflick 1965). Diese Form der Seneszenz wurde als replikative Seneszenz bezeichnet. Nachfolgend fand man jedoch heraus, dass Seneszenz auch eine Reaktion auf verschiedene Stressoren wie z.B. reaktive Stick- und Sauerstoffspezies sein kann (Kuilman et al. 2010) und bezeichnete diese Form als zelluläre Seneszenz. Die Seneszenz wird über die Aktivierung verschiedener Seneszenz-vermittelnder Signalkaskaden aktiviert. Hierzu zählt die Aktivierung des Zellzyklus-Masterregulators p53, der eine Transkriptionssteigerung der Seneszenz-vermittelnden Gene p21 und GADD45 α (*Growth arrest and DNA-damage-inducible protein alpha*) bewirkt (Duan et al. 2005). Die Proteinprodukte dieser Gene gelangen in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsrepressoren wirken. Hierüber verhindern sie den Übertritt in die nächste Phase des Zellzyklus und bewirken damit den Arrest der Zellen im Zellzyklus (Hollander et al. 1999; Chen 2000). Von großer Bedeutung ist, dass seneszente Zellen nicht nur die Fähigkeit verlieren zu proliferieren, sondern auch weitere spezifische Funktionen. So verlieren seneszente Astrozyten die Fähigkeit, synaptische Kontakte zu stabilisieren. In der Folge werden diese gelöst und die Neurotransmission beeinträchtigt (Kawano et al. 2012). Daher wurde vermutet, dass die Astrozyten-Seneszenz dazu beiträgt, dass die kognitive Beeinträchtigung bei

Patienten mit Leberzirrhose nach Auflösen einer akuten HE-Episode nicht vollständig reversibel sind (Bajaj et al. 2010, Riggio et al. 2011).

Kürzlich wurde gezeigt, dass die durch Ammoniak induzierte Seneszenz Folge einer Transkriptionshemmung der microRNA pri-miR326-3p ist, welche über eine verstärkte O-GlcNAcylierung bislang unbekannter Proteine vermittelt wird. Hierdurch werden die Hämoxygenase-1- (HO1) und Nox4-mRNA-Spiegel gesteigert, welche über die Freisetzung von zweiwertigen Eisenionen aus Häm und der Bildung von Wasserstoffperoxid die Bildung von Hydroxylradikal-Anionen in der Fenton-Reaktion triggern. Hierdurch wird RNA oxidiert, die p53 aktiviert und Transkription von p21 und GADD45α gesteigert, sowie eine Proliferationshemmung in den Astrozyten induziert (siehe **Abb. 6**) (Görg et al. 2015; Oenarto et al. 2016; Görg et al. 2019; Häussinger und Görg 2019; Häussinger et al. 2022).

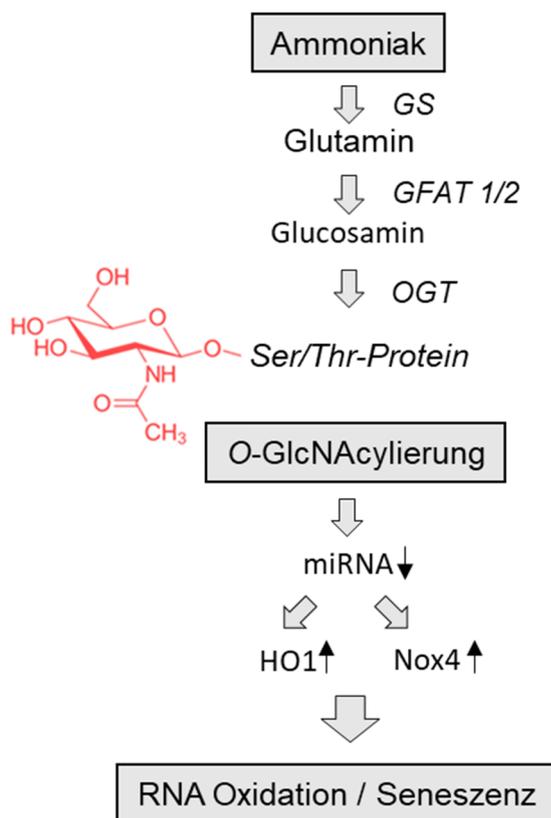


Abb. 6: Mechanismus der durch Ammoniak induzierten RNA-Oxidation und Seneszenz in kultivierten Rattenastrozyten. Ammoniak führt über eine O-GlcNAcylierung bisher unbekannter Proteine und nachfolgender Herunterregulation von miR326-3p zu einer Hochregulation der HO1 und NOX4, die wiederum RNA-Oxidation und Seneszenz in Astrozyten hervorrufen. GS: Glutaminsynthetase, GFAT1,2: *Glucosamine-fructose-6-phosphate aminotransferase*. OGT: *N-acetylglucosaminyltransferase*. O-GlcNAc: O-linked β-N-acetylglucosamine, HO1: Hämoxygenase 1, NOX4: NADPH-Oxidase 4. (Abbildung erstellt auf Grundlage von Görg et al. 2019).

1.5 Ziele der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu überprüfen, ob die *kidney-type* Glutaminase in Rattenastrozyten *in vitro* und im Rattenhirn *in situ* vorhanden ist. An kultivierten Rattenastrozyten sollte überprüft werden, ob Ammoniak die mRNA- und Proteinkonzentration der KGA beeinflusst. Nachfolgend sollten Mechanismen, durch die Ammoniak die mRNA- und Proteinspiegel der KGA beeinflusst und die Rolle der KGA für durch Ammoniak induzierten oxidativen Stress und Seneszenz untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material-Tabellen

2.1.1 Antikörper

Zielprotein, Klonalität, Wirt	Hersteller, Katalog-Nr.	Verwendung, Verdünnung
ANT monoklonal <i>mouse</i>	Abcam, Cambridge, UK Kat.-Nr.: #ab110322	Immunfluoreszenzanalysen, 1:100
KGA polyklonal <i>rabbit</i>	Abcam, Cambridge, UK Kat.-Nr.: #ab93434	Western-Blot, 1:5000 Immunfluoreszenzanalysen, - 1:500/1:200 in kultivierten Rattenastrozyten - 1:200 in Rattenhirnschnitten
GS monoklonal <i>mouse</i>	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Kat.-Nr.: #610518	Immunfluoreszenzanalysen, 1:150
GRP78 monoklonal <i>mouse</i>	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Kat.-Nr.: #610978	Western-Blot, 1:5000
HO1 polyklonal <i>rabbit</i>	StressGen Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland Kat.-Nr.: #ADI-SPA-895	Western-Blot, 1:1000
GAPDH monoklonal <i>mouse</i>	Biodesign International, Saco, USA Kat.-Nr.: #H86504M	Western-Blot, 1:5000

2.1.2 Sekundärantikörper

Anti- <i>mouse</i> HRPOD <i>goat</i>	Biorad, München, Deutschland Kat.-Nr.: #170-6516	Western-Blot, 1:10000
Anti- <i>rabbit</i> HRPOD <i>goat</i>	Dako, Biozol, Eching, Deutschland Kat.-Nr.: #P0448	Western-Blot, 1:10000
Anti- <i>mouse</i> FITC <i>goat</i>	Jackson Corp., West Grove, USA Kat.-Nr.: #715-096-150	Immunfluoreszenzanalysen, 1:200
Anti- <i>rabbit</i> CY3 <i>goat</i>	Jackson Corp., West Grove, USA Kat.-Nr.: #711-166-152	Immunfluoreszenzanalysen, 1:200
Anti- <i>rabbit</i> FITC <i>donkey</i>	Jackson Corp., West Grove, USA Kat.-Nr.: #711-096-152	Immunfluoreszenzanalysen, 1:200
Anti- <i>mouse</i> Alexa Fluor 488	Jackson Laboratories, Maine, USA	Immunfluoreszenzanalysen, 1:200
Anti- <i>rabbit</i> Alexa Fluor 647	Jackson Laboratories, Maine, USA	Immunfluoreszenzanalysen, 1:200

2.1.3 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid 4K-Lösung 30 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Material und Methoden

Bradfordproteinassay	BioRad, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA-Laboratories, Linz, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fluoromount-G™	SouthernBiotech, Birmingham, Vereinigtes Königreich
Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Immersionsöl	ZEISS, Jena, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methylammoniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
MSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NH ₄ Cl	Merck, Bad Soden, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (PBS) w/o Ca ²⁺ /Mg ²⁺	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Cytogen, Sinn, Deutschland
PPT	AK Scientific Inc., Union City, CA, USA
Ponceau-S-Färbelösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
<i>Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablets</i>	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Pyruvat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tumornekrosefaktor (TNF)-alpha	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	VWR BDH Prolabo Chemicals, Darmstadt, Deutschland
Triton-X 100	Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Reagenzien für die siRNA-Transfektion

Chemikalien	Hersteller
siRNA GFAT1 (Rn_MGC95214_1)	Qiagen, Hilden, Deutschland Kat.-Nr.: #SI01914759
siRNA GFAT2 (Rn_RGD: 1303097_2)	Qiagen, Hilden, Deutschland Kat.-Nr.: #SI01974126
siRNA GLS1 (NM_001109968)	Qiagen, Hilden, Deutschland Kat.-Nr.: #SI01517103
<i>AllStars™ Negative Control siRNA</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland Kat.-Nr.: #SI03650318
<i>HiPerfect transfection reagent</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland Kat.-Nr.: #301704

2.1.5 Farbstoffe

Farbstoff	Hersteller
Hoechst 34580	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.6 Zellkulturreagenzien

Reagenz	Hersteller
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Cytogen, Sinn, Deutschland
EDTA	Cytogen, Sinn, Deutschland

2.1.7 Molekularbiologische Kits

<i>First Strand cDNA-Synthesis-Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
Molekulargewichtsmarker (<i>Dual Color Protein Standard</i>)	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
<i>RNeasy-Mini-Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Western Lightning Plus ECL™</i>	Amersham, Waltham, Niederlande

2.1.8 Spezielle Lösungen für die Western-Blot-Analysen

Puffer	Zusammensetzung
Blotting-Puffer	39 mmol/l Glycin; 48 mmol/l Tris/HCl; 0,03 % SDS; 20 % Methanol
5-fach Elektrophoresepuffer	1,73 mmol/l SDS; 125 mmol/l Tris; 1,25 mmol/l Glyzin
Proteinlysepuffer	10 mmol/l Tris/HCl Puffer (pH 7,4); 1 % Triton X-100; 150 mmol/l NaCl; 1 mmol/l EDTA; 1 mmol/l EGTA; 20 mmol/l NaF; 0,2 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid und 0,5 % Nonidet-P-40
SDS-Auftragspuffer	220 mmol/l Tris/HCl (pH 8,8); 22,5 mmol/l EDTA; 9 % SDS; 40 % Glycerin; 0,125 % Bromphenolblau; 200 mmol/l DTT
<i>Tris-buffered saline with Tween20 (TBS-T)</i>	Tris 20 mmol/l; pH7,5; NaCl 150 mmol/l; 0,1 % Tween-20
10-fach TBS-T	1,98 mmol/l Tris; 1,488 mmol/l NaCl; pH 7,6

Waschpuffer	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) + 0,1% Tween
-------------	--

2.1.9 Spezielle Lösungen für PCR

RLT-Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
------------	-----------------------------

2.1.10 Materialien und Geräte

Material/Gerät	Hersteller
Analysenwaage (Kern 770)	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Brutschrank (Heracell150)	Heraeus, Hanau, Deutschland
CellObserver Z1	ZEISS, Oberkochen, Deutschland
ChemiDoc MP BioRad Detektionsgerät	BioRad Laboratories, Feldkirchen, Deutschland
Deckgläser (Ø12 mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland
Ein-Kanal-Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalspritzen (1 ml)	Braun, Melsungen, Deutschland
Einwegküvetten	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutsch- land
Elektrophoresekammer	Biometra GmbH, Göttingen, Deutsch- land
Elektroblottingkammer	Biometra GmbH, Göttingen, Deutsch- land

Material und Methoden

Fluorimeter (Fluoroskan Ascent™ FL)	Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
Glaspipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
Glasplatten	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Hamilton-Spritze	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
<i>Kodak Digital Image Station (4000MM)</i>	Eastman Kodak Co., Rochester, USA
Konfokales Laserscanning-Mikroskop (LSM880)	ZEISS, Jena, Deutschland
Konfokales Laserscanning-Mikroskop (LSM510meta)	ZEISS, Jena, Deutschland
Kunststoffstripetten (5 ml/ 10 ml, 25 ml)	Corning Costar GmbH, Bodenheim, Deutschland
MatTek-Schale (Ø60 mm, Glas)	MatTek Corporation, Ashland, USA
Magnetrührer (MR 2000)	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Nanodrop (1000 Spectrophotometer)	NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Nitrozellulose-Transfermembran Protran®	Whatman, Dassel, Deutschland
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, Deutschland
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg, Deutschland

Material und Methoden

Präzisionswaage Kern (440-47N)	Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland
Reaktionsgefäße (<i>Safe-lock</i>)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<i>Realtime-PCR-Cycler</i> (ABI 7500)	Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA
Röhrchen (Greiner, 14 ml/50 ml)	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Roller (SRT1)	Stuart Scientific, Staffordshire, USA
Schlauchpumpe (505 S)	Watson-Marlow, Rommerskirchen, Deutschland
Schüttelinkubator Ecotron	INFORS HAT, Einsbach, Deutschland
Stereolupe MZ8	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Schüttler (GFL-3017)	Watson-Marlow, Rommerskirchen, Deutschland
Sterile Filter (Filtropur, 0,20 µm)	Millipore, Eschborn, Deutschland
ThermoMixer® C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallstab	Hielscher Ultrasonics GmbH, Teltow, Deutschland
Ultrazentrifuge (J2-HS)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
ViiA7 qPCR cycler	Applied Biosystems®, Life Technologies, Darmstadt; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

24-Well-Platte	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Platte	Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA
Whatman-Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Zellkulturflaschen (<i>cellstar</i>)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschalen (Ø60 mm/ 100 mm)	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber	Corning Costar GmbH, Bodenheim Deutschland
Zentrifugationsröhrchen (13x51 mm)	Beckman, Krefeld, Deutschland
Zentrifuge (5415D)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge (Rotina 420R)	Hettich, Tuttlingen, Deutschland

2.1.11 Primer für die Realtime-PCR

Ziel cDNA	Sequenz	Hersteller
KGA <i>forward</i>	5'-GCG AAG GCA AGG AGA TGG TG -3'	Eurofins Scientific, Ebersberg, Deutschland
KGA <i>reverse</i>	5'-CTC TTT CAA CCT GGG ATC AGA TGT TC -3'	Eurofins Scientific, Ebersberg, Deutschland
HPRT1 <i>forward</i>	5'-TGC TCG AAT GTC ATG AAG GA-3'	Eurofins Scientific, Ebersberg, Deutschland
HPRT1 <i>reverse</i>	5'-CAG AGG GCC ACA ATG TGA TG-3'	Eurofins Scientific, Ebersberg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 *Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus dem zerebralen Rattenkortex*

Der Kopf neugeborener Wistar-Ratten wurden nach Dekapitation für zehn Sekunden in einer 70%-igen Ethanollösung inkubiert. Nach Entfernung der Haut sowie der mechanischen Eröffnung des Schädels folgte die Entnahme des Gehirns sowie dessen Teilung entlang des Interhemisphärenspalts unter Zuhilfenahme einer Stereolupe. Im Anschluss wurden die Meningen entfernt, der zerebrale Kortex frei präpariert und mit einem Skalpell zerkleinert. Nach Transfer in 10 ml DMEM + 10 % Penicillin/Streptomycin und 10 % FBS wurde das Gewebe für eine Minute bei 1500 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Gewebesediment in 2 ml Zellkulturmedium (10 % Penicillin/Streptomycin + 10 % FBS) überführt. Daraufhin wurde das Gewebe mit Hilfe einer Pasteurpipette titriert und 8 ml DMEM (1000 mg/l D-Glucose, 10 % FBS) hinzugefügt. Die so gewonnene Suspension aus Zellen und Geweberesten wurde durch sterile Nylongaze (Maschenweite 60 µm) filtriert und in zwei Gewebekulturflaschen transferiert, die man mit dem Zellkulturmedium auf ein Endvolumen von 20 ml auffüllte. Die Zellen wurden dann für sieben Tage im Brutschrank inkubiert (95 % Wasserdampfsättigung, 10 % CO₂, 37 °C). In einem nachfolgenden Schritt wurden durch 12-stündiges Schütteln der Kulturen bei 200 U/min und 37°C in einem Schüttelinkubator andere Zelltypen wie Mikroglia, Neurone oder Oligodendrozyten entfernt (Booher und Sensenbrenner 1972). Mittels Lichtmikroskopie wurde das Wachstum der Zellen kontinuierlich überwacht und nach Erreichen einer konfluenten Astrozytenkultur wurden die Astrozyten auf weitere Kulturbedingungen ausgesät. Dazu wurde den Zellkulturflaschen zum Zweck der Ablösung der Astrozyten von der Oberfläche ein Gemisch aus 0,05 % EDTA und 0,02 % Trypsin in PBS hinzugefügt. Der Inhalt einer Flasche wurde dann auf zwei neue Flaschen verteilt und bis zur Konfluenz im Brutschrank aufbewahrt. Im Anschluss wurden die Astrozyten auf Zellkulturschalen mit 100 oder 60 mm Durchmesser oder auf Deckgläsern von 12 mm Durchmesser (in 24-Well-Platten) ausplattiert. Das aus DMEM + 10 % FBS bestehende Zellkulturmedium wurde alle 48 Stunden ausgetauscht und das Wachstum der Astrozyten lichtmikroskopisch überprüft. Alle Arbeiten mit den Astrozyten wurden an der sterilen Laborbank verrichtet.

Die Präparation der Rattenastrozyten wurde von Frau Vanessa Herbertz und Frau Dr. Ayse Karababa durchgeführt (Organentnahme-Projektnummer der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT): O78/08).

2.2.2 Immunfluoreszenzanalysen

Bei Immunfluoreszenzanalysen werden Proteine mit Antikörpern nachgewiesen, die gegen spezifische Epitope des jeweiligen Proteins gerichtet sind. Diese „Primärantikörper“ können nachfolgend mit Hilfe von mit Fluoreszenzfarbstoff-beladenen sekundären Antikörpern markiert werden. Diese Sekundärantikörper sind gegen Proteine der Spezies gerichtet, in welcher der Primärantikörper hergestellt wurde. Unter Zuhilfenahme der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie werden nachfolgend an die Sekundärantikörper gekoppelte Fluorochrome mit einer Lichtquelle angeregt und deren Emission im für das jeweilige Fluorochrom typischen Emissionswellenlängenbereich mit Hilfe von Filtern detektiert. Immunfluoreszenzanalysen ermöglichen es, die relative Häufigkeit und die Verteilung von Proteinen in Zellen und Geweben zu erfassen (Coons und Kaplan 1950). Durch die Verwendung von Antikörpern, die in unterschiedlichen Wirten hergestellt wurden, können auch mehrere Proteine gleichzeitig nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der CellObserver Z1 (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) für die Aufnahmen verwendet.

2.2.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie ist eine technisch aufwendigere Form der Fluoreszenzmikroskopie, mit der Licht aufgenommen werden kann, welches aus einer definierten optischen Ebene stammt. Dafür werden mit Fluorochromen markierte Proben mit Hilfe eines Lasers in der fokalen Ebene angeregt und Licht, welches aus anderen Ebenen als der Fokusebene stammt, mit Hilfe einer Lochblende von der Detektion ausgeschlossen. Dadurch wird es möglich, Aufnahmen mit hoher Auflösung und gleichzeitig einem sehr hohen Signal-zu-Rausch-Verhältnis bzw. mit einem hohen Kontrast anzufertigen. Die Anregung erfolgt mit Lasern, die monochromates Licht einer definierten Wellenlänge mit hoher Energiedichte erzeugen, wodurch eine spezifische Anregung und Fluoreszenzdetektion von mehreren gleichzeitig verwendeten Farbstoffen möglich wird. Da bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie die Detektion auf eine definierte optische Ebene begrenzt werden kann, können Aussagen darüber getroffen werden, ob zwei Fluorochrome in sehr enger räumlicher Nähe zueinanderstehen. Dabei ist zu beachten, dass die optische Auflösung physikalisch begrenzt ist. Im

Gegensatz zur konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie entsteht das Bild bei der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie durch sequenzielles Anregen und Aufnehmen definierter Bereiche der zu scannenden Probe. In der vorliegenden Arbeit wurde dies mit den verwendeten Lasern sequenziell durchgeführt.

Zum Einsatz kamen dabei die konfokalen Laserscanning-Mikroskope LSM880 und LSM510meta von ZEISS (Oberkochen, Deutschland). Die für die jeweiligen Aufnahmen verwendeten Objektive und die respektiven Vergrößerungen sind in den Abbildungslegenden angegeben.

2.2.4 Nachweis der KGA und der GS in Rattenhirnschnitten

Zum Nachweis des KGA- und des GS-Proteins im Rattenhirn wurden Gehirne von acht Wochen alten männlichen WISTAR-Ratten verwendet. Aus isolierten Gehirnhälften wurden mit einem Kryotom in horizontaler Schnittrichtung 50 µm dicke Hirnschnitte angefertigt und in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ überführt. Im Anschluss wurden die Schnitte fünfmal in PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ für jeweils zehn Minuten gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter langsamem Schütteln mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ + 10 % BSA + 1 % Saponin inkubiert.

Anschließend wurden die Schnitte für 48 Stunden bei 4 °C mit Antikörpern gegen KGA (1:200) und GS (1:150) inkubiert, welche sich in PBS mit 2% BSA und 0,1% Saponin befanden. Danach wurden die Schnitte fünfmal mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ unter langsamem Schütteln gewaschen. Nachfolgend wurden die Schnitte für 24 Stunden bei 4 °C mit den gegen Maus (GS) bzw. Kaninchen (KGA) gerichteten und mit FITC bzw. Cy3 gekoppelten Sekundärantikörpern (beide 1:200) und Hoechst34580 (1:5000) in PBS mit 2% BSA und 0,1% Saponin inkubiert. Zuletzt wurden die Schnitte nach erneutem fünfmaligem Waschen mit PBS mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ auf Objektträger überführt und mit Fluoromount-G versiegelt.

