

Aus der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

**Effekte von Ammoniak auf die Eisenhomöostase und deren
Konsequenzen für oxidativen Stress und Seneszenz in
kultivierten Rattenastrozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von
Elina Simone Schütz

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Dieter Häussinger

Zweitgutachter: Prof. Dr. Markus Butz

Für meine Tochter

Lelia

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Als Posterbeitrag

Wirkung von Ammoniak auf die mitochondriale Konzentration freier Eisen (II)-Ionen und deren Bedeutung für durch Ammoniak induzierte Seneszenz in kultivierten Rattenastrozyten

Elina Schütz, Boris Görg, Ayşe Karababa, Dieter Häussinger

Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinik Düsseldorf

(Doktorandenkongress der *Medical Research School*, April 2017, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)

In Originalarbeiten

Görg B, Karababa A, Schütz E, Paluschinski M, Schrimpf A, Shafigullina A, Castoldi M, Bidmon HJ, Häussinger D. O-GlcNAcylation-dependent upregulation of HO1 triggers ammonia-induced oxidative stress and senescence in hepatic encephalopathy. *Journal of Hepatology* 2019;71:930-941 (1)

Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass oxidativer Stress und Seneszenz eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der HE spielen. Die der Bildung von oxidativem Stress zugrunde liegenden Mechanismen sind aber noch nicht hinreichend bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Ammoniak die Eisenhomöostase in kultivierten Rattenastrozyten beeinträchtigt und über eine Steigerung der Konzentration freier Eisenionen oxidativen Stress und Seneszenz in Rattenastrozyten induziert. Dies wurde deutlich an Expressionsänderungen von in den Eisenstoffwechsel-involvierten Genen und Proteinen die mithilfe von Immunofluoreszenzanalyse untersucht wurden.

Ferroportin (FPN) wurde auf mRNA- und Proteinebene signifikant hochreguliert, Ceruloplasmin (CP), Hephaestin und Ferritin hingegen nicht. Diese Veränderungen gingen einher mit einer zeit- und konzentrationsabhängigen Steigerung der intrazellulären Konzentration an freien Eisenionen, einer gesteigerten RNA-Oxidation und von Seneszenz. Letztere wurde durch eine Steigerung der GADD45 α - und P21 mRNA-Spiegel sowie der Proliferationshemmung der Astrozyten gezeigt. Sowohl die gesteigerte RNA-Oxidation als auch die Seneszenz konnte durch Eisenchelatoren verhindert werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass der durch Ammoniak-induzierte oxidative Stress und die Proliferationshemmung abhängig sind von der intrazellulären Konzentration freier Eisenionen.

Summary

Oxidative stress and senescence play a key role in the pathogenesis of hepatic encephalopathy, but the underlying mechanisms are currently incompletely understood. In this study, we could show that ammonia impairs the iron homeostasis in cultured rat astrocytes. The findings show that ammonia elevates the levels of free ferrous iron in cultured rat astrocytes in a time and concentration dependent way. This increase was evidenced by fluorescent ferrous iron chelators and by changes in the levels of mRNA and protein species which are involved in iron metabolism.

While mRNA- and protein-levels of ferroportin (FPN) were significantly elevated, those of ceruloplasmin (CP), hephaestin and ferritin were downregulated. The elevation of the intracellular levels of free ferrous iron was also accompanied by enhanced oxidation of RNA and senescence in the astrocytes. The latter one was demonstrated by an elevation of the mRNA levels of the cell cycle inhibitory genes GADD45 α and P21 and a proliferation inhibition. Both the RNA-oxidation and the senescence were inhibited by iron chelators. The present data suggest that ammonia triggers oxidative stress and senescence in astrocytes by elevating the intracellular levels of free ferrous iron. This may include a liberation of free ferrous iron from heme by heme oxygenase 1. Ammonia-induced oxidative stress and proliferation inhibition correlate with the concentration of intracellular free ferrous iron.

I. Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Zusammenfassung..... | 5 |
| Summary | 6 |
| I. Inhaltsverzeichnis | 7 |
| II. Abbildungsverzeichnis..... | 9 |
| III. Tabellenverzeichnis | 10 |
| IV. Abkürzungsverzeichnis..... | 11 |
| 1. Einleitung..... | 13 |
| 1.1. Hepatische Enzephalopathie | 13 |
| 1.2. Diagnostik der hepatischen Enzephalopathie | 16 |
| 1.3. Therapie der Hepatischen Enzephalopathie | 19 |
| 1.3.1. Laktulose..... | 19 |
| 1.3.2. Rifaximin | 20 |
| 1.3.3. L-Ornithin-L-Aspartat..... | 20 |
| 1.3.4. Verzweigt-kettige Aminosäuren | 20 |
| 1.3.5. Flumazenil..... | 21 |
| 1.3.6. Ernährung | 21 |
| 1.4. Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie | 23 |
| 1.4.1. HE-präzipitierende Faktoren | 23 |
| 1.4.2. Osmotischer und oxidativ/nitrosativer Stress bei der HE | 26 |
| 1.4.3. RNA-Oxidation bei der HE | 28 |
| 1.4.4. Proteintyrosinnitrierung..... | 28 |
| 1.4.5. Freisetzung von in Proteinen gebundener Zinkionen | 29 |
| 1.5. Astrozytenseneszenz | 31 |
| 1.6. Rolle von microRNAs und der HO1 für durch Ammoniak induzierte Astrozytenseneszenz | 32 |
| 1.7. Mechanismen der Eisenhomöostase | 35 |
| 1.7.1. Eisenaufnahme | 37 |
| 1.7.2. Eisenspeicherung..... | 38 |
| 1.7.3. Eisenexport..... | 38 |
| 1.8. Arbeitshypothese | 39 |
| 1.9. Zielsetzung der Arbeit | 39 |
| 2. Material und Methoden..... | 40 |
| 2.1. Chemikalien | 40 |

| | |
|--|----|
| 2.2. Antikörper | 41 |
| 2.3 Reagenzien für die quantitative PCR | 42 |
| 2.4. Materialien und Geräte | 43 |
| 2.5. Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus dem zerebralen Kortex der Ratte..... | 45 |
| 2.6. <i>Realtime</i> PCR | 47 |
| 2.6.1. Prinzip..... | 47 |
| 2.6.1.1. Farbstoffbasierte quantitative PCR | 47 |
| 2.6.2. Durchführung | 48 |
| 2.6.3. Verwendete Einstellungen bei der Durchführung der <i>Realtime</i> -PCR. | 49 |
| 2.7. Immunofluoreszenzanalyse..... | 50 |
| 2.8. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis freier Eisenionen in kultivierten Astrozyten..... | 51 |
| 3. Statistik..... | 53 |
| 4. Ergebnisse..... | 55 |
| 4.1.1. Effekte von Ammoniak auf die Spiegel in den Eisenstoffwechsel involvierter Gene und Proteine in kultivierten Rattenastrozyten | 55 |
| 4.1.2. Effekte von Ammoniak auf die intrazelluläre Konzentration freier Eisenionen..... | 60 |
| 4.2. Bedeutung der intrazellulären Konzentration freier Eisenionen für durch Ammoniak induzierten oxidativen Stress | 64 |
| 4.3. Rolle freier Eisenionen für die durch Ammoniak induzierte Astrozytenseneszenz | 66 |
| 5. Diskussion..... | 73 |
| 5.1. Einfluss von Ammoniak auf die Eisenhomöostase in Astrozyten..... | 73 |
| 5.2. Bedeutung der gestörten Eisenhomöostase für die Bildung von oxidativem Stress in mit Ammoniak-behandelten Astrozyten | 75 |
| 5.3. Bedeutung der beeinträchtigten Eisenhomöostase für die durch Ammoniak induzierte Astrozytenseneszenz | 76 |
| 5.4 Mechanismen der Ammoniak-induzierten RNA-Oxidation und Astrozytenseneszenz..... | 77 |
| 5.5. In vivo Relevanz..... | 79 |
| 5.6. Limitationen der vorliegenden Arbeit | 80 |
| 5.7. Ausblick..... | 81 |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 83 |
| 7. Danksagung | 90 |

II. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: HE-präzipitierende und -relevante Faktoren | 24 |
| Abbildung 2: Pathogenese der HE: Geringgradiges zerebrales Ödem | 25 |
| Abbildung 3: Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie..... | 27 |
| Abbildung 4: Mechanismus der durch HE-präzipitierende Faktoren induzierten Bildung von oxidativ/ nitrosativem Stress und hieraus resultierender RNA-Oxidation, PTN und zinkabhängigen Gentranskription. | 31 |
| Abbildung 5: Mechanismen der Ammoniak-induzierten Seneszenz..... | 32 |
| Abbildung 6: Abbau von Häm..... | 34 |
| Abbildung 7: Mechanismen der Aufnahme, Abgabe und Speicherung von Eisenionen..... | 37 |
| Abbildung 8: Das Prinzip der farbstoffbasierten <i>Realtime</i> PCR..... | 48 |
| Abbildung 9: Einfluss von NH ₄ Cl auf die Spiegel von in den Eisenstoffwechsel involvierten Proteinen in kultivierten Rattenastrozyten..... | 56 |
| Abbildung 10: Einfluss von NH ₄ Cl auf die mRNA-Spiegel von Eisenstoffwechsel-relevanten Genen.. | 58 |
| Abbildung 11: Charakterisierung der durch Ammoniak induzierten Änderung der von mRNA-Spiegel von in den Eisenstoffwechsel involvierten Genen. | 59 |
| Abbildung 12: Effekte von Fe(II)Cl ₂ auf mRNA-Spiegel von Ferroportin und Ferritin. | 61 |
| Abbildung 13: Effekte von Fe(II)Cl ₂ auf die Ferritin-Proteinspiegel..... | 62 |
| Abbildung 14: Einfluss von NH ₄ Cl auf die intrazelluläre Konzentration freier Eisenionen..... | 63 |
| Abbildung 15: Rolle freier Eisenionen für die durch Ammoniak induzierte RNA-Oxidation in kultivierten Rattenastrozyten. | 65 |
| Abbildung 16: Rolle freier Eisenionen für die nukleäre Akkumulation von Serin ³⁹² -phosphoryliertem p53 und von p21 in Ammoniak-behandelten Astrozyten <i>in vitro</i> | 68 |
| Abbildung 17: Effekte von Fe(II)Cl ₂ auf die Phosphorylierung von p53 und die nukleäre Akkumulation von p21 in kultivierten Rattenastrozyten..... | 69 |
| Abbildung 18: Rolle der Glutaminsynthetase und freier Eisenionen für die durch Ammoniak gesteigerten mRNA-Spiegel von GADD45α und p21 in kultivierten Rattenastrozyten. | 70 |
| Abbildung 19: Rolle intrazellulärer freier Eisenionen für die Ammoniak-induzierte Proliferationshemmung kultivierter Rattenastrozyten. | 71 |
| Abbildung 20: Bedeutung intrazellulärer freier Eisenionen für die durch Ammoniak induzierte Proliferationshemmung kultivierter Rattenastrozyten..... | 72 |
| Abbildung 21: Die Fenton-Reaktion. | 75 |
| Abbildung 22: Mechanismus der Ammoniak-induzierten RNA-Oxidation und Astrozytenseneszenz.. | 79 |

III. Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Einteilung der Hepatischen Enzephalopathie nach der <i>World Organisation of Gastroenterology</i> | 14 |
| Tabelle 2: Einteilung der Schweregrade der hepatischen Enzephalopathie nach <i>West-Haven-Kriterien</i> | 15 |
| Tabelle 3: Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien. | 40 |
| Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Primär- und Sekundärantikörper..... | 41 |
| Tabelle 5: In der vorliegenden Arbeit verwendete Primer Sequenzen für die quantitative PCR..... | 42 |
| Tabelle 6: Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte. | 43 |
| Tabelle 7: Reaktionsgemisch für die <i>Realtime-PCR</i> | 49 |
| Tabelle 8: Durchführungsprotokoll der <i>Realtime-PCR</i> | 49 |
| Tabelle 9: Effekte von NH ₄ Cl auf die Immunoreaktivität von FPN, CP, Hephaestin oder Ferritin in kultivierten Rattenastrozyten. | 57 |
| Tabelle 10: Effekte von NH ₄ Cl auf die RDA- oder RhoNox TM -1-Fluoreszenz in kultivierten Rattenastrozyten. | 64 |

IV. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| 3' UTR | 3' untranslatierte Region |
| 8OH(d)G | 8-Oxo-2'-deoxyguanosine |
| ANOVA | Analysis of variance/Varianzanalyse |
| BCAA | Branched-chain amino acids |
| BIP | 2,2'-Bipyridin |
| BSA | Bovine serum albumin/Rinderserum |
| CFF | Critical Flicker Frequency/ Flimmerfrequenz-Analyse |
| CP | Ceruloplasmin |
| Cy3 | Cyanine3 |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle medium |
| DMT1 | divalent metal transporter 1 |
| DNA | Desoxyribonucleic acid |
| dNTP | Desoxyribonukleosidtriphosphat |
| EDTA | Ethylendiamintetraazetat |
| FBS | Fetal bovine serum |
| Fe(II)Cl ₂ | Eisen(II)-chlorid |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| FPN | Ferroportin |
| GABA | γ-Aminobuttersäure |
| GADD45α | Growth arrest and DNA damage-45 α |
| GAPDH | Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase |
| GCS | Glasgow Coma Scale |
| GFAT | Glutamin Fruktose-6-Phosphat Amidotransferase |
| GLAST | Glutamat-Aspartat-Transporter |
| GlcN-6-P | Glucosamin-6-Phosphat |
| GS | Glutaminsynthetase |
| HBS | Hexosamin-Biosynthese-Stoffwechselweg |
| HCP1 | Häm-Carrier-Protein1 |
| HE | Hepatische Enzephalopathie |
| HO1 | Hämoxygenase1 |
| HPRT1 | Hypoxanthine ribosyl transferase1 |
| IgG | Immunglobulin G |
| IRPs | Iron responsive proteins |
| Mg ²⁺ | Magnesium |
| mHE | minimale hepatische Enzephalopathie |
| miRNA | MicroRNA |
| mRNA | messenger RNA |
| MSO | Methioninsulfoximin |
| MT | Metallothionein |
| MTF1 | metallabhängige Transkriptionsfaktor 1 |
| NADPH | nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase |
| NH ₄ Cl | Ammoniumchlorid |
| NKCC1 | Na-K-Cl Kotransporters 1 |
| NMDA | N-methyl-D-aspartate |
| nNOS | Stickstoffmonoxid Synthase vom neuronalen Typ |
| Nox4 | NADPH-Oxidase 4 |
| O-GlcNAcylation | O-linked-N-acetylglucosaminylation |
| OGT | O-GlcNAc-Transferase |
| ONOO ⁻ | Peroxynitrit-Anion |

| | |
|------------------|---|
| p21 | Cyclin-abhängiger Kinasen-Inhibitor 1 |
| p38MAPK | p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen |
| p53 | Tumorsuppressor Protein p53 |
| PBR | peripherer Benzodiazepin-Rezeptor |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCBP | <i>poly(rC)-binding protein</i> |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PHES | <i>Psychometric Hepatic Encephalopathy Score</i> |
| PIH | <i>Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone</i> |
| p-p53 | Phosphoprotein p53 |
| PPT | Phosphinotricin |
| qPCR | Quantitative Polymerasekettenreaktion |
| RDA | <i>Rhodamine B-[(2,2'-bipyridine-4-yl)-aminocarbonyl]benzyl ester</i> |
| RhoNox | <i>Rhodamine N-oxide</i> |
| RISC | <i>RNA-induced silencing complex</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic acid</i> |
| RNS | reaktive Stickstoffspezies |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| RT | Raumtemperatur |
| sCP | lösliches Ceruloplasmin |
| SHE | <i>subclinical hepatic encephalopathy</i> |
| TfR | Transferrin-Rezeptor, Transferrinrezeptor |
| TNF- α | Tumornekrosefaktor- α |
| VEP | visuell evozierte Potentiale |
| Zn ²⁺ | Zink |

1. Einleitung

1.1. Hepatische Enzephalopathie

Die Hepatische Enzephalopathie (HE) ist ein neuropsychiatrisches Syndrom, das bei Patienten mit akutem Leberversagen oder einer chronischen Leberschädigung auftreten kann (2). Bis zu 80% aller Patienten mit Leberzirrhose entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine HE (3).

Die Ätiologie der Leberzirrhose variiert in Abhängigkeit der geographischen Lage und dem sozioökonomischen Status. In westlichen Ländern sind die Hauptursachen einer Leberzirrhose eine Hepatitis C Erkrankung und chronischer Alkoholabusus (4, 5). Innerhalb Asiens variieren die Ursachen der Leberzirrhose in den einzelnen Ländern. In Japan ist die Ursache einer Leberzirrhose insbesondere eine Hepatitis C Erkrankung, gefolgt von Alkoholabusus und Hepatitis B (6). In China und Korea hingegen, ist die Hepatitis B Erkrankung die Hauptursache einer Leberzirrhose, gefolgt von Alkoholabusus und Hepatitis C (7). Weitere Ursachen für die Entwicklung einer Leberzirrhose können nicht alkoholische Steatohepatitis (NASH), die primäre biliäre Zirrhose (PBC) und die Autoimmunhepatitis (AIH), sein (6).

Die Hepatische Enzephalopathie ist gekennzeichnet durch ein breites Spektrum an neuropsychiatrischen Störungen unterschiedlicher Schwere. Dazu gehören Beeinträchtigungen der Konzentrationsfähigkeit, des Reaktionsvermögens, des Gedächtnisses, der Sensorik und der Motorik (8).

Im ungünstigen Verlauf können Patienten mit einer HE das Bewusstsein völlig verlieren und im *coma hepaticum* versterben (9, 10).

Die *World Organisation of Gastroenterology* hat die HE entsprechend der Ätiologie der Erkrankung in 3 Subtypen eingeteilt, Typ A, B und C (Tab. 1) (11).

Typ A ist mit einem akuten Leberversagen assoziiert, Typ B ist Folge eines portosystemischen Bypasses ohne intrinsische hepatozelluläre Erkrankung und Typ C ist Folge einer chronischen Leberzirrhose und mit portalvenöser Hypertension assoziiert.

Vom Typ A sind nur etwa 5% der Patienten betroffen, vom Typ B 45% und Typ C ca. 50% der Patienten.

Nach dem zeitlichen Verlauf wird die HE in episodisch, episodisch präzipitierend oder spontan, rekurrent und persistierend eingeteilt (11).

Die episodische HE ist nach der Klassifikation im diagnostischen und statistischen Leitfadens psychischer Störungen (DMS-IV), ein Delir einer allgemeinmedizinischen Erkrankung.

Die episodische präzipitierende Form wird durch Faktoren wie gastrointestinale Blutungen, Urämie, psychoaktive Medikation, Infektionen, Konstipation, Dehydratation, Hypo- oder Hyperkaliämie oder Hyponatriämie ausgelöst. Gleichmaßen können Diuretika, über eine gesteigerte Ammoniakbildung in den Nieren und eine gestörte hepatische Harnstoffsynthese eine Hyperammonämie induzieren und ebenfalls die episodische präzipitierende Form verstärken (12).

Tabelle 1: Einteilung der Hepatischen Enzephalopathie nach der *World Organisation of Gastroenterology*. (modifiziert nach (11), mit Genehmigung des Verlags)

| HE Typ | Nomenklatur | Unterkategorie | |
|--------|--------------------------|-------------------|--|
| A | Akutes Leberversagen | | |
| B | Portosystemischer Bypass | | |
| C | Leberzirrhose | Episodische HE | Präzipitierend Spontan Rekurrent |
| | | Persistierende HE | Mild Schwer Behandlungsbedürftig |
| | | Minimale HE | |

Nach dem Schweregrad der Symptome kann die manifeste HE nach den *West Haven Kriterien* in 4 verschiedene Grade eingeteilt werden (Tab. 2) (15). Da die Symptome der HE-Grade 0-2 nicht spezifisch sind, wurde eine Einteilung in geringgradig und hochgradig

vorgeschlagen. Dabei werden die Grade 0, mHE, 1 und 2 der geringgradigen HE zugeteilt und die Grade 3 und 4 der hochgradigen, manifesten HE (15).

Während die Grade 3 und 4 objektiv diagnostizierbar sind, sind die Symptome der Grade 0, 1 und 2 vom Untersucher und vom Bildungsstand des Patienten beeinflusst. Die HE-Grade 0-2 sind nach der neuen Nomenklatur durch ein kontinuierliches Symptomspektrum gekennzeichnet (16).

Die episodische spontane Form tritt ohne auslösende präzipitierende Faktoren auf.

Die rezurrenente Form ist eine episodische HE die mindestens zweimal jährlich auftritt.

Patienten, die unter einer HE leiden, haben ausgeprägte kognitive Defizite, die sich negativ auf die Autonomie und das soziale Leben des Patienten auswirken. Der mentale Zustand kann, je nachdem wie stark ausgeprägt die Symptome sind, in 4 Grade aufgeteilt werden, eine minimale, milde, schwere und eine behandlungsbedürftige Form. Die minimale HE ist eine "subklinische Enzephalopathie"-Form (8, 13, 14).

Tabelle 2: Einteilung der Schweregrade der hepatischen Enzephalopathie nach West-Haven-Kriterien. (modifiziert nach (15))

| Grad der Enzephalopathie | Bewusstseinslage | Intellekt | Verhalten | Neuromuskuläre Störungen | Neuropsychometrie |
|---|--|---|--|--|------------------------------|
| Grad 0 (keine HE) | Unauffällig | Unauffällig | Unauffällig | Nicht nachweisbar | Unauffällig |
| MHE (keine manifeste HE) | Unauffällig | Unauffällig | Unauffällig | Nicht nachweisbar | Pathologische Testergebnisse |
| Grad I (geringgradig manifeste HE) | Schlafstörungen, Schläfrigkeit, Schlaflosigkeit, Umkehrung des Schlaf-Wach-Rythmus | Verminderte Konzentration, verminderte Aufmerksamkeit, verminderte Reaktionsgeschwindigkeit | Zunehmende Erschöpfung, Euphorie oder Depression, Geschwätzigkeit, Reizbarkeit | Gestörte Feinmotorik, einschlägiges Fingerzittern, Schriftänderung | Pathologische Testergebnisse |

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|---|
| Grad II (mittelgradig manifeste HE) | Verlangsamung, starke Schläfrigkeit, träger Gedankenfluss, Lethargie | Kein Zeitgefühl, Rechnen beeinträchtigt , Erinnerungs- lücken | Enthemmung, Persönlichkeit sänderung, Angst, Teilnahmslos- igkeit, | Zunahme des Händezitterns, verwaschene Sprache, verminderte Reflexe, verstärkter Muskeltonus | Pathologische Testergebnisse |
| Grad III (schwere manifeste HE, Vorstufe des Komas) | Desorientiertheit, stärkste Schläfrigkeit, Bewusstseins- eintrübung, Verwirrtheit, Bewegungslosig- keit, z.T. „Erstarrungen“ | Fortschreit- ende Erinnerungs- lücken (z.B. für die Erkrankung), Unfähigkeit zu Rechnen | Desorientiert- heit (zeitlich und örtlich), Wahnvorstell- ungen, Aggressionen | Verstärkte Reflexe, Zunahme krankhafter Fremdreflexe, unwillkürliche rhythmische Augen- bewegungen (Augenzittern), Augenflattern, Muskelkrämpfe, fortschreitende Spastik | Keine psychometrischen bzw. Computer- psychometrischen Untersuchungen durchführbar |
| Grad IV (schwerste Form der manifesten HE, Koma) | | | | Pupillen- erweiterung, Streckkrämpfe, Nackensteifigkeit | Keine psychometrischen bzw. Computer- psychometrischen Untersuchungen durchführbar |
| | Bewusstlosigkeit | Keine Funktion | Erlöschen | Erlöschen der Reflexe, Tonusverlust | |

1.2. Diagnostik der hepatischen Enzephalopathie

Die HE wird mithilfe unterschiedlicher Methoden diagnostiziert, je nachdem ob eine gering- oder hochgradige HE vorliegt.

Ein Großteil der zirrhotischen Patienten erscheint in der klinischen Untersuchung zunächst unauffällig. Bei genauerer Untersuchung mit den anschließend aufgeführten Testverfahren, können jedoch neuropsychologische Defizite erkannt werden. Dieser Zustand der Patienten wird als minimale HE oder *subclinical hepatic encephalopathy* SHE bezeichnet.

Derzeitig werden insbesondere psychometrische Tests für die Diagnostik genutzt. Dazu gehört z.B. der *Psychometric Hepatic Encephalopathy Score* (PHES), der verschiedene „*Paper-Pencil Tests*“ beinhaltet, wie die *Number Connection Tests A und B* (NCT), den *Digit Symbol Test* (DST), den Linie-Nachfahr-Test und den *Serial Dotting Test* (SDOT) (17). Alle genannten Tests untersuchen hauptsächlich die kognitive Verarbeitungsgeschwindigkeit und psychomotorische Reaktionsfähigkeit, die visuelle Wahrnehmung und das visuell räumliche Denken.

Eine weitere Möglichkeit in der Diagnostik stellen Computer-Tests dar. Hier steht eine Testbatterie aus 5 computerbasierten neuropsychologischen Tests zu Verfügung. Dazu gehört der *Visual Pursuit Test*, zur Registrierung von konzentrierter, zielgerichteter, visueller Wahrnehmung, der *Cognitron Test*, zur Evaluierung der Aufmerksamkeit und Konzentrationsfähigkeit und die Motorische Leistungsserie zur Evaluierung der Feinmotorik (18).

Um die verschiedenen auftretenden neuropsychiatrischen Auffälligkeiten genau zu evaluieren, bedarf es jedoch präziserer, validierter und standardisierter psychometrischer Testkombinationen, die derzeit nicht verfügbar sind (18).

Die Interpretation von psychometrischen Testergebnissen wird außerdem durch mehrere Faktoren erschwert. Die Probanden erlernen die Tests im Zeitverlauf, es entsteht also ein Trainingseffekt, man benötigt stets eine gleichaltrige Kontrollgruppe und es gibt derzeit noch keine standardisierte Definition der geringgradigen HE (18).

Diese Unsicherheiten führen dazu, dass bei der Beurteilung der mHE bei Patienten mit Leberzirrhose, eine sehr große Prävalenzspanne von 20-80% auftritt (18).

Dahingegen zeigen Methoden wie das EEG und visuell evozierte Potentiale (VEP) eine sehr gute *Test-Retest*-Reliabilität und Lerneffekte beeinflussen die Testergebnisse nur geringfügig. Bei Patienten mit einer HE beobachtet man im Spontan-EEG eine diffuse Verlangsamung mit einer Abnahme der Alpha- und einer moderaten Zunahme der Theta-Aktivität.

Die Sensitivität dieser Methode ist jedoch nicht ausreichend für die Diagnostik früher HE-Stadien (19).

Eine weitere diagnostische Methode, um eine minimale HE nachzuweisen, sind visuell evozierte Potentiale (VEP). Hierbei handelt es sich um im EEG nachweisbare Potentialunterschiede, die nach visueller Stimulation der Netzhaut, durch am Hinterkopf angebrachte Elektroden abgeleitet werden. Der diagnostische Wert der VEP-Messung ist nicht höher als der von anderen Tests, wie z.B. dem „*Paper-Pencil Test*“ (19).