Die Mikroskopie wurde mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop LSM510meta von ZEISS (Oberkochen, Deutschland) durchgeführt.

Für die oben beschriebenen Färbungen wurden bereits vorhandene Gehirne unbehandelter Ratten genutzt (Aktenzeichen des LANUV: AZ82-02.04.2015.A342). Die Herstellung der Rattenhirnschnitte und die Färbungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Bidmon und Frau Jelena Igdalowa durchgeführt.

2.2.5 Nachweis der KGA und der GS in kultivierten Rattenastrozyten

Die Expression von KGA und GS in kultivierten Rattenastrozyten bzw. die Lokalisation der KGA in den Mitochondrien kultivierter Rattenastrozyten wurde mittels Immunfluoreszenzanalysen überprüft. Dazu wurden kultivierte Rattenastrozyten, welche auf 100 mm-Schalen bis zu einer Konfluenz von etwa 90 % kultiviert wurden, verwendet. Zur Überführung der Astrozyten auf das jeweilige für die Experimente verwendete Kulturgefäß wurden diese zunächst zweimalig mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen und anschließend für fünf Minuten mit Trypsin (5 ml) im Inkubator (5 % CO_2 und 37°C) inkubiert. Anschließend wurde DMEM mit 10 % FBS hinzugefügt und je 1 ml der Zellsuspension auf MatTek-Zellkulturschalen überführt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das Zellmedium abgesaugt und die Astrozyten zweimal mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte beim Nachweis von KGA/GS mit Paraformaldehyd (4 %) bzw. beim Nachweis der KGA/ANT mit eiskaltem Methanol (-20°C) für fünf Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von erneutem zweimaligem Waschen mit kaltem PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$). Es folgte zum Blockieren die Inkubation mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) mit 5 % BSA und 0,1 % Triton X-100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die fixierten Zellen zunächst für zwei Stunden mit dem Primärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert (KGA: 1:200; GS: 1:150; ANT: 1:100). Dabei diente die PBS-Lösung (ohne $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$) mit 5 % BSA als Inkubationsmedium. Es folgte nach dreimaligem Waschen mit PBS die Zugabe des Sekundärantikörpers bzw. von Hoechst 34580 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland; 1:5000) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper (1:200; Inkubationsmedium: PBS mit 5 % BSA; Anti-*mouse* oder Anti-*rabbit*) war bei den KGA/GS-Färbungen zum Nachweis der KGA mit Alexa Fluor 647 und zum Nachweis der GS mit Alexa Fluor 488 bzw. in den KGA/ANT-Färbungen zum Nachweis der KGA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (*goat*-Anti-*rabbit*) und für den ANT-Nachweis mit FITC (*goat*-Anti-*mouse*) gekoppelt. Es folgten drei weitere Waschvorgänge mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) sowie im Anschluss eine Überdeckung der Zellen mit PBS für die Mikroskopie. Die Kofärbung von KGA und GS wurde mit dem LSM880 und die Kofärbung von KGA und ANT wurde mit dem CellObserver Z1 (beide ZEISS, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen.

Die Färbungen und die Fluoreszenzmikroskopie wurden in Zusammenarbeit mit Michaela Fastrich und Alina Schrimpf durchgeführt.

2.2.6 Western-Blot-Analysen

Die Western-Blot-Analyse ist eine Methode, mit der Proteine qualitativ und semiquantitativ analysiert werden können. Ähnlich der Immunfluoreszenz wird zum Nachweis eines Proteins ein Antikörper genutzt, der gegen ein spezifisches Epitop des zu untersuchenden Proteins gerichtet ist. Die Proteine werden einheitlich positiv geladen und in einem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide* (PAA) *gel electrophoresis*, kurz: SDS-PAGE) entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Polyacrylamid bildet ein Gitternetz, dessen Porengröße abhängig ist von der PAA-Konzentration. Hierüber wird die Migrationsgeschwindigkeit der unterschiedlich großen Proteine beeinflusst.

Im nachfolgenden als „Blotten“ bezeichneten Schritt folgt dann der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine entlang eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulose-Membran. Zur Markierung des zu untersuchenden Proteins wird die Membran nachfolgend mit einer den Primärantikörper enthaltenden Lösung inkubiert. Das durch den Primärantikörper auf der Membran markierte Protein wird dann durch einen gegen diesen gerichteten und mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörper markiert. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert eine Chemilumineszenz-Reaktion, bei der das emittierte Licht proportional ist zum Expressionsniveau des detektierten Proteins. Das Licht wird nachfolgend digital mit einer CCD-Kamera gesammelt und hieraus ein Bild erstellt. Mit Hilfe eines Molekulargewichtmarkers ist eine Größenabschätzung des Proteins möglich (Towbin et al. 1979).

Die Proteine wurden aus Rattenastrozyten gewonnen, welche auf 60- bzw. 100-mm-Schalen kultiviert wurden. Unter Zuhilfenahme eines Zellschabers wurden die mit 300 µl Proteinlysierungspuffer (10 mmol/l Tris/HCl Puffer (pH 7,4); 1 % Triton X-100; 150 mmol/l NaCl; 1 mmol/l EDTA; 1 mmol/l EGTA; 20 mmol/l NaF; 0,2 mmol/l Phenylmethylsulfonylfluorid und 0,5 % Nonidet-P-40) inkubierten Astrozyten von der Schale abgelöst. Nachfolgend wurde die Zellsuspension dreimalig für jeweils zehn Sekunden mit einem Ultraschallstab zum weiteren Aufschluss der Zellen und Zellfragmente behandelt. Zwischen den einzelnen Ultraschallbehandlungen wurden die Proben auf Eis gelagert. Die Lysate wurden nachfolgend für zehn Minuten bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand weiter verwertet.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in den gewonnenen Proben erfolgte mit dem *Bradford-Assay* (BIO-RAD München, Deutschland). Jede Probe wurde im Triplikat gemessen. Es wurden jeweils 995 µl des 1:5 in *Aqua bidest* vorverdünnten Bradfordproteinassays (BioRad, München, Deutschland) in eine Küvette pipettiert und die Probe im Verhältnis 1:200 (5 µl auf 995 µl) verdünnt. Nach gründlicher Durchmischung erfolgte dann mit Hilfe eines Spektrophotometers (Ultrospec 2100, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm. Aus den Absorptionswerten wurde die relative Proteinkonzentration mit Hilfe einer Standardgeraden ermittelt. Für die Western-Blot-Analyse wurden gleiche Proteinmengen aller zu untersuchenden Proben in SDS-Auftragspuffer (220 mmol/l Tris/HCl (pH 8,8); 22,5 mmol/l EDTA; 9 % SDS; 40 % Glycerin; 0,125 % Bromphenolblau; 200 mmol/l DTT) aufgenommen und das Gemisch drei Minuten im Thermoblock bei 95 °C inkubiert.

Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzung der in der Arbeit verwendeten Elektrophoresegele. Dazu wurden für die Western-Blots zum Nachweis der HO1 Trenngele mit einem Polyacrylamid-Anteil von 12 % und für alle anderen Proteine Trenngele mit einem Polyacrylamidanteil von 10 % verwendet. Das Einlaufen in das Gel, in dem die jeweiligen Proben gesammelt wurden, erfolgte im sog. „Sammelgel“.

Inhaltsstoffe	Trenngel		Sammelgel 4%
	10 %	12 %	
<i>Aqua bidest</i>	5,9 ml	4,9 ml	3,4 ml
30 % PAA	5,0 ml	6,0 ml	0,83 ml
1,5 mol/l Tris-Puffer (pH 8,8)	3,8 ml	3,8 ml	-
1,0 mol/l Tris-Puffer (pH 6,8)	-	-	0,63 ml
10 % SDS	0,15 ml	0,15 ml	0,05 ml
10 % APS	0,15 ml	0,15 ml	0,05 ml
TEMED	0,006 ml	0,006 ml	0,005 ml

Tabelle 2: Zusammensetzung der Elektrophoresegele.

Nach Herstellung der für die Gele benötigten Lösungen wurde zunächst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten (Biometra, Göttingen, Deutschland) gegossen und dessen

Oberfläche durch Zugabe von 300 µl Isopropanol geglättet. Danach folgte das Einfüllen des Sammelgels, welches mit Hilfe eines Kunststoffkammes Aussparungen zur Befüllung der jeweiligen Proben enthielt. Die Platten wurden dann mit Klammern in einer Elektrophoresekammer befestigt, die Gelelektrophoresepuffer (17,3 mmol/l SDS; 125 mmol/l Tris; 1,25 mmol/l Glycin) enthielt.

Die wie oben beschriebenen vorbereiteten Proben sowie ein Molekulargewichtsmarker (*Dual Color Protein Standard*, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) wurden mit einer Hamilton-Spritze in die Geltaschen gefüllt. Anschließend wurde eine elektrische Spannung von 90 (kleines Gel) bzw. 120 Volt (mittleres Gel) eingestellt. Nach vollständigem Übertritt der Proteine in das Sammelgel wurde die Spannung zur weiteren Auftrennung im Trenngel auf 110 Volt (kleines Gel) bzw. auf 160 Volt (mittleres Gel) erhöht, bis die Proteine den unteren Rand des Gels erreicht haben.

Es folgte der Transfer der im Polyacrylamidgel nach Größe aufgetrennten Proteine nach dem *Semi-Dry-Blotting*-Prinzip (Towbin et al. 1992) auf eine Nitrozellulosemembran (*Nitrozellulose Transfer Membran Protran®*, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland). Zu diesem Zweck kam eine Elektroblottingkammer (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) zum Einsatz, deren untere Platte der Anode und deren obere Platte der Kathode entsprechen. Zwischen den beiden Polen wurden zunächst sechs Lagen in Blottingpuffer (39 mmol/l Glycin; 48 mmol/l Tris/HCl; 0,03 % SDS; 20 % Methanol) getränktes Filterpapier (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) und die Nitrozellulosemembran gelegt, die zuerst in *Aqua bidest* aktiviert und anschließend für wenige Sekunden in Blottingpuffer eingelegt wurde. Darauf wurden das PAA-Gel sowie weitere sechs Schichten des in Blottingpuffer eingelegten Filterpapiers platziert. Der Proteintransfer erfolgte bei einer Stromstärke von $I=0,8 \text{ mA/cm}^2$ und dauerte zwei Stunden. Zur Überprüfung der Übertragung der Proteine auf die Membran wurde diese mit dem Ponceau-S-Reagenz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) angefärbt.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach dem Blotting-Vorgang in TBS-T (Tris 20 mmol/l; pH7,5; NaCl 150 mmol/l; 0,1 % Tween-20), welches 10 % bovines Serumalbumin (BSA) enthielt, zur Absättigung von freien proteinbindenden Bereichen auf der Membran inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit von 30 Minuten wurde mit Hilfe eines Schüttlers bzw. Rollers die Membran über Nacht mit der Primärantikörper-

Lösung in der Kühlkammer inkubiert. Diese setzte sich aus einer TBS-T-Lösung mit 10 % BSA und dem jeweiligen Antikörper (für die jeweilige Konzentration: siehe **2.1.1**) zusammen. Im Anschluss wurde die Membran sechsmal für zehn Minuten mit TBS-T gewaschen und dann für zwei Stunden mit einer TBS-T-Lösung mit 10% BSA und dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe **2.1.2**) inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang von 60 Minuten zur Entfernung des überschüssigen Sekundärantikörpers erfolgte die Detektion der Proteine. Dabei wurde die Lichtemission, die durch die Peroxidase vermittelt wird, digital unter Verwendung des *Western Lightning Plus ECL™* Kits (Waltham, USA) an der *Kodak Digital Image Station 4000MM* (Eastman Kodak Co., Rochester, USA) oder dem ChemiDoc MP (BioRad Laboratories) erfasst. Nach der Detektion wurde überprüft, ob auf dem Gel gleiche Proteinmengen in den einzelnen Proben aufgetragen bzw. geblottet wurden. Hierfür folgte eine 30-minütige Inkubation mit einem gegen die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) gerichteten, monoklonalen Antikörper, der in 10 % BSA in TBS-T in einer Konzentration von 1:5000 verdünnt wurde. Nach einem Waschvorgang von 30 Minuten in TBS-T erfolgte die Inkubation der Nitrozellulosemembran mit einem gegen Maus-Immunglobuline gerichteten und HRP-gekoppelten Sekundärantikörper. Die Chemilumineszenz wurde wie oben beschrieben detektiert.

Die Intensitäten der detektierten Banden wurden mit Hilfe der *Kodak MI Software* (v.4.0.3) (Eastman Kodak Co., Rochester, USA) bzw. der *Image Lab Software* (BioRad Laboratories) quantifiziert.

Die Western-Blot-Analysen von GS, HO1 und GRP78 nach *KGA-Knockdown* sowie von KGA nach *GFAT1- und 2-Knockdown* wurden mit Unterstützung von Frau Dr. Ayse Karababa durchgeführt.

2.2.7 Quantifizierung der KGA-mRNA mittels Real-Time-PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können in der Zelle vorhandene RNA-Spezies quantifiziert werden (Saiki et al. 1992). Die Besonderheit der „*Real-Time*“-PCR (rt-PCR) liegt darin, dass nach jedem Vervielfältigungsschritt die gebildete DNA-Menge gemessen wird und keine Endpunktmessung nach Abschluss aller Amplifikationen erfolgt. Hierdurch wird es möglich zu bestimmen, in welchem Zyklus eine lineare Amplifikation der DNA erfolgt. Dies ist Voraussetzung dafür, dass mRNA-Spiegel

quantifiziert und die Expressionsniveaus in unterschiedlichen Proben miteinander verglichen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die KGA-mRNA-Expression in mit NH₄Cl für 24, 48 und 72 Stunden inkubierten kultivierten Rattenastrozyten mit der mRNA-Expression in jeweilig unbehandelten Astrozyten verglichen. Am Ende der Inkubationszeit wurden die kultivierten Rattenastrozyten zweimal mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und nach Zugabe von 300 µl einer Lösung aus 5 ml RLT-Puffer und 50 µl β-Mercaptoethanol mit Hilfe eines Zellschabers vom Kulturgefäß gelöst und lysiert. Im Anschluss erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA nach Vorgaben des *RNeasy-Mini-Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Bestimmung der mRNA-Menge erfolgte mittels Nanodrop durch Messung der Absorption bei λ=260 nm. Der Reinheitsgrad der RNA wurde erfasst durch Bildung des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und der bei 280 nm (als Maß für Verunreinigungen). Es folgte die cDNA-Synthese. Dazu wurde aus je 1 µg RNA cDNA mit Hilfe des *First Strand cDNA-Synthesis-Kits* (Qiagen, Hilden, Deutschland) hergestellt.

Nach Zusammenführen aller für den Ablauf der PCR-Reaktion benötigten Komponenten (siehe **Tabelle 3**) in einer 96-Wellplatte (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien) und Verschluss der Platte mit einer Folie folgte die Durchführung der PCR am *Real-time-Cycler ABI 7500* (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien). Dabei wurden die Proben zunächst für zwei Minuten bei 50 °C und im Anschluss für zehn Minuten bei 95 °C denaturiert. Es folgte das *Annealing* (95 °C, 15 Sekunden) und die *Elongation* (60 °C, 60 Sekunden). Insgesamt wurden 40 Amplifikationszyklen durchgeführt.

Bestandteil	Menge pro Well
cDNA (10 ng/µl)	1,2 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Reverse Primer	1,0 µl
Nuklease-freies Wasser	9,3 µl
SYBR Green	12,5 µl
Gesamtmenge pro Well	25 µl

Tabelle 3: Zusammensetzung der PCR-Reaktionslösung.

Zur Quantifizierung der gebildeten DNA-Menge wurde in jedem Durchgang der PCR die Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR Green* detektiert, welcher nach Bindung an die doppelsträngige DNA nach Anregung durch Licht der Wellenlänge 494 nm blaues Licht absorbiert und bei einer Wellenlänge von 521 nm grünes Licht emittiert (Livak et al. 1995).

Zur Bestimmung der Spezifität der durchgeführten PCR wurden die Schmelzkurven der gebildeten Amplifikate analysiert: Dabei werden die neu gebildeten DNA-Doppelstränge durch Erhitzen dissoziiert. Dies geht mit charakteristischen Veränderungen der Fluoreszenz einher, die Rückschlüsse darüber erlauben, ob während der Amplifikation ein oder mehrere Produkte gebildet wurden. Expressionsänderungen wurden nachfolgend mit Hilfe der *Delta-Delta-C_t*-Methode bestimmt (Livak und Schmittgen 2001). Die Genexpressionsniveaus wurden für jede Probe und jedes Gen doppelt gemessen. Die berechneten Mittelwerte der Zyklusanzahl für die Zielamplifikation wurden vom Mittelwert der Zyklusanzahl des *Housekeeping*-Gens (Hypoxanthin-Ribosyl-Transferase 1, HPRT1) für die jeweilige Probe abgezogen und mit zwei potenziert. Die Genexpressionsunterschiede nach experimenteller Behandlung wurden relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben.

Die Messung der KGA-mRNA erfolgte mit Unterstützung von Frau Dr. Ayse Karababa.

2.2.8 Knockdown der kidney-type Glutaminase und der Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferasen 1 und 2 mittels siRNA

Mithilfe der RNA-Interferenz können Zellen die Expression von mRNA-Spezies herunterregulieren (Fire et al. 1998). Dabei wird zum Zielgen komplementäre Doppelstrang-RNA (dsRNA) durch eine RNase III (auch *Dicer* genannt) in kleine siRNA-Fragmente mit einer Länge von 21-23 Basenpaaren sowie zwei 3'-Nukleotidenden zerschnitten. Die Fragmente werden von einem Proteinkomplex namens RISC (*RNA-induced silencing complex*) aufgenommen und durch Argonaut 2 entwunden. Der hierdurch aktivierte RISC-Proteinkomplex bindet über die siRNA an komplementäre Ziel-mRNA, die in der Folge gespalten wird (Sliva und Schnierle 2010; Elbashir et al. 2001).

Für den siRNA-vermittelten *Knockdown* von Proteinen wurden Astrozyten auf 60- oder 100-mm-Schalen kultiviert und für 24 Stunden entweder mit einer Kontroll-siRNA oder mit einer gegen die KGA bzw. gegen die Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-

Aminotransferasen-1 und -2 (GFAT)-gerichteten siRNA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM ohne FBS dreimalig mit jeweils 2 ml (60 mm Schale) bzw. 5 ml (100 mm Schale) gewaschen, bevor sie wie an den entsprechenden Stellen beschrieben entweder mit NH_4Cl inkubiert wurden, oder unbehandelt blieben (Kontrolle). Im Anschluss wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, um den Einfluss der experimentellen Behandlungen auf die Proteinkonzentrationen von KGA, GS, HO1 oder GRP78 zu messen.

2.2.9 Messung der Proliferation kultivierter Rattenastrozyten

Mit der im Jahr 1985 von Richards et al. beschriebenen fluorimetrischen Bestimmung der DNA-Menge kann das Zellwachstum und die Vermehrung von Zellen gemessen werden. In den vorliegenden Experimenten wurde die DNA mit Hoechst34580 (Bisbenzimidazol) angefärbt und die Fluoreszenz von an Chromatin gebundenem Hoechst fluorimetrisch mittels dem *Fluoroskan Ascent™* FL (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland) quantifiziert (Richards et al. 1985; Rago et al. 1990). Dabei ist die Hoechst34580 Fluoreszenzintensität proportional zur Anzahl der Zellen/Zellkerne.

Zur Messung der Proliferation wurden auf 100 mm-Schalen wachsende Astrozyten verwendet. Nach Entfernung des DMEM ohne FBS wurden die Zellen mit Ca^{2+} und Mg^{2+} -haltigem PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml Trypsinlösung für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Durch Abklopfen folgte anschließend die endgültige Ablösung der Zellen, die in 45 ml FBS-haltigem Medium aufgenommen wurden. Je 1 ml dieser Zellsuspension wurde jeweils in jede Vertiefung einer 24-Well-Platte gefüllt.

Nach sechs Stunden Inkubation im Brutschrank erfolgte der Austausch des FBS-haltigen gegen FBS-freies DMEM. Daraufhin folgte nach weiteren 30 Minuten Inkubation der Platten bei 37 °C die Behandlung der Zellen mit NH_4Cl und KGA- bzw. Kontroll-siRNA. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit einer 4%-igen Paraformaldehydlösung (PFA) fixiert (5 Minuten bei Raumtemperatur). Das überschüssige PFA wurde durch dreimaliges Waschen mit Ca^{2+} - und Mg^{2+} -haltigem PBS entfernt und die Zellen mit Hoechst34580 (1:5000 in DMEM, 15 Minuten bei 37 °C) inkubiert. Zwei Wells pro Platte wurden nicht mit Hoechst gefärbt und für die Ermittlung der Hintergrundfluoreszenz verwendet, die von den jeweiligen mit Hoechst inkubierten Wells abgezogen wurde. Es folgte die Messung der Fluoreszenz (Exzita-

tion: 380 nm, Emission: 460 nm) am *Fluoroskan Ascent*TM FL (Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland). Für die Auswertung wurden die Fluoreszenzintensitätswerte für jede experimentelle Bedingung gemittelt. Die Messungen wurden mit drei unabhängigen Präparationen durchgeführt und aus den jeweiligen relativen Unterschieden in der jeweiligen Präparation ein Mittelwert gebildet. Die Proliferationsmessungen wurden mit Unterstützung von Frau Dr. Ayse Karababa durchgeführt.

2.2.10 Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Unabhängig bedeutet dabei, dass die für die Experimente verwendeten kultivierten Rattenastrozyten aus unterschiedlichen Präparationen und damit aus unterschiedlichen Tieren stammten. Untersuchungen an *post mortem* Hirngewebe wurden an mindesten drei unterschiedlichen Tieren durchgeführt. Die Anzahl der den gezeigten Daten zugrundeliegenden unabhängigen Experimente bzw. Untersuchungen ist in den jeweiligen Legenden der Abbildungen bzw. Tabellen angegeben.