Zusätzlich zu den genannten Methoden, werden der *Inhibitory Control Test* (ICT) und die Flimmerfrequenz-Analyse (*Critical Flicker Frequency*, CFF) verwendet.

Beim ICT handelt es sich um einen computergesteuerten Test zur Erfassung von Aufmerksamkeit und der sogenannten *Response Inhibition*, der Fähigkeit, ungewollte Reaktionen zu unterdrücken. Er wird auch benutzt um Aufmerksamkeitsdefizit-Erkrankungen, Schizophrenie und Hirnverletzungen nach Traumata zu charakterisieren.

Die Methode weist eine Sensitivität und Spezifität von 90% und eine hohe *Test-Retest*-Reliabilität bei der Diagnostik der mHE, auf (20).

Die visuelle Unterscheidungsfähigkeit kann mithilfe der Flimmerfrequenzanalyse beurteilt werden. Sie ist eine außerordentlich wichtige und international etablierte Methode für die Diagnostik der mHE (18).

Dabei wird eine intrafoveale Stimulation mithilfe einer konkav-konvexen Linse durchgeführt, die es dem Auge erlaubt, auf eine virtuelle Lichtquelle in 12 Metern Entfernung, zu fokussieren. Eine schrittweise Steigerung der Lichtfrequenz ausgehend von 25 Hz erlaubt die Bestimmung der sogenannten Verschmelzungsfrequenz. Dies ist die Frequenz bei der der Patient das Licht nicht mehr flimmernd, sondern als permanenten Reiz wahrnimmt. Im Gegenzug wird durch Absenkung der Lichtfrequenz von 60 Hz abwärts, die kritische Flimmerfrequenz (CFF) bestimmt. Die CFF ist die Frequenz bei der der Patient die anfänglich als kontinuierlichen Reiz wahrgenommene Lichtquelle wieder als flimmernd wahrnimmt (18). Die Besonderheit und Überlegenheit der Flimmerfrequenzanalyse gegenüber anderen psychometrischen Testverfahren ist, dass sie reproduzierbar ist, und nur geringfügig beeinflusst wird durch Trainingseffekte, Ausbildungsgrad des Untersuchers, Tageszeit oder Interobserver-Variabilität (18).

Die CFF sinkt parallel zum Ausmaß der psychomotorischen und mentalen Beeinträchtigung bei zirrhotischen Patienten und erlaubt eine Quantifizierung der HE als ein Kontinuum, über einen längeren Zeitraum und eine Unterscheidung zwischen SHE, HE I und HE II. Die CFF ist ein gut reproduzierbarer physikalischer Messparameter der international anerkannt ist (18).

Bei Patienten mit HE Grad III-IV, ist eine Quantifizierung mithilfe von psychometrischen Tests nicht mehr möglich, da diese Patienten sich in einem präkomatösen oder komatösen Zustand befinden und nicht ansprechbar sind (21).

Hier bietet der *Glasgow Coma Scale* (GCS) Score die Möglichkeit den Bewusstseinszustand des Patienten mithilfe von einfachen und objektivierbaren Parametern zu bewerten. Ursprünglich wurde der GCS Score für das posttraumatische Koma entwickelt. Mittlerweile wird er aber bei allen Komaformen verwendet. Der GCS Score ist dabei zuverlässiger als die *West Haven Kriterien* für die Bewertung der schweren Formen der manifesten HE (Grad III-IV) (21).

1.3. Therapie der Hepatischen Enzephalopathie

Da derzeit die der HE zugrundeliegenden pathogenetischen Mechanismen nicht vollständig aufgeklärt sind, zielt die Therapie ausschließlich darauf ab, präzipitierende Faktoren (Siehe Kapitel 1.4.1.) zu vermeiden und insbesondere den Ammoniakplasmawert zu senken.

Ammoniak ist ein Haupttoxin in der Pathogenese der HE (14, 21). Die Behandlung beinhaltet mehrere Therapeutika, die eine Besserung der Symptomatik bewirken können und auf die im nachfolgenden Textabschnitt eingegangen wird.

1.3.1. Laktulose

Das am häufigsten verwendete Therapeutikum ist Laktulose, ein nicht resorbierbares Disaccharid, welches über eine laxative Wirkung die Ammoniakbelastung über die Steigerung der fäkalen Stickstoffausscheidung verringert (8, 22). Laktulose wird aber auch von der Darmflora enzymatisch zu Essigsäure und Milchsäure umgesetzt (8). Diese

kurzkettigen organischen Säuren reduzieren den pH-Wert im Darm und hemmen hierüber das Wachstum von Ammoniak- und Urease-produzierenden Bakterien (8, 22).

1.3.2. Rifaximin

Das am zweithäufigsten eingesetzte Therapeutikum ist Rifaximin, ein lokal wirkendes Antibiotikum, welches nur minimal im Darm resorbiert wird und die Ammoniakproduktion im Darm durch Elimination der bakteriellen Flora, reduziert. So kann die Ammoniakbelastung des Körpers noch weiter verringert werden. Rifaximin senkt das relative Risiko für wiederkehrende Episoden einer HE und verbessert die Lebensqualität der Erkrankten signifikant (23, 24).

1.3.3. L-Ornithin-L-Aspartat

Daneben kann eine Therapie mit L-Ornithin-L-Aspartat (LOLA) erfolgen. LOLA steigert die gestörte Harnstoffbildung in der Leber und die Glutaminbildung in Leber und Muskulatur (25). Eine orale Gabe, sowie eine intravenöse Infusion, bewirken eine signifikante Reduktion des HE Grades und der Ammoniakkonzentration im Blut und verbessern die psychomotorischen Fähigkeiten der Patienten (22).

1.3.4. Verzweigtkettige Aminosäuren

Zusätzlich zu diesen Therapeutika, gibt es die Möglichkeit für Patienten mit HE die verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin zu supplementieren (*Branched-chain amino acids*, BCAA) (26).

BCAAs gehören zu den essenziellen Aminosäuren, können die Proteinsynthese steigern und dem katabolen Proteinabbau entgegenwirken. Im Gegensatz zu den meisten Aminosäuren, die in der Leber metabolisiert werden, werden die BCAAs primär in extrahepatischen Geweben, wie Muskeln, Fettgewebe, Nieren und Gehirn metabolisiert (26).

Bei Patienten mit einer manifesten HE wird eine Supplementierung mit oralen BCAAs als begleitende Therapie empfohlen, um ein Gleichgewicht der Aminosäuren im Körper zu erreichen und den körpereigenen Eiweißabbau zu reduzieren (26, 27).

1.3.5. Flumazenil

Der Benzodiazepinrezeptor-Antagonist Flumazenil blockiert γ -Aminobuttersäure (GABA)-Rezeptoren im Gehirn und kann so der Verlangsamung der Hirnaktivität bei HE Patienten entgegenwirken (28). Das Medikament verbessert den mentalen Zustand der Patienten, hat jedoch keine Wirkung auf die Genesung oder die Gesamtüberlebenszeit (27).

1.3.6. Ernährung

Zusätzlich zu den genannten Behandlungsformen, sollte die Therapie der HE, mit einer Optimierung der Ernährung einhergehen.

Bei bis zu 60% der Patienten mit einer dekompensierten Erkrankung, wurde eine Protein-Energie-Unterernährung (PEU) festgestellt (29). Dabei ist Mangelernährung ein Faktor der signifikant die Morbidität und die Mortalität von Patienten mit chronischen Lebererkrankungen, beeinflusst (30). Bei zirrhotischen Patienten ist die Mangelernährung mit weiteren Komplikationen, wie Varizenblutungen, refraktärem Aszites, spontaner bakterieller Peritonitis und hepatorenalem Syndrom verbunden (31).

Die frühere Annahme, dass eine Verringerung der Proteinzufuhr bei allen Patienten hilfreich sein könnte, wurde mittlerweile widerlegt (32). Heutzutage geht man davon aus, dass die Wahl der richtigen Proteinquelle mindestens genauso wichtig ist, wie die Gesamtmenge an aufgenommenem Protein. Pflanzliche Proteinquellen werden häufig besser vertragen als Proteine aus tierischen Quellen (32).

Produkte die reich an pflanzlichen Proteinen sind, enthalten häufig auch viele Ballaststoffe. Dies führt zu einer verkürzten Darmassage und somit zu einer verringerten Möglichkeit der Ammoniakaufnahme im Darm. Zusätzlich tragen Ballaststoffe zu einer erhöhten Elimination von Ammoniak aus dem Darm über den Stuhlgang bei (33).

Zusätzlich zu diesen Behandlungsmöglichkeiten, werden noch eine Supplementierung mit Zink und Vitaminen diskutiert (34)

HE- und Leberzirrhose Patienten haben ein erhöhtes Risiko einen Zinkmangel zu entwickeln, weil die Zink-Homöostase primär im Körper durch die Leber bewerkstelligt wird (35). Zink

dient vielen Enzymen und Proteinen, die an anti-oxidativen, anti-entzündlichen und apoptotischen Reaktionen beteiligt sind, als Kofaktor (34). Des Weiteren wird Zink für die Freisetzung von Vitamin-A aus der Leber benötigt (34). Bei HE Patienten kommt es somit häufig aufgrund eines Zinkmangels, zur Ausbildung einer Vitamin-A-Mangel-induzierten Nachtblindheit aufgrund einer beeinträchtigten Produktion von Rhodopsin in den Stäbchen, welches aus dem Vitamin-A-Produkt Retinal und dem Eiweiß Opsin gebildet wird. Die Umwandlung des Retinols in das Retinal erfolgt dabei durch eine Zink-abhängige Alkohol-Dehydrogenase (36). Bei Patienten mit einer Leberzirrhose kommt es zu einer gesteigerten Ausscheidung von Zink über die Nieren (37) und zu einer gestörten Aufnahme von Zink im Dünndarm (38). Es konnte gezeigt werden, dass es bei HE Patienten durch die schlechte Zinkversorgung zu einer Störung des Stickstoffmetabolismus kommt, welche aus einer Reduktion des Harnstoffzyklusenzym Ornithin-Transcarbamylase resultiert (39). Eine verringerte Zink Serumkonzentration im Blut korreliert mit erhöhten Ammoniakplasmakonzentrationen bei HE Patienten (34).

Bei Patienten mit einer Leberzirrhose oder HE kommt es häufig durch Malabsorption und einer verringerten Speicherkapazität der Leber zu Vitaminmangelerscheinungen (40). Ein schwerer Vitamin B1 Mangel kann zu einer Wernicke Enzephalopathie führen, ein schwerer Vitamin D Mangel kann bei Leberzirrhosepatienten zu Knochen- und Muskelschmerzen führen und wird mit einer erhöhten Mortalität in Zusammenhang gebracht (33). Eine Supplementierung der entsprechenden Vitamine wird grundsätzlich empfohlen, verbessert die HE-Symptomatik selbst aber nicht (33).

1.4. Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

Die HE ist die klinische Manifestation eines geringgradigen Hirnödems das durch auslösende Faktoren exazerbiert (41). Das sich bei der HE ausbildende geringgradige Gliädem geht dabei mit der zerebralen Bildung von oxidativem Stress einher (42).

Bei der HE kommt es aufgrund der gestörten Leberfunktion zu einer eingeschränkten Entgiftung von neurotoxisch-wirksamen Substanzen, wie dem Ammoniak, der als ein Haupttoxin in der Pathogenese der HE betrachtet wird (10, 14, 42).

Bereits in den 1890er Jahren wurde die Neurotoxizität von Ammoniak erkannt und auch der Bezug zur HE hergestellt. Mithilfe eines operativen Shunts zwischen Portalvene und Vena cava, wurde bei Hunden ein Umgehungskreislauf der Leber hergestellt, durch den die Ammoniakentgiftung des Harnstoff- und Glutaminmetabolismus umgangen wurde, in dessen Folge die Ammoniakspiegel im Blut anstiegen. Innerhalb von 6 Wochen zeigen die Hunde ein aggressives, gereiztes Verhalten und wirkten verwirrt. Nach Gabe von Ammoniaksalzen, fielen die Hunde in ein Koma und verstarben (43). In weiteren Untersuchungen zeigten Gabuzda et al. bei Aszitespatienten, die mit Kationenaustauschern behandelt wurden, die Natriumionen durch Ammoniumionen austauschen, dass hierdurch neurologische Symptome bei den Patienten verursacht wurden, die heute als charakteristisch für die hepatische Enzephalopathie gelten (44).

1.4.1. HE-präzipitierende Faktoren

Die HE kann durch eine Reihe von präzipitierenden Faktoren ausgelöst werden. Zu diesen Faktoren gehören Elektrolytentgleisungen, wie Hyponatriämie und Hypokaliämie, die durch Diuretika, Durchfallleiden oder Erbrechen induziert werden (45). Weitere präzipitierende Faktoren sind gastrointestinale Blutungen, Proteinüberschuss, Infektionen, Sedativa vom Diazepam Typ (46), metabolische Azidose und Traumata (Abb. 1) (47).

Die HE-präzipitierende Wirkung dieser recht unterschiedlichen Faktoren beruht dabei darauf, dass sie die Konzentration der HE-relevanten Faktoren Ammoniak, proinflammatorische Zytokine, Hyponatriämie und Benzodiazepine beeinflussen können: So erhöhen z.B. gastrointestinale Blutungen wie auch eine erhöhte Proteinzufuhr über eine Freisetzung von

Protein-gebundenem Ammoniak die Blutammoniakspiegel. Entzündungen hingegen erhöhen die Blutspiegel proinflammatorischer Zytokine.

Die gleichsamer HE-auslösende Wirkung der heterogenen HE-relevanten Faktoren beruht dabei darauf, dass alle sowohl eine Astrozytenschwellung als auch oxidativen Stress induzieren und dabei außerdem synergistisch wirken (Abb. 1) (46).

Dem Ammoniak kommt in der Pathogenese der HE dabei eine Schlüsselrolle zu. Ammoniak fällt im menschlichen Körper in unterschiedlichen Geweben als Stoffwechselprodukt an und wird durch Bakterien im Kolon und dem Jejunum gebildet (10, 48, 49).

Die Entgiftung von Ammoniak erfolgt beim gesunden Menschen hauptsächlich über die Leber (50). Ca. 80% des Ammoniaks im Blut wird in der Leber von den periportalen Hepatozyten in Harnstoff und von den perizentralen Hepatozyten in Glutamin fixiert (21).

In der Skelettmuskulatur wird Ammoniak mithilfe der Glutaminsynthetase (GS) in Glutamin fixiert. Daher wurde vermutet, dass die Erhaltung der Muskelmasse bei Patienten mit Leberzirrhose bedeutsam sein könnte für die Entgiftung von systemischem Ammoniak (21).

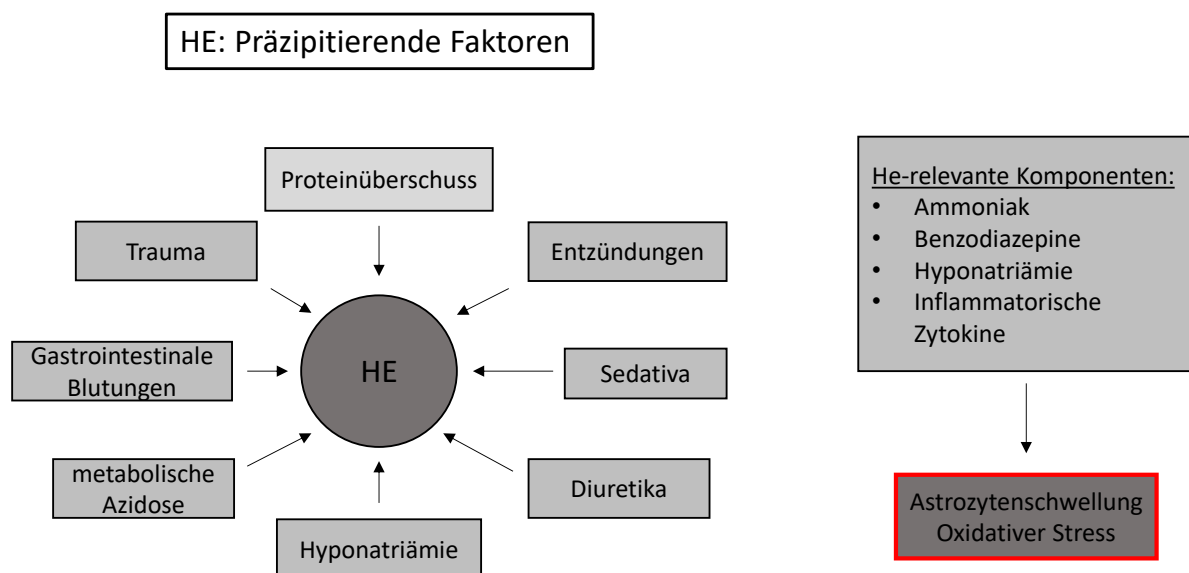


Abbildung 1: HE-präzipitierende und -relevante Faktoren

HE- präzipitierende Faktoren beeinflussen die HE über HE-relevante Faktoren durch Bildung einer Astrozytenschwellung und zerebralem oxidativem Stress in Astrozyten. (modifiziert nach (47) mit Genehmigung des Verlags)

In den Nieren fällt Ammoniak, als Nebenprodukt bei der Desamidierung von Glutamin an. (21). Bis zu 70% des produzierten Ammoniaks können bei Patienten mit Leberzirrhose über die Niere ausgeschieden werden, bei Gesunden sind es ca. 30%. Eine schlechte Nierenfunktion kann deshalb kognitive Beeinträchtigungen bei Patienten mit HE weiter verstärken (10).

Ammoniak wirkt auf unterschiedliche Zelltypen im Gehirn, aber seine Fixierung in Glutamin über die GS erfolgt ausschließlich in Astrozyten (51).

Die Hyperammonämie beim Leberzirrhosepatienten induziert eine Glutaminakkumulation und einen osmotischen Gradienten, der durch eine volumenregulatorische Freisetzung von organischen Osmolyten aus Astrozyten kompensiert wird (41).

Durch Freisetzung des Osmolyten Myo-Inositol können Astrozyten die osmotischen Folgen einer Glutaminakkumulation ausgleichen und so eine Schwellung verhindern. Wenn dieser Mechanismus unter hyperammonämischen Bedingungen erschöpft, reagieren die Astrozyten sensibel auf die schwellungsinduzierende Wirkung weiterer HE-relevanter Faktoren und es kommt zu einer Astrozytenschwellung und Bildung eines geringgradigen zerebralen Ödems (Abb. 2) (52).

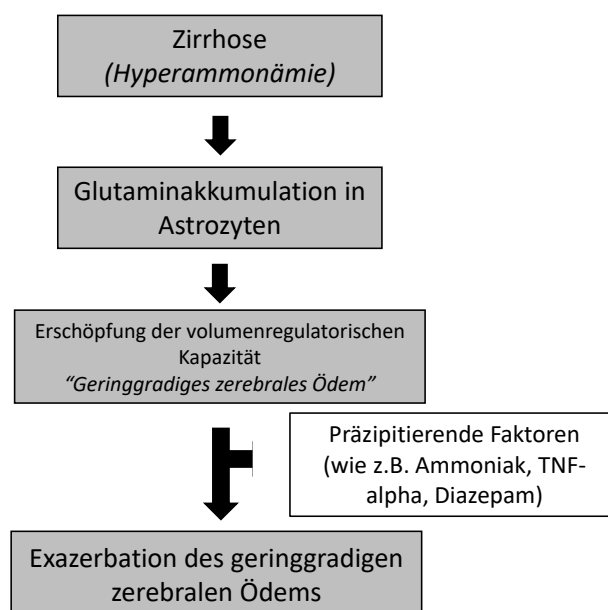


Abbildung 2: Pathogenese der HE: Geringgradiges zerebrales Ödem

Ammoniak und HE-relevante Faktoren erschöpfen die volumenregulatorische Kapazität der Astrozyten und fördern die Bildung eines geringgradigen zerebralen Ödems in Leberzirrhose-Patienten. (modifiziert nach (52), mit Genehmigung des Verlags)

Bei gesunden Patienten können HE-präzipitierende Faktoren hingegen keine Astrozytenschwellung auslösen, da der astrogliale-Osmolyt-Pool noch nicht erschöpft ist.

1.4.2. Osmotischer und oxidativ/nitrosativer Stress bei der HE

Alle HE-relevanten Faktoren wie Ammoniak, Hyponatriämie, Benzodiazepine oder inflammatorische Zytokine induzieren eine Astrozytenschwellung und die Bildung von oxidativ/ nitrosativem Stress (51, 53, 54). Oxidativ/ nitrosativer und osmotischer Stress bedingen sich dabei wechselseitig in den Astrozyten (55). Einerseits führt eine Astrozytenschwellung zu einer erhöhten Bildung reaktiver Stick- und Sauerstoffspezies. Andererseits induziert oxidativer Stress eine Astrozytenschwellung (56). Hierüber wird ein sich selbst verstärkender Kreislauf in Gang gesetzt und eine Reihe von funktionell bedeutsamen Veränderungen hervorgerufen (10, 53, 57). Diese beinhalten die Oxidation von RNA, die Tyrosinnitrierung von Proteinen, Genexpressionsänderungen und Änderungen der Signaltransduktion und der Zinkhomöostase. Diese funktionellen Konsequenzen beeinflussen astrogliale und neuronale Funktionen, beeinträchtigen deren Kommunikation und stören darüber die synaptische Plastizität und oszillatorische Netzwerke im Gehirn. Diese Veränderungen manifestieren sich in der Symptomatik der Patienten (Abb. 3).

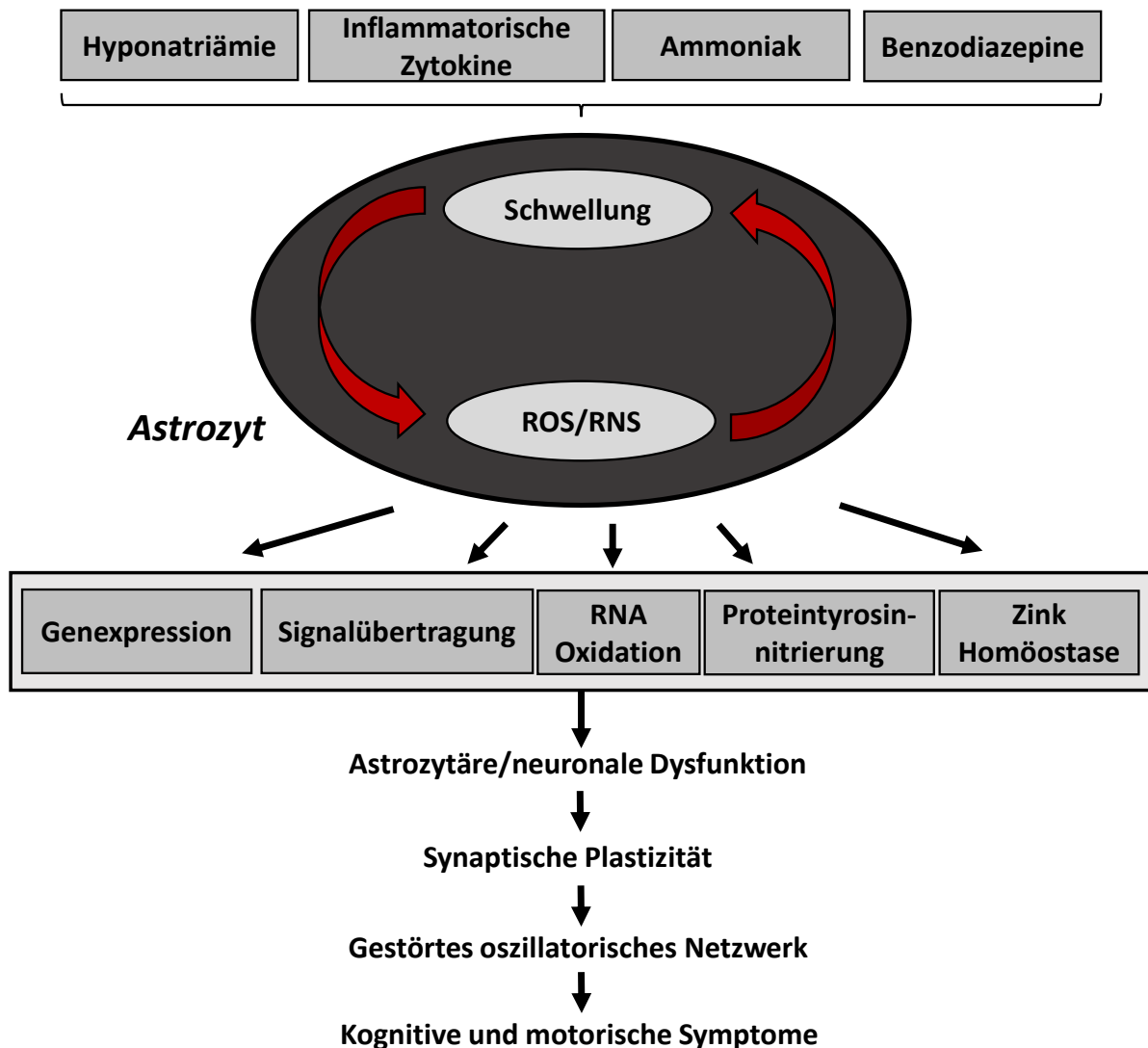


Abbildung 3: Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie

Ammoniak und weitere HE-relevante Faktoren induzieren eine Astrozytenschwellung und die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffspezies (RNS). ROS/ RNS induzieren wiederum eine Astrozytenschwellung und es kommt zu einem sich selbst steigernden Kreislauf, welcher für Astrozytenfunktionen relevante Veränderungen nach sich ziehen: RNA-Oxidation, Proteintyrosinnitrierung, Beeinflussung der Zinkhomöostase, der Genexpression und der Signalübertragung in Astrozyten (modifiziert nach (52), mit Genehmigung des Verlags).

Die zugrundeliegenden Mechanismen wurden intensiv untersucht: In den Astrozyten induzieren HE-relevante Faktoren initial einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration. Der Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle erfolgt dabei über eine Aktivierung von N-methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren über eine Depolarisations-vermittelte Wegnahme der Mg^{2+} -Blockade. Über eine Ca^{2+} -abhängige Glutamat-Exozytose, kommt es dann zu einer Amplifikation der

NMDA-Rezeptoraktivierung. Hierzu tragen auch die Prostanoiden bei, die Ca^{2+} vermittelt gebildet werden und auch die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration weiter verstärken. Die erhöhte Ca^{2+} -Ionenkonzentration aktiviert die NADPH Oxidase (NOX) und die Stickstoffmonoxid Synthase vom neuronalen Typ (nNOS). NOX und nNOS vermitteln die Synthese von Superoxid-Anion-Radikalen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) bzw. von Stickstoffmonoxid ($\text{NO}\cdot$) (51). $\text{O}_2^{\cdot-}$ induziert die Oxidation von RNA in Astrozyten und kann hierüber vermutlich die Translation beeinträchtigen. Das gebildete $\text{NO}\cdot$ mobilisiert Zn^{2+} -Ionen aus Proteinen über die S-Nitrosylierung von Zink-Thiolat Clustern. Hierüber wird die Transkription unterschiedlicher Gene, wie z.B. von Metallothioneinen (MT) oder dem peripheren Benzodiazepinrezeptor (PBR) aktiviert (51). $\text{O}_2^{\cdot-}$ und $\text{NO}\cdot$ rekombinieren zu Peroxynitrit-Anion (ONOO^-) welches instabil ist und über Zerfallsprodukte eine Tyrosinnitrierung von Proteinen in Zellen induziert und hierüber die spezifischen Aktivitäten zahlreicher Proteine, wie z.B. die der GS oder des Na-K-Cl Kotransporters (NKCC1), beeinflusst (14) (Abb. 4).

1.4.3. RNA-Oxidation bei der HE

Oxidierter RNA ist ein sehr sensitiver *Surrogat-Marker* für oxidativen Stress (57).

RNA ist deutlich empfindlicher gegenüber oxidativem Stress als DNA, da sie nur aus einem einzigen Strang und nicht wie die DNA, aus zwei Strängen besteht wo eine Korrektur über eine Matrize erfolgen kann. RNA ist auch nicht wie die DNA an Histone gebunden, welche eine Schutzfunktion ausüben können, indem sie die Nucleinsäuren wie vor reaktiven Verbindungen abschirmen.

Einige Arbeiten zeigen, dass die RNA-Oxidation die Translations-Effizienz vermindern kann und die Genauigkeit der Translation beeinträchtigt (57). Hierüber kann es zur Bildung von fehlerhaften oder nicht funktionsfähigen Proteinen kommen (54).

1.4.4. Proteintyrosinnitrierung

Einige RNOS-Spezies, wie z.B. Peroxynitrit (ONOO^-), können eine Nitrierung von Tyrosinresten in Proteinen induzieren. In mit Ammoniak-behandelten Astrozyten wurden unter den Tyrosin-nitrierten Proteinen die GS, der periphere Benzodiazepin-Rezeptor (PBR), die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), die extrazellulär regulierte Kinase

ERK-1 (58, 59) und der Na-K-Cl-Kotransporter (NKCC1) gefunden (51, 60). Die Tyrosinnitrierung kann die Funktion von Proteinen in verschiedenster Art und Weise beeinflussen (51). Die Tyrosinnitrierung der GS vermindert deren enzymatische Aktivität (59). Beim NKCC1 hingegen steigert eine Tyrosinnitrierung dessen Transportaktivität, ähnlich wie bei seiner Phosphorylierung (51, 60). Eine verstärkte Tyrosinnitrierung von Proteinen wurde auch im Gehirn Ammoniumazetat-behandelter Ratten in perivaskulären Astrozyten gefunden. Diese konstituieren die Bluthirnschranke, so dass diese Beobachtung in Verbindung gebracht wurde mit einer Permeabilitätsänderung der Bluthirnschranke, welche die Ausbildung eines zerebralen Ödems begünstigen könnte (61-63). Auch im Gehirn von Ratten nach partieller Portalvenenligatur sowie in leberspezifischen GS-Knockoutmäusen, die beide erhöhte, systemische Ammoniakspiegel haben, wurde eine verstärkte Tyrosinnitrierung im Gehirn gefunden (64).

1.4.5. Freisetzung von in Proteinen gebundener Zinkionen

In Proteinen wird Zink (Zn^{2+}) über Thiole des Cysteins komplexiert. Nitrosativer Stress kann diese Zink-Thiolat-Cluster zerstören und eine Freisetzung der Zinkionen bewirken. Hierdurch erhöht sich die Konzentration an freien Zinkionen in der Zelle. Da viele Transkriptionsfaktoren über Zinkfinger an die DNA binden, kann hierüber die Genexpression beeinflusst werden (65).

Zink spielt eine bedeutsame Rolle für die neuronale Aktivität im Gehirn. Dabei beeinflusst Zn^{2+} vor allem die Langzeitpotenzierung und die synaptische Plastizität. Dies erklärt, warum Zinkmangel Lern- und Gedächtnisstörungen vermitteln kann (66). Einige Studien zeigen, dass systemischer Zinkmangel auch bei der hepatischen Enzephalopathie auftreten kann (67).

Ein Zinküberschuss ist in Zusammenhang mit Hirnschäden und neurodegenerativen Störungen gebracht worden (68). Durch eine hypoosmotische Zellschwellung werden in Astrozyten sehr rasch Zinkionen aus Proteinen freigesetzt. Dabei wurden erhöhte Spiegel freier Zinkionen im Zytosol, in den Mitochondrien und auch im Nukleus, gefunden (69).

Neben der hypoosmotisch-induzierten Astrozytenschwellung, erhöhen auch andere HE-relevanten Faktoren wie Ammoniak, Diazepam und TNF- α die Konzentration freier Zinkionen in den Astrozyten (69). Dies lässt vermuten, dass die unterschiedlichen HE-relevante Faktoren über eine Astrozytenschwellung und der damit vergesellschafteten Bildung von reaktiver Stickstoffspezies (RNS) die intrazelluläre Konzentration freier Zn²⁺-Ionen erhöht (54).

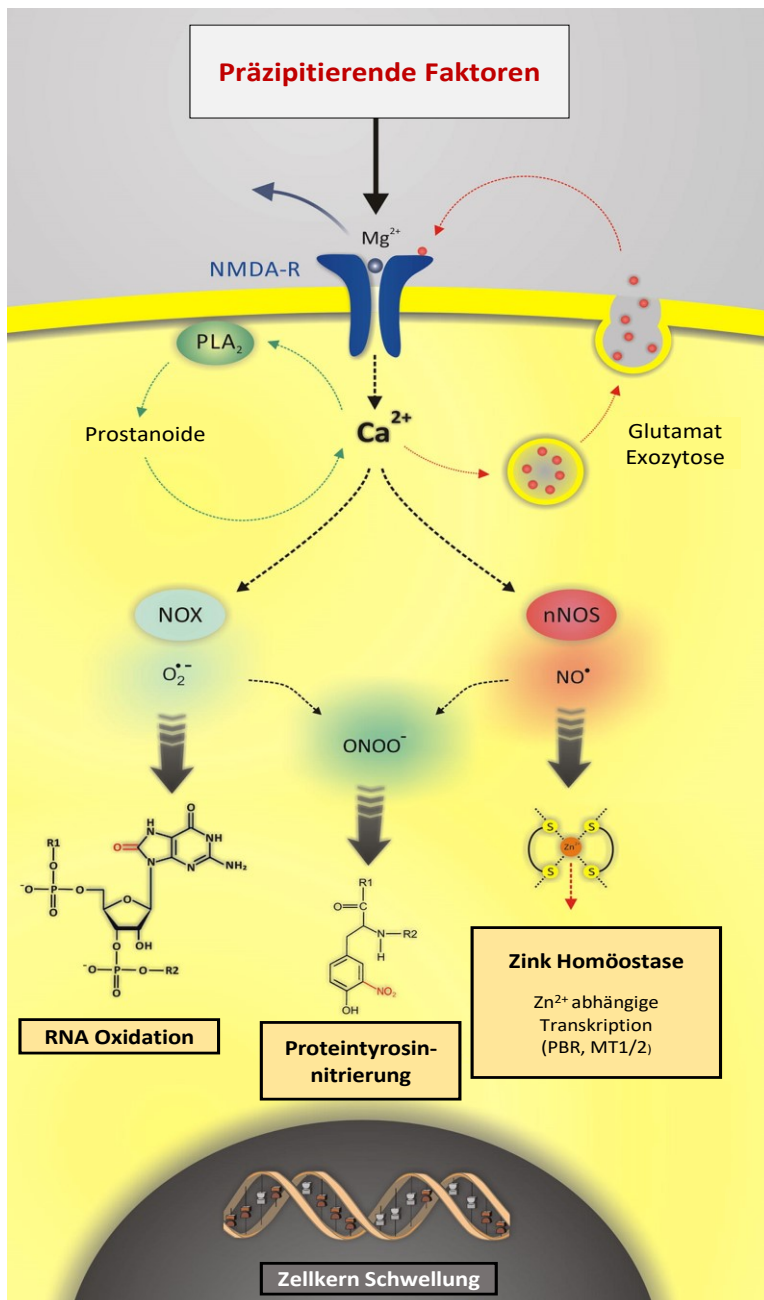


Abbildung 4: Mechanismus der durch HE-präzipitierende Faktoren induzierten Bildung von oxidativ/ nitrosativem Stress und hieraus resultierender RNA-Oxidation, PTN und zinkabhängigen Gentranskription.

Infolge der Bildung von Prostanoiden und der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren durch eine initiale depolarisationsinduzierte Aufhebung der Mg^{2+} -Blockade und anschließende Amplifikation der NMDA-Rezeptor-Aktivierung durch Ca^{2+} -abhängige Glutamat-Exozytose, kommt es zu einer Erhöhung der intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Diese Konzentrationssteigerung führt zu einem sich selbst verstärkenden Kreislauf aus Astrozytenschwellung und oxidativ/ nitrosativem Stress, welcher durch präzipitierende Faktoren induziert wird. In der Folge wird über die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration die Synthese von Superoxid-Anion-Radikalen ($O_2^{\cdot-}$) und Stickstoffmonoxid ($NO\cdot$) durch die Aktivierung der NADPH Oxidase (NOX) und der Stickstoffmonoxid Synthase vom neuronalen Typ (nNOS), getriggert. $O_2^{\cdot-}$ vermittelt die Oxidation von RNA in Astrozyten und kann hierüber die Translation beeinträchtigen. Das gebildete $NO\cdot$ triggert die Mobilisation von Zn^{2+} -Ionen aus Proteinen über die S-Nitrosylierung von Zink-Thiolat Clustern und aktiviert hierüber die Transkription unterschiedlicher Gene, wie von Metallothioneinen (MT) oder dem peripheren Typ des Benzodiazepinrezeptors (PBR). $O_2^{\cdot-}$ und $NO\cdot$ rekombinieren zu Peroxynitrit-Anion ($ONOO^-$) welches eine Tyrosinnitrierung von Proteinen in Zellen induzieren und hierüber die Funktionen zahlreicher Proteine beeinflussen kann. Präzipitierende Faktoren fördern die Bildung von reaktiven Stick- und Sauerstoffspezies und bedingen so eine Schwellung des Zellkerns (modifiziert nach (51), mit Genehmigung des Verlags).

1.5. Astrozytenseszenz

Neuere Untersuchungen zeigen, dass Ammoniak vorzeitige (prä-mature) Seneszenz in Astrozyten induziert (70).

Die Seneszenz ist dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen die Fähigkeit zu proliferieren verlieren, aber dennoch nicht sterben. Sie wird durch verschiedene Arten von Stress ausgelöst. Hierzu zählen Zytostatika, Zellkultivierung, oxidativer Stress und andere Faktoren. Seneszenz kann insbesondere auch durch eine Schädigung der DNA ausgelöst werden (71). Dies wurde als ein Schutzmechanismus interpretiert, der verhindert, dass potenziell geschädigte Zellen proliferieren. Im Gegensatz zur replikativen Seneszenz kann die vorzeitige Seneszenz reversibel sein, wenn die auslösenden Faktoren beseitigt werden (72).

Ammoniak hemmt konzentrationsabhängig die Proliferation der Astrozyten und steigert die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase. Die Astrozytenproliferation wird über ROS- und p38MAPK-abhängige Aktivierung von p53 inhibiert. Diese steigert die Transkription der zellzyklushemmenden Gene p21 und GADD45 α (Abb. 5) (70, 73).

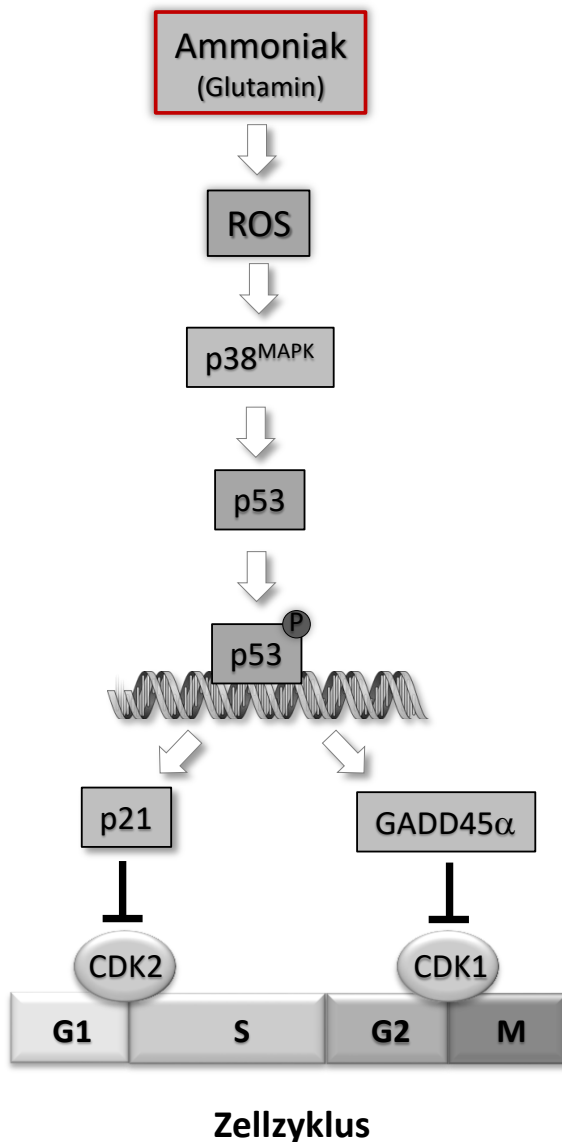


Abbildung 5: Mechanismen der Ammoniak-induzierten Seneszenz.

Ammoniak aktiviert über die Bildung von ROS die p38MAP-Kinase, welche die p53 phosphoryliert und hierüber deren Akkumulation im Zellkern bewirkt. Die Phosphorylierung führt zur gesteigerten Genexpression der Zellzyklus-inhibierenden Gene p21 und GADD45 α . Der Zellzyklus wird dadurch unterbrochen und die Zelle wird seneszent. (modifiziert nach (73), mit Genehmigung des Verlags)

1.6. Rolle von microRNAs und der HO1 für durch Ammoniak induzierte Astrozytenseneszenz

Die Arbeiten der Arbeitsgruppe von Professor Häussinger haben gezeigt, dass die durch Ammoniak induzierte Astrozytenseneszenz durch die Hämoxigenase 1 (HO1) vermittelt wird (73). Die HO1 wird in mit Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten und in

unterschiedlichen Tiermodellen für HE hochreguliert und eine gesteigerte mRNA-Expression wurde auch in *post mortem* humanen Hirnproben von Patienten mit Leberzirrhose und HE, nachgewiesen (74, 75).

Kürzlich durchgeführte Untersuchungen weisen auf eine Rolle von microRNAs (miRNAs) für die Hochregulation der HO1 in mit Ammoniak-behandelten Astrozyten (76).

MicroRNAs sind kleine nicht-kodierende RNA-Fragmente, welche die Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene regulieren. Die miRNA bindet an die 3' untranslatierte Region (3'UTR) der mRNA von Zielgenen und überbrückt hier die Bindung des RNA-*induced silencing complex* (RISC) an die Zielsequenz (77). Der RISC kann spezifische Proteine ausschalten oder deren Konzentration verringern, indem er entweder die mRNA abbaut oder die Translation des Proteins hemmt (77). Man geht davon aus, dass die individuelle Ziel-mRNA über die Bindung mit der jeweiligen miRNA koreguliert wird (78). So kann die miRNA-Aktivität multiple biologische Funktionen, wie z.B. Apoptose (79) oder Zelldifferenzierung (80), beeinflussen und eine Dysfunktion der miRNA Expression ist somit mit unterschiedlichen Erkrankungsbildern und neurologischen Störungen assoziiert (81).

In kultivierten Rattenastrozyten steigert Ammoniak die HO1-Expression durch eine Herabregulation der miRNA-Spezies miR-221-3p, -221-5p, -222-3p oder -326-3p. Weitere Untersuchungen zeigten, dass reaktive Sauerstoffspezies die Spiegel dieser miRNA-Spezies regulieren und sie demnach der Gruppe der RedoximiRs zugeordnet werden können (76).

Die HO1 katalysiert die Bildung von Kohlenmonoxid, Fe(II) und Biliverdin aus Häm (Abb. 6). Die HO1 befindet sich innerhalb der Zelle überwiegend an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) (82).

Die RNOS steigern die mRNA- und Proteinspiegel der HO1. Daher wird sie oft als Biomarker für oxidativen/ nitrosativen Stress verwendet (83).

Gleichzeitig kann sie selbst über die Freisetzung von Eisenionen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der sogenannten Fenton-Reaktion beitragen (83).

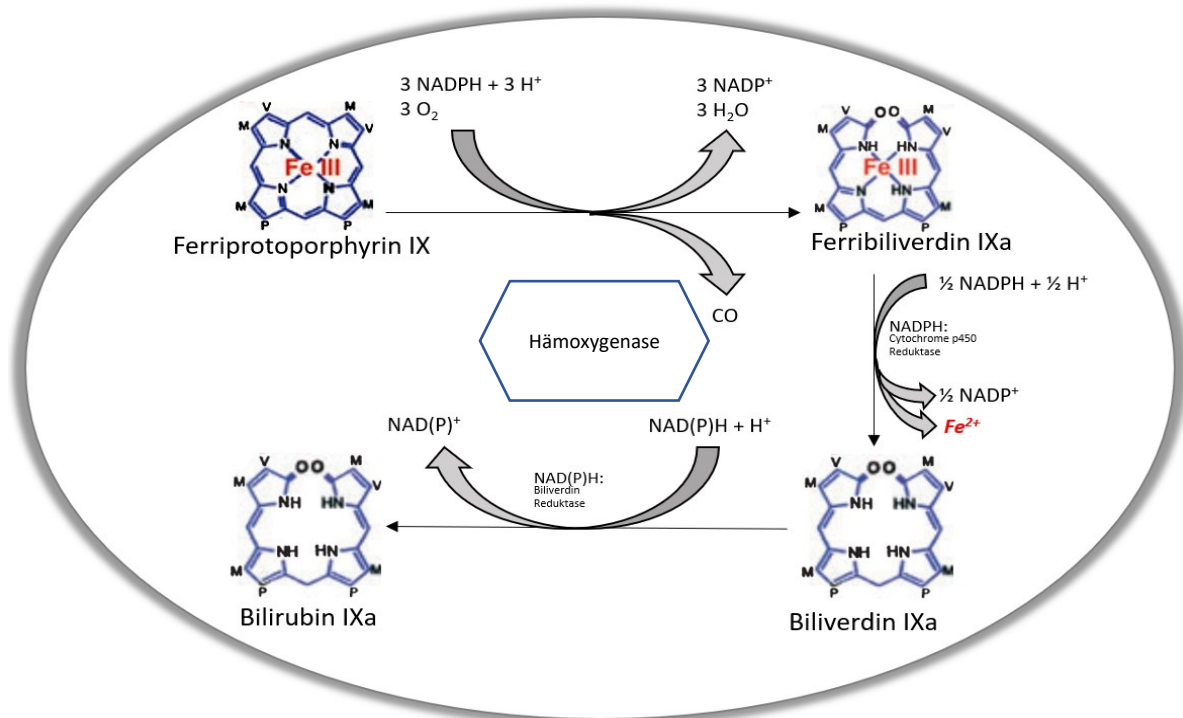


Abbildung 6: Abbau von Häm

Abbau von Häm zu Biliverdin, Kohlenmonoxid und zweiwertigen Eisenionen durch die Hämoxigenase. Biliverdin kann nachfolgend weiter zu Bilirubin umgewandelt werden. (modifiziert nach (82), mit Genehmigung des Verlags)

In der Literatur finden sich viele Berichte, die einerseits protektive und andererseits die Pathogenese anderer Erkrankungen verstärkende Wirkungen der HO1 beschreiben. Die protektiven Wirkungen werden überwiegend in Zusammenhang gebracht mit der Bildung von Biliverdin. Biliverdin und das daraus gebildete Bilirubin sind potente Antioxidantien die reaktive Stickstoff- und Sauerstoffspezies neutralisieren können (84). Demgegenüber wurde die Freisetzung von Eisenionen in Zusammenhang mit pro-oxidativen Effekten gebracht.

Unter pathophysiologischen Bedingungen kann Häm in großen Mengen freigesetzt werden (85). Da freies Häm sehr hydrophob ist, lagert es sich leicht an Zellmembranen an und kann dort z.B. durch Induktion von Lipidperoxidation die Zelle schädigen (86, 87). Um einem Überfluss an freiem Häm und dessen pro-oxidativen Wirkungen entgegenzuwirken, kommt es zu einer Steigerung der Expression der HO1 und hierüber zu einer Induktion des Abbaus von Häm (87).

Um toxischen Wirkungen von Eisenionen, die aus Häm durch die HO1 freigesetzt werden, entgegenzuwirken, kann der endogene Eisenchelator Ferritin hochreguliert werden (82, 88). Ist dieser Mechanismus nicht ausreichend, können in der Folge freie Eisenionen die intrazelluläre ROS-Bildung über die sogenannte Fenton-Reaktion verstärken (88, 89). Im Gehirn wird die HO1 im Falle einer Schädigung z.B. durch ein Trauma am stärksten in Astrozyten hochreguliert (90, 91).

Die HO1 kann auch unabhängig von einer Eisenionenfreisetzung den Verlauf einiger Erkrankungen negativ beeinflussen. Ein Beispiel hierfür ist der Kernikterus. Es ist bekannt, dass eine zu hohe Konzentration an Bilirubin bei einem neonatalen Kernikterus irreversible neurologische Störungen induziert (82). Dies kann durch eine Gabe von Metalloporphyrin, einem kompetitiven HO1-Inhibitor, oder durch eine Phototherapie, die das Bilirubin aufspaltet, verhindert werden (82).

Neben der HO1 gibt es eine weitere Isoform, die HO2, die insbesondere in einigen Subpopulationen von Neuronen im Gehirn konstitutiv exprimiert wird. Unter physiologischen Bedingungen ist die HO1 nur in sehr wenigen Zellen in geringer Menge, hauptsächlich in Neuronen des Kleinhirns, des *Thalamus*, *Hypothalamus*, im Hirnstamm, im *Hippocampus*, im *Gyrus dentatus* und im Kortex exprimiert (84, 92, 93). Die HO2 wird im Gehirn unter physiologischen Bedingungen stärker als die HO1 exprimiert. Die höchsten Proteinspiegel der HO2 finden sich in den Pyramidenzellen des *Hippocampus* und dem *Gyrus dentatus*.

1.7. Mechanismen der Eisenhomöostase

Eisen spielt als Komponente von Hämgruppen und Eisen-Schwefel-*Clustern* eine essenzielle Rolle, für den Transport von Sauerstoff und Elektronen in der Atmungskette und Eisen ist an einer Vielzahl weiterer enzymatischer Reaktionen beteiligt (94).

Im Darm werden an Hämin gebundene Eisenionen mithilfe des Häm-*Carrier-Proteins* (HCP1) aufgenommen (95). Im Blut werden Eisenionen an Transferrin gebunden und mithilfe des Transferrin-Rezeptors in die Zellen aufgenommen. Neben dem Transferrin-System existieren

noch weitere Transportsysteme für Eisenionen, wie die Eisen-bindenden Proteine Lactoferrin und Melanotransferrin. Wenn Fe^{2+} an das *poly(rC)-binding protein* PCBP gebunden ist, dann kann es über den *divalent metal transporter 1* (DMT1) von unterschiedlichen Zelltypen ins Blut aufgenommen werden (96-98) oder über DMT1 aus den endosomalen Kompartimenten der Zelle in das Zytosol ausgeschleust werden (99).

Die Konzentration an Eisen ist im Gehirn sehr hoch und die Blut-Hirn-Schranke spielt eine wichtige Rolle für die Regulation des Eisenaustauschs zwischen Blut und Neuropil (99). Astrozyten bilden in den großen Gefäßen des Gehirns, zusammen mit den Endothelzellen, die Blut-Hirn-Schranke und können hierüber den Stofftransport beeinflussen. Diese Funktion der Astrozyten schützt vor der unkontrollierten Diffusion von Toxinen und ermöglicht den gerichteten Transport von Eisenionen über die Blut-Hirn-Schranke über spezifische Eisentransporter (Abb. 7) (99).

Eisen ist im Gehirn Kofaktor einer Vielzahl von Enzymen, die in Prozessen wie Energiemetabolismus, Neurotransmittersynthese und Myelinisierung eine bedeutende Rolle spielen. Im Gehirn ist die Eisenkonzentration in Oligodendrozyten am höchsten, da diese es für die Synthese von Myelin benötigen. Hier sind hohe Mengen an Eisenionen in Ferritin komplexiert (100).

Eine hohe Konzentration an freien Eisenionen kann biologische Systeme durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) schädigen. Um dies zu verhindern, komplexiert und speichert die Zelle überschüssige Eisenionen redox-inaktiv an Ferritin gebunden (Abb. 7) (96). Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson, Morbus Friedreich und dem Halleorden-Spatz-Syndrom, wurden hohe Spiegel an freien Eisenionen in spezifischen Hirnregionen nachgewiesen und in Zusammenhang mit der Pathogenese der Erkrankungen gebracht (97, 101-103).

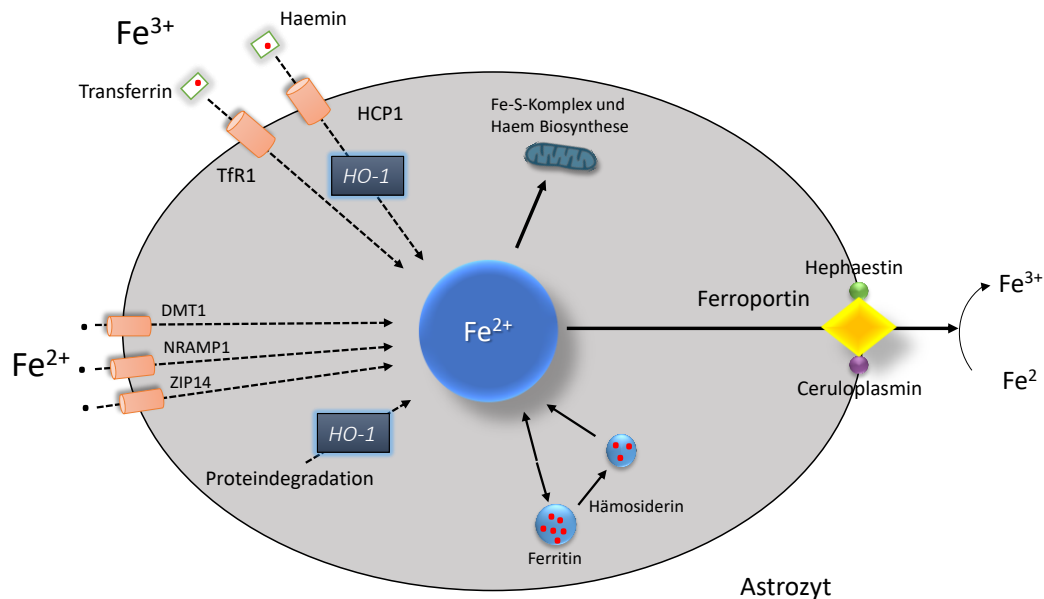


Abbildung 7: Mechanismen der Aufnahme, Abgabe und Speicherung von Eisenionen
(modifiziert nach (104), mit Genehmigung des Verlags)

Neben einem Eisenüberschuss, kann auch ein Eisenmangel neuronale Funktionen beeinträchtigen. Ein zerebraler Eisenmangel nach perinataler oder postnataler Eisendefizienz, kann permanente kognitive und motorische Störungen bedingen (105). Daher müssen der Eisentransport und die Eisenspeicherung präzise reguliert werden (Abb. 7) (97, 106).