Statistisch bedeutsame Unterschiede wurden in Abhängigkeit der Anzahl der zu vergleichenden Gruppen durchgeführt. Wurden zwei Gruppen miteinander verglichen, so wurde ein zweiseitiger gepaarter t-Test nach Student durchgeführt. Dabei wurde mit dem *Shapiro-Wilk* Test hinsichtlich einer Normalverteilung der Residuen geprüft. Dieser Test eignet sich insbesondere für die Testung auf das Vorliegen einer Normalverteilung bei kleineren Stichproben.

Da mit der Anzahl der durchgeführten Tests auch die Wahrscheinlichkeit ansteigt, falsch signifikante Tests zu erhalten, muss eine Fehlerkorrektur vorgenommen werden, wenn eine Gruppe mit mehr als nur einer weiteren Gruppe verglichen wird. Um dieser sog. Alphafehler-Akkumulierung entgegenzuwirken, wurden in der vorliegenden Arbeit mehr als zwei Gruppen mittels einfaktorieller Varianzanalyse (*one-way ANOVA: analysis of variance*) mit Messwiederholung gefolgt von einem *Dunnnett's* bzw. *Tukey's post hoc* Test miteinander verglichen.

Bei den statistischen Analysen wurde das Signifikanzniveau auf 0,05 gesetzt und damit ein p-Wert <0,05 als statistisch signifikant gewertet. Der für die Berechnung der Signifikanzen verwendete statistische Test ist in den jeweiligen Legenden der Abbildungen bzw. Tabellen angegeben.

Die statistischen Analysen und Präsentation der Ergebnisse wurden mit den Programmen *Excel* (Microsoft, München, Deutschland) und *GraphPad Prism* (GraphPad Software, Kalifornien, USA) durchgeführt. Messwerte in Tabellen oder Diagrammen sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM; *standard error of the mean*) angegeben.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Rattenastrozyten die *kidney-type* Glutaminase exprimieren und ob deren mRNA- und Proteinspiegel durch Ammoniumchlorid beeinflusst werden. Dazu wurden Western-Blot- und Immunfluoreszenz- sowie Realtime-PCR-Analysen durchgeführt. Außerdem wurden die Effekte einer durch spezifische siRNA vermittelten Herunterregulation des KGA-Proteins im Hinblick auf die durch Ammoniak induzierten Expressionsänderungen von oxidativ/ nitrosativem- und endoplasmatisch-retikulärem Stress und mit Seneszenz-assoziierten Genen untersucht.

3.1 Expression der *kidney-type* Glutaminase in unbehandelten kultivierten Rattenastrozyten

Um zu überprüfen, ob die KGA in kultivierten Rattenastrozyten exprimiert wird, wurden Immunfluoreszenz- und Fluoreszenzmikroskopieanalysen durchgeführt. Als Astrozyten-spezifischer Marker wurde die Glutaminsynthetase (GS) angefärbt.

Abbildung 7 zeigt eine ausgeprägte KGA-Immunfluoreszenz in GS-positiven kultivierten Rattenastrozyten. Vergleicht man die Stärke der roten (KGA) bzw. grünen (GS) Fluoreszenz zwischen den individuellen Astrozyten, wird deutlich, dass sowohl die KGA- als auch die GS-Immunoreaktivität unterschiedlich stark ist.

Dies zeigt, dass sowohl die GS-, als auch KGA-Proteinkonzentration in den individuellen Astrozyten nicht uniform sind. Dabei war in diesen Untersuchungen kein Zusammenhang zwischen den individuellen Proteinspiegeln der GS und KGA erkennbar.

Glutaminsynthetase / *Kidney-type* Glutaminase / Hoechst34580

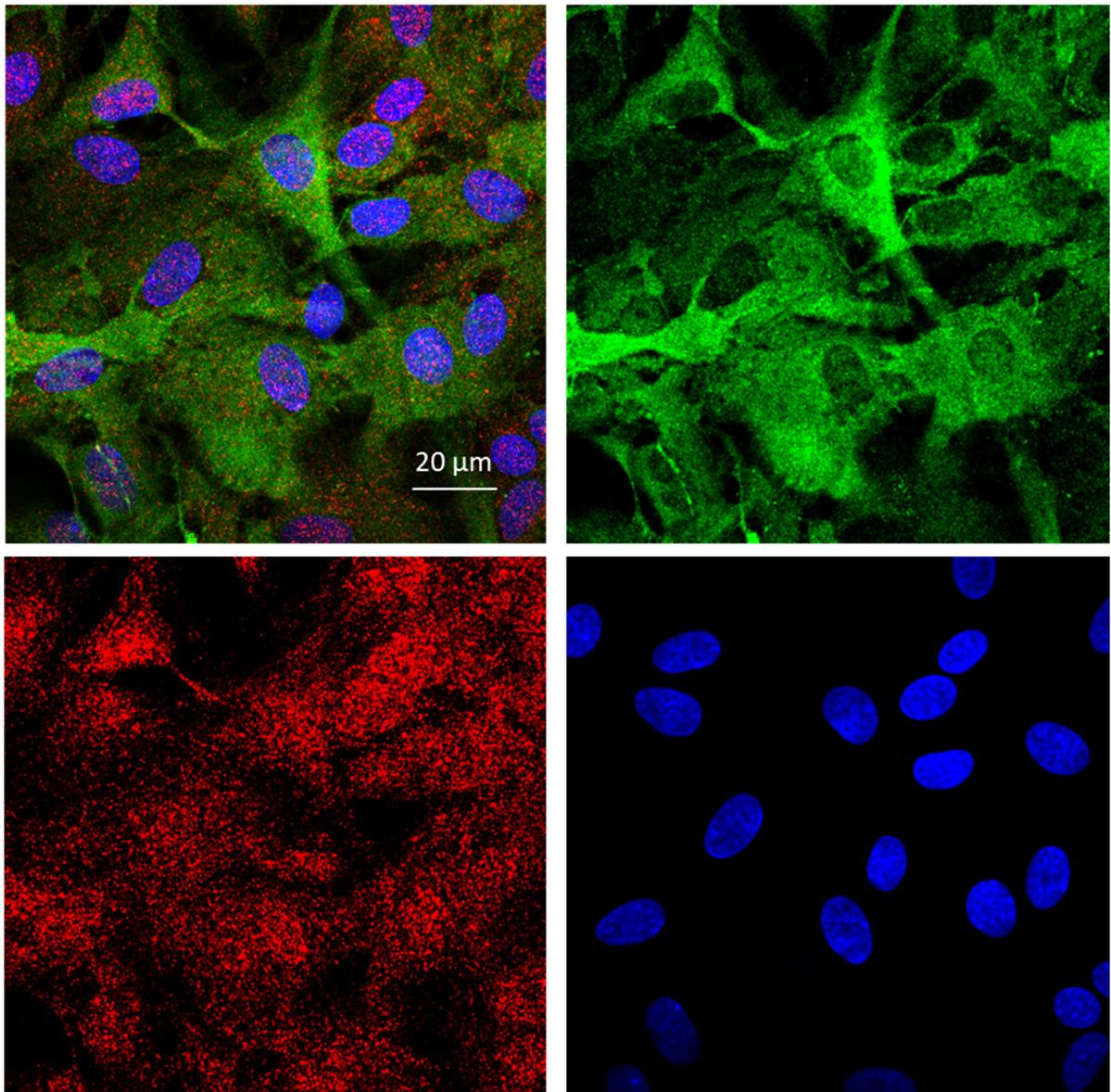


Abb. 7: Expression der *kidney-type* Glutaminase in unbehandelten kultivierten Rattenastrozyten. Die *kidney-type* Glutaminase (KGA) und Glutaminsynthetase (GS) wurden mit Hilfe spezifisch gegen sie gerichteter Antikörper mittels Immunfluoreszenzanalyse in unbehandelten kultivierten Rattenastrozyten nachgewiesen. Die Sekundärantikörper wurden zum Nachweis der KGA mit Alexa Fluor 647 (Anti-*mouse*) und zum Nachweis der GS mit Alexa Fluor 488 (Anti-*rabbit*) markiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst 34580 markiert. Es ist ein repräsentatives Bild von Astrozyten aus einer von drei unabhängigen Präparationen gezeigt (N=3). Mikroskop: LSM880, Objektiv: Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27.

3.2 Nachweis der *kidney-type* Glutaminase im zerebralen Kortex der Ratte

Um zu überprüfen, ob die KGA auch im Rattenhirn in Astrozyten vorkommt, wurden Immunfluoreszenz- und konfokale Laserscanning-Mikroskopieanalysen an Rattenhirnschnitten durchgeführt. Die Astrozyten wurden dabei durch die Anfärbung der GS nachgewiesen.

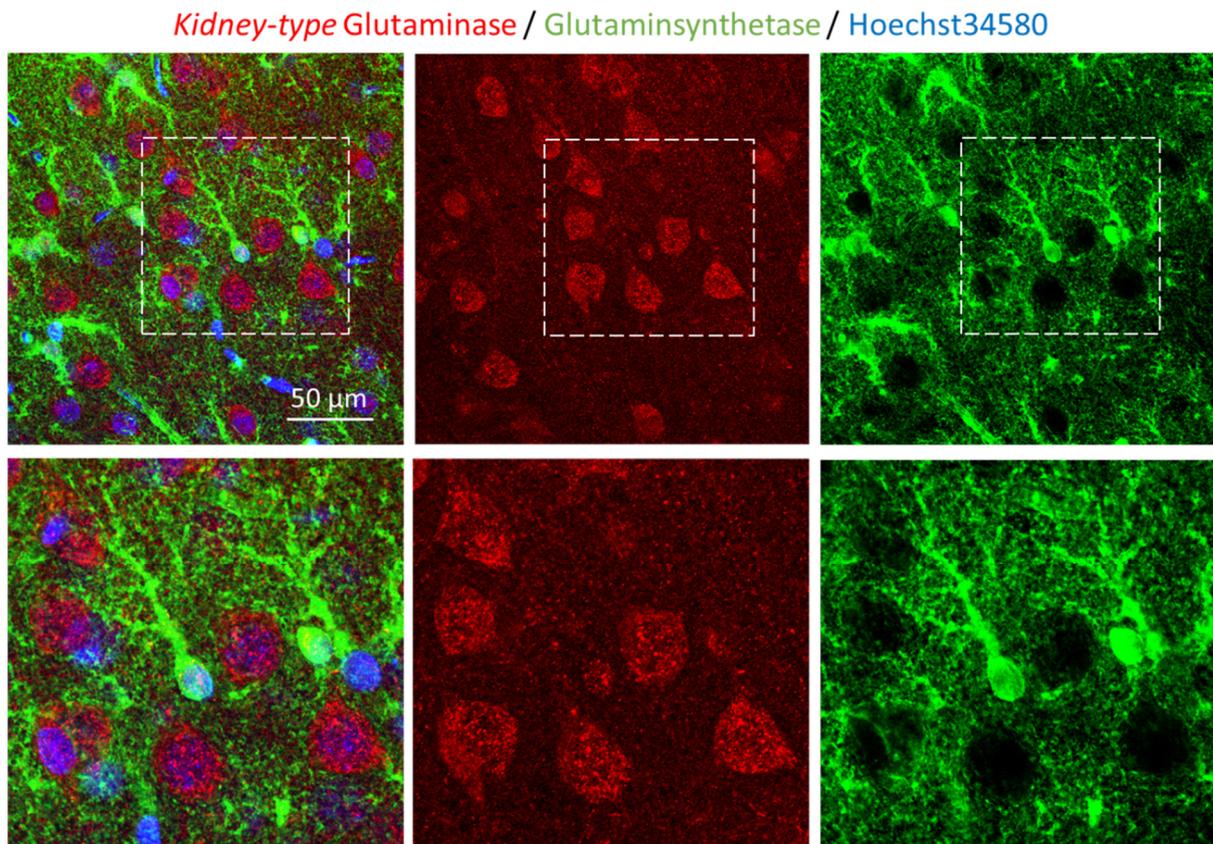


Abb. 8: Immunfluoreszenzanalyse von KGA- und GS-Protein im Rattenhirn *in situ*. KGA und GS wurden mit Hilfe spezifischer gegen sie gerichteter Antikörper und Immunfluoreszenzanalyse in fixierten Rattenhirnschnitten nachgewiesen. Es wurden mit CY3 bzw. FITC gekoppelte Antikörper verwendet, um die Primärantikörper fluoreszenzmikroskopisch detektieren zu können. Zellkerne wurden mit Hoechst 34580 markiert. Unten: Elektronische Vergrößerungen der in den oberen Bildern markierten Bereiche. Dargestellt ist ein repräsentatives Bild, das an einem von drei Gehirnen aufgenommen wurde (N=3). Mikroskop: LSM510meta (konfokale Laserscanning-Mikroskopie). Objektiv: C-Apochromat 40x/1,2 W Korr.

Abbildung 8 zeigt eine ausgeprägte anti-KGA-Immunreaktivität in neuronalen Somata im zerebralen Kortex der Ratte, die nicht mit der GS kolokalisiert. Des Weiteren ist eine zwar geringere, aber deutlich erkennbare anti-KGA-Immunreaktivität in GS-

positiven Astrozyten in der Vergrößerung des durch einen Kasten in **Abbildung 8** markierten Areals erkennbar. Eine Anti-KGA-Immunoreaktivität war nicht beschränkt auf den im unteren Bildabschnitt der **Abbildung 8** vergrößerten Astrozyten, sondern in allen Astrozytensomata erkennbar.

3.3 Zeitabhängigkeit der durch NH₄Cl-vermittelten Steigerung der *kidney-type* Glutaminase-Proteinkonzentration in kultivierten Rattenastrozyten

Die Zeitabhängigkeit der durch NH₄Cl vermittelten Steigerung der KGA-Proteinexpression wurde an kultivierten Rattenastrozyten untersucht, die für 24, 48 und 72 Stunden mit NH₄Cl (5 mmol/l) inkubiert wurden. Nachfolgend wurde die KGA-Proteinkonzentration mittels Western-Blot-Analyse und densitometrischer Auswertung semiquantitativ bestimmt.

Wie in der **Abbildung 9** erkennbar ist, steigerte NH₄Cl die KGA-Proteinexpression bereits nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Nach Inkubation der Astrozyten mit NH₄Cl für 48 Stunden waren die KGA-Proteinspiegel tendenziell höher als nach 24 Stunden und vergleichbar mit dem Niveau, welches nach 72 Stunden beobachtet wurde. Gegenüber den unbehandelten Kontrollen war die KGA-Proteinkonzentration in den mit NH₄Cl-behandelten Astrozyten zu jedem Zeitpunkt signifikant erhöht.

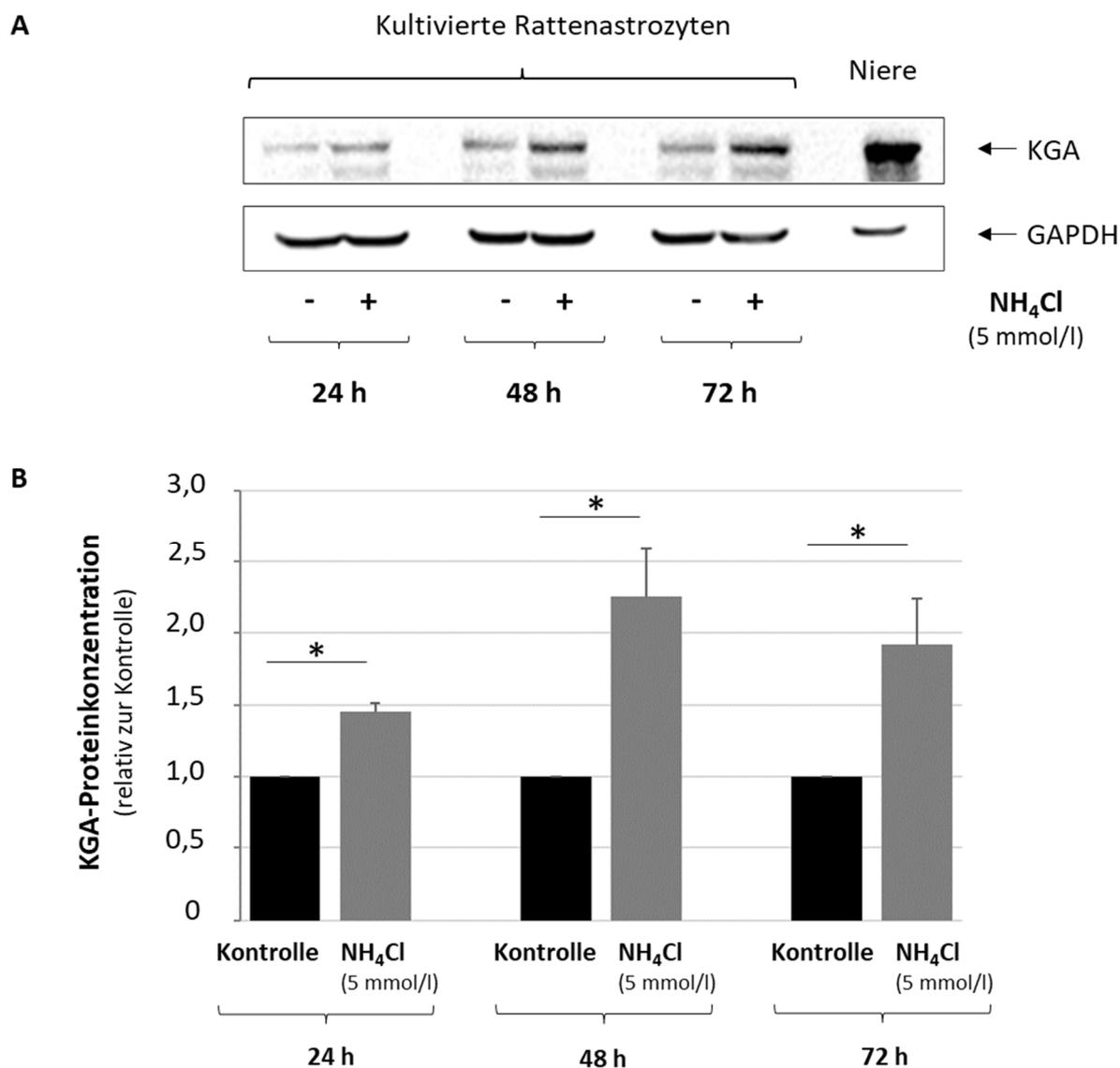


Abb. 9: Zeitabhängige Wirkungen von NH₄Cl auf die KGA-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten. Mittels Western-Blot-Analysen wurde die KGA-Proteinexpression in unbehandelten und mit NH₄Cl (5 mmol/l) für jeweils 24, 48 und 72 Stunden inkubierten kultivierten Rattenastrozyten untersucht. Die Proteinspiegel wurden mittels Densitometrie semiquantitativ bestimmt. A: Western-Blot-Analyse. B: Densitometrische Auswertung der KGA-Immunoreaktivität. Dabei wurde die KGA-Proteinkonzentration jeder Probe auf die der GAPDH, die als Beladungskontrolle diente, normiert. Die KGA-Proteinspiegel, die in den mit NH₄Cl behandelten Astrozyten gefunden wurden, sind relativ zu denen der jeweiligen Kontrolle angegeben. Proteinlysat aus der Rattenniere wurde als Positivkontrolle für die Detektion der *kidney-type* Glutaminase mit dem verwendeten Antikörper verwendet. Die statistische Analyse der Daten erfolgte für jeden Zeitpunkt separat mittels zweiseitigem gepaarten t-Test nach Student (N=6). * statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle.

3.4 Konzentrationsabhängigkeit der durch NH_4Cl -vermittelten Steigerung der *kidney-type* Glutaminase-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten

Die Abhängigkeit der Steigerung der KGA-Proteinexpression von der Ammoniakkonzentration wurde an kultivierten Rattenastrozyten untersucht, die für 72 Stunden mit 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 und 5 mmol/l NH_4Cl inkubiert wurden. Die Kontrollen blieben unbehandelt. Die KGA-Proteinkonzentration wurde mittels Western-Blot-Analyse und densitometrischer Auswertung semiquantitativ bestimmt (siehe **Abb. 10** und **Tabelle 4**).

Obwohl ein Trend zu einer Steigerung der KGA-Proteinexpression in den mit NH_4Cl inkubierten Astrozyten gegenüber den unbehandelten Kontrollen erkennbar war, waren diese Unterschiede bei einer Anzahl von sieben unabhängigen Experimenten für die Konzentrationen 0,1 bis 2,5 mmol/l bei dieser N-Zahl nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Die fehlende statistische Signifikanz ist mit einer hohen Varianz der Ergebnisse verbunden.

Demgegenüber war unter Verwendung von 5 mmol/l bei N=16 unabhängigen Experimenten die durch NH_4Cl -vermittelte Hochregulation der KGA statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber den Kontrollen.

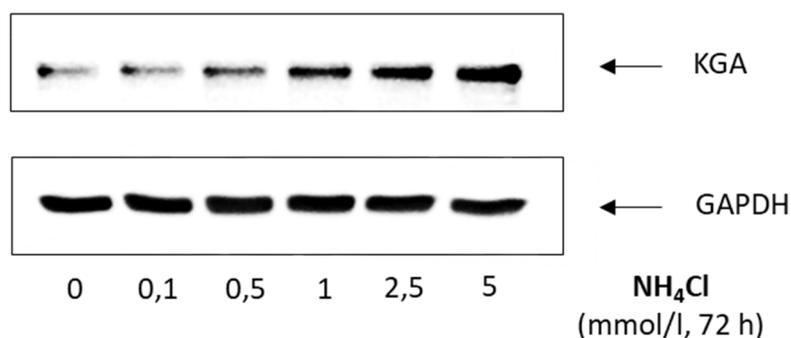


Abb. 10: Konzentrationsabhängige Wirkung von NH_4Cl auf die KGA-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten. Mittels Western-Blot-Analysen wurde die KGA-Proteinkonzentration in kultivierten Rattenastrozyten untersucht, die unbehandelt blieben oder für 72 Stunden mit NH_4Cl in einer Konzentration von 0,1, 0,5, 1,0, 2,5 oder 5,0 mmol/l behandelt wurden.

Ergebnisse

Kontrolle	NH ₄ Cl 0,1 mmol/l	NH ₄ Cl 0,5 mmol/l	NH ₄ Cl 1,0 mmol/l	NH ₄ Cl 2,5 mmol/l	NH ₄ Cl 5,0 mmol/l
1,0	1,2±0,1 n.s.	1,3±0,2 n.s.	1,5±0,3 n.s.	1,8±0,3 n.s.	2,1±0,4 *

Tabelle 4: Densitometrische Quantifizierung der Western-Blot-Analysen zur Konzentrationsabhängigkeit der durch NH₄Cl-vermittelten Steigerung der *kidney-type* Glutaminase-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten. Die Proteinexpression wurde mittels Densitometrie semiquantitativ bestimmt. Dabei wurden die KGA-Proteinspiegel jeder Probe auf die der jeweiligen GAPDH, die als Beladungskontrolle diente, normiert. Die KGA-Proteinkonzentrationen, die in den mit NH₄Cl-behandelten Astrozyten gefunden wurden, sind relativ zu denen der jeweiligen Kontrolle angegeben. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels *One-way analysis of variance* (ANOVA) (N=7). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte±SEM. * statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber der unbehandelten Kontrolle, n.s. statistisch nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

3.5 Effekte von NH₄Cl auf die KGA-mRNA-Konzentration

Astrozyten wurden für die angegebenen Zeiträume mit NH₄Cl inkubiert und die KGA-mRNA mittels *Real-time*-PCR quantifiziert. Die Kontrollen blieben jeweils unbehandelt für den entsprechenden Zeitraum. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass NH₄Cl zu keinem der untersuchten Zeitpunkte die KGA-mRNA-Spiegel statistisch signifikant veränderte (siehe **Tabelle 5**).

Kontrolle (24, 48 oder 72 h)	NH ₄ Cl (5 mmol/l) 24 h	NH ₄ Cl (5 mmol/l) 48 h	NH ₄ Cl (5 mmol/l) 72 h
1,0	2,01±0,95 n.s.	1,29±0,21 n.s.	1,1±0,41 n.s.

Tabelle 5: Zeitabhängige Effekte von NH₄Cl (5 mmol/l) auf die KGA-mRNA-Konzentration. Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 24, 48 oder 72 Stunden mit NH₄Cl (5 mmol/l) inkubiert, oder blieben für die gleiche Dauer unbehandelt (Kontrolle). Nach Gewinnung der mRNA wurde die KGA-mRNA mittels *Realtime*-PCR quantifiziert. Dabei wurden die KGA-mRNA-Spiegel jeder Probe auf die Expression des *Housekeeping*-Gens HPRT1 normiert. Die KGA-mRNA-Konzentrationen der mit NH₄Cl behandelten Astrozyten sind relativ zu denen der jeweiligen Kontrolle angegeben. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test (N=3). n.s. statistisch nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

3.6 Nachweis der KGA und des mitochondrialen Marker-Proteins ANT in kultivierten Rattenastrozyten

Mittels Immunfluoreszenzanalyse und Fluoreszenzmikroskopie wurde untersucht, ob die KGA in Mitochondrien kultivierter Rattenastrozyten exprimiert wird. Hierfür wurden die KGA und die Mitochondrien durch Anfärbung des mitochondrialen Markerproteins *Adenine Nucleotide Translocator* (ANT) markiert und die KGA und ANT-Immunfluoreszenz mittels Fluoreszenzanalyse mit dem CellObserver Z1 (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) untersucht.

Wie in **Abbildung 11** zu erkennen ist, wurden Mitochondrien mit dem gegen ANT gerichteten Antikörper sehr spezifisch angefärbt (grüne Farbe). Es ist deutlich eine Überlappung der grünen Fluoreszenz mit der roten, welche die KGA repräsentiert, erkennbar. Diese Überlappung wurde zusätzlich durch das *Colocalization-Plugin* der FIDJI-*Distribution* von *ImageJ* extrahiert und ist separat in weißer Farbe gezeigt. In den mit NH₄Cl inkubierten Astrozyten war sowohl die ANT- als auch die KGA-Immunreaktivität deutlich höher als in den Kontrollen.

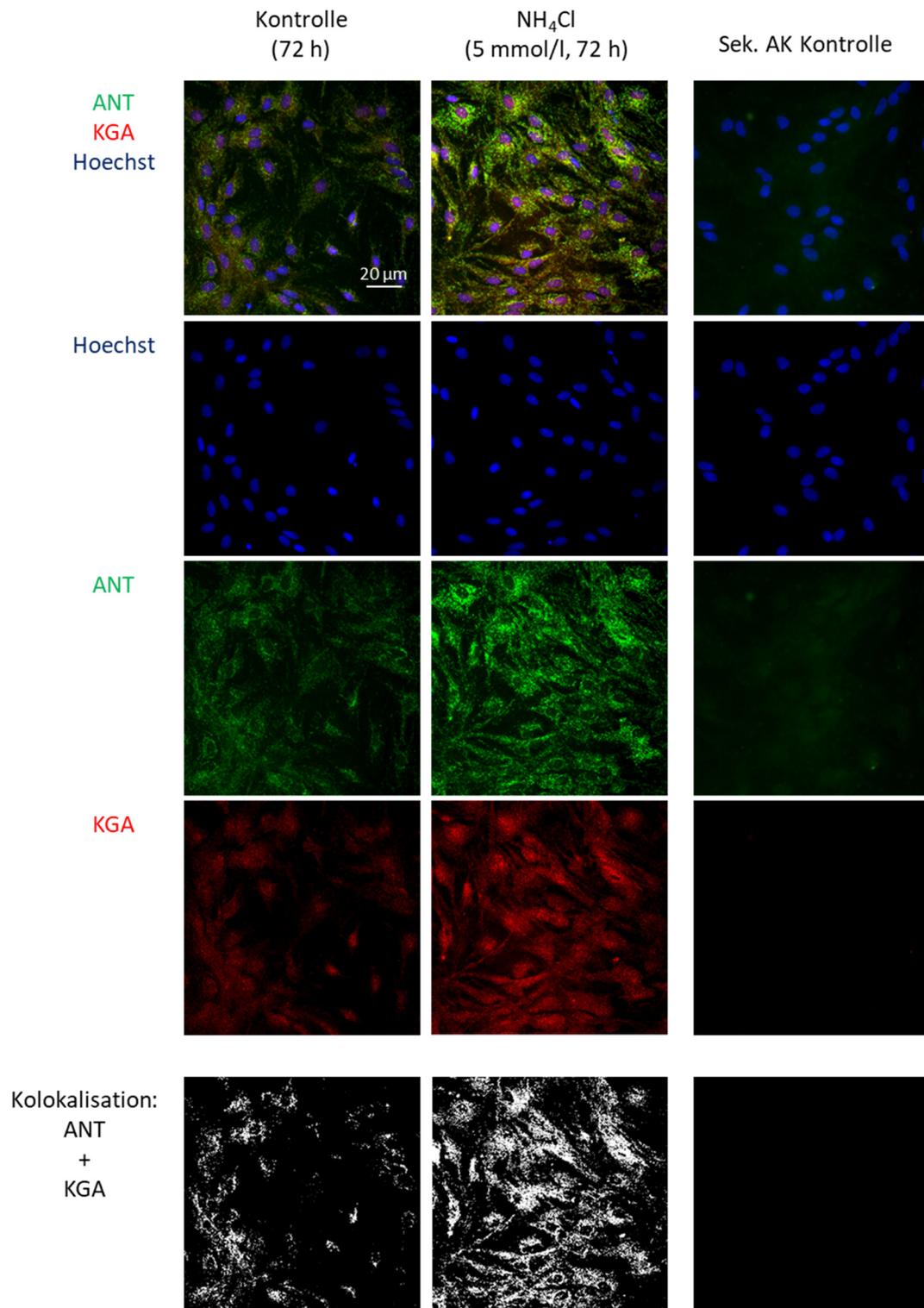


Abb. 11: Immunfluoreszenzanalysen von KGA und ANT in kultivierten Rattenastrozyten. Kultivierte Rattenastrozyten wurden fixiert und ANT und KGA mittels Immunfluoreszenz wie im Material und Methoden-Teil beschrieben nachgewiesen. Die Kolokalisation der ANT- und KGA-Immunfluoreszenz wurde mit dem Programm ImageJ (NIH, Wayne Rasband) unter Verwendung des *Colocalization-Plugins* von Pierre Bourdoncle extrahiert und dargestellt. Die DNA der Zellkerne wurde mit Hoechst34580 angefärbt. Es ist ein repräsentatives Bild gezeigt, das an Astrozyten aus einer von vier unabhängigen Präparationen gewonnen wurde. (N=4). Mikroskop: CellObserver Z1 (ZEISS, Oberkochen, Deutschland), Objektiv: LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Korr DIC M27.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die KGA auch in Mitochondrien exprimiert wird. Daneben wurde aber auch eine punktuelle rote Fluoreszenz im Zytosol, sowie sehr ausgeprägt im Bereich des Zellkerns, welcher durch die blaue Hoechst-Fluoreszenz repräsentiert wird, gefunden. Die Spezifität der Färbung wurde dadurch überprüft, dass in parallel durchgeführten Färbungen die Primärantikörper weggelassen wurden und die Zellen nur mit den Sekundärantikörpern und dem Kernfarbstoff Hoechst angefärbt wurden (Sek. AK Kontrolle).

3.7 Reversibilität der durch Ammoniak gesteigerten KGA-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten

Um eine mögliche Reversibilität der durch NH_4Cl vermittelten Expressionssteigerung des KGA-Proteins zu überprüfen, wurden Western-Blot-Analysen an kultivierten Rattenastrozyten durchgeführt. Die Astrozyten wurden hierfür für 48 Stunden mit NH_4Cl (5 mmol/l) inkubiert und nachfolgend für weitere 24 Stunden in NH_4Cl -freiem Zellkulturmedium weiter inkubiert („*wash-out*“).

Wie in **Abbildung 12** gezeigt, ist der durch NH_4Cl (5 mmol/l) nach 72 Stunden hervorgerufene Anstieg der KGA-Proteinkonzentration gegenüber den unbehandelten Kontrollen nicht mehr erkennbar, wenn die Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit NH_4Cl für weitere 24 Stunden in NH_4Cl -freiem Medium inkubiert wurden.

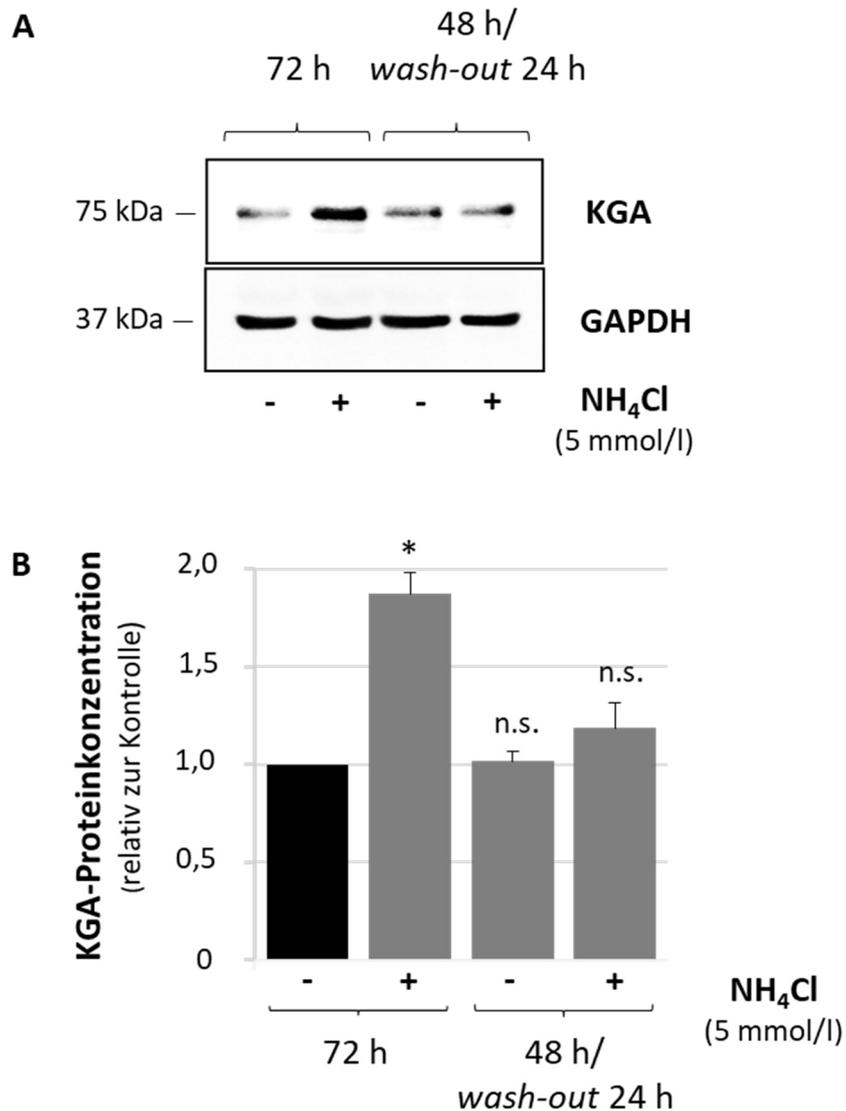


Abb. 12: Reversibilität der durch NH₄Cl gesteigerten KGA-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten. Kultivierte Rattenastrozyten wurden für 48 Stunden mit NH₄Cl (5 mmol/l) behandelt. Nachfolgend wurde das Medium entweder auf den Zellen belassen oder durch NH₄Cl-freies Medium ersetzt. Die KGA-Proteinexpression wurde mittels Western-Blot analysiert (A) und densitometrisch quantifiziert (B). Dabei wurden die KGA-Proteinkonzentrationen jeder Probe auf die der GAPDH, die als Beladungskontrolle diente, normiert. Die KGA-Proteinspiegel, die in den mit NH₄Cl behandelten Astrozyten gefunden wurden, sind relativ zu denen der jeweiligen Kontrolle angegeben. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels *One-way analysis of variance* (ANOVA) (N=3). * statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber den unbehandelten Kontrollen. n.s. statistisch nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

3.8 Bedeutung von Glutamin für die durch NH₄Cl induzierte Steigerung der KGA-Proteinexpression in kultivierten Rattenastrozyten

Um die Bedeutung der durch NH₄Cl-induzierten Glutaminsynthese für die durch NH₄Cl vermittelte Steigerung der KGA-Proteinkonzentration in kultivierten Rattenastrozyten

zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Die Astrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden jeweils mit den GS-Hemmstoffen MSO und PPT für 30 Minuten vorinkubiert. Nachfolgend blieben sie entweder für 72 Stunden unbehandelt oder wurden mit NH_4Cl (5 mmol/l, 72 h) inkubiert.

Abbildung 13 zeigt, dass die GS-Hemmstoffe MSO und PPT unter den experimentellen Bedingungen bereits in Abwesenheit von NH_4Cl die KGA-Proteinspiegel signifikant vermindern und die GS-Proteinkonzentration tendenziell, aber nicht signifikant, erhöhen. Auch die durch NH_4Cl (5 mmol/l, 72 h) herbeigeführte Erhöhung der KGA-Proteinexpression unterblieb in Gegenwart der GS-Hemmstoffe MSO und PPT. Des Weiteren wird deutlich, dass eine Inkubation mit 5 mmol/l NH_4Cl für 72 Stunden unter den Bedingungen dieser Untersuchungen keinen signifikanten Effekt auf die GS-Proteinkonzentration hatte.

Demgegenüber konnte eine Tendenz erhöhter GS-Proteinspiegel in den mit MSO oder PPT behandelten Astrozyten gefunden werden. Dieser Unterschied war aber statistisch bei einer N-Zahl von 3 nicht signifikant unterschiedlich gegenüber den unbehandelten Astrozyten.

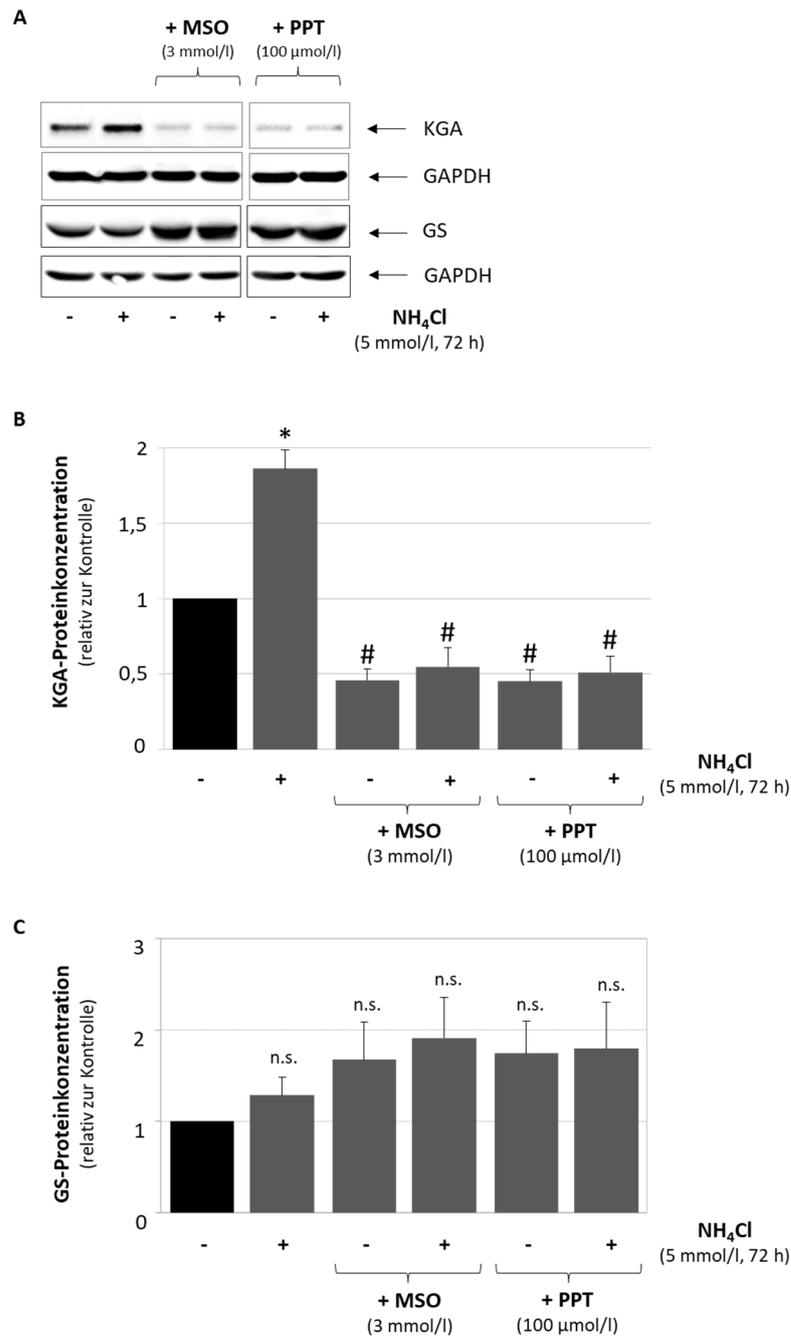


Abb. 13: Effekte von Glutaminsynthetasehemmstoffen auf die durch NH₄Cl vermittelte Steigerung des KGA-Proteins in kultivierten Rattenastrozyten. Die Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 3 mmol/l Methioninsulfoximin oder 100 µmol/l Phosphinothricin (30 Minuten Vorbehandlung) mit NH₄Cl (5 mmol/l, 72 h) inkubiert oder blieben unbehandelt. Die KGA- und die GS-Proteinkonzentration wurde mittels Western-Blot detektiert (A) und densitometrisch quantifiziert (B, C). Dabei wurden die KGA-/GS-Proteinkonzentrationen jeder Probe auf die der GAPDH, die als Beladungskontrolle diente, normiert. Die KGA-/GS-Proteinspiegel, die in den mit NH₄Cl-behandelten Astrozyten gefunden wurden, sind relativ zur Kontrolle angegeben. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels *One-way analysis of variance* (ANOVA) (N=3, außer beim Nachweis der KGA (B) NH₄Cl 5 mmol 72 h: N=13). # statistisch signifikant unterschiedlich zu mit NH₄Cl (5 mmol/l, 72 h) inkubierten Astrozyten. * statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber unbehandelten Kontrollen. n.s. statistisch nicht signifikant unterschiedlich gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

3.9 Wirkung eines siRNA-vermittelten *Knockdowns* der KGA auf die Proteinexpression von Glutaminsynthetase, Hämoxxygenase 1 und *Glucose-regulated-protein 78*

Die durch Ammoniak induzierte Glutaminbildung in den Astrozyten steigert die mRNA- und Proteinspiegel der Hämoxxygenase 1 (HO1) und des Surrogatmarkers für endoplasmatisch-retikulären Stress, *Glucose-regulated-protein 78* (GRP78). Zur Überprüfung, ob eine KGA-abhängige Glutaminolyse für die Hochregulation der HO1 und von GRP78 bedeutsam ist, wurde die KGA mittels siRNA herunterreguliert und die Astrozyten wurden nachfolgend mit NH₄Cl (5 mmol, 72 h) inkubiert. Wie **Abbildung 14** zeigt, wurde die KGA-Proteinkonzentration durch die KGA-siRNA tendenziell vermindert und der durch NH₄Cl herbeigeführte Anstieg des KGA-Proteins ebenfalls signifikant vermindert. Die Inkubation der Astrozyten mit NH₄Cl änderte die GS-Proteinspiegel weder in den mit Kontroll-siRNA noch in den mit KGA-siRNA behandelten Astrozyten. Gleichzeitig unterblieb der in den mit Kontroll-siRNA vorbehandelten Astrozyten gefundene signifikante Anstieg der HO1 bzw. von GRP78 nach Inkubation mit NH₄Cl in den Proben, die mit der KGA-siRNA vorbehandelt wurden. Der KGA-*Knockdown* verminderte die Proteinspiegel der HO1 und von GRP78 folglich nicht (**Abb. 14**).