1.7.1. Eisenaufnahme

Die Aufnahme von Eisen über den TfR und die Speicherung an Ferritin wird über die Eisenregulationsproteine „*Iron responsive proteins*“ (IRPs) gesteuert. Eine verminderte intrazelluläre Eisenkonzentration führt dazu, dass die IRPs an Eisen-*responsive*-Elemente in der mRNA des Transferrinrezeptors oder Ferritin binden, und dabei die Translation der Ferritin mRNA inhibieren und die TfR mRNA stabilisieren (96). Folglich führt ein Eisenmangel zu einer reduzierten Bildung des Ferritinproteins und einer gesteigerten Synthese des Transferrinrezeptorproteins. Umgekehrt, stimuliert ein Überschuss an intrazellulären ungebundenen Eisenionen, die Ferritinproteinsynthese und inhibiert die Synthese des Transferrinrezeptors TfR und die Synthese von DMT1 (96, 100). DMT1 ist ein wichtiger Eisentransporter für nicht-Häm-Eisen in vielen verschiedenen Zelltypen (107).

In vivo ist DMT1 auf astrozytären Endfüßen exprimiert, welche die Kapillaren auskleiden. Die Regionen im Gehirn, in denen eine starke Expression von DMT1 nachgewiesen wurde sind, der zerebrale Kortex und der *Hippocampus* (108, 109).

Eine weitere extrazelluläre Eisenquelle ist Hämin, die oxidierte Form von Häm. Im Gehirn wird Hämin aus degenerierten Nervenzellen oder aus Blutzellen freigesetzt (99). Astrozyten nehmen Hämin über den HCP1 Transporter als intaktes Metalloporphyrin auf. Im Zytosol kann freies Hämin durch die HO1 zu Biliverdin unter Freisetzung von zweiwertigen Eisenionen und Kohlenmonoxid oxidiert werden(99).

1.7.2. Eisenspeicherung

Intrazellulär werden Eisenionen an Ferritin gebunden gespeichert. Dieses setzt sich zusammen aus sogenannten „heavy“ und „light“ Untereinheiten die einen Komplex aus 24 Untereinheiten bilden. Pro Komplex können bis zu 4500 Fe^{3+} -Ionen gebunden werden (96, 100, 110). Die schwere Kette (H-Ferritin) besitzt eine Ferroxidase-Aktivität und kann hierüber Fe^{2+} in Fe^{3+} überführen, welches redox-inaktiv ist und gespeichert werden kann. Für die Freigabe der Eisenionen aus dem Ferritinkomplex müssen diese wieder reduziert werden (99).

Ferritin wird posttranskriptionell über die Eisenverfügbarkeit reguliert (108).

Kultivierte Astrozyten exprimieren nur geringe Mengen an Ferritin, die weiter erniedrigt werden können durch Behandlung mit einem Eisenchelator (100).

Nach Zugabe von Ammoniumeisen-(III)-zitrat, Hämoglobin, Hämin oder Eisensulfat, steigt die Expression von Ferritin innerhalb von wenigen Stunden stark an (100, 111).

1.7.3. Eisenexport

Ferroportin (FPN) ist derzeitig der einzige bekannte Eisenexporter in Säugetieren (112). Der FPN-vermittelte Export von zweiwertigen Eisenionen ist abhängig von Ceruloplasmin (CP), einer extrazellulären Ferroxidase, die Fe^{2+} zu Fe^{3+} oxidiert (Abb. 7) (113).

Das Ceruloplasmin ist hierfür essenziell (114). Bei Patienten mit Aceruloplasminämie, eine autosomal rezessive Erkrankung des Eisenstoffwechsels, bei der eine Mutation des CP-Gens

vorliegt, ist der Ceruloplasmin-Gehalt in den Zellen verringert. Dies führt zu einer Akkumulation von Eisenionen in den Astrozyten im zerebralen Kortex (115).

1.8. Arbeitshypothese

Oxidativer Stress und Astrozytenseneszenz spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie. Der vorliegenden Arbeit liegt die Arbeitshypothese zugrunde, dass Ammoniak die Eisenhomöostase in kultivierten Rattenastrozyten beeinflusst und dass eine Störung der Eisenhomöostase im Zusammenhang mit der Bildung von oxidativem Stress und Seneszenz steht.

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten Effekte von Ammoniak auf die Expression von für den Eisenstoffwechsel-relevanten Genen und Proteinen und der intrazellulären Konzentration freier Eisenionen untersucht werden. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob eine durch Ammoniak in Astrozyten herbeigeführte Änderung der Eisenionenkonzentration im Zusammenhang steht mit der Bildung von oxidativem Stress und Seneszenz.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

Tabelle 3: Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

| Name | Hersteller | Kat Nr. |
|---|--|----------|
| 2,2'-Bipyridin (BIP) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) | D216305 |
| 3'-(Diethylamino)-N,N-Diethyl-3-Oxo-3H-Spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-6'-Amin Oxid (RhoNox™-1) | Goryo Chemical (MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland) | GC 901 |
| Zellkulturmedium DMEM (<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>) (1000mg/l D-Glucose, GlutaMAX™) | Life Technologies (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) | 25030081 |
| dNTP Mix (Desoxyribonukleosidtriphosphat) | Promega (Mannheim, Deutschland) | U1205 |
| Fe (II)Cl ₂ -Tetrahydrat | Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) | 372870 |
| <i>Fetal bovine serum</i> (FBS) | Biochrom (Berlin, Deutschland) | S0415 |
| GoTaq SYBR® Green Mix | Promega (Mannheim, Deutschland) | A6002 |
| Hämin | Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) | H9039 |
| Hoechst34580 | Life Technologies (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) | H21486 |
| L-Methionin Sulfoximin (MSO) | Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) | M5379 |
| NH ₄ Cl | Merck (Bad Soden, Deutschland) | A9434 |
| Phosphinotricin (PPT) | AK Scientific Inc. (Union City, CA, USA) | O214 |
| <i>Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone</i> | Merck (Bad Soden, Deutschland) | 528110 |

| | | |
|--|--|-------------|
| (PIH) | | |
| <i>Phosphate buffered saline (PBS)</i> | PAN-Biotech (Aidenbach, Deutschland) | P0435500 |
| <i>QuantiTect Reverse Transcription</i> | Qiagen (Hilden, Deutschland) | 205310 |
| <i>Rhodamine B-[(2,2'-bipyridine-4-yl)-aminocarbonyl] benzyl ester (RDA)</i> | <i>Squarix Biotechnology</i> (Marl, Deutschland) | ME042.1 |
| <i>RNase Inhibitor</i> | <i>Thermo Fisher Scientific</i> (Waltham, USA) | N8080119 |
| <i>RNeasy Mini Kit</i> | Qiagen (Hilden, Deutschland) | 74106 |
| <i>Triton X-100</i> | Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) | 11332481001 |

2.2. Antikörper

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

| Antikörperspezifität | Hersteller | Kat. Nr. | Klon Nr. |
|----------------------------------|--|-------------|------------|
| FPN | Novus Bio (Wiesbaden, Deutschland) | NBP1-21502 | 30061 |
| CP | Abcam (Cambridge, UK) | ab110449 | 3B11 |
| Hephaestin | Abcam (Cambridge, UK) | ab108003 | 2D3 |
| Ferritin | Novus Bio (Wiesbaden, Deutschland) | NBP2-11536 | 3F8 |
| Phospho-Serin ³⁹² p53 | Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) | SAB4301466 | TP53(7157) |
| p21 | Thermo Fisher | AHZ0422 | HJ21 |
| 8OH(d)G | QED BioScience Inc. (San Diego, USA) | 12501 | 15A3 |
| Anti-Maus FITC | Dianova (Hamburg, Deutschland) | 715-096-150 | - |

| | | | |
|---------------------|-----------------------------------|-------------|---|
| Anti-Maus Cy3 | Dianova (Hamburg, Deutschland) | 115-166-062 | - |
| Anti-Kaninchen Cy3 | Dianova (Hamburg, Deutschland) | 711-166-152 | - |
| Anti-Kaninchen FITC | Dianova (Hamburg, Deutschland) | 711-096-152 | - |

2.3 Reagenzien für die quantitative PCR

Tabelle 5: In der vorliegenden Arbeit verwendete Primer Sequenzen für die quantitative PCR.

| Name | Primer-Sequenz | Hersteller |
|------------------------|--|---|
| 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) |
| p21 <i>forward</i> | 5'-GAG GCC TCT TCC CCA TCT TCT-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| p21 <i>reverse</i> | 5'-AAT TAA GAC ACA CTG AAT GAA GGC TAA G-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| HO1 <i>forward</i> | 5'-CGG CCC TGG AAG AGG AGA TAG-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| HO1 <i>reverse</i> | 5'-CGA TGC TCG GGA AGG TGA AAA-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| GADD45α <i>forward</i> | 5'-TCT GTT GCG AGA ACG ACA TC-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| GADD45α <i>reverse</i> | 5'-TGT GAT GAA TGT GGG TTC GT-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| FPN <i>forward</i> | 5'-CCC TGC TCT GGC TGT AAA AG-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |

| | | |
|---------------------------|---|---|
| <i>FPN reverse</i> | 5'-GCA CAG GTG GGT TCT TGT TC-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| <i>CP forward</i> | 5'-CAA ACG CCT GGA ACC TGG TTA CTC-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| <i>CP reverse</i> | 5'-ATG TTC CAG GTC ATC CTG TAG CTC TG-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| <i>sCP forward</i> | 5'-GGA ATT GGT AAT GCC GAT GGA CAG A-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| <i>sCP reverse</i> | 5'-ATT TGT TGC CAC TTT GCA GAG TCC T-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| <i>Ferritin forward</i> | 5'-GCC CTG AAG AAC TTT GCC AAA T-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| <i>Ferritin reverse</i> | 5'-TGC AGG AAG ATT CGT CCA CCT-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| <i>Hepcidin forward</i> | 5'-GGC AAC AGA CGA GAC AGA CT-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| <i>Hepcidin reverse</i> | 5'-AAC AGA GAC CAC AGG AGG AA-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| <i>Hephaestin forward</i> | 5'-TAG CTG GCA CCT TGA TGA CAA CAT T-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |
| <i>Hephaestin reverse</i> | 5'-CAA CTC GGG TAA GTT CCC AAA GAC A-3' | Eurofins Scientific (Ebersberg, Deutschland) |

2.4. Materialien und Geräte

Tabelle 6: Übersicht zu den in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Geräte.

| Material und Geräte | Hersteller |
|----------------------------------|---|
| 24-Wellplatte | Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland |
| 96-Wellplatte | Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien |
| <i>Cell Strainer, 70µM Nylon</i> | Falcon, Heidelberg, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Deckgläser für die Mikroskopie | Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim, Deutschland |
| Einkanal-Pipetten | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Einmalspritze (1ml, 20ml, 50ml) | Braun, Melsungen, Deutschland |
| Fiji Distribution, ImageJ | Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA |
| Glaspipetten | Brand, Wertheim, Deutschland |
| Ibidi-Schale (Ø35mm, Plastik, Glas) | Ibidi, Planegg, Deutschland |
| MatTek-Schale (Ø60mm, Plastik, Glas) | MatTek Corporation, Ashland, USA |
| Objektträger für die Mikroskopie | Engelbrecht, Edermünde, Deutschland |
| Pipettenspitzen | StarLab, Ahrensburg, Deutschland |
| <i>QIAshredder</i> Säulen | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Röhrchen (Greiner, 14ml, 50ml) | Falcon, Heidelberg, Deutschland |
| <i>RNeasy Mini Kit</i> | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Sterilfilter (Filtropur, 0,20µm) | Millipore, Eschborn, Deutschland |
| Stripetten (5, 10, 25ml) | Corning Costar GmbH, Bodenheim |
| Zellkulturflasche (cellstar) | Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland |
| Zellkulturschalen (Ø60mm, Ø100mm) | Falcon, Heidelberg, Deutschland |
| Zellschaber | Corning Costar GmbH, Bodenheim |
| Zentrifugationsröhrchen (Ø13x51mm, Plastik) | Beckman, Krefeld, Deutschland |
| Analysenwaage (Kern 770) | Kern & Sohn, Balingen-Frmern, Deutschland |
| Brutschrank (Heracell150) | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| First Strand cDNA-Synthesis-Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| Fluorimeter (Fluoroskan Ascent™ FL) | Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland |
| Magnetrührer (MR 2000) | Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland |
| Nanodrop (1000 Spectrophotometer) | NanoDrop Technologies, Wilmington, USA |

| | |
|---|---|
| CellObserver Z1 | Carl Zeiss, Oberkochen, Germany |
| Phasenkontrast-Mikroskop (AXIO Vert.A1) | Zeiss, Jena, Deutschland |
| pH-Meter (330) | WTW , Weilheim, Deutschland |
| Präzisionswaage Kern (440-47N) | Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland |
| Roller (SRT1) | Stuart Scientific, Staffordshire, USA |
| Schlauchpumpe (505 S) | Watson-Marlow, Rommerskirchen, Deutschland |
| Schüttler (GFL-3017) | Hilab, Düsseldorf, Deutschland |
| Spektrophotometer (Ultrospec 2100 pro) | Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland |
| Ultrazentrifuge (J2-HS) | Beckman Coulter Inc., Krefeld, Deutschland |
| Zentrifuge (5415D) | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Zentrifuge (Rotina 420R) | Hettich, Tuttlingen, Deutschland |

2.5. Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus dem zerebralen Kortex der Ratte

Die Gewinnung von primären Astrozyten erfolgte aus Großhirnhemisphären von neugeborenen Wistar-Ratten (116). Nach der Enthauptung wurde der Schädel für 10 Sekunden in eine 70%ige Ethanollösung eingetaucht und anschließend die Kopfhaut entfernt. Danach wurde der Schädel eröffnet, das Gehirn entnommen und die Großhirnhälften an der Sagittallinie mit einem Skalpell unter Verwendung einer Stereolupe getrennt. Die Meningen wurden mit zwei Pinzetten von den Großhirnhälften gelöst und entfernt.

Der zerebrale Kortex wurde präpariert und das gewonnene Material mit einem Skalpell zerkleinert und in 10ml DMEM + 10% Penicillin/Streptomycin und 10% fötales Kälberserum (FBS) aufgenommen und 1 Minute bei 1500 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellsuspension und das Gewebepellet wurden in 2ml frischem

Zellkulturmedium (1% Penicillin/Streptomycin + 10% FBS) aufgenommen und nachfolgend mittels einer Pasteurpipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren titriert, anschließend wurden 8mL DMEM (1000mg/l D-Glucose und GlutaMAX™) hinzugefügt. Diese Zellmischung wurde dann durch eine sterile Nylongaze mit 60µm Maschenweite filtriert, um große Zellklumpen von den vereinzelt Zellen abzutrennen und zu entfernen. Die hierdurch gewonnene Suspension vereinzelter Zellen wurde dann auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt und anschließend das Volumen auf 20mL mit Zellkulturmedium aufgefüllt.

Die Zellen wurden anschließend in einem Brutschrank bei 95% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt von 5% bei 37°C für 4-6 Wochen kultiviert. Alle durchgeführten Arbeiten wurden unter einer Sterilbank ausgeführt.

Die Gewebekulturflaschen wurden nach der Inkubationszeit für 12 Stunden bei 200U/Min geschüttelt, um die Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und die restlichen verbliebenen Neuronen von den Astrozyten zu trennen und so die Reinheit der Rattenastrozytenkultur zu erhöhen (117).

Nachdem sich eine konfluente Zellschicht gebildet hatte, wurden die Astrozyten mit EDTA/Trypsin (0,05%/0,02% in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS)) von der Zellkulturflasche durch Klopfen und leichtes Rütteln der Schale abgelöst (5 Minuten Inkubation), in DMEM mit FBS aufgenommen und im Verhältnis 1:2 auf neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Für die Durchführung von Experimenten wurden die Astrozyten weiter auf unbeschichtete Zellkulturschalen (100mm, 60mm) oder Deckgläser (12mm) ausgesät. Dreimal pro Woche wurde das Nährmedium (DMEM+ 10% FBS) gewechselt. Das Wachstum der Zellen wurde mit einem Phasenkontrast-Mikroskop in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Die Astrozyten wurden vor jeder experimentellen Behandlung dreimalig mit DMEM ohne FBS gewaschen und anschließend für 30 Minuten in DMEM ohne FBS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Abhängigkeit des jeweiligen Experiments für jeweils 30 Minuten mit MSO (3mM), PPT (100µM), BIP (150µM) oder PIH (100µM) inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen für die jeweils angegebene Zeit mit oder ohne 5mM oder 0,5mM NH₄Cl weiter kultiviert.

Die Astrozyten wurden von Frau Ursula Kristek und Frau Dr. Ayşe Karababa präpariert und von Dr. Ayşe Karababa und Torsten Janssen kultiviert und gepflegt (Organentnahme-Projektnummer des ZETT: 078/08).

2.6. *Realtime* PCR

2.6.1. Prinzip

Mit der *Realtime* PCR oder quantitative PCR (qPCR), kann die Vervielfältigung einer DNA-Sequenz in Echtzeit gemessen werden. Im Gegensatz zu der gängigen PCR, wird bei der *Realtime* PCR nach jedem Amplifikationszyklus die Menge der synthetisierten DNA quantifiziert, wodurch es möglich wird die Kinetik der Reaktion zu bestimmen.

2.6.1.1. Farbstoffbasierte quantitative PCR

Für die Quantifizierung der in den einzelnen Proben jeweils untersuchten mRNA-Spezies, wurde in dieser Arbeit ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR® *Green*) benutzt. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffes steigt bei Bindung an doppelsträngige DNA stark an. Bei Amplifikation der Ziel-DNA-Sequenz nimmt somit die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte zu.

Diese Art der quantitativen PCR stellt eine kostengünstige und schnelle Methode dar die nur zwei sequenz-spezifische Primer benötigt.

Der fluoreszierende Farbstoff bindet jedoch an jede doppelsträngige DNA und somit auch an möglicherweise bei der Amplifikation gebildete unspezifische Produkte. Um ausschließen zu können, dass der Primer mehrere und damit auch unterschiedliche DNA-Sequenzen amplifiziert hat, wird am Ende des Experiments eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen (118).

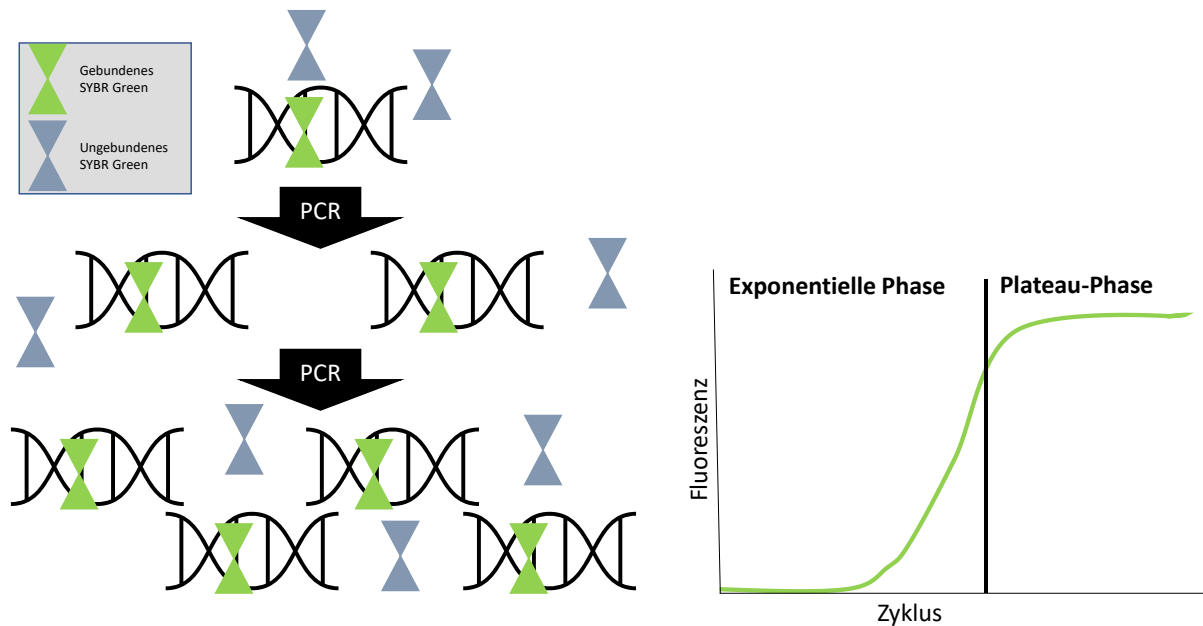


Abbildung 8: Das Prinzip der farbstoffbasierten *Realtime* PCR

Zunahme der Fluoreszenz bei Bindung des Farbstoffes SYBR® Green an doppelsträngige DNA. DNA kann mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green nachgewiesen werden, der präferentiell an doppelsträngige DNA bindet. DNA-gebundenes SYBR® Green absorbiert Licht blauer Wellenlänge und emittiert nach Anregung Licht im grünen Spektralbereich. Am Ende eines jeden PCR-Zyklus wird die SYBR® Green-Fluoreszenz gemessen und am Ende der PCR wird der Bereich bestimmt, in dem die Fluoreszenz von SYBR® Green exponentiell ansteigt und sich erstmalig signifikant von der des Hintergrunds abgrenzt. Damit wird vermieden, dass eine Quantifizierung der DNA unterhalb der Nachweisgrenze bzw. in der Sättigung (Plateau-Phase) erfolgt (119).

2.6.2. Durchführung

Für die Durchführung der *Realtime*-PCR wurde zuerst RNA mittels des *RNeasy Mini Kits* isoliert. Die RNA-Menge wurde anschließend mit dem *Nanodrop1000*, durch Messen der Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm quantifiziert.

Um die cDNA zu synthetisieren, wurde ein *QuantiTect Reverse Transcription Kit* benutzt. Pro Probe wurde hierfür 1µg RNA in einem Reaktionsgemisch von 20µL nach Herstellerangaben verwendet (Tab. 7). Die *Realtime*-PCR erfolgte am ViiA7 unter Verwendung von SYBR® Green.

Tabelle 7: Reaktionsgemisch für die *Realtime*-PCR.

| Komponente | Volumen in μl |
|--|--------------------------|
| cDNA (10ng/ μL) | 1,2 |
| <i>Forward Primer</i> (10pmol/ μL) | 1 |
| <i>Reverse Primer</i> (10pmol/ μL) | 1 |
| Nuklease-freies Wasser | 9,3 |
| SYBR® <i>Green</i> | 12,5 |
| Gesamtvolumen | 25 |

Für jede Probe wurde ein PCR-Reaktionsgemisch wie in Tabelle 7 aufgeführt hergestellt und in jeweils ein Well einer 96-Well Reaktionsplatte gegeben. Es wurde jede Probe im Duplikat auf die Platte aufgetragen und gemessen. Danach wurde eine dünne durchsichtige Folie über die 96-Well Platte geklebt, um die Proben zu verschließen. Diese Platte wurde mit der Folie in den *Realtime*-PCR-Cycler eingesetzt und die PCR nach einem vorgegebenen Protokoll durchgeführt (Tab. 8).

2.6.3. Verwendete Einstellungen bei der Durchführung der *Realtime*-PCR.

Die *Realtime*-PCR wurde entsprechend des Protokolls durchgeführt, welches in Tabelle 8 aufgeführt ist.

Tabelle 8: Durchführungsprotokoll der *Realtime*-PCR.

| RT-PCR | | | |
|-------------------|-----------------------------------|-------------|--------|
| Schritt | Temperatur [$^{\circ}\text{C}$] | Zeit | Zyklen |
| Denaturierung | 50 | 2 Minuten | } 40 |
| Denaturierung | 95 | 10 Minuten | |
| <i>Annealing</i> | 95 | 15 Sekunden | |
| <i>Elongation</i> | 60 | 1 Minuten | |

Um am Ende des Durchlaufs zu überprüfen, ob die Reaktion/Amplifikation korrekt erfolgte, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Hiermit wurde überprüft, ob ein einzelnes Amplifikationsprodukt gebildet wurde oder ob sich ggf. *Primer*-Dimere gebildet haben.

Durch Erhitzen der Probe dissoziieren die DNA-Doppelstränge und werden dadurch in zwei Einzelstränge aufgetrennt. Dieser Prozess ist charakteristisch für das Amplifikat und weist eine spezifische Schmelztemperatur auf. Bei diesem Vorgang der Denaturierung wird stetig die Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenzfarbstoffe lösen sich während der Dissoziation langsam von der DNA und es kommt zu einem Abfall der Fluoreszenzintensität. Eine korrekt verlaufene PCR zeigt nur einen *Peak* in der Schmelzanalyse an. Dies bedeutet, dass nur die Synthese eines spezifischen Produktes erfolgt ist.

Die relative Quantifizierung der Amplifikate wurde mittels Delta-Delta-Ct-Methode ($\Delta\Delta Ct$) durchgeführt. (120) Hierbei wurden die mRNA-Spiegel des Zielgens mithilfe eines *Housekeeping*-Gens (*Hypoxanthine ribosyl transferase*, HPRT1) normiert. Aus den Delta Ct - Werten (ΔCt) beider Gruppen wurde der $\Delta\Delta Ct$ -Wert und der Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen durch die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ermittelt.

Die *Realtime*-PCR wurde mit Unterstützung von Frau Dr. Ayşe Karababa durchgeführt.

2.7. Immunfluoreszenzanalyse

Am Ende der experimentellen Behandlung wurden die Zellen mit Paraformaldehyd (4%, 5min, RT) fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}) mit 10% Rinderserum-Albumin (*bovine serum albumin*, BSA) und 0,1% Triton X-100 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Verwendung von TritonX dient dabei dazu, die Membran permeabel zu machen für die Penetration der Antikörper. Die Zugabe von BSA soll Bindestellen blockieren, die unspezifisch von Proteinen, wie es Antikörper ebenfalls sind, gebunden werden können. Man spricht in diesem Zusammenhang vom „Blockieren unspezifischer Bindungsstellen“. Primär- und Sekundärantikörper wurden in PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}) mit 10% BSA und 0,1% Triton X-100, verdünnt und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf die fixierten Zellen gegeben und inkubiert. Am Ende der Inkubationsdauer wurden die Zellen mit PBS (ohne Ca^{2+}/Mg^{2+}) gewaschen und für 2 Stunden

mit Hoechst34580 (1:5000) und FITC- oder Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern gegen Maus oder Kaninchen IgG (1:200) bei Raumtemperatur inkubiert.

Mithilfe des Epifluoreszenzmikroskops *CellObserver Z1* wurden an in MatTek Schalen (\varnothing 60mm) kultivierten Rattenastrozyten durchgeführte Fluoreszenzfärbungen gemessen. Die Aufnahmen wurden mit einem Axio Observer.Z1 Mikroskop und der AxioCamMR3_2 Kamera unter Verwendung der Objektive EC Plan-Neofluar 10x/0.30 Ph 1EC (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) und LD LCI Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Korr DIC M27 (ZEISS, Oberkochen, Deutschland) aufgenommen. Dabei wurde beim 25x Objektiv Wasser als Immersionsmittel verwendet.