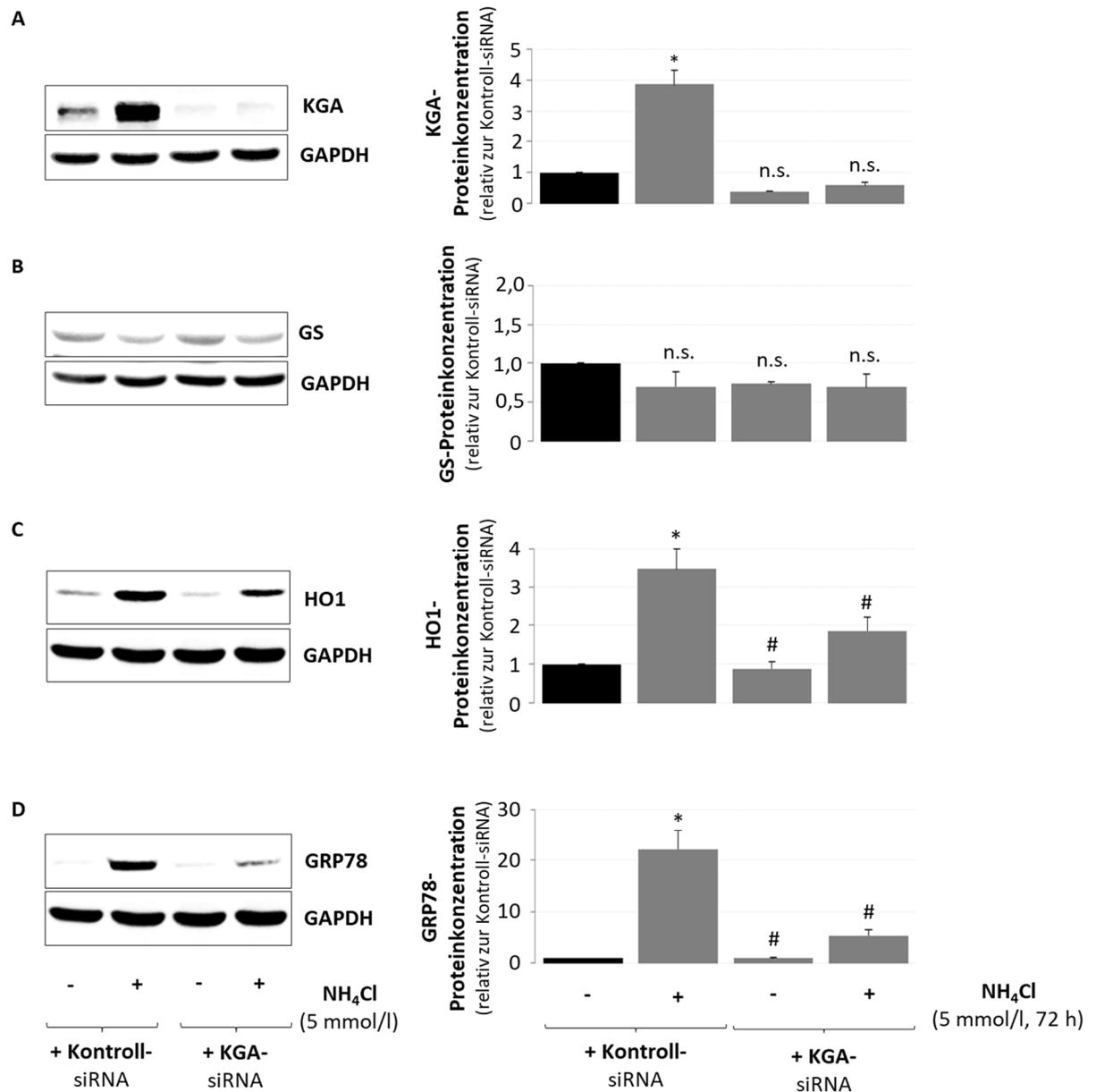


Abb. 14: Effekte eines siRNA-vermittelten *Knockdowns* der KGA auf die Proteinexpression von KGA (A), GS (B), HO1 (C) und GRP78 (D). Astrozyten wurden für 24 Stunden mit gegen die KGA gerichteter siRNA und nachfolgend für 72 Stunden mit NH₄Cl (5 mmol/l) inkubiert oder blieben unbehandelt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit inaktiver Kontroll-siRNA inkubiert. Dabei wurde die KGA-, GS-, HO1- und GRP78-Proteinkonzentration jeder Probe auf die der GAPDH, die als Beladungskontrolle diente, normiert. Die jeweiligen Proteinkonzentrationen, die in den mit NH₄Cl-behandelten Astrozyten gefunden wurden, sind relativ zu denen der jeweiligen Kontrolle angegeben. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels *One-way analysis of variance* (ANOVA) und *Tukey's post hoc* Test (N=3). * statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber mit Kontroll-siRNA behandelten Astrozyten. # statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber mit Kontroll-siRNA und NH₄Cl inkubierten Astrozyten. n.s. statistisch nicht signifikant.

3.10 Rolle der Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferasen 1 und 2 für die durch Ammoniak herbeigeführte Steigerung des KGA-Proteins

Um den Einfluss der Glutamin-Fruktose-6-Phosphat-Aminotransferasen (GFAT) 1 und 2 auf die NH_4Cl -vermittelte Steigerung der KGA-Proteinexpression zu untersuchen, wurden die Astrozyten mit spezifisch gegen GFAT1 und 2 gerichteter siRNA inkubiert. Die Effektivität der Herunterregulation der Proteinspiegel von GFAT1 und 2 durch die hier verwendete siRNA wurde bereits in einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe von Professor Häussinger gezeigt (Görg et al. 2019).

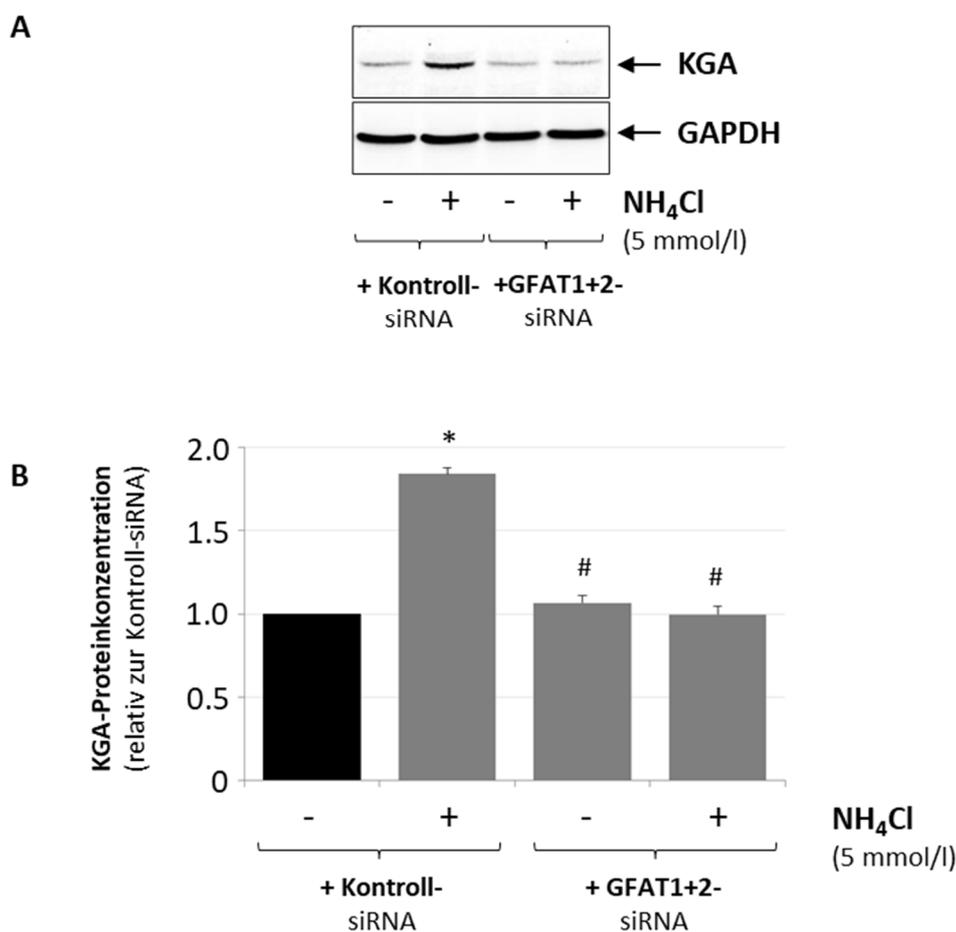


Abb. 15: Effekte eines GFAT1 und 2 *Knockdowns* auf die NH_4Cl -vermittelte Steigerung der KGA-Proteinexpression. Kultivierte Rattenastrozyten wurden mit Kontroll-siRNA oder mit gegen GFAT1 und 2 gerichteter siRNA behandelt und blieben entweder unbehandelt oder wurden für 72 Stunden mit NH_4Cl inkubiert. A. Western-Blot-Analyse von KGA und GAPDH. B. Densitometrische Quantifizierung der KGA-Proteinkonzentration. Dabei wurden die KGA-Proteinkonzentrationen jeder Probe auf die der GAPDH, die als Beladungskontrolle diente, normiert. Die jeweiligen Proteinspiegel, die in den mit NH_4Cl -behandelten Astrozyten gefunden wurden, sind relativ zu denen der jeweiligen Kontrolle angegeben. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels *One-way analysis of variance* (ANOVA) (N=3). * statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber mit Kontroll-siRNA behandelten Astrozyten. # statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber mit NH_4Cl behandelten Astrozyten.

Abbildung 15 zeigt, dass die durch NH_4Cl vermittelte Steigerung der KGA-Proteinexpression durch den *Knockdown* von GFAT1 und 2 vollständig gehemmt werden kann.

3.11 Bedeutung der KGA für die durch NH_4Cl induzierte Astrozytenproliferationshemmung

Wie bereits in vorhergehenden Arbeiten beschrieben, hemmt NH_4Cl die Proliferation kultivierter Rattenastrozyten (Görg et al. 2015). In den vorliegenden Untersuchungen wurden Effekte eines siRNA-vermittelten *Knockdowns* der KGA auf die durch NH_4Cl -vermittelte Astrozytenproliferationshemmung untersucht. Hierfür wurden die Astrozyten mit dem Kernfarbstoff Hoechst34580 am Ende des Experiments inkubiert und dessen Fluoreszenz als relatives Maß für die Anzahl der Zellen fluorimetrisch bestimmt.

Wie in **Abbildung 16** erkennbar ist, verminderte NH_4Cl die Astrozytenproliferation in mit Kontroll-siRNA behandelten Astrozyten, aber nicht in den Zellen, die mit gegen die KGA gerichteter siRNA inkubiert wurden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die KGA-vermittelte mitochondriale Glutaminolyse bedeutsam für die durch Ammoniak vermittelte Astrozytenproliferationshemmung ist.

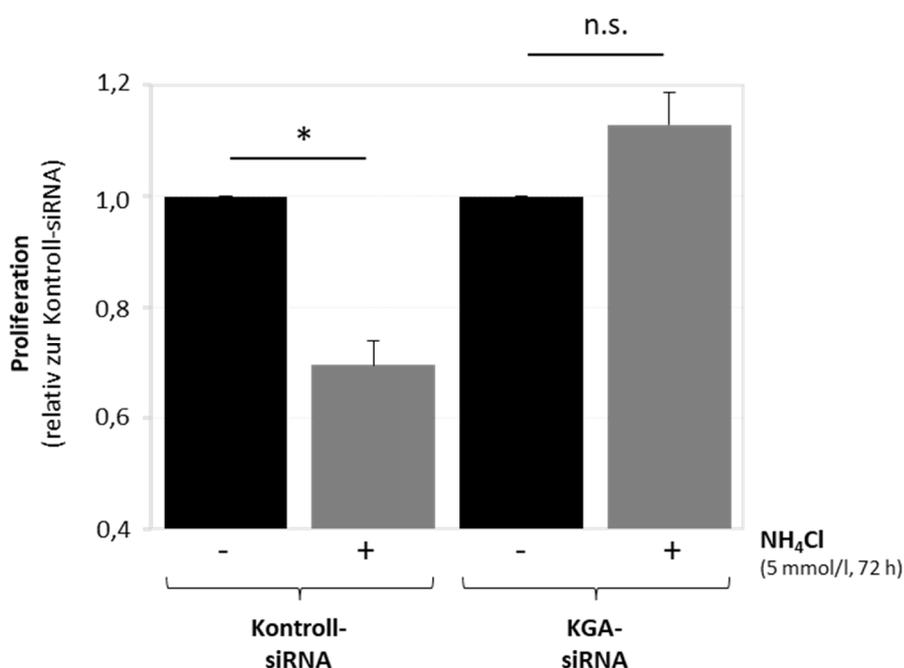


Abb. 16: Rolle der KGA für die durch Ammoniak induzierte Proliferationshemmung in kultivierten Rattenastrozyten. Astrozyten wurden entweder mit Kontroll-siRNA oder mit siRNA inkubiert, die gegen die KGA gerichtet ist. Nachfolgend wurden die Zellen für 72 Stunden entweder mit NH_4Cl inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Proliferation der Zellen wurde durch Quantifizierung der Hoechst34580-

Ergebnisse

Fluoreszenz, die der DNA-Menge entspricht, bestimmt. Diese wird in Relation zur jeweiligen nicht mit NH_4Cl behandelten Kontrolle angegeben (N=3). Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels zweiseitigem, gepaartem t-Test nach Student. Dabei diente die jeweilige unbehandelte Kontrolle (Kontroll- oder KGA-siRNA) als Referenz. * statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber mit Kontroll-siRNA behandelten Astrozyten. n.s. statistisch nicht signifikant.

4 Diskussion

4.1 Expression der KGA in kultivierten Rattenastrozyten *in vitro* und im Rattenhirn *in situ*

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Untersuchungen zeigen, dass Rattenastrozyten *in vitro*, aber auch im Rattengehirn *in vivo* die *kidney-type* Glutaminase exprimieren. Eine Reihe von in der Literatur beschriebenen Untersuchungen an kultivierten Rattenastrozyten, bei denen eine Hemmung der Ammoniaktoxizität durch 6-Diazo-5-oxo-L-norleucin (DON) beobachtet wurde, wurden bereits dahingehend interpretiert (Goldstein 1975; Inoue et al. 1977; Hilgier et al. 1992; Jayakumar et al. 2004; Rama Rao et al. 2005a). Zu den durch Ammoniak-induzierten Effekten, die durch DON gehemmt werden können, zählen die Schwellung der Astrozyten, die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies und die Induktion der MPT (Jayakumar et al. 2004; Rama Rao et al. 2005b; Jayakumar et al. 2006). Bei diesen Untersuchungen gingen die Autoren davon aus, dass die Hemmwirkungen von DON auf die genannten Effekte des Ammoniaks in Zusammenhang mit der Glutaminolyse in den Mitochondrien stehen und spezifisch sind.

Ein direkter Beweis hierfür wurde allerdings in diesen Arbeiten nicht erbracht und die bekannten unspezifischen Wirkungen von DON schwächen diese Interpretationen. Diese Kritik ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da der KGA-Hemmstoff DON neben den Glutaminasen (LGA und KGA) bekanntermaßen auch die GS sowie weitere im Glutamin-Stoffwechsel involvierte Proteine hemmt (Pinkus 1977; Ortlund et al. 2000; Thangavelu et al. 2014). Da außerdem viele Untersuchungen zeigen, dass die oben beschriebenen Wirkungen von Ammoniak, wie z.B. die Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies (Murthy et al. 2001), auch durch den Glutaminsynthetasehemmstoff MSO verhinderbar sind, ist eine spezifische Hemmung der KGA notwendig, um die Bedeutung der KGA zu überprüfen.

Eine bedeutsame Beobachtung der vorliegenden Arbeit ist, dass die KGA und GS in ein und demselben Astrozyten *in vitro* und im Rattenhirn *in situ* koexprimiert werden. Die Bedeutung davon ist derzeit unklar. Verglichen mit der strikten und zonal getrennten Expression der GS und der LGA in der Leber war dieser Befund äußerst überraschend. Dies lässt Raum zur Spekulation, dass im Gehirn im Gegensatz zur Leber

kein inter-, sondern ein intrazellulärer Glutaminzyklus existieren könnte, aber ob es sich hierbei in der Tat um einen Zyklus handelt, ist derzeit noch unklar. In der Leber ist ein interzellulärer Glutaminzyklus klar beschrieben worden: Die periportale Glutaminase und die perivenöse Glutaminsynthetase wirken hier synergistisch bei der Entgiftung des systemischen Ammoniaks zu Harnstoff (Häussinger et al. 1984). Es stellt sich daher die Frage, ob der Auf- und Abbau in ein und derselben Zelle im Sinne eines „*futile cycle*“ ein sinnloser energieverbrauchender Prozess sein könnte. Dagegen könnte sprechen, dass die GS und die KGA innerhalb der Zelle in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert sind: Während die GS im Zytosol zu finden ist, befindet sich die KGA in den Mitochondrien.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Immunfluoreszenzanalysen die KGA in Mitochondrien in kultivierten Rattenastrozyten nachgewiesen. Interessanterweise wurde die KGA auch im Bereich des Zellkerns nachgewiesen, welcher vom endoplasmatischen Retikulum (ER) umgeben ist. Da die Kernmembran vom ER gebildet wird, könnte damit diese Fluoreszenz auf im ER neu synthetisiertes KGA-Protein hinweisen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Western-Blot-Analysen, die zeigten, dass Ammoniak die KGA-Proteinexpression steigert, wurde auch in den Immunfluoreszenzanalysen eine Zunahme der KGA-Fluoreszenz beobachtet. Interessanterweise stieg aber auch gleichzeitig die ANT-Immunfluoreszenz nach Inkubation der Astrozyten mit Ammoniak an. In welchem Zusammenhang die Zunahme der ANT-Fluoreszenz mit der früher bereits beobachteten Schwellung der Mitochondrien in den mit Ammoniak behandelten Astrozyten steht, ist gegenwärtig unklar.

Im Rattengehirn war die KGA-Immunoreaktivität in Neuronen erwartungsgemäß um ein Vielfaches stärker als in den Astrozyten. Dieser Umstand mag dazu beigetragen haben, dass über viele Jahrzehnte hinweg angezweifelt wurde, dass die KGA in Astrozyten im Gehirn vorkommt (Kaneko et al. 1987; Ottersen et al. 1992; Laake et al. 1999). Hier könnte aufgrund der deutlich höheren KGA-Immunoreaktivität in Neuronen die vergleichsweise schwache KGA-Immunoreaktivität in Astrozyten als unspezifische Bindung des anti-KGA-Antikörpers bzw. als unspezifischer „Hintergrund“ der Färbung interpretiert worden sein. Diese Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit den Untersuchungen von Cardona und Kollegen überein, die ebenfalls die KGA in Gewebeproben des Ratten- und auch des menschlichen Gehirns (im zerebralen Kortex und Hippocampus) sowie in kultivierten Maus-Astrozyten nachwiesen (Cardona et al.

2015). Interessanterweise machen die Transkripte des GLS-Gens über 99% der Glutaminase-Transkripte in den Astrozyten des Rattenzerebellums aus, wobei die GAC stärker exprimiert wird als die KGA (Martín-Rufián et al. 2012; Cardona et al. 2015), was auf eine besondere Bedeutung der GLS-Gen-Transkripte hinweisen könnte.

Das LGA-Transkript (mRNA) wurde in Astrozyten im Zerebellum der Ratte im Vergleich zur KGA deutlich weniger exprimiert gefunden (Cardona et al. 2015). Olalla und Kollegen konnten in ihren Arbeiten das LGA- und KGA-Protein im Ratten- und Affengehirn nachweisen. KGA- und LGA-mRNA wiesen sie im menschlichen Gehirn im Kortex, Zerebellum, *Putamen*, *Medulla oblongata* und dem Rückenmark nach (in absteigender Stärke) sowie die KGA-mRNA im Kuh-, Huhn-, Maus-, Kaninchen- und Rattenhirn und die LGA-mRNA im Kuh-, Maus-, Kaninchen- und Rattenhirn (Olalla et al. 2002; Cardona et al. 2015). Des Weiteren wiesen sie im Ratten- und Affenkortex eine Expression des KGA-Proteins in den Mitochondrien sowie des LGA-Proteins in den Zellkernen nach (Olalla et al. 2002). Die Bedeutung der nukleären Lokalisation der LGA ist bislang völlig unklar. Allerdings könnten diese Befunde darauf hindeuten, dass die LGA möglicherweise neben der Glutaminolyse auch als Regulator der Gentranskription dienen könnte. Olalla und Kollegen vermuteten in diesem Zusammenhang, dass die LGA mit nukleären Rezeptoren interagieren könnte und so die aktuell bestehende Lücke zwischen *Glutaminsignaling* und durch den Glutaminspiegel vermittelten Transkriptionsvorgängen schließen könnte (Olalla et al. 2002).

Bislang ist dieser Zusammenhang nur unzureichend untersucht, so dass weitere Studien notwendig sind, um klären zu können, ob die LGA die Transkription von Genen z.B. indirekt durch Stabilisierung von Transkriptionsfaktoren vermitteln kann.

4.2 Effekte von Ammoniak auf die KGA-mRNA- und Proteinkonzentration in kultivierten Rattenastrozyten

Ein weiteres wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass Ammoniak die KGA-Proteinexpression zeit- und konzentrationsabhängig in kultivierten Rattenastrozyten steigert. Interessanterweise wurde keine Steigerung der KGA-mRNA-Konzentration in den mit Ammoniak inkubierten Rattenastrozyten beobachtet. Bereits nach 24 Stunden und bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 72 Stunden war ein signifikanter Anstieg der KGA-Proteinspiegel in den mit Ammoniak inkubierten Rattenastrozyten *in*

vitro nachweisbar. Da kein früherer Zeitpunkt als 24 Stunden untersucht wurde, und die KGA-Proteinkonzentrationen zu diesen Zeitpunkten vergleichsweise ähnlich waren, sind weitere Untersuchungen notwendig, um den genauen Zeitpunkt zu bestimmen, an dem die KGA-Proteinspiegel durch Ammoniak gesteigert werden. Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn es darum geht, die Mechanismen zu identifizieren, über die die KGA-Proteinexpression gesteigert wird.

Da die KGA auf Protein-, aber nicht auf mRNA-Ebene durch Ammoniak in den Astrozyten gesteigert wurde, kann vermutet werden, dass die Erhöhung der KGA-Proteinkonzentration die Folge eines posttranskriptionellen Mechanismus ist. Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die KGA-mRNA-Spiegel zu einem früheren Zeitpunkt als 24 Stunden gesteigert wurden und zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Ammoniakinkubation bereits wieder abgefallen waren.

Eine mögliche Erklärung für eine transkriptionsunabhängige Steigerung der KGA-Proteinkonzentration bieten Untersuchungen aus der Literatur, die darauf verweisen, dass die Proteinspiegel der KGA durch spezifische microRNAs reguliert werden können. Gao und Kollegen konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass der onkogene Transkriptionsfaktor c-Myc die Transkription der miR-23a/b hemmt, die wiederum die Translation der KGA-mRNA blockieren (Gao et al. 2009). Daher könnte eine Herunterregulation von miR-23a und -23b die Translation der KGA-mRNA verstärken (Gao et al. 2009; Masamha et al. 2016). Interessanterweise wird die c-Myc-mRNA miR-145 vermittelt degradiert (Sachdeva et al. 2009; Sachdeva und Mo 2010). Tatsächlich konnte in einer Arbeit von Oenarto auch eine Herunterregulation der miR-145 gezeigt werden, die von einem Anstieg der c-Myc-mRNA in mit Ammoniak inkubierten Rattenastrozyten begleitet war (Oenarto et al. 2016). Ob dies kausal in Beziehung zueinander steht in der Weise, dass c-Myc die Transkription von miR-23a/b hemmt und hierüber die KGA-mRNA in den mit Ammoniak inkubierten Astrozyten verstärkt translatiert wird, könnte nur durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Neben den genannten miRNA-Spezies wurden in mit Ammoniak inkubierten kultivierten Rattenastrozyten weitere miRNA-Spezies identifiziert, deren Expression durch Ammoniak ebenfalls vermindert wurde (Oenarto et al. 2016). Hierzu zählen z.B. miR31a-5p, miR221-3p/-5p, miR222-3p, miR326-3p und miR365-3p, welche in Zusammenhang mit der in mit Ammoniak inkubierten kultivierten Rattenastrozyten beobachteten

Steigerung der HO1-mRNA- und Proteinspiegel gebracht wurden. Die Herunterregulation der miR326-3p ist außerdem für die Steigerung der Nox4-mRNA- und Proteinspiegel in mit Ammoniak inkubierten Rattenastrozyten bedeutsam. (Oenarto et al. 2016).

Demgegenüber wurden keine miRNA-Spezies gefunden, deren Expression durch Ammoniak in den Rattenastrozyten *in vitro* gesteigert wurde (Oenarto et al. 2016). Ob die Herunterregulation dieser miRNA-Spezies in einem Zusammenhang mit einer Hochregulation der KGA, wie in der vorliegenden Studie gezeigt, stehen, kann nur durch weiterführende Untersuchungen geklärt werden.

Interessanterweise zeigten weitere unserer Untersuchungen, dass sich die durch Ammoniak nach 48 Stunden gesteigerte KGA-Proteinkonzentration 24 Stunden nach Wegnahme des Ammoniaks auf Basalniveau der unbehandelten Kontrolle normalisiert. Dies verdeutlicht, dass die durch Ammoniak induzierte Steigerung der KGA-Proteinexpression reversibel ist. Diese Daten sind damit in Einklang mit der prinzipiellen Reversibilität der klinischen Symptome bei den HE-Patienten und einer Verbesserung der Lebensqualität nach erfolgreicher Lebertransplantation (Moore et al. 2000; Allampati und Mullen 2014; Acharya et al. 2017). Allerdings zeigen neuere Studien auch, dass die bisherige Annahme, die Symptome der HE seien zu jedem Zeitpunkt der Erkrankung vollständig reversibel, nicht immer zutrifft (Bajaj et al. 2010; Riggio et al. 2011; Umapathy et al. 2014). So können nach einer HE-Episode kognitive Einschränkungen bestehen und die Lernfähigkeit beeinträchtigt bleiben (Riggio et al. 2011; Nardelli et al. 2017). Bajaj und Kollegen zeigten in einer Studie, dass die kognitiven Einschränkungen der Patienten mit einer positiven Anamnese für manifeste HE stärker ausgeprägt waren als bei Patienten ohne manifeste HE-Episoden. Außerdem nahm die Schwere der Einschränkung proportional zur Anzahl vorheriger Episoden einer manifesten HE zu (Bajaj et al. 2010). Diese persistierenden Beeinträchtigungen wurden kürzlich in Zusammenhang mit zerebraler Seneszenz bei HE gebracht (Görg et al. 2015; Görg et al. 2018; Görg et al. 2019), durch die neuronale Funktionen irreversibel beeinträchtigt bleiben können (Foster 2006; Bitto et al. 2010; Bhat et al. 2012; Chinta et al. 2013).

Weitere Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die KGA wie bereits in anderen Zelltypen gezeigt, auch in den Astrozyten in Mitochondrien exprimiert wird.

Interessanterweise zeigen die Untersuchungen, dass die Steigerung der KGA-Proteinexpression durch Ammoniak mit der bereits beschriebenen Mitochondrienschwellung einhergeht. Eine mögliche Ursache für die Mitochondrienschwellung könnte eine verstärkte Glutaminaufnahme in die Mitochondrien und eine dadurch bedingte Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies in den Mitochondrien sein. In diesem Zusammenhang konnten Norenberg und Kollegen zeigen, dass durch den KGA-Hemmstoff DON die durch Ammoniak hervorgerufene ROS-Produktion in Astrozyten gehemmt werden kann (Jayakumar et al. 2004; Rama Rao und Norenberg 2012). Eine Hemmung der Glutaminsynthese mit MSO verhindert ebenfalls die durch Ammoniak induzierte Bildung freier Radikale (Murthy et al. 2001). Aufgrund der unspezifischen Hemmwirkung von DON können diese Versuche nicht zweifelsfrei klären, ob Glutaminasen und im speziellen die KGA in die durch Ammoniak induzierte ROS-Bildung involviert sind. Die derzeitige Kenntnislage lässt jedoch vermuten, dass die KGA-vermittelte Glutaminolyse an der Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies in den Mitochondrien mit Ammoniak inkubierter Astrozyten beteiligt sein könnte (Norenberg et al. 2004).

Es bleibt derzeit aber weiter unklar, ob die in der Literatur beschriebenen Hemmeffekte von DON auf die mitochondriale ROS-Bildung und Astrozytenschwellung tatsächlich auf einer Hemmung der KGA beruhen. Zur Klärung dieser Frage sind weitere spezifischere Untersuchungen mit einer KGA-siRNA notwendig.

Zusätzlich bleibt unklar, ob die durch Ammoniak induzierte Bildung von oxidativem Stress in Mitochondrien (Görg et al. 2015) der Schwellung vorausgeht und diese ggf. induziert, oder aber eine Folge davon ist. Auch dies erfordert die Durchführung weiterer Untersuchungen.

Die Arbeiten von Milewski und Kollegen zeigen, dass auch TNF α (50 ng/ml) die KGA-Protein- und mRNA-Expression in Astrozyten steigert. Dies wurde als Folge einer verstärkten Phosphorylierung des *Signal Transducer and Activator of Transcription 3* (STAT3) diskutiert. Da sowohl die mRNA- als auch die Proteinkonzentration der KGA hochreguliert wurden, halten die Autoren eine Beteiligung von miRNAs bei der Hochregulation des KGA-Proteins für unwahrscheinlich (Milewski et al. 2019).

Da TNF α ein wichtiger Faktor für die Pathogenese der HE ist und oxidativ-nitrosativen Stress in Astrozyten induziert, und HE-relevante Faktoren synergistisch wirken in der Induktion der klinischen Symptome (Görg et al. 2003; Häussinger und Schliess 2008),

werfen diese Untersuchungen die Frage auf, ob TNF α und Ammoniak ebenfalls synergistisch die KGA-Proteinspiegel steigern könnten. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht und könnte in zukünftigen Studien genauer betrachtet werden.

4.3 Mechanismen der durch Ammoniak vermittelten Hochregulation des KGA-Proteins in kultivierten Rattenastrozyten

In weiteren Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung von Glutamin und von Glucosamin in den Astrozyten durch die Glutaminsynthetase bzw. Glutamin-Fruktose Amido Transferasen 1 und 2 als bedeutsam für die Steigerung der KGA-Proteinexpression in den mit Ammoniak inkubierten Astrozyten identifiziert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die beiden GS-Hemmstoffe MSO und PPT die KGA-Proteinexpression unter Kontrollbedingungen verringerten und somit auch die durch Ammoniak vermittelte Hochregulation des KGA-Proteins verhinderten. Im Gegensatz dazu hatten weder MSO noch PPT einen signifikanten Einfluss auf die GS-Proteinspiegel.

Es kann aus diesen Untersuchungen geschlossen werden, dass die Verfügbarkeit des Substrats Glutamin die Proteinspiegel der KGA reguliert, so dass die Koexpression von KGA und GS tatsächlich im Zusammenhang mit einem intrazellulären Glutaminzyklus stehen könnte. Dabei könnte die Hydrolyse des Glutamins die Glutaminspiegel in den Astrozyten auf einem konstanten Niveau halten und Glutamat für andere Stoffwechselprozesse bereitstellen. In diesem Zusammenhang dient Glutamat in den Mitochondrien der Synthese von α -Ketoglutarat durch die Glutamatdehydrogenase, welches in den Citratzyklus eingeht (Hudson und Daniel 1993; Tapiero et al. 2002). Damit könnte die KGA dazu dienen, die intrazellulären Glutamin- und Glutaminspiegel im Sinne einer metabolischen Homöostase konstant zu halten, da unphysiologisch hohe Spiegel multiple zelluläre Funktionen beeinträchtigen könnten (Pitt et al. 2000; Werner et al. 2001; Sharp et al. 2003; Matute 2011; Azevedo et al. 2014).

Der Mechanismus, über den die Ammoniak-induzierte Glucosaminbildung das KGA-Protein hochreguliert, bleibt derzeit unklar. Denkbar wäre, dass hier die durch Ammoniak induzierte Glucosaminbildung über die O-GlcNAcylierung von bislang unbekannt Proteinen eine Rolle spielt und möglicherweise hierüber eine Transkriptionshemmung von miRNAs vermittelt wird, welche die KGA-Translation blockieren könnte.

In ähnlicher Weise wurde dies bereits für miRNA-Spezies postuliert, deren Herunterregulation eine Expressionssteigerung der HO1 bedingen (Görg et al. 2019) (siehe Kapitel 1.4). In diesem Zusammenhang zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass ein *Knockdown* von GFAT1 und 2 die durch Ammoniak vermittelte Hochregulation der KGA hemmt.

GFAT1/2 synthetisiert Glucosamin im Hexosaminbiosynthese-*Pathway*. Im letzten Schritt dieses Stoffwechselweges wird UDP-GlcNAc gebildet, welches für die O-GlcNAcylierung von Proteinen verwendet werden kann. Tatsächlich konnte in Astrozyten eine verstärkte O-GlcNAcylierung gezeigt werden, die durch einen *Knockdown* von GFAT1 und 2 verhindert werden kann (Görg et al. 2019).

4.4 Bedeutung der KGA für durch Ammoniak induzierten oxidativen und ER-Stress und Seneszenz

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, dass die KGA in die Entstehung von durch Ammoniak induzierten oxidativen Stress, ER-Stress sowie die Proliferationshemmung der Astrozyten involviert ist. Ein *Knockdown* der KGA verhinderte die Ammoniak-induzierte Hochregulation von Surrogatmarkern für oxidativen Stress (HO1) und ER-Stress (GRP78) sowie die Ammoniak-induzierte Proliferationshemmung der Astrozyten. Derzeitig ist bekannt, dass die HO1 durch eine Herunterregulation der HO1-bindenden microRNA miR326-3p in den mit Ammoniak inkubierten Astrozyten hochreguliert wird. Die Herunterregulation von miR326-3p ist dabei abhängig von einer Steigerung der O-GlcNAcylierung bislang unbekannter Proteine (Görg et al., 2019).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass auch die KGA O-GlcNAcylierungs-abhängig hochreguliert wird, und dass eine Hemmung der KGA die Ammoniak-induzierte Hochregulation der HO1 und des ER-Stress-Surrogatmarkers GRP78 deutlich vermindert. Derzeitig ist unklar, über welchen Mechanismus die KGA zur Hochregulation der HO1 beiträgt. In diesem Zusammenhang ist denkbar, dass die KGA über die Induktion von mitochondrialem oxidativen Stress miR326-3p herunterreguliert. Kongruent damit, dass die HO1 ER-Stress in mit Ammoniak behandelten Astrozyten induziert (Görg et al. 2019), hemmt auch der KGA-*Knockdown* die Hochregulation des ER-Stress-Markers GRP78.

Vor dem Hintergrund der bekannten durch Ammoniak induzierten Funktionsstörungen der Mitochondrien (Bai et al. 2001; Rama Rao et al. 2003) und der Modulation der Autophagie (Tan et al. 2016; Zimmermann und Reichert 2017; Lu et al. 2019; Zimmermann und Reichert 2021) und Mitophagie (Lu et al. 2018) in Astrozyten, ist es denkbar, dass hier auch die KGA eine Rolle spielen könnte.

So könnte KGA-vermittelter mitochondrialer oxidativer Stress Mitophagie induzieren, in dessen Folge Häm aus mitochondrialen Proteinen freigesetzt würde. Dieses Häm würde als Substrat der HO1 über die Freisetzung von Eisenionen die Fenton-Reaktion triggern und damit zur Oxidation von RNA und Seneszenz in den mit Ammoniak inkubierten Astrozyten beitragen.

Die hier an Astrozyten gemachten Beobachtungen stehen in starkem Kontrast zu Untersuchungen, die an Tumorzellen durchgeführt wurden. Hier wurde gezeigt, dass eine gesteigerte KGA-Expression die Proliferationsrate der Zellen steigert (Pérez-Gómez et al. 2005). Die Bedeutung der KGA für das Wachstum von Tumorzellen wird darin gesehen, dass Tumore neben Glukose weitere Energiesubstrate für ihr Wachstum benötigen, da der Energiegewinn durch die Glykolyse sehr gering ist. In Tumoren ist Glutamin daher neben Glukose ein wichtiger Energielieferant (Medina et al. 1992; Turner und McGivan 2003) und stellt Glutamat bereit, das in den Citratzyklus eingehen kann (Yang et al. 2017). Aufgrund des schnellen Wachstums vor allem maligner Tumore ist die Vaskularisierung häufig nicht ausreichend und der Tumor muss zusätzlich über einen anaeroben Stoffwechsel Energie gewinnen. Glutamin-sensitive Tumorzellen, in denen das GLS-Gen ausgeschaltet wird, verlieren ihre Tumorigenität und weisen eine verringerte Wachstumsrate und veränderte Morphologie auf (Lobo et al. 2000; Donadio et al. 2008).

Ein Mangel an LGA fördert das Wachstum Glia-assoziiierter Tumore (Szeliga et al. 2009). Interessant ist in dem Zusammenhang auch, dass eine Hemmung der GLS in Tumorzellen deren Resistenz gegenüber Chemotherapeutika verringern kann (Shen et al. 2020). Diese Ergebnisse haben dazu angeregt, die Eignung von KGA-Inhibitoren für die Therapie von Tumorerkrankungen zu nutzen und klinische Studien durchzuführen (Szeliga et al. 2014) (z.B. BeGIN Study, NCT03872427).

4.5 Limitationen der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden Experimente zur Wirkung von Ammoniak auf die KGA-Expression ausschließlich an kultivierten Rattenastrozyten durchgeführt. Es bleibt daher gegenwärtig offen, welche Wirkungen Ammoniak auf die KGA-mRNA- und -Proteinkonzentration im Rattenhirn *in vivo* hat und ob eine mögliche Hochregulation ebenfalls durch Glutamin vermittelt wird. Diese Fragestellung wird derzeit in weiterführenden Arbeiten untersucht.

Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren wie MSO und PPT auch unspezifische Wirkungen in den Zellkulturexperimenten ausgeübt haben. Daher sind ergänzende Untersuchungen notwendig, um die Bedeutung der Glutaminbildung durch die Glutamin-Synthetase für die Steigerung der KGA-Proteinexpression in den mit Ammoniak inkubierten Astrozyten zu verifizieren. Dies kann z.B. durch siRNA-vermittelten *Knockdown* der GS erfolgen.

Die in der Zellkultur verwendeten Ammoniakkonzentrationen sind deutlich höher als die Ammoniakspiegel im Blut von Patienten mit HE. Dies ist ein häufiger Kritikpunkt bei der Bewertung von *in vitro* Untersuchungen. Entscheidend für die Beurteilung der *in vivo* Relevanz der *in vitro* verwendeten Ammoniakkonzentrationen sind aber die Ammoniakspiegel im Gehirn und diese sind bei Zirrhose-Patienten mit HE gegenwärtig unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Wirkungen von Ammoniak auf die KGA-Expression untersucht. Es bleibt dabei offen, ob auch andere HE-relevante Faktoren möglicherweise synergistisch mit Ammoniak die KGA-Spiegel in den Astrozyten beeinflussen.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, ob und ggf. wie Ammoniak die katalytische Aktivität der KGA beeinflusst. Eine Hochregulation des Proteins bedeutet nicht zwangsläufig eine gesteigerte Aktivität, da die KGA-Aktivität durch Phosphorylierung (Thangavelu et al. 2012) und möglicherweise weitere, bisher unbekannte posttranslationale Proteinmodifikationen reguliert wird bzw. werden könnte. Insgesamt bleibt auch unbekannt, wie die Hochregulation der KGA die intrazellulären Glutaminspiegel und den mitochondrialen Stoffwechsel beeinflusst.

In weiteren Experimenten sollte die Bedeutung der KGA für die Hochregulation der GADD45 α - und p21-mRNA-Konzentration untersucht werden. Diese Zellzyklus-hemmenden und Seneszenz-vermittelnden Gene werden durch Ammoniak hochreguliert (Görg et al. 2015). In diesem Zusammenhang sollte auch die Bedeutung der KGA für die durch Ammoniak gesteigerte Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase untersucht werden (Görg et al. 2015).

Des Weiteren könnte mit Hilfe hochauflösender Mikroskopie wie z.B. der Superresolution-Mikroskopie die intrazelluläre Lokalisation der KGA genauer untersucht werden. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen zwar einerseits, dass die KGA in den Mitochondrien der Astrozyten lokalisiert ist, andererseits zeigen sie aber auch, dass die KGA extramitochondrial in der Zelle vorhanden ist.

4.6 Schlussfolgerungen

Die Pathomechanismen der HE sind immer noch unvollständig verstanden und die vorliegenden *in vitro* Untersuchungen deuten auf eine Rolle der KGA für die Toxizität von Ammoniak hin, welches unbestritten als ein wichtiges Toxin bei der HE gilt. Sollten weiterführende Untersuchungen, und hier insbesondere tierexperimentelle Studien, belegen, dass die KGA für die HE-Pathogenese bedeutsam ist, könnten KGA-Hemmstoffe zukünftig therapeutisch relevant werden. Hierfür könnten Substanzen verwendet werden, die derzeit wie vorhergehend beschrieben in der klinischen Erprobung in der Tumorthherapie sind. In diesem Zusammenhang könnten auch Untersuchungen an KGA-*Knockout*-Ratten oder -Mäusen hilfreich sein. Die therapeutische Relevanz einer KGA-Hemmung ist aber höchstwahrscheinlich dadurch limitiert, dass eine unspezifische Hemmung der KGA im gesamten Organismus ungewollte Nebenwirkungen nach sich ziehen wird.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass die intrazellulären Glutaminspiegel eine entscheidende Stellgröße für die KGA-Aktivität darstellen und dieser eine Bedeutung für den Erhalt der Glutaminhomöostase zukommt.

Daher kann die Hochregulation der KGA als Kompensationsmechanismus verstanden werden, welcher der durch Ammoniak in Astrozyten gesteigerten Bildung und Akkumulation von Glutamin bei der HE entgegenwirkt.

Vor dem Hintergrund der bedeutsamen Rolle der Glutaminakkumulation für die Astrozytenschwellung bei der HE wäre demnach eine weitere Beeinträchtigung der Glutaminhomöostase durch eine Hemmung der KGA als ungünstig anzusehen.