Die nukleäre Immunreaktivität von p-p53 und p21 wurde mithilfe von Macro-Routinen der *Fiji Distribution* (121) von ImageJ automatisch quantifiziert. Hierfür wurde die Immunoreaktivität von p-p53 und p21 in den durch die Hoechst34580 Fluoreszenz begrenzten nukleären Regionen quantifiziert. Die Fluoreszenzintensität die in unbehandelten Zellen (Kontrolle) gemessen wurde, wurde gleich 1 gesetzt und die jeweilige Intensität der behandelten Zellen wurde relativ dazu angegeben.

Die Immunofluoreszenzanalysen wurden mit Unterstützung von Dr. Ayşe Karababa und Dr. Boris Görg durchgeführt.

2.8. Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis freier Eisenionen in kultivierten Astrozyten

Astrozyten wurden auf Ibidi-Schalen ausplattiert und wie jeweils beschrieben experimentell behandelt. Ungebundene zweiwertige Eisenionen wurden in den Astrozyten mit RDA (50nM, 10min) oder RhoNoxTM-1 (5 μ M, 30min) angefärbt.

Rhodamine B-[(2,2'-bipyridine-4-yl)-aminocarbonyl] benzyl ester (RDA) ist ein selektiver, fluoreszierender, membrangängiger Fe²⁺-Chelator. Die Fluoreszenz von RDA ermöglicht es fluoreszenzmikroskopisch freie Eisenionen in Mitochondrien nachzuweisen, da RDA leicht die negativ geladene Mitochondrienmembran durchdringen und dort akkumulieren kann. Die Fluoreszenz von RDA nimmt bei zunehmender Bindung an Eisenionen ab. Eine Abnahme

der RDA-Fluoreszenz kann verhindert werden, indem ungebundene Eisenionen vorherig durch andere Eisenchelatoren gebunden wurden (122).

RhoNoxTM-1 ist auch ein fluoreszierender Fe²⁺-Marker der selektiv an freie Fe²⁺-Ionen bindet. Bei Bindung freier zweiwertiger Eisenionen nimmt die Fluoreszenz von RhoNoxTM-1 zu. Es wurde gezeigt, dass RhoNoxTM-1 im Golgi-Apparat akkumulieren kann.

Die Spezifität der Eisenmarker RDA und RhoNoxTM-1 wurde in mit NH₄Cl (5mM) inkubierten Astrozyten mithilfe der Eisenchelatoren *2,2'-Bipyridin* (BIP, 150µM) und *Pyridoxal Isonicotinoyl Hydrazone* (PIH, 100µM) bestätigt. PIH durchdringt die mitochondriale Membran (123) und bindet freie Eisenionen (124). Die Zellkerne wurden mit Hoechst34580 (1:50,000, 5min) gefärbt. Am Ende jeder Inkubationszeit wurde der jeweilige überschüssige Farbstoff entfernt und die Zellen wurden mit PBS gewaschen und die Fluoreszenzintensität gemessen.

3. Statistik

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Auswertungen, wurden jeweils Daten aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten, mit Astrozyten welche aus jeweils unterschiedlichen Präparationen gewonnen wurden, verwendet. Die in den jeweiligen Tabellen und Abbildungen angegebenen Daten entsprechen den arithmetischen Mittelwerten \pm dem Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM).

Die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den zu vergleichenden Bedingungen wurde in Abhängigkeit der Anzahl der zu vergleichenden Gruppen durchgeführt.

Wurden zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde ein zweiseitiger gepaarter T-Test nach *Student* durchgeführt. Dieser Test vergleicht die Varianz der Differenzen der Mittelwerte. Werden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, steigt mit jedem individuellen Vergleich auch die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Test ein falsches Ergebnis hervorbringt. Dieses Phänomen bezeichnet man als "Alpha-Fehler-Akkumulation". Bei für Mehrfachvergleichen geeigneten statistischen Tests erfolgt daher eine Fehlerkorrektur für das multiple Testen.

Wurden mehr als zwei unterschiedliche normalverteilte Gruppen miteinander verglichen, erfolgte eine einfache Streuungsanalyse (*one-way analysis of variance*, *one-way ANOVA*). Hierbei untersucht man den Einfluss einer unabhängigen Variablen mit unterschiedlichen Gruppen auf die Ausprägung einer Zufallsvariablen. Hierfür wird die Varianz zwischen den Gruppen mit der Varianz innerhalb der Gruppen verglichen. Die ANOVA Varianzanalyse ermöglicht es einen Unterschied zwischen mehreren Gruppen festzustellen, aber eine genaue Aussage wo der Unterschied ist, wird nicht definiert. Hierfür wurde in Abhängigkeit davon, ob eine Kontrollgruppe mit weiteren Gruppen oder alle Gruppen miteinander verglichen wurden, ein Dunnett's oder ein Tukey's post hoc Test durchgeführt. Mit Hilfe des Shapiro-Wilk Tests wurde überprüft, ob die Daten der zu untersuchenden Gruppen normalverteilt sind. Ein α -Fehler von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

Die für die statistischen Analysen verwendeten Tests sind jeweils in den Legenden der zugehörigen Tabellen und Abbildungen angegeben.

Die statistischen Analysen und die Abbildungen wurden mit den Programmen GraphPad Prism (GraphPad Software, Kalifornien, USA) und Excel (Microsoft, München, Deutschland) erstellt.

4. Ergebnisse

4.1.1. Effekte von Ammoniak auf die Spiegel in den Eisenstoffwechsel involvierter Gene und Proteine in kultivierten Rattenastrozyten

Um den Effekt von Ammoniak auf die Spiegel von Eisenstoffwechsel-relevanten Faktoren in kultivierten Rattenastrozyten zu untersuchen, wurden quantitative-PCRs und Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt. Die untersuchten Gene und deren Proteinprodukte Ferroportin (FPN), Caeruloplasmin (CP), lösliches Caeruloplasmin (sCP), Hephaestin und Ferritin spielen dabei eine bedeutende Rolle für den Transport und die Speicherung von Eisenionen in Zellen.

Sowohl 5mM als auch 0,5mM NH_4Cl induzieren konzentrationsabhängig eine Steigerung der anti-FPN Immunreaktivität um das 1,2- bzw. 1,12-fache der jeweiligen Kontrolle (Abbildung 9, Tabelle 9). Die Immunfluoreszenzen von CP und Hephaestin nahmen bei Inkubation der Astrozyten mit 5mM um das 0,63- bzw. 0,83-fache ab. Bei einer Inkubation mit 0,5mM NH_4Cl konnte keine signifikante Änderung gezeigt werden (Abb. 9, Tab. 9).

Bei Inkubation der Astrozyten mit 5mM NH_4Cl stieg die anti-Ferritin-Immunreaktivität um das 1,59-fache an. Dies war nicht der Fall bei Inkubation der Astrozyten mit 0,5mM NH_4Cl , aber hier wurde eine gesteigerte nukleäre Immunreaktivität von Ferritin im Bereich des Zellkerns beobachtet (Abb. 9, Tab. 9).

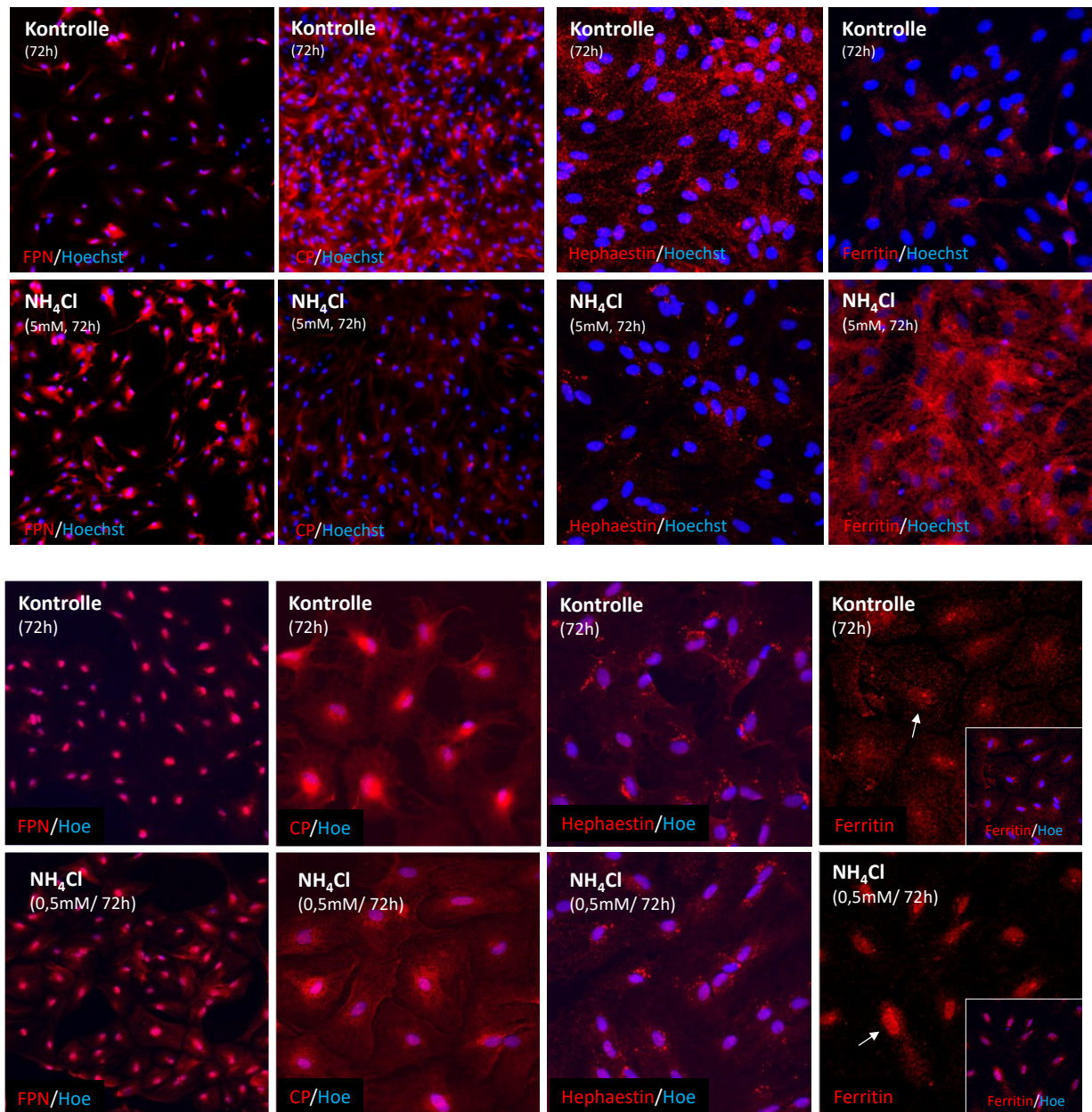


Abbildung 9: Einfluss von NH₄Cl auf die Spiegel von in den Eisenstoffwechsel involvierten Proteinen in kultivierten Rattenastrozyten.

Immunfluoreszenzanalyse von FPN, CP, Hephaestin und Ferritin. Die Astrozyten wurden entweder für 72h mit der angegebenen NH₄Cl-Konzentration inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt. Die Pfeile im Bild markieren nukleäre anti-Ferritin-Immunoreaktivität.

Für die Aufnahme der Bilder verwendete Objektive:

Oben: Spalten 1 und 2: EC Plan-Neofluar 10x; Spalten 3 und 4: LD LCI Plan-Apochromat 25x.

Unten: Spalte 1: EC Plan-Neofluar 10x; Spalten 2, 3 und 4: LD LCI Plan-Apochromat 25x.

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

Tabelle 9: Effekte von NH₄Cl auf die Immunoreaktivität von FPN, CP, Hephaestin oder Ferritin in kultivierten Rattenastrozyten.

Die Immunoreaktivität von FPN, CP, Hephaestin und Ferritin wurde aus der Immunofluoreszenzanalyse aus Abbildung 9 über das gesamte Bild quantifiziert.

Die Immunoreaktivität ist relativ zu der jeweiligen Kontrolle angegeben.

*: *statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. n.s.: nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.*

(n=3-6 unabhängige Experimente, Student's T-Test).

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

| | FPN | CP | Hephaestin | Ferritin |
|---------------------------------|------------|----------------|----------------|----------------|
| Kontrolle (72h) | 1±0 | 1±0 | 1±0 | 1±0 |
| NH ₄ Cl (5mM/ 72h) | 1,20±0,07* | 0,63±0,03* | 0,83±0,07 n.s. | 1,59±0,07* |
| NH ₄ Cl (0,5mM/ 72h) | 1,12±0,04* | 0,96±0,04 n.s. | 1,00±0,05 n.s. | 1,00±0,07 n.s. |

Auf mRNA-Ebene konnte in mit 0,5mM NH₄Cl behandelten Astrozyten eine geringfügige, aber statistisch signifikante Hochregulation des Eisenexporters FPN beobachtet werden (Abb. 10), welche in mit 5mM NH₄Cl behandelten Astrozyten noch stärker ausgeprägt war (Abb. 11). Die mRNAs der FPN-akzessorischen Faktoren CP, sCP und Hephaestin wurden in mit 5mM NH₄Cl behandelten Astrozyten runterreguliert (Abb. 11).

In mit 0,5mM NH₄Cl konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden (Abb. 10). Für die Ferritin mRNA Expression konnte bei beiden NH₄Cl Konzentrationen keine signifikante Expressionsänderung beobachtet werden (Abb. 10).

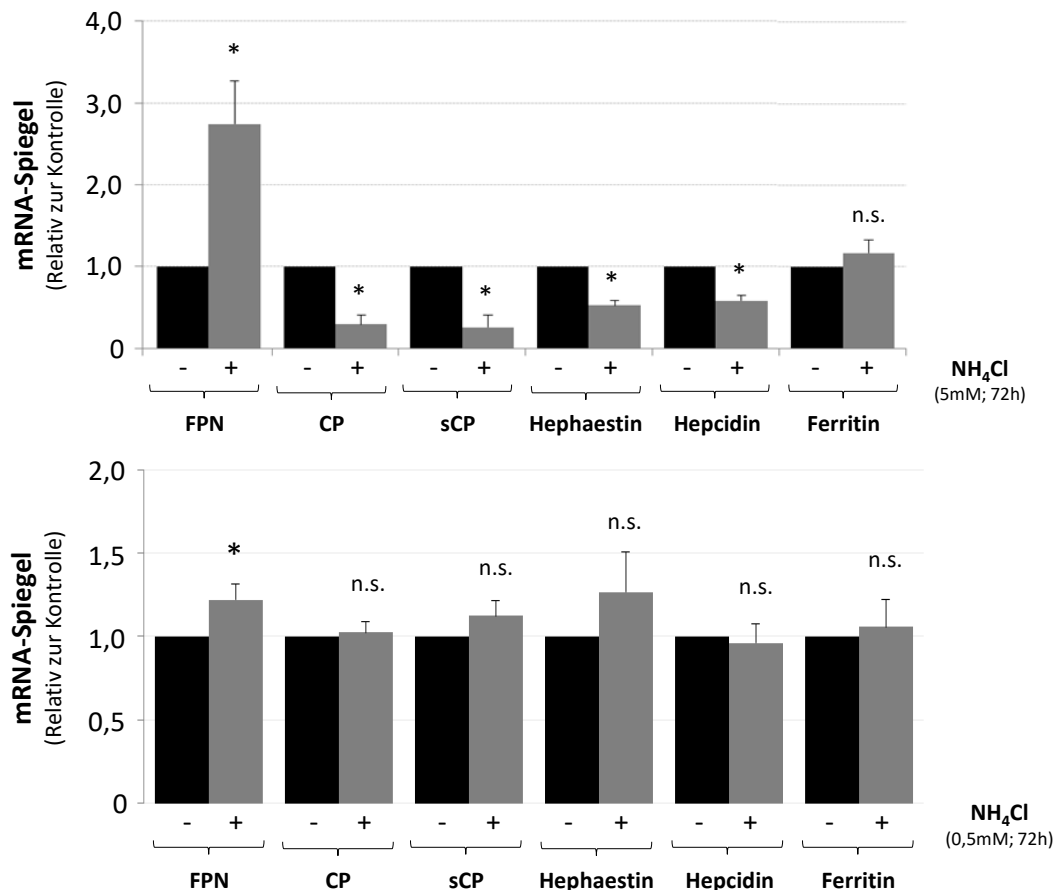


Abbildung 10: Einfluss von NH_4Cl auf die mRNA-Spiegel von Eisenstoffwechsel-relevanten Genen.

Die Astrozyten wurden entweder mit NH_4Cl (0,5mM oder 5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Die mRNA-Spiegel von FPN, CP, sCP, Hephaestin, Hecpidin und Ferritin wurden mittels Realtime-PCR quantifiziert. Die mRNA-Konzentration ist relativ zu der jeweiligen Kontrolle angegeben.

*: statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. n.s.: nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

(n=3-4 unabhängige Experimente, Student's T-Test).

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

Die durch NH_4Cl herbeigeführte Erniedrigung der CP und sCP und Hephaestin mRNA-Spiegel und die Erhöhung der FPN-Spiegel wurde in Gegenwart der Glutaminsynthetase-Hemmstoffe MSO (3mM) und PPT (100 μM) nicht beobachtet (Abb. 11). Auch in Gegenwart der Eisenchelatoren PIH (100 μM) und BIP (150 μM) wurden die CP, sCP, Hephaestin und FPN mRNA-Spiegel durch die Inkubation mit NH_4Cl nicht geändert. Die beobachteten Effekte von NH_4Cl auf die mRNA-Spiegel von FPN, CP, sCP, Hephaestin und Hecpidin, konnten mithilfe

der Glutaminsynthetase-Inhibitoren MSO (3mM) und PPT (100µM), den Eisenchelatoren PIH (100µM) und BIP (150µM), vollständig gehemmt werden (Abb. 11).

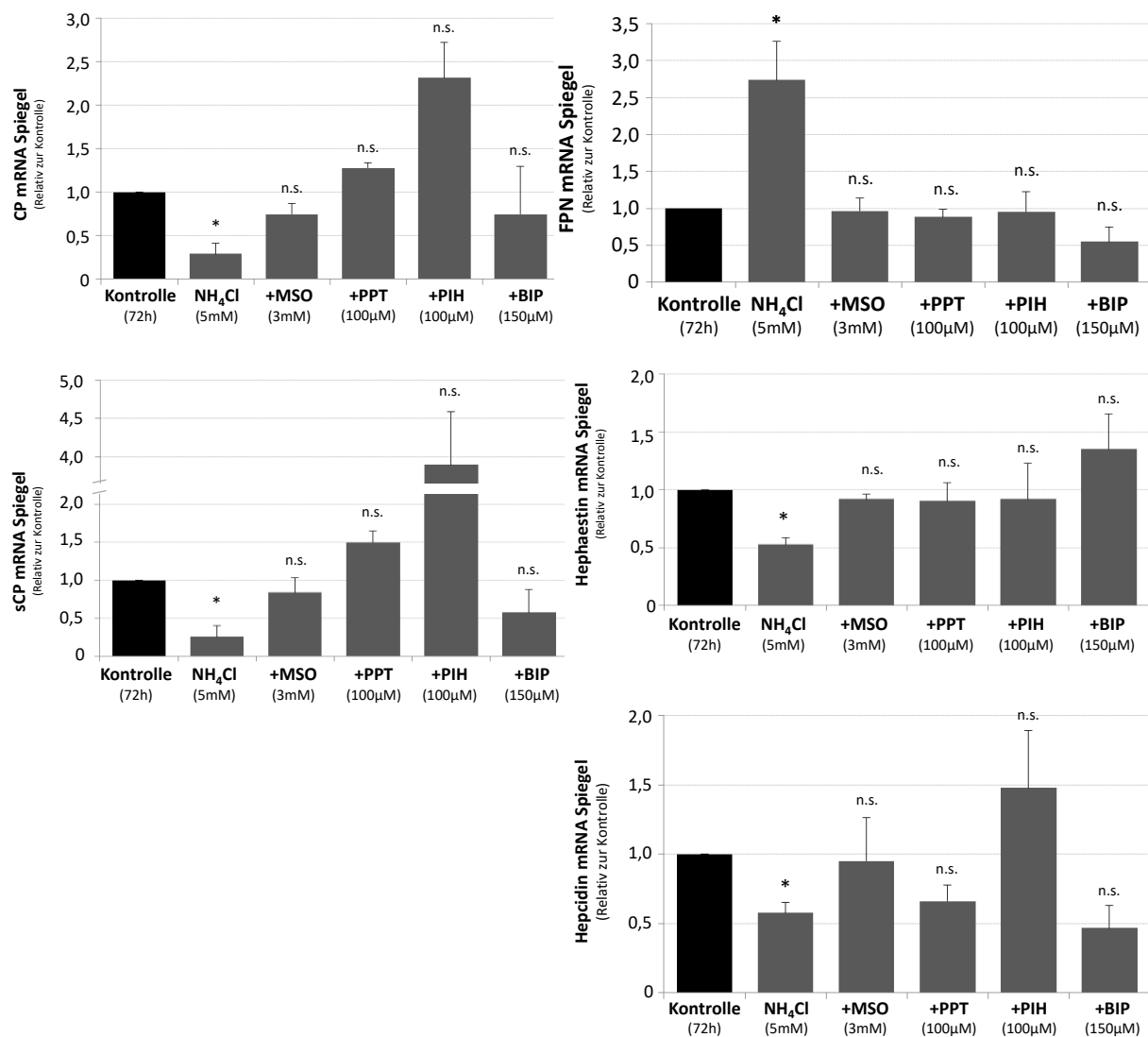


Abbildung 11: Charakterisierung der durch Ammoniak induzierten Änderung der von mRNA-Spiegel von in den Eisenstoffwechsel involvierten Genen.

Die Astrozyten wurden für 72h mit NH₄Cl (5mM) behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Dort wo angegeben, wurden die Astrozyten mit MSO, PPT, PIH oder BIP 30min vor der Inkubation mit NH₄Cl inkubiert. Alle Hemmstoffe oder Eisenchelatoren blieben während des gesamten Versuches im Medium. Die mRNA-Spiegel in den mit NH₄Cl inkubierten Astrozyten sind relativ angegeben zu den jeweiligen Kontrollen (unbehandelt bzw. Inhibitor ohne NH₄Cl)

*: statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. n.s.: nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

(n=3-13 unabhängige Experimente, one-way ANOVA, Dunnett's post hoc Test).
(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ammoniak konzentrationsabhängig die mRNA-Spiegel von für die Eisen-Homöostase-relevanten Gene in Astrozyten in Abhängigkeit der Glutaminbildung und der intrazellulären Konzentration an freien Eisenionen, verändert.

4.1.2. Effekte von Ammoniak auf die intrazelluläre Konzentration freier Eisenionen

Die Konzentration freier Eisenionen in der Zelle kann durch Hochregulation des Eisenexporters Ferroportin und des Eisenchelators Ferritin vermindert werden. Daher können die mRNA- und Proteinspiegel von FPN und die mRNA-Spiegel von Ferritin als Surrogatmarker für die intrazellulären Spiegel freier Eisenionen herangezogen werden (112, 125).

Die Effekte einer Überladung der Zelle mit freien Eisenionen auf die Ferritin und FPN mRNA-Spiegel und Ferritin-Proteinspiegel wurden durch Inkubation der Astrozyten mit Fe(II)Cl_2 (25 μM oder 500 μM , 18h) untersucht.

Wie in Abbildung 12 erkennbar ist, führte diese Behandlung zu einer Steigerung der FPN-mRNA um mehr als das 10-fache der Kontrolle, jedoch nicht zu einem Anstieg der Ferritin-mRNA.

Im Gegensatz zur Ferritin mRNA wurde nach Inkubation der Astrozyten mit Fe(II)Cl_2 ein Anstieg des Ferritin-Proteins in Immunfluoreszenzanalysen beobachtet. Die Inkubation mit 25 μM Fe(II)Cl_2 bewirkte keinen signifikanten aber einen tendenziellen Anstieg der Ferritin-Immunoreaktivität. Die Inkubation mit 500 μM Fe(II)Cl_2 steigerte die Ferritin-Immunoreaktivität signifikant auf das 1,4-fache der Kontrolle.

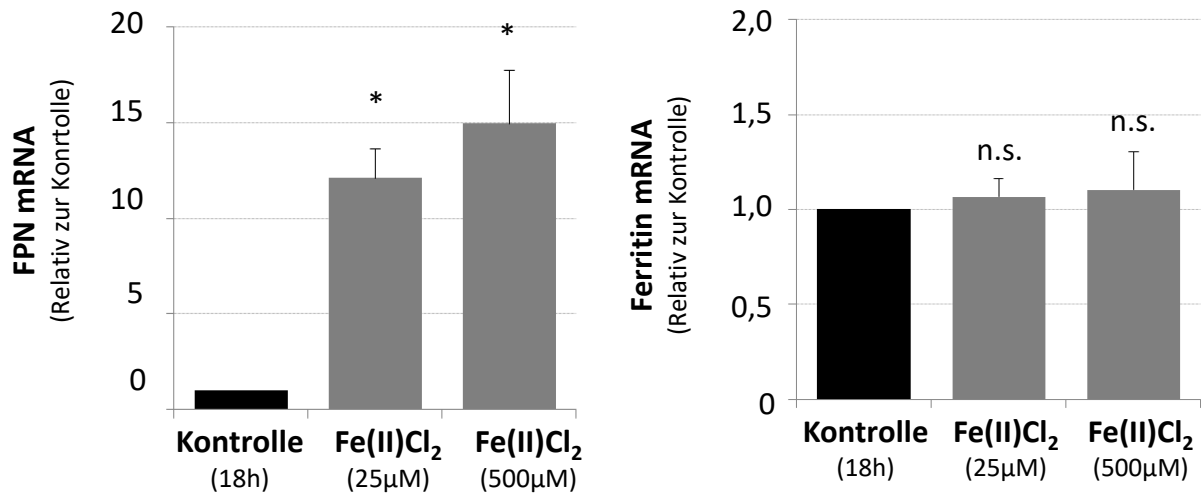


Abbildung 12: Effekte von Fe(II)Cl₂ auf mRNA-Spiegel von Ferroportin und Ferritin.

Quantifizierung der FPN mRNA und Ferritin mRNA mittels qPCR. Die mRNA-Spiegel sind relativ zu der jeweiligen Kontrolle angegeben. Die Astrozyten wurden entweder mit Fe(II)Cl₂ (25µM oder 500µM, für 10 Minuten und dann gefolgt von weiteren 18h in einem Fe(II)Cl₂ freiem Medium weiterkultiviert) behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt.

*: statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. n.s.: nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

(n=5-6 unabhängige Experimente, one-way ANOVA, Dunnett's post hoc Test).

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

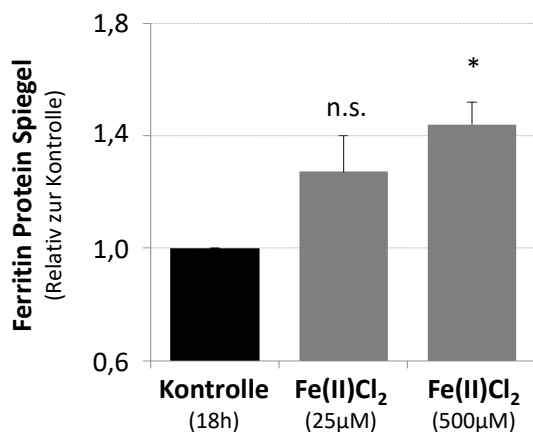
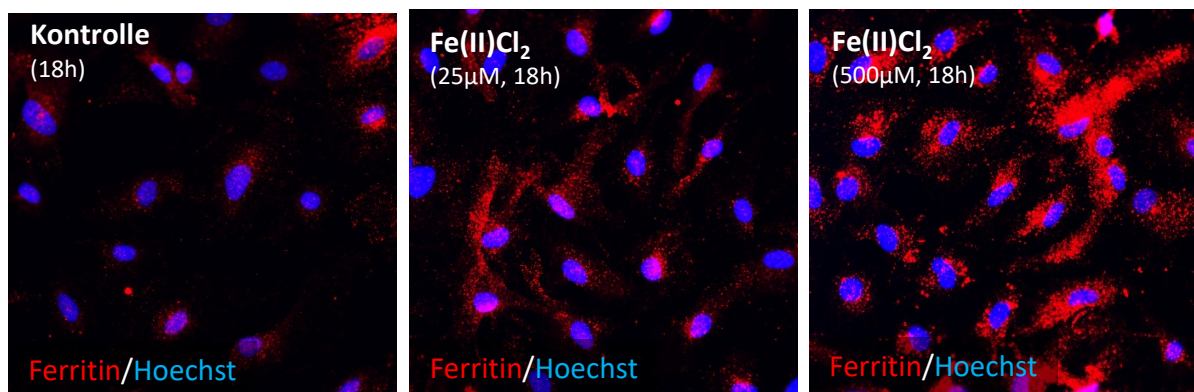


Abbildung 13: Effekte von Fe(II)Cl₂ auf die Ferritin-Proteinspiegel.

Die Astrozyten wurden entweder mit Fe(II)Cl₂ (25µM oder 500µM für 10 Minuten und dann gefolgt von weiteren 18h in einem Fe(II)Cl₂-freien Medium weiterkultiviert) behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Am Ende des Experiments wurden die Zellen fixiert und mit einem gegen Ferritin gerichteten Antikörper inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt.

Die Expression von Ferritin wurde mittels Immunofluoreszenzanalyse gemessen, anschließend erfolgte die Quantifizierung der Ferritin-Protein-Spiegel über das gesamte Bild.

Für die Aufnahme der Bilder verwendetes Objektiv: LD LCI Plan-Apochromat 25x.

**: statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. n.s.: nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.*

(n=4 unabhängige Experimente, one-way ANOVA, Dunnett's post hoc Test).

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

Um die Effekte von Ammoniak auf die intrazellulären Spiegel freier Eisenionen zu untersuchen, wurden Astrozyten mit 0,5mM und 5mM NH₄Cl inkubiert und anschließend freie Eisenionen mit den fluoreszierenden Eisenchelatoren RDA und RhoNoxTM-1 sichtbar gemacht. Dabei führt die Bindung freier Eisenionen an RDA zu einer Verringerung der RDA-Fluoreszenz und die Bindung freier Eisenionen an RhoNoxTM-1 zu einer Verstärkung der RhoNoxTM-1 Fluoreszenz. Nach Inkubation mit NH₄Cl konnte eine Abnahme der RDA-Fluoreszenz und eine Zunahme der RhoNoxTM-1 Fluoreszenz zeit- und konzentrationsabhängig beobachtet werden (Abb. 14, Tab. 10). Bereits ab einer Konzentration von 0,5mM NH₄Cl und einer Inkubationszeit von 24h war eine signifikante Abnahme der RDA-Fluoreszenz und eine Zunahme der RhoNoxTM-1-Fluoreszenz erkennbar. Auch nach 72h Inkubationsdauer waren diese Effekte immer noch beobachtbar. Diese Ergebnisse zeigen, dass Ammoniak die intrazelluläre Konzentration freier Eisenionen in Astrozyten *in vitro* steigert.

Als technische Kontrolle diente die Inkubation der Astrozyten mit Fe(II)Cl₂. Diese Behandlung führte zu einem Rückgang der RDA und zu einer Steigerung der RhoNoxTM-1 Fluoreszenz.

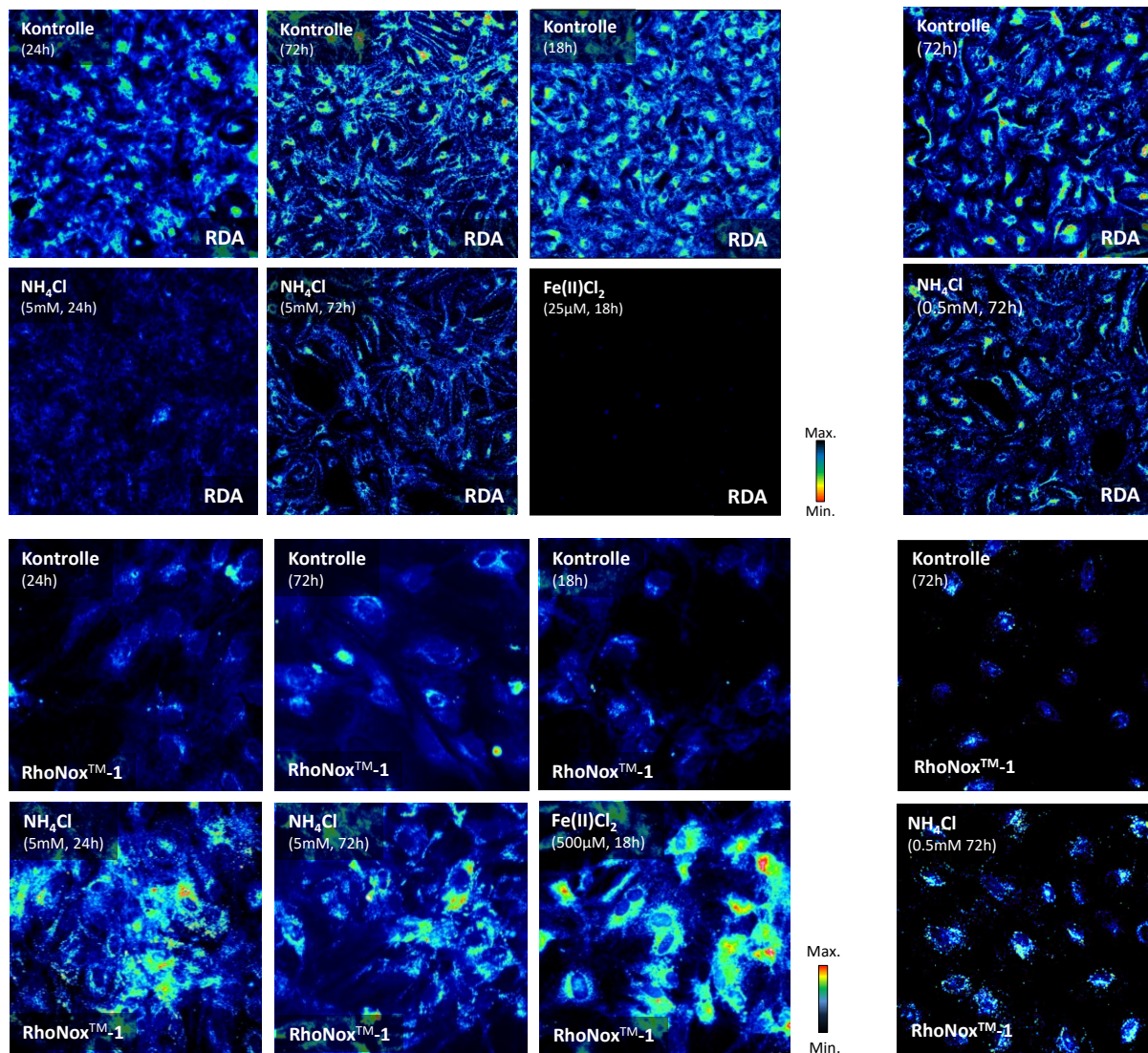


Abbildung 14: Einfluss von NH_4Cl auf die intrazelluläre Konzentration freier Eisenionen.

Nachweis von freien Eisenionen in Astrozyten mithilfe der fluoreszierenden Eisenchelatoren RDA oder RhoNoxTM-1 und Epifluoreszenz-Mikroskopie. Die Fluoreszenzintensität ist Falschfarben-kodiert dargestellt und die relativen Intensitäten sind in der jeweiligen Farbskala wiedergegeben. Die Astrozyten wurden entweder mit NH_4Cl (0,5mM oder 5mM) oder mit Fe(II)Cl_2 (500 μM) über die angegebene Zeit inkubiert oder blieben als Kontrolle unbehandelt.

Für die Aufnahme der Bilder verwendete Objektive: Von oben: Zeilen 1 und 2: EC Plan-Neofluar 10x; Zeilen 3 und 4: LD LCI Plan-Apochromat 25x.

(n=3-8 unabhängige Experimente)

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

Tabelle 10: Effekte von NH₄Cl auf die RDA- oder RhoNoxTM-1-Fluoreszenz in kultivierten Rattenastrozyten.

Die Astrozyten wurden entweder mit NH₄Cl (0,5mM, 1mM oder 5mM) behandelt oder blieben als Kontrolle über 24h oder 72h unbehandelt.

Die Fluoreszenz in den mit NH₄Cl-inkubierten Astrozyten ist relativ zur jeweiligen Kontrolle angegeben.

**: statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. n.s.: nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.*

(n=3-8 unabhängige Experimente, Student's T-Test, jede experimentelle Bedingung (=,5, 1 oder 5mM NH₄Cl) wurde mit einer dazugehörigen separaten Kontrollgruppe verglichen).

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

| | Kontrolle (24 oder 72h) | NH ₄ Cl (1mM, 24h) | NH ₄ Cl (5mM, 24h) | NH ₄ Cl (0,5mM, 72h) | NH ₄ Cl (5mM, 72h) |
|------------------------------|----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| RDA | 1±0 | 0,70±0,1* | 0,46±0,11* | 0,82±0,05* | 0,54±0,09* |
| RhoNoxTM-1 | 1±0 | 1,22±0,08* | 1,36±0,07* | 1,40±0,05* | 1,21±0,05* |

4.2. Bedeutung der intrazellulären Konzentration freier Eisenionen für durch Ammoniak induzierten oxidativen Stress

Die RNA-Oxidation ist ein sensitiver Biomarker für oxidativen Stress. Reaktive Sauerstoffspezies, wie z.B. Hydroxylradikale, können Guanin angreifen und so zur Bildung von 8-Hydroxydesoxyguanosin (8OHdG) in DNA oder 8-Hydroxyguanosin (8OHG) in RNA führen (46). 8OHdG und 8OHG können mit einem spezifisch hiergegen gerichteten Antikörper und einer Immunfluoreszenzanalyse nachgewiesen werden.

Die Inkubation mit NH₄Cl (0,5mM oder 5mM für 72h) führte in den Experimenten der vorliegenden Arbeit zu einem deutlichen Anstieg der zytosolischen anti-8OHdG/8OHG Immunreaktivität in den Astrozyten. In Gegenwart der Eisenchelatoren PIH (100µM) und BIP (150µM), wurde der durch NH₄Cl (5mM) induzierte Anstieg der 8OHdG/8OHG Immunreaktivität vollständig verhindert (Abb. 15). Der durch NH₄Cl (5mM) induzierte Anstieg der 8OHdG/8OHG Immunreaktivität war im Zytosol lokalisiert und die Zellkerne, die durch Anfärbung mit dem DNA-bindenden Farbstoff Hoechst34580 angefärbt wurden, blieben weitestgehend ausgespart, was auf die Oxidation von RNA und nicht auf die von DNA hinweist (Abb. 15).

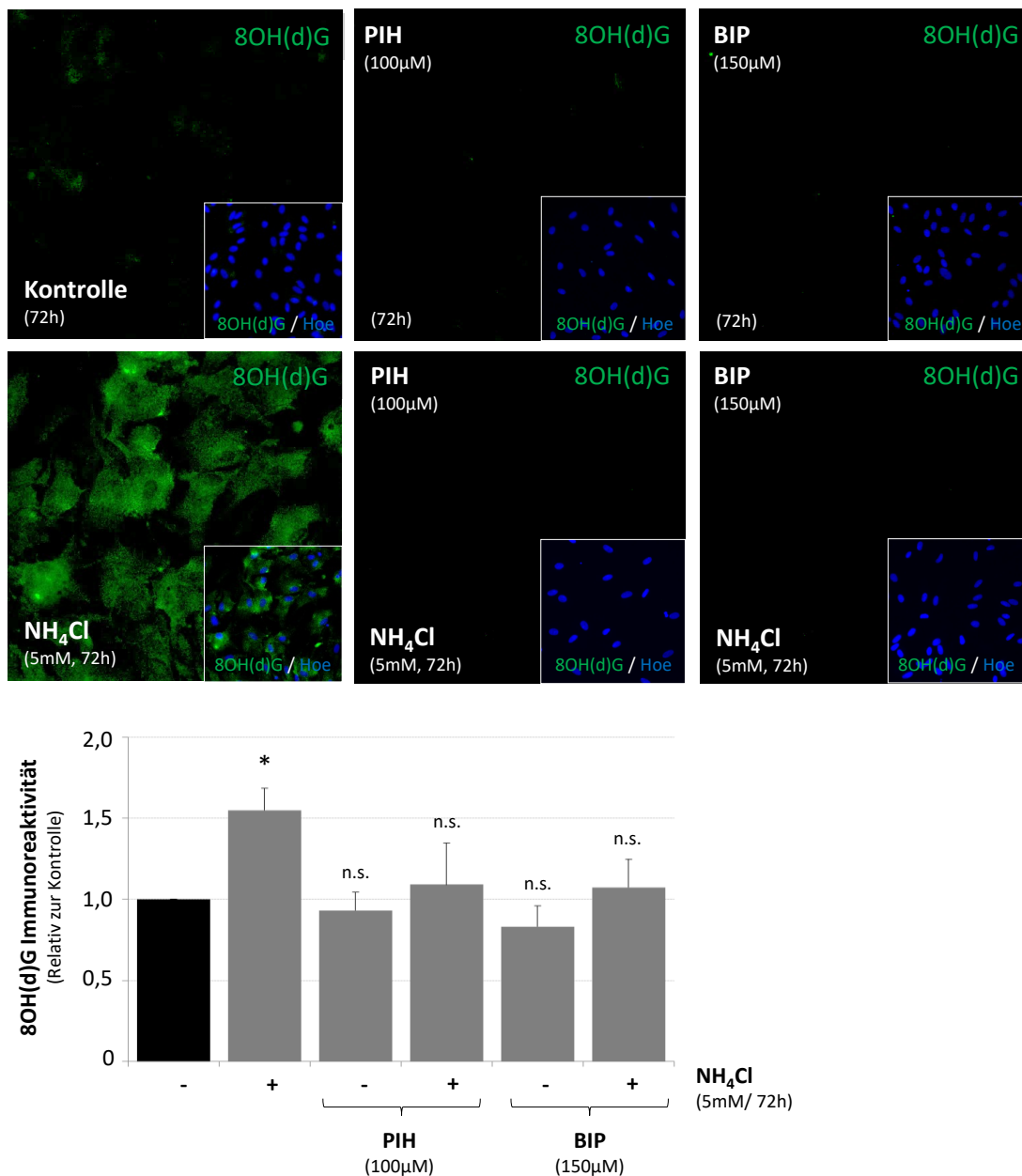


Abbildung 15: Rolle freier Eisenionen für die durch Ammoniak induzierte RNA-Oxidation in kultivierten Rattenastrozyten.

Die Astrozyten wurden mit NH₄Cl (5mM), PIH (100µM) oder BIP (150µM) über die angegebene Zeit behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen.

Oben: Oxidierte DNA/RNA wurden mittels eines gegen anti-8OHdG/8OHG gerichteten Antikörpers gefärbt und die Immunoreaktivität mittels Immunofluoreszenzanalyse gemessen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst34580 gefärbt.

Unten: Quantifizierung der anti-8OHdG Immunoreaktivität. Die Fluoreszenzintensitäten der Bilder wurde mittels ImageJ wie im Material- und Methoden-Teil beschrieben quantifiziert.

Für die Aufnahme der Bilder verwendetes Objektiv: LD LCI Plan-Apochromat 25x.

*: statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle n.s.: nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle

(n=3-9 unabhängige Experimente, one-way ANOVA, Dunnett's post hoc Test)

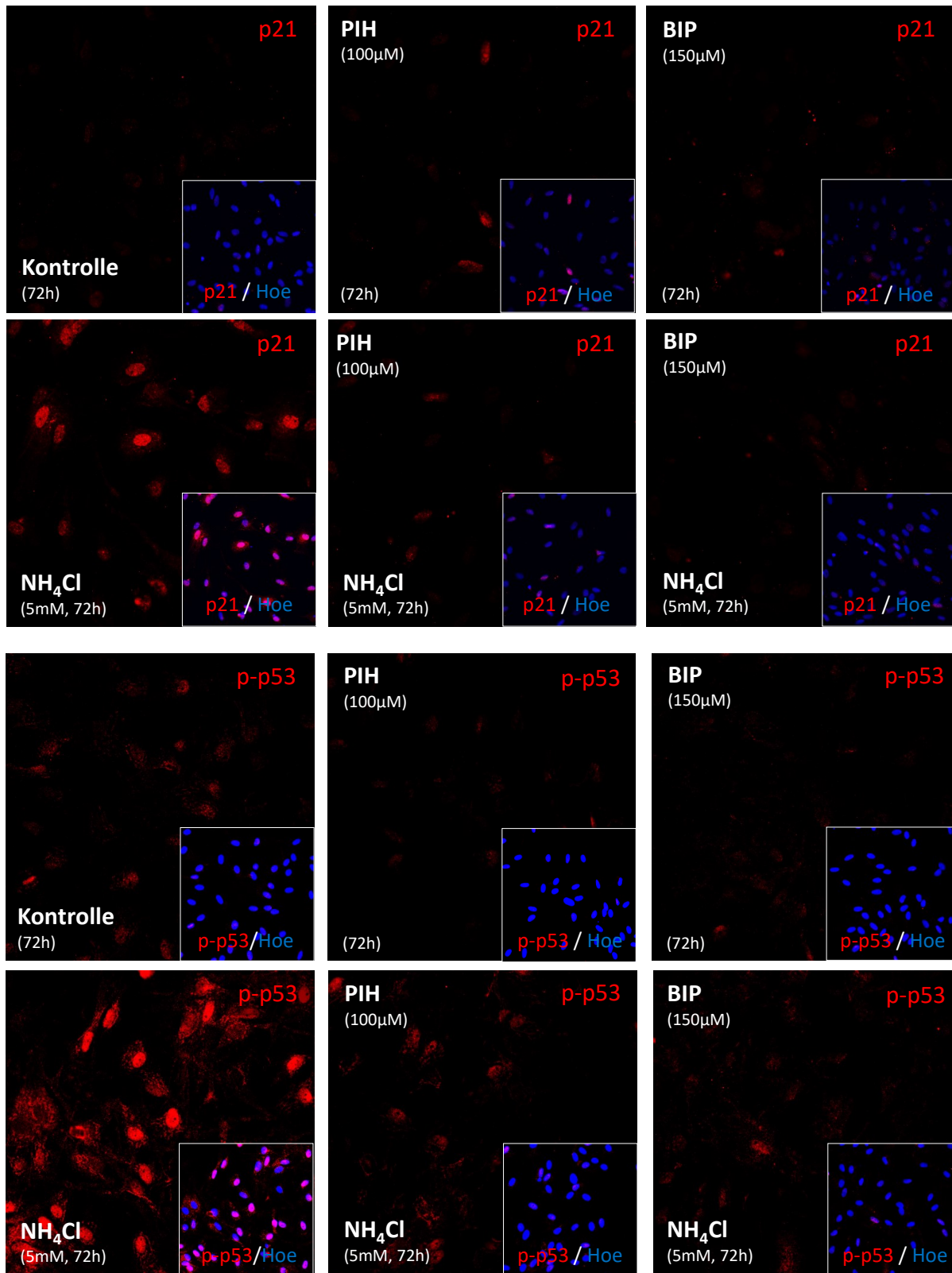
(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

Diese Ergebnisse zeigen, dass freie Eisenionen beteiligt sind an der durch Ammoniak induzierten Oxidation von RNA in kultivierten Rattenastrozyten.

4.3. Rolle freier Eisenionen für die durch Ammoniak induzierte Astrozytenseneszenz

Die Ammoniak-induzierte ROS Bildung führt über die Aktivierung der p53-abhängigen Transkription der zellzyklusinhibierenden Gene p21 und GADD45 α zur Seneszenz in Astrozyten (70). In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, ob dies im Zusammenhang steht mit einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Eisenionen.

In An- oder Abwesenheit der Eisenchelatoren PIH (100 μ M) oder BIP (150 μ M) wurde die Serin³⁹²-Phosphorylierung von p53 (p-p53) und dessen nukleäre Akkumulation und die von p21 in mit NH₄Cl (5mM, 72h) inkubierten Astrozyten untersucht. Wie in Abbildung 16 gezeigt, steigerte NH₄Cl (5mM, 72h) die nukleäre Akkumulation von p-p53 und von p21. Diese Effekte waren vollständig gehemmt in Gegenwart der Eisenchelatoren PIH und BIP. Auch die Inkubation der Astrozyten mit Fe(II)Cl₂ (25 μ M, 18h) bewirkte eine nukleäre Akkumulation von p-p53 und von p21 (Abb. 17).



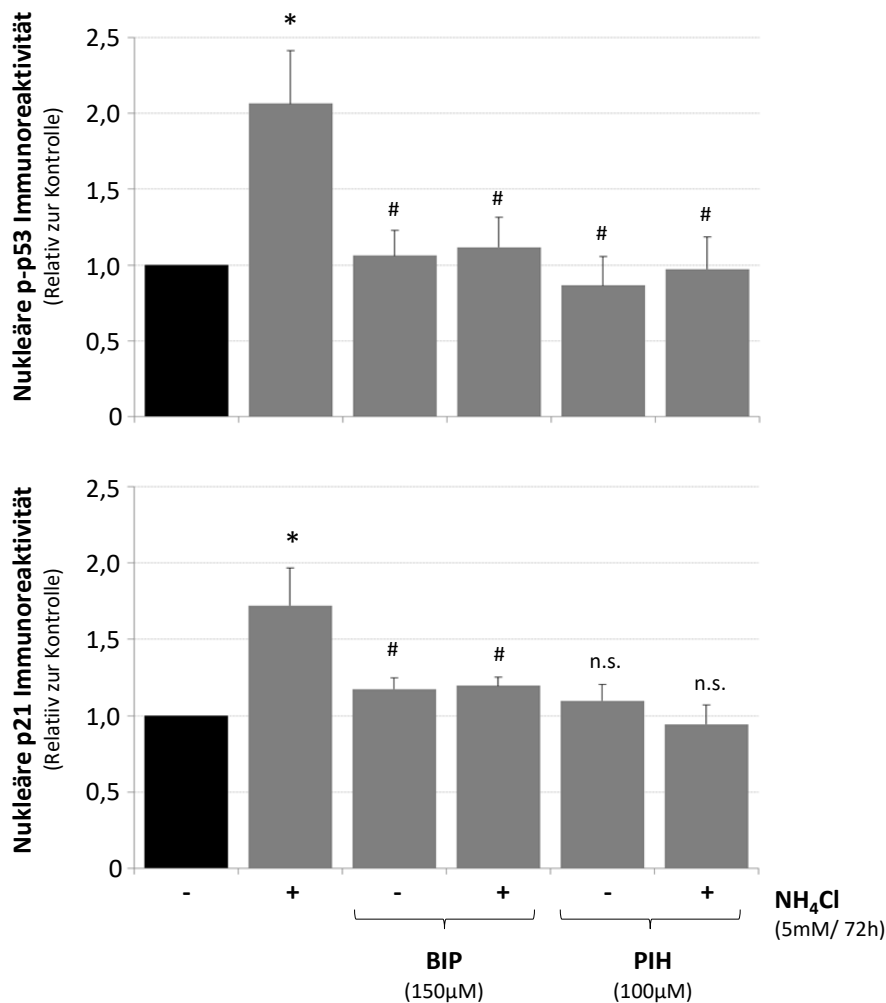


Abbildung 16: Rolle freier Eisenionen für die nukleäre Akkumulation von Serin³⁹²-phosphoryliertem p53 und von p21 in Ammoniak-behandelten Astrozyten *in vitro*.

Die Astrozyten blieben entweder unbehandelt oder wurden mit NH₄Cl (5mM) über die angegebene Zeit inkubiert. Dort wo angegeben, wurden die Astrozyten mit BIP (150µM) oder PIH (100µM) für 30 Minuten vorinkubiert. p-p53 und p21 wurden mittels Immunfluoreszenzanalyse nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst34580 gefärbt.

Unten: Quantifizierung von nukleär Serin³⁹²-phosphoryliertem p-p53 und von p21.

Für die Aufnahme der Bilder verwendetes Objektiv: LD LCI Plan-Apochromat 25x.

*: statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. n.s.: nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

(n=3-5 unabhängige Experimente, one-way ANOVA, Tukey's post hoc Test)

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

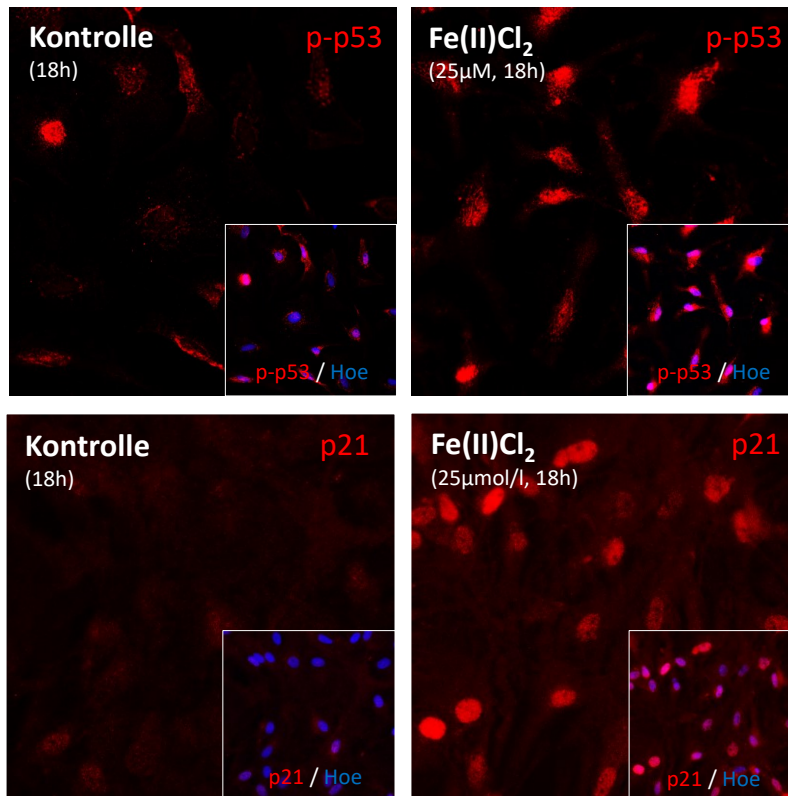


Abbildung 17: Effekte von Fe(II)Cl₂ auf die Phosphorylierung von p53 und die nukleäre Akkumulation von p21 in kultivierten Rattenastrozyten.