Literaturverzeichnis

- Abou-Assi S, Vlahcevic ZR. 2001. Hepatic Encephalopathy. Metabolic Consequence of Cirrhosis Often is Reversible. *Postgraduate medicine* 109:52-70.
- Acharya C, Wade JB, Fagan A, White M, Gavis E, Ganapathy D, Gilles H, Heuman DM, Bajaj JS. 2017. Overt Hepatic Encephalopathy Impairs Learning on the EncephalApp Stroop Which Is Reversible After Liver Transplantation. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 23:1396–1403.
- Albrecht J, Norenberg MD. 2006. Glutamine: A Trojan Horse in Ammonia Neurotoxicity. *J Hepatol* 44:788–794.
- Albrecht J, Zielińska M, Norenberg MD. 2010. Glutamine as a Mediator of Ammonia Neurotoxicity: A Critical Appraisal. *Biochemical pharmacology* 80:1303–1308.
- Aledo JC, Gómez-Fabre PM, Olalla L, Márquez J. 2000. Identification of Two Human Glutaminase Loci and Tissue-Specific Expression of the Two Related Genes. *Mammalian Genome* 11:1107–1110.
- Aledo JC, Segura JA, Barbero LG, Marquez J. 1998. Early Differential Expression of Two Glutaminase mRNAs in Mouse Spleen after Tumor Implantation. *Cancer Lett.* 133:95–99.
- Allampati S, Mullen KD. 2014. Does Overt Hepatic Encephalopathy Cause Persistent Cognitive Defects Even after Successful Liver Transplantation? *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 20:874–875.
- Amodio P, Quero JC, Del Piccolo F, Gatta A, Schalm SW. 1996. Diagnostic Tools for the Detection of Subclinical Hepatic Encephalopathy. Comparison of Standard and Computerized Psychometric Tests with Spectral-EEG. *Metabolic brain disease* 11:315–327.
- Atterbury CE, Maddrey WC, Conn HO. 1978. Neomycin-Sorbitol and Lactulose in the Treatment of Acute Portal-Systemic Encephalopathy. A Controlled, Double-Blind Clinical Trial. *Digestive diseases and sciences* 5:398-406.
- Azevedo CJ, Kornak J, Chu P, Sampat M, Okuda DT, Cree BA, Nelson SJ, Hauser SL, Pelletier D. 2014. In vivo Evidence of Glutamate Toxicity in Multiple Sclerosis. *Annals of Neurology* 76:269–278.
- Bai G, Rama Rao KV, Murthy CRK, Panickar KS, Jayakumar AR, Norenberg MD. 2001. Ammonia Induces the Mitochondrial Permeability Transition in Primary Cultures of Rat Astrocytes. *Journal of neuroscience research* 66:981–991.
- Bajaj JS, Lauridsen M, Tapper EB, Duarte-Rojo A, Rahimi RS, Tandon P, Shawcross DL, Thabut D, Dhiman RK, Romero-Gomez M, Sharma BC, Montagnese S. 2020. Important Unresolved Questions in the Management of Hepatic Encephalopathy. An ISHEN Consensus. *The American Journal of Gastroenterology* 115:989–1002.
- Bajaj JS, Schubert CM, Heuman DM, Wade JB, Gibson DP, Topaz A, Saeian K, Hafeezullah M, Bell DE, Sterling RK, Stravitz RT, Luketic V, White MB, Sanyal AJ. 2010. Persistence of Cognitive Impairment after Resolution of Overt Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology* 138:2332–2340.

- Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, Johnson FB, Trojanowski JQ, Sell C, Torres C. 2012. Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease. *PloS one* 7:e45069.
- Bitto A, Sell C, Crowe E, Lorenzini A, Malaguti M, Hrelia S, Torres C. 2010. Stress-induced Senescence in Human and Rodent Astrocytes. *Experimental Cell Research* 316:2961–2968.
- Booher J, Sensenbrenner M. 1972. Growth and Cultivation of Dissociated Neurons and Glial Cells from Embryonic Chick, Rat and Human Brain in Flask Cultures. *Neurobiology* 2:97–105.
- Butterworth RF. 2014. Pathophysiology of Brain Dysfunction in Hyperammonemic Syndromes: The Many Faces of Glutamine. *Molecular genetics and metabolism* 113:113–117.
- Butterworth RF, Giguère J-F, Michaud J, Lavoie J, Layrargues GP. 1987. Ammonia: Key Factor in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Neurochemical Pathology* 6:2–12.
- Butz M, Timmermann L, Braun M, Groiss SJ, Wojtecki L, Ostrowski S, Krause H, Pollok B, Gross J, Südmeyer M, Kircheis G, Häussinger D, Schnitzler A. 2010. Motor Impairment in Liver Cirrhosis without and with Minimal Hepatic Encephalopathy. *Acta neurologica Scandinavica* 122:27–35.
- Campos-Sandoval JA, Martín-Rufián M, Cardona C, Lobo C, Peñalver A, Márquez J. 2015. Glutaminases in Brain: Multiple Isoforms for Many Purposes. *Neurochemistry international* 88:1–5.
- Cardona C, Sanchez-Mejias E, Davila JC, Martin-Rufian M, Campos-Sandoval JA, Vitorica J, Alonso FJ, Mates JM, Segura JA, Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR, Gutierrez A, Marquez J. 2015. Expression of Gls and Gls2 Glutaminase Isoforms in Astrocytes. *Glia* 63:365–382.
- Castell L, Vance C, Abbott R, Marquez J, Eggleton P. 2004. Granule Localization of Glutaminase in Human Neutrophils and the Consequence of Glutamine Utilization for Neutrophil Activity. *The Journal of biological chemistry* 279:13305–13310.
- Chen QM. 2000. Replicative Senescence and Oxidant-Induced Premature Senescence: Beyond the Control of Cell Cycle Checkpoints. *Annals New York Academy of Science* 908:111–125.
- Chinta SJ, Lieu CA, Demaria M, Laberge R-M, Campisi J, Andersen JK. 2013. Environmental Stress, Ageing and Glial Cell Senescence. A Novel Mechanistic Link to Parkinson's Disease? *Journal of internal medicine* 273:429–436.
- Ciećko-Michalska I, Szczepanek M, Słowik A, Mach T. 2012. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology research and practice* 2012:1–7.
- Coons AH, Kaplan MK. 1950. Localization of Antigen in Tissue Cells. Improvements in a Method for the Detection of Antigen by Means of Fluorescent Antibody. *Journal of experimental medicine* 91:1–13.
- Curthoys NP. 1995. Regulation of Glutaminase Activity and Glutamine Metabolism. *Annual Review of Nutrition* 15:133–159.
- Das A, Dhiman RK, Saraswat VA, Verma M, Naik SR. 2001. Chronic Liver Diseases: Epidemiology, Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. Prevalence and Natural

- History of Subclinical Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 16:531–535.
- Donadio AC, Lobo C, Tosina M, La Rosa V de, Martín-Rufián M, Campos-Sandoval JA, Matés JM, Márquez J, Alonso FJ, Segura JA. 2008. Antisense Glutaminase Inhibition Modifies the O-GlcNAc Pattern and Flux Through the Hexosamine Pathway in Breast Cancer Cells. *Journal of cellular biochemistry* 103:800–811.
- Duan J, Zhang Z, Tong T. 2005. Irreversible Cellular Senescence Induced by Prolonged Exposure to H₂O₂ Involves DNA-Damage-and-Repair Genes and Telomere Shortening. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37:1407–1420.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-Nucleotide RNAs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells. *Nature* 411:494–498.
- Elgadi KM, Meguid RA, Qian M, Souba WW, Abcouwer SF. 1999. Cloning and Analysis of Unique Human Glutaminase Isoforms Generated by Tissue-Specific Alternative Splicing. *Physiological genomics* 1:51–62.
- Errera M, Greenstein JP. 1949. Phosphate-Activated Glutaminase in Kidney and Other Tissues. *The Journal of biological chemistry* 178:495–502.
- Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. 2002. Hepatic Encephalopathy- Definition, Nomenclature, Diagnosis, and Quantification: Final Report of the Working Party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 35:716–721.
- Fire A, Xu S, Montgomery SAK, Driver, S.E., Mello CC. 1998. Potent and specific Potent and Specific Genetic Interference by Double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806–811.
- Foster TC. 2006. Biological Markers Of Age-Related Memory Deficits. *CNS Drugs* 20:153–166.
- Gao P, Tchernyshyov I, Chang T-C, Lee Y-S, Kita K, Ochi T, Zeller KI, Marzo AMd, van Eyk JE, Mendell JT, Dang CV. 2009. c-Myc Suppression of miR-23a/b Enhances Mitochondrial Glutaminase Expression and Glutamine Metabolism. *Nature* 458:762–765.
- Gilberstadt SJ, Gilberstadt H, Zieve L, Buegel B, Collier RO, McClain CJ. 1980. Psychomotor Performance Defects in Cirrhotic Patients Without Overt Encephalopathy. *Archives of internal medicine* 140:519–521.
- Gitlin N, Lewis DC, Hinkley L. 1986. The Diagnosis and Prevalence of Subclinical Hepatic Encephalopathy in Apparently Healthy, Ambulant, Non-Shunted Patients with Cirrhosis. *J Hepatol* 3:75–82.
- Goldstein L. 1975. Glutamine Transport by Mitochondria Isolated from Normal and Acidotic Rats. *American Journal of Physiology* 229:1027–1033.
- Gómez-Fabre PM, Aledo JC, Del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Nunez De Castro I, Campos JA, Márquez J. 2000. Molecular Cloning, Sequencing and Expression Studies of the Human Breast Cancer Cell Glutaminase. *Biochemical Journal* 345:365–375.

- Görg B, Bidmon HJ, Häussinger D. 2013a. Gene Expression Profiling in the Cerebral Cortex of Patients with Cirrhosis with and without Hepatic Encephalopathy. *J Hepatol* 57:2436–2447.
- Görg B, Foster N, Reinehr R, Bidmon HJ, Höngen A, Häussinger D, Schliess F. 2003. Benzodiazepine-induced Protein Tyrosine Nitration in Rat Astrocytes. *J Hepatol* 37:334–342.
- Görg B, Karababa A, Häussinger D. 2018. Hepatic Encephalopathy and Astrocyte Senescence. *Journal of clinical and experimental hepatology* 8:294–300.
- Görg B, Karababa A, Schütz E, Paluschinski M, Schrimpf A, Shafigullina A, Castoldi M, Bidmon HJ, Häussinger D. 2019. O-GlcNAcylation-Dependent Upregulation of HO1 Triggers Ammonia-Induced Oxidative Stress and Senescence in Hepatic Encephalopathy. *J Hepatol* 71:930–941.
- Görg B, Karababa A, Shafigullina A, Bidmon HJ, Häussinger D. 2015. Ammonia-induced Senescence in Cultured Rat Astrocytes and in Human Cerebral Cortex in Hepatic Encephalopathy. *Glia* 63:37–50.
- Görg B, Qvarckhava N, Keitel V, Bidmon H-J, Selbach O, Schliess F, Häussinger D. 2008. Ammonia Induces RNA Oxidation in Cultured Astrocytes and Brain in Vivo. *J Hepatol* 48:567–579.
- Görg B, Schliess F, Häussinger D. 2013b. Osmotic and Oxidative/Nitrosative Stress in Ammonia Toxicity and Hepatic Encephalopathy. *Archives of biochemistry and biophysics* 536:158–163.
- Gregorios JB, Mozes LW, Norenberg LOB, Norenberg MD. 1985. Morphologic Effects of Ammonia on Primary Astrocyte Cultures. I. Light Microscopic Studies. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 44:397–403.
- Groeneweg M, Moerlan W, Quero JC, Hop WCJ, Krabbe PF, Schalm SW. 2000. Screening of Subclinical Hepatic Encephalopathy. *J Hepatol* 32:748–753.
- Groeneweg M, Quero JC, Bruijn I de, Hartmann IJ, Essink-bot ML, Hop WC, Schalm SW. 1998. Subclinical Hepatic Encephalopathy Impairs Daily Functioning. *J Hepatol* 28:45–49.
- Gundling F, Zelihic E, Seidl H, Haller B, Umgelter A, Schepp W, Dodt C. 2013. How to Diagnose Hepatic Encephalopathy in the Emergency Department. *Annals of Hepatology* 12:108–114.
- Häussinger D. 2006. Low Grade Cerebral Edema and the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis. *J Hepatol* 43:1187–1190.
- Häussinger D. 2018. Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie. Kompendium und Praxisleitfaden, 1st ed. Berlin: De Gruyter.
- Häussinger D, Blei AT. 2008. Hepatic Encephalopathy. In: Rodes J, Benhamou JP, Blei A, Reichen J, Rizzetto M, editor. *The textbook of hepatology: from basic science to clinical practice*. 3rd ed. Oxford: Wiley-Blackwell. 728–760.
- Häussinger D, Dhiman RK, Felipo V, Görg B, Jalan R, Kircheis G, Merli M, Montagnese S, Romero-Gomez M, Schnitzler A, Taylor-Robinson SD, Vilstrup H. 2022. Hepatic Encephalopathy. *Nature Reviews Disease Primers* 8:715.

- Häussinger D, Görg B. 2019. Chapter 32 - Oxidative/Nitrosative Stress and Hepatic Encephalopathy. In: Sies H, editor. Oxidative Stress. Eustress and Distress. Cambridge, USA: Elsevier. 669–693.
- Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, Vom Dahl S. 2000. Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease: A Clinical Manifestation of Astrocyte Swelling and Low-Grade Cerebral Edema? *J Hepatol* 32:1035–1038.
- Häussinger D, Laubenberger J, Vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Henning J. 1994. Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Studies on Human Brain Myo-inositol in Hypo-osmolarity and Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology* 107:1475–1480.
- Häussinger D, Schliess F. 2008. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 57:1156–1165.
- Häussinger D, Schliess F, Kircheis G. 2002. Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17:256–259.
- Häussinger D, Sies H. 2013. Hepatic Encephalopathy. Clinical Aspects and Pathogenetic Concept. *Archives of biochemistry and biophysics* 536:97–100.
- Häussinger D, Sies H, Gerok W. 1984. Functional Hepatocyte Heterogeneity in Ammonia Metabolism. The Intercellular Glutamine Cycle. *J Hepatol* 1:3–14.
- Hayflick L. 1965. The Limited in vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Experimental Cell Research* 37:614–636.
- Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The Serial Cultivation of Human Diploid Cell Stains. *Experimental Cell Research* 25:585–621.
- Hazell AS, Butterworth RF. 1999. Hepatic Encephalopathy: An Update of Pathophysiologic Mechanisms. *Proc Soc Exp Biol Med*:99–112.
- Herranz N, Gil J. 2018. Mechanisms and Functions of Cellular Senescence. *The Journal of clinical investigation* 128:1238–1246.
- Hertz L. 1979. Functional Interactions between Neurons and Astrocytes I. Turnover and Metabolism of Putative Amino Acid Transmitters. *Progress in neurobiology* 13:277–323.
- Hertz L. 2004. Intercellular Metabolic Compartmentation in the Brain: Past, Present and Future. *Neurochemistry international* 45:285–296.
- Hilgier W, Puka M, Albrecht J. 1992. Characteristics of Large Neutral Amino Acid-induced Release of Preloaded L-Glutamine from Rat Cerebral Capillaries in Vitro: Effects of Ammonia, Hepatic Encephalopathy, and γ -Glutamyl Transpeptidase Inhibitors. *Journal of Neuroscience* 32:221–226.
- Himoto T, Hosomi N, Nakai S, Deguchi A, Kinekawa F, Matsuki M, Yachida M, Masaki T, Kurokochi K, Watanabe S, Senda S, Kuriyama S. 2007. Efficacy of Zinc Administration in Patients with Hepatitis C Virus-Related Chronic Liver Disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* 42:1078–1087.
- Hiramoto K, Fujino T, Kikugawa K. 1996. DNA Strand Cleavage by Tumor-Inhibiting Antibiotic 6-diazo-5-oxo-L-norleucine. *Mutation Research* 360:95–100.

- Holeček M. 2017. Branched-Chain Amino Acid Supplementation in Treatment of Liver Cirrhosis: Updated Views on How to Attenuate Their Harmful Effects on Cataplerosis and Ammonia Formation. *Nutrition* 41:80–85.
- Hollander MC, Sheikh MS, Bulavin DV, Lundgren K, Augeri-Henmueller L, Shehee R, Molinaro TA, Kim KE, Tolosa E, Ashwell JD, Rosenberg MP, Zhan Q, Fernandez-Salguero PM, Morgan WF, Deng C-X, Fornace Jr AJ. 1999. Genomic Instability in Gadd45a-Deficient Mice. *Nature genetics* 23:176–184.
- Hudson RC, Daniel RM. 1993. L-Glutamate Dehydrogenases: Distribution, Properties and Mechanism. *Comparative Biochemistry and Physiology* 106:767–792.
- Inoue M, Horiuchi S, Morino Y. 1977. Affinity Labeling of Rat-Kidney γ -Glutamyl Transpeptidase. *European Journal of Biochemistry* 73:335–342.
- Jayakumar AR, Rama Rao KV, Schousboe A, Norenberg MD. 2004. Glutamine-Induced Free Radical Production in Cultured Astrocytes. *Glia* 46:296–301.
- Jayakumar AR, Rao KVR, Murthy CRK, Norenberg MD. 2006. Glutamine in the Mechanism of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling. *Neurochemistry international* 48:623–628.
- Joelsson B, Aslund U, Hultberg B, Alwmark A, Gullstrand P, Bengmark S. 1986. Portal-Systemic Encephalopathy. Influence of Shunt Surgery and Relations to Serum Amino Acids. *Scandinavian journal of gastroenterology* 21:900–906.
- Kaneko T, Urade Y, Watanabe Y, Mizuno N. 1987. Production, Characterization, and Immunohistochemical Application of Monoclonal Antibodies to Glutaminase Purified from Rat Brain. *Neuroscience* 7:302–309.
- Katayama K, Kawaguchi T, Shiraishi K, Ito T, Suzuki K, Koreeda C, Ohtake T, Iwasa M, Tokumoto Y, Endo R, Kawamura N, Shiraki M, Hanai T, Habu D, Tsuruta S, Sakai H, Miwa Y, Kawada N, Kato A, Takei Y, Mine T, Kohgo Y, Seki T, Sata M, Ito Y, Fukui K, Nishiguchi S, Moriwaki H. 2018. The Prevalence and Implication of Zinc Deficiency in Patients With Chronic Liver Disease. *Journal of clinical medicine research* 10:437–444.
- Katt WP, Cerione RA. 2014. Glutaminase Regulation in Cancer Cells. A Druggable Chain of Events. *Drug discovery today* 19:450–457.
- Katt WP, Lukey MJ, Cerione RA. 2017. A tale of two glutaminases. Homologous Enzymes with Distinct Roles in Tumorigenesis. *Future medicinal chemistry* 9:223–243.
- Kawano H, Katsurabayashi S, Kakazu Y, Yamashita Y, Kubo N, Kubo M, Okuda H, Takasaki K, Kubota K, Mishima K, Fujiwara M, Harata NC, Iwasaki K. 2012. Long-Term Culture of Astrocytes Attenuates the Readily Releasable Pool of Synaptic Vesicles. *PLoS one* 7:e48034.
- Keitel V, Görg B, Bidmon HJ, Zemtsova I, Spomer L, Zilles K, Häussinger D. 2010. The Bile Acid Receptor TGR5 (Gpbar-1) Acts as A Neurosteroid Receptor in Brain. *Glia* 58:1794–1805.
- Khan A, Ayub M, Khan WM. 2016. Hyperammonemia Is Associated with Increasing Severity of Both Liver Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy. *J Hepatol* 2016:1–5.

- Kircheis G, Hilger N, Häussinger D. 2014. Value of Critical Flicker Frequency and Psychometric Hepatic Encephalopathy Score in Diagnosis of Low-Grade Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology* 146:961–969.
- Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D. 2002. Critical Flicker Frequency for Quantification of Low-Grade Hepatic Encephalopathy. *J Hepatol* 35:357–366.
- Koch H, Schauder P, Schäfer G, Dahme B, Ebel W, Vahldiek B, König F, Henning H. 1990. Untersuchungen zur Diagnose und Prävalenz der latenten hepatischen Encephalopathie. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 28:610–615.
- Krebs HA. 1935. The Synthesis of Glutamine from Glutamic Acid and Ammonia, and the Enzymic Hydrolysis of Glutamine in Animal Tissues. *Biochemical Journal* 29:1951–1969.
- Kruczek C, Görg B, Keitel V, Pirev E, Kröncke KD, Schliess F, Häussinger D. 2009. Hypoosmotic Swelling Affects Zinc Homeostasis in Cultured Rat Astrocytes. *Glia* 57:79–92.
- Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. 2010. The Essence of Senescence. *Genes & Development* 24:2463–2479.
- Kumar S, Modi R, Bhandari BM, Sass DA, Rothstein KD. 2018. A Head CT is Unnecessary in the Initial Evaluation of A Cirrhotic Patient with Recurrent Hepatic Encephalopathy. *Annals of Hepatology* 17:810–814.
- Kvamme E, Svenneby G, Hertz L, Schousboe A. 1982. Properties of Phosphate Activated Glutaminase in Astrocytes Cultured from Mouse Brain. *Neurochemical Research* 7:761–770.
- Kvamme E, Torgner IA, Roberg B. 2001. Kinetics and Localization of Brain Phosphate Activated Glutaminase. *Journal of neuroscience research* 66:951–958.
- Laake JH, Takumi Y, Eidet J, Torgner IA, Roberg B, Kvamme E, Ottersen OP. 1999. Postembedding Immunogold Labelling Reveals Subcellular Localization and Pathway-Specific Enrichment of Phosphate Activated Glutaminase in Rat Cerebellum. *Neuroscience* 88:1137–1151.
- Lachmann V, Görg B, Bidmon HJ, Keitel V, Häussinger D. 2013. Precipitants of Hepatic Encephalopathy Induce Rapid Astrocyte Swelling in an Oxidative Stress Dependent Manner. *Archives of biochemistry and biophysics* 536:143–151.
- Liu J, Xu Y, Jiang B. 2021. Novel Insights Into Pathogenesis and Therapeutic Strategies of Hepatic Encephalopathy, From the Gut Microbiota Perspective. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 11:1–11.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. 1995. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization. *PCR methods and applications* 4:357–362.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25:402–408.

- Lobo C, Ruiz-Bellido MA, Aledo JC, Marquez J, Núñez de Castro I, Alonso FJ. 2000. Inhibition of Glutaminase Expression by Antisense mRNA Decreases Growth and Tumorigenicity of Tumour Cells. *Biochemical Journal* 348:257–261.
- Lu KH, Görg B, Zimmermann M, Bidmon HJ, Häussinger D, Reichert AS. 2018. Cell Symposia: Multifaceted Mitochondria. Role of Mitochondrial Quality Control in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. Juli 2018. San Diego, CA, USA.
- Lu KH, Zimmermann M, Görg B, Bidmon HJ, Biermann B, Klöcker N, Häussinger D, Reichert AS. 2019. Hepatic Encephalopathy is Linked to Alterations of Autophagic Flux in Astrocytes. *EBioMedicine* 48:539–553.
- Mallet M, Weiss N, Thabut D, Rudler M. 2018. Why and When to Measure Ammonemia in Cirrhosis? *Clinics and research in hepatology and gastroenterology* 42:505–511.
- Marchesini G, Fabri A, Bianchi G, Brizi M, Zoli M. 1996. Zinc Supplementation and Amino Acid-Nitrogen Metabolism in Patients with Advanced Cirrhosis. *J Hepatol* 23:1084–1092.
- Marchesini G, Zoli M, Dondi C, Cecchini L, Angiolini A, Bianchi FB, Pisi E. 1980. Prevalence of Subclinical Hepatic Encephalopathy in Cirrhotics and Relationship to Plasma Amino Acid Imbalance. *Digestive diseases and sciences* 25:763–768.
- Martín-Rufián M, Tosina M, Campos-Sandoval JA, Manzanares E, Lobo C, Segura JA, Alonso FJ, Matés JM, Márquez J. 2012. Mammalian Glutaminase Gls2 Gene Encodes Two Functional Alternative Transcripts by a Surrogate Promoter Usage Mechanism. *PLoS one* 7:e38380.
- Masamha CP, Xia Z, Peart N, Collum S, Li W, Wagner EJ, Shyu A-B. 2016. CFIm25 Regulates Glutaminase Alternative Terminal Exon Definition to Modulate miR-23 Function. *RNA* 22:830–838.
- Matute C. 2011. Glutamate and ATP Signalling in White Matter Pathology. *Journal of anatomy* 219:53–64.
- McPhail MJW, Patel NR, Taylor-Robinson SD. 2012. Brain Imaging and Hepatic Encephalopathy. *Clinics in liver disease* 16:57–72.
- Medina MA, Sánchez-Jiménez JM, Quesada AR, Castro IN de. 1992. Relevance of Glutamine Metabolism to Tumor Cell Growth. *Molecular and Cellular Biochemistry* 113:1–15.
- Milewski K, Bogacińska-Karaś M, Hilgier W, Albrecht J, Zielińska M. 2019. TNF α Increases STAT3-mediated Expression of Glutaminase Isoform KGA in Cultured Rat Astrocytes. *Cytokine* 123:154774.
- Montagnese S, Biancardi A, Schiff S, Carraro P, Carlà V, Mannaioni G, Moroni F, Tono N, Angeli P, Gatta A, Amodio P. 2011. Different Biochemical Correlates for Different Neuropsychiatric Abnormalities in Patients with Cirrhosis. *J Hepatol* 53:558–566.
- Montagnese S, Merkel C, Amodio P. 2012. Encephalopathy or Hepatic Encephalopathy? *J Hepatol* 57:928-929.
- Montoliu C, Cauli O, Urios A, EIMlili N, Serra MA, Giner-Duran R, González-Lopez O, Del Olmo JA, Wassel A, Rodrigo JM, Felipe V. 2011. 3-Nitro-Tyrosine as a Peripheral Biomarker of Minimal Hepatic Encephalopathy in Patients with Liver Cirrhosis. *Gastroenterology* 106:1629–1637.

- Moore JW, Dunk AA, Crawford JR, Deans H, Besson JAO, Lacey G de, Sinclair TS, Mowat NAG, Brunt PW. 1989. Neuropsychological Deficits and Morphological MRI Brain Scan Abnormalities in Apparently Healthy Non-Encephalopathic Patients with Cirrhosis. *J Hepatol* 9:319–325.
- Moore KA, McL Jones R, Burrows GD. 2000. Quality of Life and Cognitive Function of Liver Transplant Patients. A Prospective Study. *Liver transplantation: official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* 6:633–642.
- Murthy CRK, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD. 2001. Ammonia-Induced Production of Free Radicals in Primary Cultures of Rat Astrocytes. *Journal of neuroscience research* 66:282–288.
- Nardelli S, Allampati S, Riggio O, Mullen KD, Prakash R, Gioia S, Unser A, White MB, Fagan AC, Wade JB, Farcomeni A, Gavis EA, Bajaj JS. 2017. Hepatic Encephalopathy Is Associated with Persistent Learning Impairments Despite Adequate Medical Treatment. A Multicenter, International Study. *Digestive diseases and sciences* 62:794–800.
- Ninan J, Feldman L. 2017. Ammonia Levels and Hepatic Encephalopathy in Patients with Known Chronic Liver Disease. *Journal of hospital medicine* 12:659–661.
- Norenberg MD. 1977. A Light and Electron Microscopic Study of Experimental Portal-Systemic (Ammonia) Encephalopathy. Progression and Reversal of the Disorder. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 36:618–627.
- Norenberg MD. 1987. The Role of Astrocytes in Hepatic Encephalopathy. *Neurochemical Pathology* 6:13–33.
- Norenberg MD. 1996. Astrocytic-Ammonia Interactions in Hepatic Encephalopathy. *Seminars in Liver Disease* 16:245–253.
- Norenberg MD. 1998. Astroglial Dysfunction in Hepatic Encephalopathy. *Metabolic brain disease* 13:319–335.
- Norenberg MD, Jayakumar AR, Rama Rao KV. 2004. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy. *Metabolic brain disease* 19:131–329.
- Oenarto J, Karababa A, Castoldi M, Bidmon HJ, Görg B, Häussinger D. 2016. Ammonia-Induced miRNA Expression Changes in Cultured Rat Astrocytes. *Scientific reports* 6:1–12.
- Olalla L, Gutiérrez A, Campos JA, Khan ZU, Alonso FJ, Segura JA, Márquez J, Aledo JC. 2002. Nuclear Localization of L-Type Glutaminase in Mammalian Brain. *The Journal of biological chemistry* 277:38939–38944.
- Ortlund E, Lacount MW, Lewinski K, Lebioda L. 2000. Reactions of Pseudomonas 7A Glutaminase-Asparaginase with Diazo Analogues of Glutamine and Asparagine Result in Unexpected Covalent Inhibitions and Suggests an Unusual Catalytic Triad Thr-Tyr-Glu. *Biochemistry* 39:1199–1204.
- Ottersen OP, Zhang N, Walberg F. 1992. Metabolic Compartmentation of Glutamate and Glutamine: Morphological Evidence Obtained by Quantitative Immunocytochemistry in Rat Cerebellum. *Neuroscience* 46:519–534.

- Perera SY, Chen TC, Curthoys NP. 1990. Biosynthesis and Processing of Renal Mitochondrial Glutaminase in Cultured Proximal Tubular Epithelial Cells and in Isolated Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 265:17764–17770.
- Pérez-Gómez C, Campos-Sandoval JA, Alonso FJ, Segura JA, Manzanares E, Ruiz-Sanchez P, Gonzales ME, Marquez J, Mates JM. 2005. Co-Expression of Glutaminase K and L Isoenzymes in Human Tumour Cells. *Biochemical Journal*:535–542.
- Pérez-Gómez C, Matés JM, Gómez-Fabre PM, Del Castillo-Olivares A, Alonso FJ, Márquez J. 2003. Genomic Organization and Transcriptional Analysis of the Human L-Glutaminase Gene. *Biochemical Journal* 370:771–784.
- Pinkus LM. 1977. Glutamine Binding Sites. *Methods Enzymol.* 46:414–427.
- Pitt D, Werner P, Raine CS. 2000. Glutamate Excitotoxicity in a Model of Multiple Sclerosis. *Nature Medicine* 6:67–70.
- Porter D, Hansen WR, Taylor L, Curthoys NP. 1995. Differential Expression of Multiple Glutaminase mRNAs in LLC-PK1-F+ Cells. *American journal of physiology. Cell physiology* 269:363–373.
- Porter LD, Ibrahim H, Taylor L, Curthoys NP. 2002. Complexity and Species Variation of the Kidney-Type Glutaminase Gene. *Physiological genomics* 9:157–166.
- Quero JC, Schalm SW. 1996. Subclinical Hepatic Encephalopathy. *Seminars in Liver Disease* 16:321–328.
- Rago R, Mitchen J, Wildling G. 1990. DNA Fluorometric Assay in 96-Well Tissue Culture Plates Using Hoechst 33258 after Cell Lysis by Freezing in Distilled Water. *Analytical Biochemistry* 191:31–34.
- Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD. 2003. Induction of the Mitochondrial Permeability Transition in Cultured Astrocytes by Glutamine. *Neurochemistry international* 43:517–523.
- Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD. 2005a. Differential Response of Glutamine in Cultured Neurons and Astrocytes. *Journal of neuroscience research* 79:193–199.
- Rama Rao KV, Jayakumar AR, Norenberg MD. 2005b. Role of Oxidative Stress in the Ammonia-Induced Mitochondrial Permeability Transition in Cultured Astrocytes. *Neurochemistry international* 47:31–38.
- Rama Rao KV, Norenberg MD. 2012. Brain Energy Metabolism and Mitochondrial Dysfunction in Acute and Chronic Hepatic Encephalopathy. *Neurochemistry international* 60:697–706.
- Rama Rao KV, Norenberg MD. 2014. Glutamine in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy: the Trojan Horse Hypothesis Revisited. *Neurochemical research* 39:593–598.
- Reding P, Duchateau J, Bataille C. 1984. Oral Zinc Supplementation Improves Hepatic Encephalopathy: Results of a Randomised Controlled Trial. *The Lancet*:493–494.
- Richards WL, Song M-K, Krutzsch H, Evarts RP, Marsden E, Thorgeirsson SS. 1985. Measurement of Cell Proliferation in Microculture Using Hoechst 33342 for the

- Rapid Semiautomated Microfluorimetric Determination of Chromatin DNA. *Experimental Cell Research* 159:235–246.
- Riggio O, Merli M, Capocaccia L, Caschera M, Zullo A, Pinto G, Gaudio E, Franchitto A, Spagnoli R, D'Aquilino E, Seri S, Moretti R, Cantafora A. 1992. Zinc Supplementation Reduces Blood Ammonia and Increases Liver Ornithine Transcarbamylase Activity in Experimental Cirrhosis. *J Hepatol* 16:785–789.
- Riggio O, Ridola L, Pasquale C, Nardelli S, Pentassuglio I, Moscucci F, Merli M. 2011. Evidence of Persistent Cognitive Impairment after Resolution of Overt Hepatic Encephalopathy. *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 9:181–183.
- Romero-Gómez M, Córdoba J, Jover R, Del Olmo JA, Ramírez M, Rey R, Madaria E de, Montoliu C, Nuñez D, Flavia M, Compañy L, Rodrigo JM, Felipo V. 2007. Value of the Critical Flicker Frequency in Patients with Minimal Hepatic Encephalopathy. *J Hepatol* 45:879–885.
- Romero-Gómez M, Montagnese S, Jalan R. 2015. Hepatic Encephalopathy in Patients with Acute Decompensation of Cirrhosis and Acute-on-Chronic Liver Failure. *J Hepatol* 62:437–447.
- Sachdeva M, Mo Y-Y. 2010. miR-145-mediated Suppression of Cell Growth, Invasion and Metastasis. *American Journal of Translational Research* 2:170–180.
- Sachdeva M, Zhu S, Wu F, Wu H, Walia V, Kumar S, Elble R, Watabe K, Mo Y-Y. 2009. p53 Represses c-Myc through Induction of the Tumor Suppressor miR-145. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:3207–3212.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1992. Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. 1985. *Biotechnology* 24:476–480.
- Saxena N, Bhatia M, Joshi YK, Garg PK, Tandon RK. 2001. Auditory P300 Event-Related Potentials and Number Connection Test for Evaluation of Subclinical Hepatic Encephalopathy in Patients with Cirrhosis of the Liver: A Follow-up Study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 16:322–327.
- Schepke M, Reichel C, Ziske C, Spengler U, Caselmann WH, Sauerbruch T. 2001. Leberzirrhose – Teil 2: Komplikationen und Therapie. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 2001 126:978–981.
- Schomerus H, Schreiegg J. 1993. Prevalence of Latent Portasystemic Encephalopathy in An Unselected Population of Patients with Liver Cirrhosis in General Practice. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 31:231–234.
- Schousboe A, Bak LK, Waagepetersen HS. 2013. Astrocytic Control of Biosynthesis and Turnover of the Neurotransmitters Glutamate and GABA. *Frontiers in endocrinology* 4:102.
- Schousboe A, Hertz L, Svenneby G, Kvamme E. 1979. Phosphate Activated Glutaminase Activity and Glutamine Uptake in Primary Cultures of Astrocytes. *Journal of neurochemistry* 32:943–950.

- Shah NJ, Neeb H, Kircheis G, Engels P, Häussinger D, Zilles K. 2008. Quantitative Cerebral Water Content Mapping in Hepatic Encephalopathy. *NeuroImage* 41:706–717.
- Shapiro RA, Clark VM, Curthoys NP. 1979. Inactivation of Rat Renal Phosphate-Dependent Glutaminase with 6-Diazo-5-oxo-L-norleucine. Evidence for Interaction at the Glutamine Binding Site. *The Journal of biological chemistry* 254:2835–2838.
- Shapiro RA, Farrell L, Srinivasan M, Curthoys NP. 1991. Isolation, Characterization, and in Vitro Expression of a cDNA That Encodes Kidney Isoenzyme of the Mitochondrial Glutaminase. *The Journal of biological chemistry* 266:18792–18796.
- Shapiro RA, Haser WG, Curthoys NP. 1985. The Orientation of Phosphate-Dependent Glutaminase on the Inner Membrane of Rat Renal Mitochondria. *Archives of biochemistry and biophysics* 248:1–7.
- Shapiro RA, Haser WG, Curthoys NP. 1987. Immunoblot Analysis of Glutaminase Peptides in Intact and Solubilized Mitochondria Isolated from Various Rat Tissues. *Biochemical Journal* 242:743–747.
- Sharma P, Sharma BC, Puri V, Sarin SK. 2007. Critical Flicker Frequency. Diagnostic Tool for Minimal Hepatic Encephalopathy. *Journal of hepatology* 47:67–73.
- Sharp CD, Hines I, Houghton J, Warren A, Jackson TH, Jawahar A, Nanda A, Elrod JW, Long A, Chi A, Minagar A, Alexander JS. 2003. Glutamate Causes a Loss in Human Cerebral Endothelial Barrier Integrity through Activation of NMDA Receptor. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 285:H2592-2598.
- Shen Y-A, Hong J, Asaka R, Asaka S, Hsu F-C, Suryo Rahmanto Y, Jung J-G, Chen Y-W, Yen T-T, Tomaszewski A, Zhang C, Attarwala N, DeMarzo AM, Davidson B, Chuang C-M, Chen X, Gaillard S, Le A, Shih I-M, Wang T-L. 2020. Inhibition of the MYC-Regulated Glutaminase Metabolic Axis Is an Effective Synthetic Lethal Approach for Treating Chemoresistant Ovarian Cancers. *Cancer research* 80:4514–4526.
- Sliva K, Schnierle BS. 2010. Selective Gene Silencing by Viral Delivery of Short Hairpin RNA. *Virology journal* 7:1–11.
- Sood GK, Sarin SK, Mahaptra J, Broor SL. 1989. Comparative Efficacy of Psychometric Tests in Detection of Subclinical Hepatic Encephalopathy in Nonalcoholic Cirrhotics. Search for a Rational Approach. *Gastroenterology* 84:156–159.
- Stauss HM, Persson PB. 2000. Role of Nitric Oxide in Buffering Short-Term Blood Pressure Fluctuations. *News Physiological Science* 15.
- Szeliga M, Bogacińska-Karaś M, Różycka A, Hilgier W, Marquez J, Albrecht J. 2014. Silencing of GLS and Overexpression of GLS2 Genes Cooperate in Decreasing the Proliferation and Viability of Glioblastoma Cells. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35:1855–1862.
- Szeliga M, Obara-Michlewska M, Matyja E, Łazarczyk M, Lobo C, Hilgier W, Alonso FJ, Márquez J, Albrecht J. 2009. Transfection with Liver-Type Glutaminase cDNA Alters Gene Expression and Reduces Survival, Migration and Proliferation of T98G Glioma Cells. *Glia* 57:1014–1023.

- Takahashi H, Koehler RC, Brusilow, S. W. and Traystman, R. J. 1991. Inhibition of Brain Glutamine Accumulation Prevents Cerebral Edema in Hyperammonemic Rats. *American Journal of Physiology* 30:825-829.
- Tan T, Zimmermann M, Reichert AS. 2016. Controlling Quality and Amount of Mitochondria by Mitophagy. Insights into the Role of Ubiquitination and Deubiquitination. *Biological chemistry* 397:637–647.
- Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD. 2002. Dossier: Free Amino Acids in Human Health and Pathologies. II. Glutamine and Glutamate. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56:446–457.
- Teasdale, G, Jennett, B. 1974. Assessment of Coma and Impaired Consciousness. A Practical Scale. *The Lancet*:81–83.
- Thangavelu K, Chong QY, Low BC, Sivaraman J. 2014. Structural Basis for the Active Site Inhibition Mechanism of Human Kidney-type Glutaminase (KGA). *Scientific reports* 4:1–7.
- Thangavelu K, Pan CQ, Karlberg T, Balaji G, Uttamchandani M, Suresh V, Schuler H, Low BC, Sivaraman J. 2012. Structural Basis for the Allosteric Inhibitory Mechanism of Human Kidney-Type Glutaminase (KGA) and Its Regulation by Raf-Mek-Erk Signaling in Cancer Cell Metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:7705–7710.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets. Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:4350–4354.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1992. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets. Procedure and Some Applications. 1979. *Biotechnology* 24:145–149.
- Turner A, McGivan D. 2003. Glutaminase Isoform Expression in Cell Lines Derived from Human Colorectal Adenomas and Carcinomas. *Biochemical Journal* 370:403–408.
- Umapathy S, Dhiman RK, Grover S, Duseja A, Chawla YK. 2014. Persistence of Cognitive Impairment after Resolution of Overt Hepatic Encephalopathy. *Gastroenterology* 109:1011–1019.
- Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Cordoba J, Ferenci P, Mullen KD, Weissenborn K, Wong P. 2014. Hepatic Encephalopathy in Chronic Liver Disease: 2014 Practice Guideline by The American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 60:715–735.
- Wang J-B, Erickson JW, Fuji R, Ramachandran S, Gao P, Dinavahi R, Wilson KF, Ambrosio ALB, Dias SMG, Dang CV, Cerione RA. 2010. Targeting Mitochondrial Glutaminase Activity Inhibits Oncogenic Transformation. *Cancer cell* 18:207–219.
- Wang Y, Huang Y, Zhao L, Li Y, Zheng J. 2014. Glutaminase 1 Is Essential for the Differentiation, Proliferation, and Survival of Human Neural Progenitor Cells. *Stem cells and development* 23:2782–2790.
- Wang Y, Li Y, Zhao R, Wu B, Lanoha B, Tong Z, Peer J, Liu J, Xiong H, Huang Y, Zheng J. 2017. Glutaminase C Overexpression in the Brain Induces Learning

- Deficits, Synaptic Dysfunctions, and Neuroinflammation in Mice. *Brain, behavior, and immunity* 66:135–145.
- Weissenborn K, Ahl B, Fischer-Wasels D, van den Hoff J, Hecker H, Burchert W, Köstler H. 2007. Correlations between Magnetic Resonance Spectroscopy Alterations and Cerebral Ammonia and Glucose Metabolism in Cirrhotic Patients with and without Hepatic Encephalopathy. *Gut* 56:1736–1742.
- Werner P, Pitt D, Raine CS. 2001. Multiple Sclerosis: Altered Glutamate Homeostasis in Lesions Correlates with Oligodendrocyte and Axonal Damage. *Annals of Neurology* 50:169–180.
- Wettstein M, Häussinger D. 2003. Hepatische Enzephalopathie-Therapie. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 128:2658–2660.
- Wettstein M, Kircheis G, Häussinger D. 2003. Hepatische Enzephalopathie-Diagnostik. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 128:2654–2657.
- Wu F, Lukinius A, Bergström M, Eriksson B, Watanabe Y, Langström B. 1999. A Mechanism behind the Antitumour Effect of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON): Disruption of Mitochondria. *European Journal of Cancer* 35:1155–1161.
- Yang L, Venneti S, Nagrath D. 2017. Glutaminolysis. A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual review of biomedical engineering* 19:163–194.
- Yang SS, Wu CH, Chiang TR, Chen DS. 1998. Somatosensory Evoked Potentials in Subclinical Portosystemic Encephalopathy: A Comparison with Psychometric Tests. *Hepatology* 27:357–361.
- Zeegen R, Drinkwater JE, Dawson AM. 1970. Method for Measuring Cerebral Dysfunction in Patients with Liver Disease. *British Medical Journal* 2:633–636.
- Zhan T, Stremmel W. 2012. The Diagnosis and Treatment of Minimal Hepatic Encephalopathy. *Deutsches Arzteblatt international* 109:180–187.
- Zimmermann M, Reichert AS. 2017. How to Get Rid of Mitochondria. Crosstalk and Regulation of Multiple Mitophagy Pathways. *Biological chemistry* 399:29–45.
- Zimmermann M, Reichert AS. 2021. Rapid Metabolic and Bioenergetic Adaptations of Astrocytes under Hyperammonemia - a Novel Perspective on Hepatic Encephalopathy. *Biological chemistry* 402:1103–1113.
- Zimmermann SC, Duvall B, Tsukamoto T. 2019. Recent Progress in the Discovery of Allosteric Inhibitors of Kidney-Type Glutaminase. *Journal of medicinal chemistry* 62:46–59.

Danksagung

Ich bedanke mich für die fachliche Unterstützung durch Herrn Dr. Boris Görg und Frau Dr. Ayse Karababa sowie für die Betreuung durch Herrn Professor Häussinger. Weiterer Dank gilt Herrn Dr. Hans Bidmon, Alina Schrimpf sowie Michaela Fastrich für die Unterstützung bei den Färbungen und mikroskopischen Aufnahmen.

Für die emotionale Unterstützung möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die in der ganzen Zeit an meiner Seite war.