Die Astrozyten wurden mit Fe(II)Cl₂ (25µM) für 10 Minuten inkubiert oder blieben als Kontrolle unbehandelt, anschließend wurden die Zellen bis 18h in Fe(II)Cl₂-freiem Medium weiterkultiviert. Nach 18h wurden die Zellen fixiert und Serin³⁹²-phosphoryliertes p53 und p21 mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht. Die Zellkerne wurden mit Hoechst34580 angefärbt.

Für die Aufnahme der Bilder verwendetes Objektiv: LD LCI Plan-Apochromat 25x.

(n=3 unabhängige Untersuchungen. Gezeigt sind jeweils 2 repräsentative Bilder von 3 (p-p53) bzw. 4 (p21) unabhängigen Experimenten.)

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

Mittels quantitativer/*Realtime*-PCR wurden Effekte von NH₄Cl auf die mRNA-Spiegel der Seneszenz-Surrogatmarker GADD45α und p21 in mit NH₄Cl inkubierten Astrozyten untersucht. NH₄Cl (5mM, 72h) steigerte die mRNA-Spiegel von GADD45α und p21 um das 3- bzw. 1,5-fache gegenüber unbehandelten Kontrollen. In Gegenwart der Glutaminsynthetase-Hemmstoffe MSO (3mM) und PPT (100µM) sowie den Eisenchelatoren PIH (100µM) und BIP (150µM) steigerte NH₄Cl die mRNA-Spiegel von GADD45α und p21 gegenüber den jeweiligen Kontrollen nicht mehr signifikant (Abb. 18).

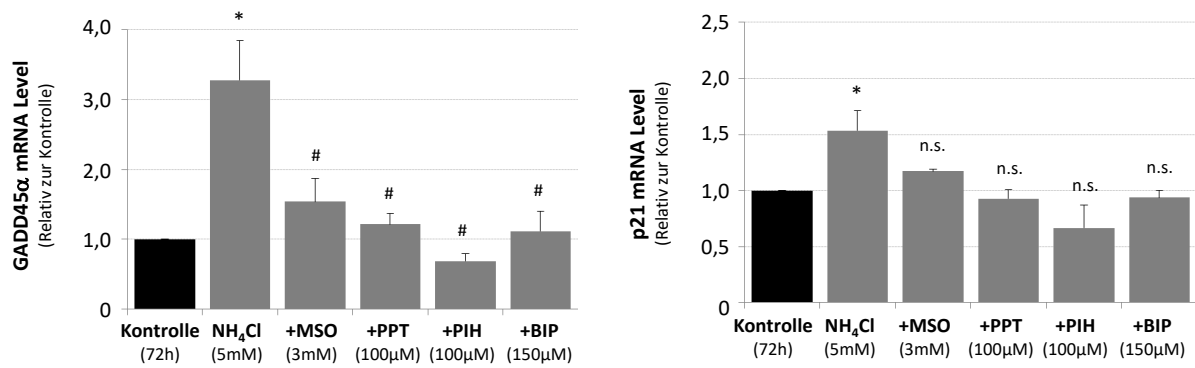


Abbildung 18: Rolle der Glutaminsynthetase und freier Eisenionen für die durch Ammoniak gesteigerten mRNA-Spiegel von GADD45α und p21 in kultivierten Rattenastrozyten.

Die Astrozyten blieben unbehandelt oder wurden 30 Minuten mit MSO (3mM), PPT(100µM), PIH (100µM) oder BIP (150µM) vorinkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen für 72h mit NH₄Cl 5mM inkubiert oder blieben unbehandelt. Die mRNA-Spiegel von GADD45α und p21 wurden mithilfe der qPCR quantifiziert. Die mRNA-Spiegel in den mit NH₄Cl-inkubierten Astrozyten sind relativ angegeben zu den jeweiligen Kontrollen (unbehandelt bzw. Inhibitor ohne NH₄Cl)

**: statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. n.s.: nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. #: statistisch signifikant unterschiedlich gegenüber den mit NH₄Cl-behandelten Astrozyten.*

(one-way ANOVA, Tukey's post hoc Test)

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

Eine potentielle Rolle freier Eisenionen für die Ammoniak-induzierte Hemmung der Astrozytenproliferation wurde durch fluorimetrische Quantifizierung der DNA-Menge in den Astrozytenkulturen 72h nach Aussaat gemessen. Wie in Abbildung 19 dargestellt, war die Hoechst34580 Fluoreszenz in den mit NH₄Cl inkubierten Astrozyten 72h nach Aussaat der Zellen niedriger als in den unbehandelten Kontrollen. Da Ammoniak nicht toxisch auf die Astrozyten wirkt (1), lassen diese Ergebnisse vermuten, dass in den mit NH₄Cl behandelten Zellen weniger DNA innerhalb des Inkubationszeitraums gebildet wurde. Dieser Effekt war in den mit den Eisenchelatoren PIH oder BIP-inkubierten Astrozyten nicht beobachtbar.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass intrazellulär freien Eisenionen eine Rolle zukommt bei der durch NH₄Cl induzierten Proliferationshemmung kultivierter Astrozyten.

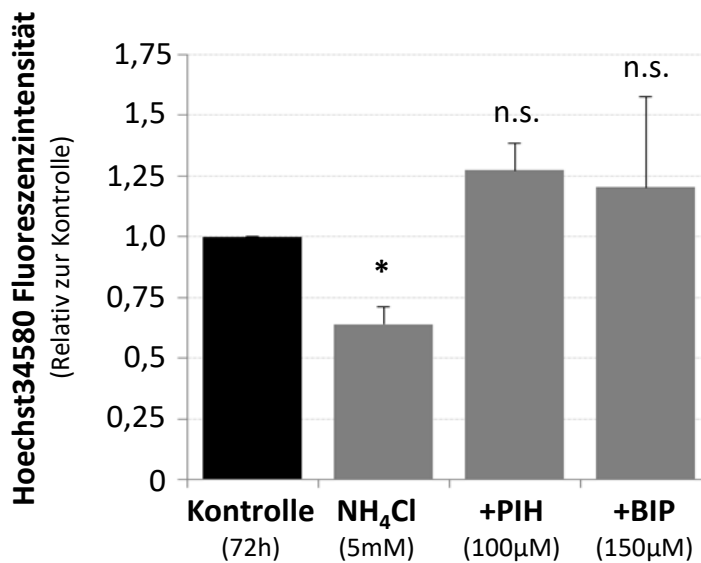


Abbildung 19: Rolle intrazellulärer freier Eisenionen für die Ammoniak-induzierte Proliferationshemmung kultivierter Rattenastrozyten.

Die Astrozyten blieben unbehandelt oder wurden 30 Minuten mit PIH (100µM) oder BIP (150µM) vorinkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen für 72h mit NH₄Cl (5mM) inkubiert oder blieben unbehandelt. Die Hoechst34580 Fluoreszenz in den mit NH₄Cl inkubierten Zellen ist relativ angegeben zu den jeweiligen Kontrollen (unbehandelt, PIH, BIP).

*: statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. n.s.: nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.

(one-way ANOVA, Tukey's post hoc Test)

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

Auch wenn die Astrozyten mit Fe(II)Cl₂ (25µM, 10 Minuten Inkubation, bis 18h in Fe(II)Cl₂-freiem Medium weiterkultiviert) oder mit Hämin (1µM oder 5µM, 72h) inkubiert wurden, wurde gegenüber den unbehandelten Kontrollen eine niedrigere Hoechst34580 Fluoreszenzintensität gemessen. Wurden die Astrozyten gleichzeitig mit dem Eisenchelator PIH und Hämin für 72h inkubiert war die Hoechst34580 Fluoreszenz gegenüber der Kontrolle nicht weiter verringert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass eine Eisenionenfreisetzung aus Hämin verantwortlich ist für die Hämin-induzierte Astrozytenproliferationshemmung. Die Ergebnisse zeigen, dass intrazelluläre freie Eisenionen für die NH₄Cl-induzierte Proliferationshemmung bedeutsam sind (Abb. 19) und, dass freie Eisenionen wie auch Hämin einen ähnlichen Effekt vermitteln (Abb. 20).

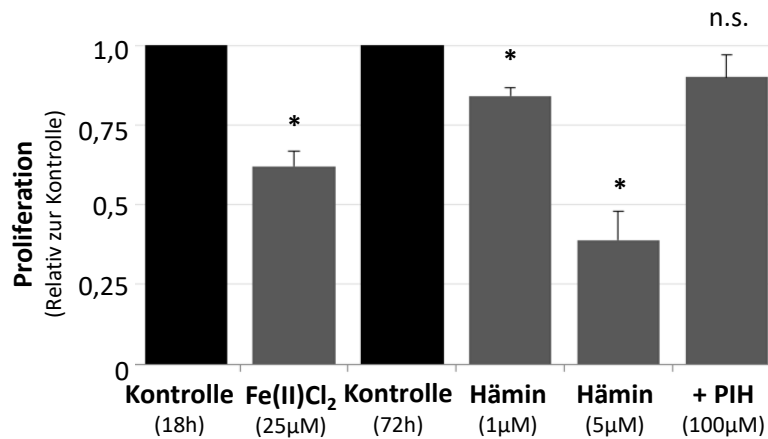


Abbildung 20: Bedeutung intrazellulärer freier Eisenionen für die durch Ammoniak induzierte Proliferationshemmung kultivierter Rattenastrozyten.

Die Astrozyten wurden mit Fe(II)Cl₂ (25µM), Hämin (1µM oder 5µM) oder Hämin (5µM) + PIH (100µM) über die angegebene Zeit inkubiert. Als Kontrolle blieben die Zellen unbehandelt oder wurden mit PIH (100µM) ohne Hämin inkubiert.

**: statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. n.s.: nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle.*

(n=3 unterschiedliche Experimente, T-Test nach Student, jede experimentelle Bedingung wurde mit unabhängigen Kontrollen untersucht).

(modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

5. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf eine wichtige und bisher unbekannte Bedeutung einer durch Ammoniak vermittelten Erhöhung der intrazellulären Spiegel freier Eisenionen in Astrozyten für die Pathogenese der HE hin. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung der intrazellulären Spiegel ungebundener Eisenionen bedeutsam ist für durch Ammoniak induzierten oxidativen Stress und Seneszenz in kultivierten Astrozyten.

5.1. Einfluss von Ammoniak auf die Eisenhomöostase in Astrozyten

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass Ammoniak die Eisenhomöostase in kultivierten Rattenastrozyten beeinträchtigt. Dies wird deutlich anhand Ammoniak-induzierter Expressionsänderungen von in den Eisenstoffwechsel involvierten Genen und Proteinen. Der Eisenexporter FPN und der Eisenchelatbildner Ferritin sind besonders bedeutsam für die Aufrechterhaltung konstanter Spiegel freier Eisenionen in den Zellen. Eine erhöhte Konzentration freier Eisenionen kann über eine Expressionssteigerung von FPN normalisiert werden. Daher sind die Expressionssteigerungen des Eisenexporters FPN und des Eisenchelatbildners Ferritin Anhaltspunkte für eine erhöhte Konzentration freier Eisenionen in den Astrozyten (Abb. 8, Tab. 9). Interessanterweise wurde Ferritin nicht nur im Zytosol hochreguliert, sondern akkumulierte auch im Zellkern von mit NH_4Cl inkubierten Rattenastrozyten. Arbeiten anderer weisen darauf hin, dass hierdurch DNA vor oxidativen Schäden geschützt werden kann (126), da DNA-Abschnitte durch das Anlagern des Ferritin-Proteins abgeschirmt werden und dadurch unerreichbar werden für schädigende reaktive Stick- und Sauerstoffspezies (46). Weitergehende Untersuchungen sind notwendig, um diese Annahme zu überprüfen.

Es ist bekannt, dass der metallabhängige Transkriptionsfaktor (MTF) 1 durch Bindung freier Eisenionen aktiviert wird. Hierdurch steigert er die Expression von in den Metallionen-Stoffwechsel involvierten Genen und kann toxischen Wirkungen freier Metallionen entgegenwirken. In diesem Zusammenhang wurde auch FPN als MTF-1-responsives Gen diskutiert (127, 128). Da es durch Ammoniak zu einer erhöhten Konzentration an freien

Eisenionen in den Astrozyten kommt, könnte die Hochregulation von FPN eine Folge der Aktivierung von MTF 1 sein. Übereinstimmend damit, haben die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, dass die mRNA-Spiegel von FPN auch durch eine experimentelle Überladung mit Eisenionen hochreguliert werden (Abb. 11).

Interessanterweise wird Heparin in Ammoniak-exponierten Astrozyten runterreguliert. Da Heparin den Abbau von FPN induziert, könnte somit die Erhöhung der FPN-Proteinspiegel auch eine Folge der Herunterregulation von Heparin in mit Ammoniak inkubierten Astrozyten sein (Abb. 10). Obwohl FPN hochreguliert wird, deuten die Ergebnisse darauf, dass die Kapazität der Astrozyten Eisenionen aus dem Zytosol in den Extrazellularraum zu transportieren verringert sein muss. Dies könnte eine Folge der Herunterregulation von CP und Heparin sein (Abb. 9, Tab. 9). In Übereinstimmung mit dieser Annahme stieg die Konzentration freier Eisenionen in den mit Ammoniak-exponierten Astrozyten deutlich an (Abb. 14, Tab. 10).

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden die Fluoreszenzindikatoren RDA sowie RhoNoxTM-1 verwendet, die selektiv Fe²⁺-Ionen binden (129). RDA lokalisiert dabei in Mitochondrien, während RhoNoxTM-1 freie Eisenionen in Lysosomen/ Endolysosomen bindet (129, 130). Geschädigte und funktionsbeeinträchtigte Mitochondrien werden durch Mitophagie in Lysosomen/ Autophagosomen abgebaut. Dies führt zu einer Freisetzung von freien Eisenionen, welche über den DMT1-Transporter in das Zytosol abgegeben werden. Hierüber kann der Pool an freien Eisenionen im Zytosol erhöht werden. Es ist denkbar, dass dieser Mechanismus zu der durch Ammoniak induzierten Erhöhung der Spiegel freier zweiwertiger Eisenionen im Zytosol beiträgt.

Diese fluoreszierenden Eisenchelatoren zeigten eine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Eisenionen in den mit Ammoniak behandelten Astrozyten (Abb. 14, Tab. 10). Dabei ist zu bedenken, dass eine längere Inkubation der Zellen mit geringeren Ammoniakkonzentrationen den Eisenspiegel nach längeren Inkubationszeiten auf ein ähnliches Niveau anheben könnte, wie es bereits nach

kürzeren Inkubationszeiten mit höheren Ammoniakkonzentrationen beobachtet wird. Dies könnte auch erklären, warum die Inkubation der Astrozyten mit 0,5mM NH₄Cl im Gegensatz zu 5mM nicht ausreichende Expressionserniedrigungen von CP und Hephaestin nach 72 Stunden zu induzieren.

Eine mögliche Erklärung für die erhöhten intrazellulären Spiegel freier Eisenionen könnte eine durch Ammoniak induzierte mitochondriale Dysfunktion sein, die zum autophagischen Abbau von Mitochondrien durch die sogenannte Mitophagie führt (131, 132).

Bei der Mitophagie wird das aus mitochondrialen Proteinen freigesetzte Häm über Transporter in das Zytosol abgegeben (133), um nachfolgend HO1-vermittelt zweiwertige Eisenionen aus Häm freizusetzen. Eine verstärkte Freisetzung von Eisenionen aus Häm könnte über die Ammoniak-induzierte Expressionssteigerung der HO1 in kultivierten Rattenastrozyten vermittelt werden (75).

Von besonderer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass auch in *post mortem* Hirnen von Zirrhosepatienten mit HE gesteigerte HO1 mRNA Spiegel gefunden wurden (62).

5.2. Bedeutung der gestörten Eisenhomöostase für die Bildung von oxidativem Stress in mit Ammoniak-behandelten Astrozyten

Die erhöhte Konzentration an freien Eisenionen im Zytosol kann zur Folge haben, dass es in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) zu einer gesteigerten Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalanionen in der sogenannten Fenton-Reaktion kommt (88).



Abbildung 21: Die Fenton-Reaktion.

Bildung von Hydroxylradikalen durch zweiwertige Eisenionen-vermittelte Reduktion von Wasserstoffperoxid.

Als potenzielle Quelle für Bildung von H₂O₂ in kultivierten Rattenastrozyten wurde dabei die NADPH-Oxidase 4 (Nox4) identifiziert. Diese wird, höchstwahrscheinlich durch

Herunterregulation von Nox4-degradierenden miRNA-Spezies, über einen posttranskriptionellen Mechanismus durch Ammoniak hochreguliert (1).

Die durch Ammoniak induzierte RNA-Oxidation konnte sowohl durch Eisenchelatoren (diese Arbeit) aber auch durch Nox4-siRNA verhindert werden (1). Dies spricht dafür, dass durch Nox4 gebildetes Wasserstoffperoxid in Gegenwart freier zweiwertiger Eisenionen über die sogenannte Fenton-Reaktion zur Bildung von Hydroxylradikalen führt, welche nachfolgend RNA oxidieren können.

Die Bedeutung der RNA-Oxidation für die hepatische Enzephalopathie ist noch nicht abschließend geklärt, aber es ist denkbar, dass über diesen Mechanismus, neben anderen Effekten, die Glutathomöostase in den Astrozyten durch Herunterregulation des Glutamat-Aspartat-Transporters (GLAST) gestört wird (46).

In diesem Zusammenhang müsste eine Eisenchelierung in den Astrozyten auch die Herunterregulation des GLAST und die damit verbundene Glutamataufnahmestörung in den mit Ammoniak-behandelten Astrozyten vermindern. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um diese Annahme zu überprüfen.

5.3. Bedeutung der beeinträchtigten Eisenhomöostase für die durch Ammoniak induzierte Astrozytenseneszenz

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen weiterhin, dass die Ammoniak-induzierte Erhöhung der intrazellulären Eisenionenkonzentrationen bedeutsam ist für die Induktion von Astrozytenseneszenz (70).

Wie schon in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde, steigerte Ammoniak, über die Bildung von oxidativem Stress (Abb. 15), die nukleäre Akkumulation von aktiviertem p53, p21 (Abb. 16) und die Transkription von p21 und GADD45 α (Abb. 18). Darüber hinaus zeigen die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, dass nicht nur Eisenchelatoren dies verhindern, sondern dass eine Eisenüberladung der Zellen auch einen ähnlichen Effekt auf die nukleäre Akkumulation von aktiviertem p53 und p21 hat und Seneszenz vermittelt (Abb. 17). Dies deutet auf eine Beteiligung freier Eisenionen an der Ammoniak-induzierten

Astrozytenseneszenz hin. In Übereinstimmung damit verhinderte auch die Chelierung freier Eisenionen die durch Ammoniak vermittelte Hemmung der Proliferation (Abb. 19).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten außerdem darauf hin, dass die Sequestrierung durch Ferritin sowie der Export von Eisen aus der Zelle durch FPN unzureichend ist, um die Bildung von oxidativem Stress in den Ammoniak-exponierten Astrozyten zu verhindern. In der Folge kommt es hierüber zur Induktion der Astrozytenseneszenz.

Die Bedeutung dieser Zellkulturbefunde für die Pathogenese der HE wird durch Untersuchungen gestützt, die eine erhöhte Expression von Seneszenzmarkern in *post mortem* Hirnproben von Zirrhosepatienten mit HE zeigen (1). Interessanterweise zeigen diese Untersuchungen auch eine gesteigerte Expression von Ferritin und Expressionsänderungen von weiteren Genen, die im Zusammenhang mit dem Eisenstoffwechsel stehen (1). Damit lassen diese Befunde eine beeinträchtigte Eisenhomöostase auch im Gehirn von Zirrhosepatienten mit HE vermuten (1).

5.4 Mechanismen der Ammoniak-induzierten RNA-Oxidation und Astrozytenseneszenz

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Befunde, sowie weitere Untersuchungen (134) wurden kürzlich herangezogen, um den Mechanismus zu beschreiben, über den Ammoniak in kultivierten Rattenastrozyten Seneszenz induziert (1).

Demnach steigert Ammoniak über die Glutaminsynthetase die Bildung von Glutamin in den Astrozyten, welches im Hexosamin-Biosynthese-Stoffwechselweg (HBS) durch die Fruktose-6-Phosphat Amidotransferase (GFAT1/2) für die Synthese von Glucosamin-6-Phosphat (GlcN-6-P) herangezogen wird. Die weitere Metabolisierung von GlcN-6-P-Spiegel im HBS steigert nachfolgend die Bildung von aktiviertem Glucosamin und darüber die O-GlcNAc-Transferase (OGT) -vermittelte O-GlcNAcylierung von bislang nicht identifizierten Proteinen in den Astrozyten.

Die Ergebnisse in (1) lassen vermuten, dass die O-GlcNAcylierung bislang unbekannter Proteine die Transkription der pri-miR326-3p blockiert. Interessanterweise ist pri-miR326-3p

ein Intron im beta-Arrestin Gen und wird mit beta-Arrestin kotranskribiert. Daher könnte die Transkriptionshemmung der pri-miR326-3p Folge einer durch O-GlcNAcylierung vermittelten Hemmung der RNA-Polymerase II sein. Hierfür spricht, dass Ammoniak sowohl die Transkription von beta-Arrestin wie auch von pri-miR326-3p hemmt und beides aufgehoben wird durch siRNA-vermittelte Herunterregulation der OGT (1).

Die Herunterregulation der miR326-3p konnte in mit Ammoniak inkubierten Astrozyten in Zusammenhang gebracht werden mit der Hochregulation der HO1 und Nox4 (1, 134) und der Induktion von Seneszenz (76).

Wie in dieser Arbeit gezeigt ist eine Erhöhung der Konzentration freier Eisenionen bedeutsam für durch Ammoniak induzierten oxidativen Stress und Seneszenz.

Im Zusammenhang mit der durch Ammoniak gesteigerten Nox4 Expression wurde daher vermutet, dass eine HO1-vermittelte Eisenfreisetzung und eine Nox4-abhängige H₂O₂-Bildung in der Fenton-Reaktion die Bildung von Hydroxylradikalen bewirkt. Über diesen Mechanismus wird p53-vermittelt die Expression der zellzyklusregulierenden Gene p21 und GADD45α gesteigert und Astrozytenseneszenz induziert (Abb. 20).

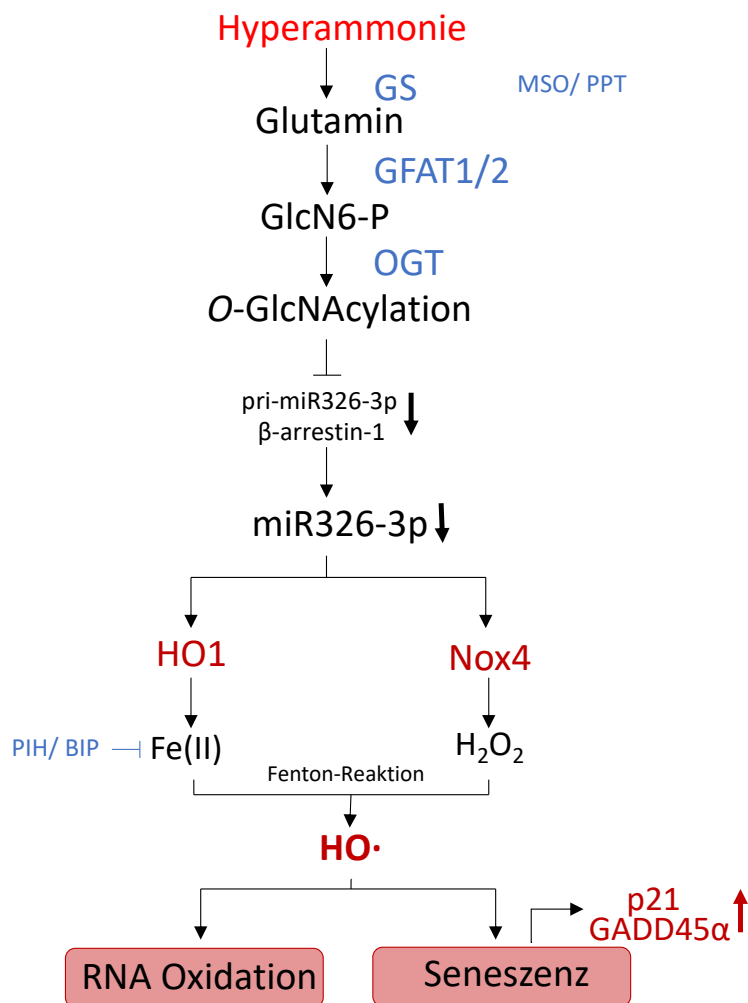


Abbildung 22: Mechanismus der Ammoniak-induzierten RNA-Oxidation und Astrozytenseneszenz.

Ammoniak steigert die Expression der HO1 Glutamin- und GlcN-6-P-Synthese-vermittelt und über eine O-GlcNAcylierungs-abhängige Hemmung der Transkription der pri-miR326-3p. Die Runterregulation von miR326-3p bewirkt eine gesteigerte Expression der HO1 und der Nox4 und vermittelt die Bildung von Hydroxyl-Radikal-Anionen in der Fenton-Reaktion. Als Folge kommt es zur RNA-Oxidation und zur p53-abhängigen Transkription der zellzyklushemmenden Gene p21 und GADD45 α und der Induktion von Astrozytenseneszenz. (modifiziert nach (1), mit Genehmigung des Verlags)

5.5. *In vivo* Relevanz

In Übereinstimmung mit den an Zellkulturen erhobenen Befunden, lassen Untersuchungen an *post mortem* Hirnproben vermuten, dass eine zerebrale Beeinträchtigung der Eisenhomöostase auch bei Patienten mit Leberzirrhose und HE vorliegt. Diese Untersuchungen wurden an *post mortem* Hirnproben aus zwei unabhängigen Kohorten durchgeführt (1). Hier wurden Expressionsänderungen multipler, in die Eisenhomöostase

involvierter Gene gefunden. Insbesondere für die Ferritin mRNA wurde eine signifikante Erhöhung in *post mortem* Hirngewebe von Zirrhosepatienten mit HE in beiden Kohorten beobachtet (1).

Da Ferritin ein Indikator für die freien Eisenionen im Zytosol sind (135), weisen diese Daten auf eine beeinträchtigte Eisenhomöostase und eine erhöhte Konzentration an freien Eisenionen im Gehirn von Patienten mit Leberzirrhose und HE hin (1).

Auch Surrogatmarker für oxidativen Stress und Seneszenz waren erhöht in *post mortem* Hirnproben von Zirrhosepatienten mit HE. Daher erscheint es möglich, dass eine Beeinträchtigung der Eisenhomöostase im Gehirn der HE-Patienten ähnlich wie in den kultivierten Astrozyten, ebenfalls mit der Bildung von oxidativem Stress und Seneszenz in Verbindung steht. Es wird angenommen, dass Astrozytenseneszenz *in vivo* permanente strukturelle Änderungen verursacht und so zu einer Störung der synaptischen Vernetzung führt (73).

Ob dies für das Fortbestehen einer kognitiven Beeinträchtigung bei Patienten mit Leberzirrhose nach einer erkennbaren HE-Episode verantwortlich ist, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden (73).

5.6. Limitationen der vorliegenden Arbeit

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen auf eine Ammoniak-induzierte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Eisenionen hin. Ein indirekter Hinweis darauf ist die durch Ammoniak induzierte Steigerung von FPN. Da NH_4Cl gleichzeitig die für die Funktionalität von FPN bedeutsamen Faktoren CP und Hephaestin herunterregulierte, wurde vermutet, dass der Export freier Eisenionen, der exklusiv über FPN erfolgt, beeinträchtigt sein muss.

Der Export von Eisenionen aus den Astrozyten wurde jedoch nicht direkt gemessen. Dies könnte in zukünftigen Untersuchungen erfolgen z.B. durch Quantifizierung von freien Eisenionen im Zellkulturmedium der Astrozyten.

Für die durchgeführten Versuche war es wichtig, dass die verwendeten Fluoreszenzindikatoren selektiv Fe^{2+} -Ionen detektieren, weil diese bedeutsam sind für die

Bildung von oxidativem Stress. Hierfür wurden RDA sowie RhoNoxTM-1 verwendet, die spezifisch zweiwertige, aber nicht dreiwertige Eisenionen binden.

Ein Vorteil dieser Farbstoffe ist, dass man mit ihnen Eisenionen in zellulären Kompartimenten nachweisen kann.

Allerdings handelt es sich hierbei um einen indirekten Nachweis, da die Konzentration freier Eisenionen in der Zelle nur semiquantitativ in Relation zur Kontrolle ermittelt wurde.

In zukünftigen Untersuchungen könnte die Konzentration freier Eisenionen in zytosolischen Fraktionen kultivierter Astrozyten quantitativ bestimmt werden.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist, dass die an kultivierten Zellen erhobenen Befunde noch nicht tierexperimentell untersucht bzw. bestätigt wurden.

Eine Studie von Wang et al (2013) an einem Tiermodell zur chronischen HE lässt aber bereits eine Relevanz der HO1 für die Pathogenese der HE vermuten (136). Ob dies aber auch im Zusammenhang steht mit einer HO1-vermittelten Eisenfreisetzung aus Häm, welche oxidativen Stress vermittelt, bleibt derzeit unklar.

Dies muss zwingend tierexperimentell geklärt werden, bevor z.B. spezifische HO1 Inhibitoren wie sie derzeit entwickelt werden auch von therapeutischer Relevanz für Patienten mit Leberzirrhose und HE sein könnten.

Die Verwendung von Eisenchelatoren als Therapeutika bei Patienten mit Leberzirrhose mit HE erscheint derzeit fragwürdig, da hierdurch der Pool an freien Eisenionen im gesamten Organismus verringert würde und dies erhebliche Nebenwirkungen mit sich bringen könnte.

5.7. Ausblick

Die durch Ammoniak induzierte Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Eisenionen in den Astrozyten konnte in den vorliegenden Untersuchungen als neuartiger Mechanismus identifiziert werden, über den Ammoniak oxidativen Stress und Seneszenz in den Astrozyten induziert.

Im Rahmen der Pathogenese der HE spielt oxidativer Stress eine bedeutsame Rolle. Eine unspezifische Therapie mit Antioxidantien ist aber vermutlich mit vielen Nebenwirkungen verbunden und daher ungeeignet. Eine Behandlung der HE mit Eisenchelatoren könnte

zumindest kurzfristig zerebralen oxidativen Stress abmildern. Eine langfristige Lösung stellt diese Therapie aber nicht dar, da eine unspezifische Chelierung von Eisen einen systemischen Eisenmangel induzieren würde.

Zukünftige Untersuchungen könnten daher darauf ausgerichtet werden, die Wirksamkeit spezifischer HO1 Inhibitoren auf zerebralen oxidativen Stress und motorische und kognitive Beeinträchtigungen in HE-Tiermodellen zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

1. Görg B, Karababa A, Schütz E, Paluschinski M, Schrimpf A, Shafiqullina A, Castoldi M, Bidmon HJ, Häussinger D. O-GlcNAcylation-dependent upregulation of HO1 triggers ammonia-induced oxidative stress and senescence in hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2019;71:930-941.
2. Häussinger D, Schliess F. Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 2005;47:64-70.
3. Labenz J. Epidemiologie und Diagnostik der hepatischen Enzephalopathie (EpHE Studie). *Z Gastroenterol* 2014;52:KG116.
4. Singh GK, Hoyert DL. Social epidemiology of chronic liver disease and cirrhosis mortality in the United States, 1935-1997: trends and differentials by ethnicity, socioeconomic status, and alcohol consumption. *Hum Biol* 2000;72:801-820.
5. Stroffolini T, Sagnelli E, Almasio P, Ferrigno L, Craxi A, Mele A. Characteristics of liver cirrhosis in Italy: results from a multicenter national study. *Dig Liver Dis* 2004;36:56-60.
6. Michitaka K, Nishiguchi S, Aoyagi Y, Hiasa Y, Tokumoto Y, Onji M. Etiology of liver cirrhosis in Japan: a nationwide survey. *J Gastroenterol* 2010;45:86-94.
7. Kim YS, Um SH, Ryu HS, Lee JB, Lee JW, Park DK, Jin YT, Chun HJ, Lee HS, Lee SW, Choi JH, Kim CD, Hyun JH. The prognosis of liver cirrhosis in recent years in Korea. *J Korean Med Sci* 2003;18:833-841.
8. Rahimi RS, Elliott AC, Rockey DC. Altered mental status in cirrhosis: etiologies and outcomes. *J Investig Med* 2013;61:695-700.
9. Romero-Gómez M, Montagnese S, Jalan R. Hepatic encephalopathy in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol* 2015;62:437-447.
10. Cichoż-Lach H, Michalak A. Current pathogenetic aspects of hepatic encephalopathy and noncirrhotic hyperammonemic encephalopathy. *World Journal of Gastroenterology : WJG* 2013;19:26-34.
11. Ferenci P, Lockwood A, Mullen K, Tarter R, Weissenborn K, Blei AT. Hepatic encephalopathy--definition, nomenclature, diagnosis, and quantification: final report of the working party at the 11th World Congresses of Gastroenterology, Vienna, 1998. *Hepatology* 2002;35:716-721.
12. Häussinger D, Kaiser S, Stehle T, Gerok W. Liver carbonic anhydrase and urea synthesis. The effect of diuretics. *Biochem Pharmacol* 1986;35:3317-3322.
13. Häussinger D, Kircheis G. Hepatic encephalopathy. *Praxis (Bern 1994)* 2002;91:957-963.
14. Häussinger D, Dhiman RK, Felipe V, Görg B, Jalan R, Kircheis G, Merli M, Montagnese S, Romero-Gómez M, Schnitzler A, Taylor-Robinson SD, Vilstrup H. Hepatic encephalopathy. *Nat Rev Dis Primers* 2022;8:43.
15. Häussinger D. Hepatic encephalopathy. *Praxis (Bern 1994)* 2006;95:1543-1549.
16. Häussinger D, Córdoba J, Kircheis G. Definition and assessment of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism* 2006:423-432.
17. Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Ruckert N, Hecker H. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol* 2001;34:768-773.
18. Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2002;35:357-366.
19. Weissenborn K, Scholz M, Hinrichs H, Wiltfang J, Schmidt FW, Kunkel H. Neurophysiological assessment of early hepatic encephalopathy. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 1990;75:289-295.
20. Bajaj JS, Hafeezullah M, Franco J, Varma RR, Hoffmann RG, Knox JF, Hirschke D, Hammeke TA, Pinkerton SD, Saeian K. Inhibitory control test for the diagnosis of minimal hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 2008;135:1591-1600.e1591.
21. Córdoba J. Hepatic Encephalopathy: From the Pathogenesis to the New Treatments. *ISRN Hepatol* 2014;2014:236268.

22. Sidhu SS, Sharma BC, Goyal O, Kishore H, Kaur N. L-ornithine L-aspartate in bouts of overt hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2018;67:700-710.
23. Hudson M, Schuchmann M. Long-term management of hepatic encephalopathy with lactulose and/or rifaximin: a review of the evidence. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2019;31:434-450.
24. Mullen KD, Sanyal AJ, Bass NM, Poordad FF, Sheikh MY, Frederick RT, Bortey E, Forbes WP. Rifaximin is safe and well tolerated for long-term maintenance of remission from overt hepatic encephalopathy. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2014;12:1390-1397.e1392.
25. Labenz C, Worns MA, Schattenberg JM, Huber Y, Galle PR, Labenz J. Epidemiology of hepatic encephalopathy in German hospitals - the EpHE study. *Z Gastroenterol* 2017;55:741-747.
26. Gluud LL, Dam G, Les I, Marchesini G, Borre M, Aagaard NK, Vilstrup H. Branched-chain amino acids for people with hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;5:Cd001939.
27. Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Córdoba J, Ferenci P, Mullen KD, Weissenborn K, Wong P. 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. *Hepatology* 2014;60:715-735.
28. Goh ET, Andersen ML, Morgan MY, Gluud LL. Flumazenil versus placebo or no intervention for people with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2017;7:Cd002798.
29. Lautz HU, Selberg O, Körber J, Bürger M, Müller MJ. Protein-calorie malnutrition in liver cirrhosis. *Clin Invest* 1992;70:478-486.
30. Sam J, Nguyen GC. Protein-calorie malnutrition as a prognostic indicator of mortality among patients hospitalized with cirrhosis and portal hypertension. *Liver Int* 2009;29:1396-1402.
31. Kalman DR, Saltzman JR. Nutrition status predicts survival in cirrhosis. *Nutr Rev* 1996;54:217-219.
32. Córdoba J, López-Hellín J, Planas M, Sabín P, Sanpedro F, Castro F, Esteban R, Guardia J. Normal protein diet for episodic hepatic encephalopathy: results of a randomized study. *Journal of Hepatology* 2004;41:38-43.
33. Pazgan-Simon M, Zuwała-Jagiello J, Serafińska S, Simon K. Nutrition principles and recommendations in different types of hepatic encephalopathy. *Clin Exp Hepatol* 2015;1:121-126.
34. Himoto T, Masaki T. Associations between Zinc Deficiency and Metabolic Abnormalities in Patients with Chronic Liver Disease. *Nutrients* 2018;10:88.
35. Yoshida Y, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Nakamura SI, Watanabe A, Tsuji T. Effects of zinc deficiency/zinc supplementation on ammonia metabolism in patients with decompensated liver cirrhosis. *Acta Med Okayama* 2001;55:349-355.
36. Al Binali HA. Night blindness and ancient remedy. *Heart Views* 2014;15:136-139.
37. Kiillerich S, Christiansen C. Distribution of serum zinc between albumin and alpha 2-macroglobulin in patients with different zinc metabolic disorders. *Clin Chim Acta* 1986;154:1-6.
38. Riggio O, Merli M, Capocaccia L, Caschera M, Zullo A, Pinto G, Gaudio E, Franchitto A, Spagnoli R, D'Aquilino E, et al. Zinc supplementation reduces blood ammonia and increases liver ornithine transcarbamylase activity in experimental cirrhosis. *Hepatology* 1992;16:785-789.
39. Grüngreiff K, Presser HJ, Franke D, Lösner B, Abicht K, Kleine FD. Correlations between zinc, amino acids and ammonia in liver cirrhosis. *Z Gastroenterol* 1989;27:731-735.
40. Licata A, Zerbo M, Como S, Cammilleri M, Soresi M, Montalto G, Giannitrapani L. The Role of Vitamin Deficiency in Liver Disease: To Supplement or Not Supplement? *Nutrients* 2021;13:4014.
41. Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, Gerok W, Hennig J. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolarity and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology* 1994;107:1475-1480.

42. Norenberg MD, Rama Rao KV, Jayakumar AR. Signaling factors in the mechanism of ammonia neurotoxicity. *Metab Brain Dis* 2009;24:103-117.
43. Hahn M, Massen O, Nencki M, Pawlow J. Die Eck'sche Fistel zwischen der unteren Hohlvene und der Pfortader und ihre Folgen für den Organismus. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 1893;32:161-210.
44. Gabuzda GJ. Ammonium metabolism and hepatic coma. *Gastroenterology* 1967;53:806-810.
45. Häussinger D, Kircheis G, Fischer R, Schliess F, vom Dahl S. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: a clinical manifestation of astrocyte swelling and low-grade cerebral edema? *J Hepatol* 2000;32:1035-1038.
46. Görg B, Qvartskhava N, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, Schliess F, Häussinger D. Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* 2008;48:567-579.
47. Häussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut* 2008;57:1156-1165.
48. Butterworth RF, Norenberg MD, Felipo V, Ferenci P, Albrecht J, Blei AT. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines. *Liver Int* 2009;29:783-788.
49. Weber FL, Jr., Friedman DW, Fresard KM. Ammonia production from intraluminal amino acids in canine jejunum. *Am J Physiol* 1988;254:G264-268.
50. Patel D, McPhail MJ, Cobbold JF, Taylor-Robinson SD. Hepatic encephalopathy. *Br J Hosp Med (Lond)* 2012;73:79-85.
51. Görg B, Schliess F, Häussinger D. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys* 2013;536:158-163.
52. Häussinger D, Sies H. Hepatic encephalopathy: clinical aspects and pathogenetic concept. *Arch Biochem Biophys* 2013;536:97-100.
53. Mannack G, Graf D, Donner MM, Richter L, Görg B, Vom Dahl S, Häussinger D, Schliess F. Taurothiocholic acid-3 sulfate impairs insulin signaling in cultured rat hepatocytes and perfused rat liver. *Cell Physiol Biochem* 2008;21:137-150.
54. Häussinger D, Görg B. Interaction of oxidative stress, astrocyte swelling and cerebral ammonia toxicity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2010;13:87-92.
55. Schliess F, Foster N, Görg B, Reinehr R, Häussinger D. Hypoosmotic swelling increases protein tyrosine nitration in cultured rat astrocytes. *Glia* 2004;47:21-29.
56. Schliess F, Görg B, Häussinger D. Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biol Chem* 2006;387:1363-1370.
57. Nunomura A, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Smith MA, Perry G. Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J Biomed Biotechnol* 2006;2006:82323.
58. Schliess F, Görg B, Fischer R, Desjardins P, Bidmon HJ, Herrmann A, Butterworth RF, Zilles K, Häussinger D. Ammonia induces MK-801-sensitive nitration and phosphorylation of protein tyrosine residues in rat astrocytes. *Faseb j* 2002;16:739-741.
59. Görg B, Qvartskhava N, Voss P, Grune T, Häussinger D, Schliess F. Reversible inhibition of mammalian glutamine synthetase by tyrosine nitration. *FEBS Lett* 2007;581:84-90.
60. Jayakumar AR, Liu M, Moriyama M, Ramakrishnan R, Forbush B, 3rd, Reddy PV, Norenberg MD. Na-K-Cl Cotransporter-1 in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *J Biol Chem* 2008;283:33874-33882.
61. Häussinger D, Schliess F. Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochem Int* 2005;47:64-70.
62. Görg B, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, Häussinger D. Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2010;52:256-265.
63. Häussinger D, Görg B, Reinehr R, Schliess F. Protein tyrosine nitration in hyperammonemia and hepatic encephalopathy. *Metab Brain Dis* 2005;20:285-294.
64. Qvartskhava N, Lang PA, Görg B, Pozdeev VI, Ortiz MP, Lang KS, Bidmon HJ, Lang E, Leibrock CB, Herebian D, Bode JG, Lang F, Häussinger D. Hyperammonemia in gene-targeted mice lacking functional hepatic glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:5521-5526.

65. Kröncke KD. Cellular stress and intracellular zinc dyshomeostasis. *Arch Biochem Biophys* 2007;463:183-187.
66. Li Y, Hough CJ, Suh SW, Sarvey JM, Frederickson CJ. Rapid translocation of Zn(2+) from presynaptic terminals into postsynaptic hippocampal neurons after physiological stimulation. *J Neurophysiol* 2001;86:2597-2604.
67. Van der Rijt CC, Schalm SW, Schat H, Foeken K, De Jong G. Overt hepatic encephalopathy precipitated by zinc deficiency. *Gastroenterology* 1991;100:1114-1118.
68. Frazzini V, Rockabrand E, Mocchegiani E, Sensi SL. Oxidative stress and brain aging: is zinc the link? *Biogerontology* 2006;7:307-314.
69. Kruczek C, Görg B, Keitel V, Pirev E, Kröncke KD, Schliess F, Häussinger D. Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia* 2009;57:79-92.
70. Görg B, Karababa A, Shafiqullina A, Bidmon HJ, Häussinger D. Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Glia* 2015;63:37-50.
71. Passos JF, Nelson G, Wang C, Richter T, Simillion C, Proctor CJ, Miwa S, Olijslagers S, Hallinan J, Wipat A, Saretzki G, Rudolph KL, Kirkwood TB, von Zglinicki T. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol* 2010;6:347.
72. Collado M, Serrano M: The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer*. Volume 6. England, 2006; 472-476.
73. Görg B, Karababa A, Häussinger D. Hepatic Encephalopathy and Astrocyte Senescence. *J Clin Exp Hepatol* 2018;8:294-300.
74. Görg B, Bidmon HJ, Häussinger D. Gene expression profiling in the cerebral cortex of patients with cirrhosis with and without hepatic encephalopathy. *Hepatology* 2013;57:2436-2447.
75. Warskulat U, Görg B, Bidmon HJ, Müller HW, Schliess F, Häussinger D. Ammonia-induced heme oxygenase-1 expression in cultured rat astrocytes and rat brain in vivo. *Glia* 2002;40:324-336.
76. Oenarto J, Karababa A, Castoldi M, Bidmon HJ, Görg B, Häussinger D. Ammonia-induced miRNA expression changes in cultured rat astrocytes. *Sci Rep* 2016;6:18493.
77. Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet* 2006;22:165-173.
78. Carroll AP, Goodall GJ, Liu B. Understanding principles of miRNA target recognition and function through integrated biological and bioinformatics approaches. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2014;5:361-379.
79. Lou G, Liu Y, Wu S, Xue J, Yang F, Fu H, Zheng M, Chen Z. The p53/miR-34a/SIRT1 Positive Feedback Loop in Quercetin-Induced Apoptosis. *Cell Physiol Biochem* 2015;35:2192-2202.
80. Ong SG, Lee WH, Kodo K, Wu JC. MicroRNA-mediated regulation of differentiation and trans-differentiation in stem cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2015;88:3-15.
81. Lau P, Bossers K, Janky R, Salta E, Frigerio CS, Barbash S, Rothman R, Sierksma AS, Thathiah A, Greenberg D, Papadopoulou AS, Achsel T, Ayoubi T, Soreq H, Verhaagen J, Swaab DF, Aerts S, De Strooper B. Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease. *EMBO Mol Med* 2013;5:1613-1634.
82. Schipper HM, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D. Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J Neurochem* 2009;110:469-485.
83. Calabrese V, Guagliano E, Sapienza M, Mancuso C, Butterfield DA, Stella AM. Redox regulation of cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Ital J Biochem* 2006;55:263-282.
84. Baranano DE, Snyder SH. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10996-11002.
85. Larsen R, Gouveia Z, Soares MP, Gozzelino R. Heme cytotoxicity and the pathogenesis of immune-mediated inflammatory diseases. *Front Pharmacol* 2012;3:77.
86. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;50:323-354.
87. Quintela-Carvalho G, Luz NF, Celes FS, Zanette DL, Andrade D, Menezes D, Tavares NM, Brodskyn CI, Prates DB, Gonçalves MS, de Oliveira CI, Almeida RP, Bozza MT, Andrade BB,

- Borges VM. Heme Drives Oxidative Stress-Associated Cell Death in Human Neutrophils Infected with *Leishmania infantum*. *Frontiers in Immunology* 2017;8:1620.
88. Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 2000;28:289-309.
89. Desmard M, Boczkowski J, Poderoso J, Motterlini R. Mitochondrial and cellular heme-dependent proteins as targets for the bioactive function of the heme oxygenase/carbon monoxide system. *Antioxid Redox Signal* 2007;9:2139-2155.
90. Dwyer BE, Nishimura RN, Lu SY. Differential expression of heme oxygenase-1 in cultured cortical neurons and astrocytes determined by the aid of a new heme oxygenase antibody. Response to oxidative stress. *Brain Res Mol Brain Res* 1995;30:37-47.
91. Manganaro F, Chopra VS, Mydlarski MB, Bernatchez G, Schipper HM. Redox perturbations in cysteamine-stressed astroglia: implications for inclusion formation and gliosis in the aging brain. *Free Radic Biol Med* 1995;19:823-835.
92. Vincent SR, Das S, Maines MD. Brain heme oxygenase isoenzymes and nitric oxide synthase are co-localized in select neurons. *Neuroscience* 1994;63:223-231.
93. Nakaso K, Kitayama M, Fukuda H, Kimura K, Yanagawa T, Ishii T, Nakashima K, Yamada K. Oxidative stress-related proteins A170 and heme oxygenase-1 are differently induced in the rat cerebellum under kainate-mediated excitotoxicity. *Neurosci Lett* 2000;282:57-60.
94. Paul BT, Manz DH, Torti FM, Torti SV. Mitochondria and Iron: current questions. *Expert Rev Hematol* 2017;10:65-79.
95. Shayeghi M, Latunde-Dada GO, Oakhill JS, Laftah AH, Takeuchi K, Halliday N, Khan Y, Warley A, McCann FE, Hider RC, Frazer DM, Anderson GJ, Vulpe CD, Simpson RJ, McKie AT. Identification of an intestinal heme transporter. *Cell* 2005;122:789-801.
96. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *J Inorg Biochem* 2002;91:9-18.
97. Burdo JR, Connor JR. Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *Biometals* 2003;16:63-75.
98. Mims MP, Prchal JT. Divalent metal transporter 1. *Hematology* 2005;10:339-345.
99. Dringen R, Bishop GM, Koeppe M, Dang TN, Robinson SR. The pivotal role of astrocytes in the metabolism of iron in the brain. *Neurochem Res* 2007;32:1884-1890.
100. Hoepken HH, Korten T, Robinson SR, Dringen R. Iron accumulation, iron-mediated toxicity and altered levels of ferritin and transferrin receptor in cultured astrocytes during incubation with ferric ammonium citrate. *J Neurochem* 2004;88:1194-1202.
101. Berg D, Gerlach M, Youdim MB, Double KL, Zecca L, Riederer P, Becker G. Brain iron pathways and their relevance to Parkinson's disease. *J Neurochem* 2001;79:225-236.
102. Koeppe AH, Dickson AC. Iron in the Hallervorden-Spatz syndrome. *Pediatr Neurol* 2001;25:148-155.
103. Puccio H, Koenig M. Friedreich ataxia: a paradigm for mitochondrial diseases. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:272-277.
104. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell* 2010;142:24-38.
105. Walter T. Effect of iron-deficiency anaemia on cognitive skills in infancy and childhood. *Baillieres Clin Haematol* 1994;7:815-827.
106. Youdim MB. Deficiency and excess of iron in brain function and dysfunction. *Nutr Rev* 2001;59:S83-85; discussion S85-87.
107. Yanatori I, Kishi F. DMT1 and iron transport. *Free Radic Biol Med* 2019;133:55-63.
108. Wang XS, Ong WY, Connor JR. A light and electron microscopic study of the iron transporter protein DMT-1 in the monkey cerebral neocortex and hippocampus. *J Neurocytol* 2001;30:353-360.
109. Burdo JR, Menzies SL, Simpson IA, Garrick LM, Garrick MD, Dolan KG, Haile DJ, Beard JL, Connor JR. Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res* 2001;66:1198-1207.

110. Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002;99:3505-3516.
111. Regan RF, Kumar N, Gao F, Guo Y. Ferritin induction protects cortical astrocytes from heme-mediated oxidative injury. *Neuroscience* 2002;113:985-994.
112. Ganz T. Cellular iron: ferroportin is the only way out. *Cell Metab* 2005;1:155-157.
113. Song D, Dunaief JL. Retinal iron homeostasis in health and disease. *Front Aging Neurosci* 2013;5:24.
114. Jeong SY, David S. Glycosylphosphatidylinositol-anchored ceruloplasmin is required for iron efflux from cells in the central nervous system. *J Biol Chem* 2003;278:27144-27148.
115. Kaneko K, Yoshida K, Arima K, Ohara S, Miyajima H, Kato T, Ohta M, Ikeda SI. Astrocytic deformity and globular structures are characteristic of the brains of patients with aceruloplasminemia. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002;61:1069-1077.
116. Matthiessen HP, Schmalenbach C, Müller HW. Astroglia-released neurite growth-inducing activity for embryonic hippocampal neurons is associated with laminin bound in a sulfated complex and free fibronectin. *Glia* 1989;2:177-188.
117. Booher J, Sensenbrenner M. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology* 1972;2:97-105.
118. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit* 2007;37:120-126.
119. Inc. B-RL. <https://www.bio-rad.com/featured/en/sybr-green-for-qpcr.html>. In; 2022.
120. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-408.
121. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012;9:676-682.
122. GORYO Chemical I. Specific detection of Fe²⁺ "FeRhoNox™-1"
https://www.2bscientific.com/getmedia/fbf6be7c-763e-47e1-a956-48f1101879d4/Goryo_Apli_Note_14_FeRhoNox-1-1009.pdf
123. Ponka P, Borová J, Neuwirt J, Fuchs O. Mobilization of iron from reticulocytes. Identification of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone as a new iron chelating agent. *FEBS Lett* 1979;97:317-321.
124. Kalinowski DS, Richardson DR. The evolution of iron chelators for the treatment of iron overload disease and cancer. *Pharmacol Rev* 2005;57:547-583.
125. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J* 2011;434:365-381.
126. Thompson KJ, Fried MG, Ye Z, Boyer P, Connor JR. Regulation, mechanisms and proposed function of ferritin translocation to cell nuclei. *J Cell Sci* 2002;115:2165-2177.
127. Kruczek C, Görg B, Keitel V, Bidmon HJ, Schliess F, Häussinger D. Ammonia increases nitric oxide, free Zn(2+), and metallothionein mRNA expression in cultured rat astrocytes. *Biol Chem* 2011;392:1155-1165.
128. Troadec MB, Ward DM, Lo E, Kaplan J, De Domenico I. Induction of FPN1 transcription by MTF-1 reveals a role for ferroportin in transition metal efflux. *Blood* 2010;116:4657-4664.
129. Hirayama T, Okuda K, Nagasawa H. A highly selective turn-on fluorescent probe for iron(II) to visualize labile iron in living cells. *Chemical Science* 2013;4:1250-1256.
130. Petrat F, Weisheit D, Lensen M, de Groot H, Sustmann R, Rauen U. Selective determination of mitochondrial chelatable iron in viable cells with a new fluorescent sensor. *Biochem J* 2002;362:137-147.
131. Rama Rao KV, Norenberg MD. Glutamine in the pathogenesis of hepatic encephalopathy: the trojan horse hypothesis revisited. *Neurochem Res* 2014;39:593-598.
132. Polletta L, Vernucci E, Carnevale I, Arcangeli T, Rotili D, Palmerio S, Steegborn C, Nowak T, Schutkowski M, Pellegrini L, Sansone L, Villanova L, Runci A, Pucci B, Morgante E, Fini M, Mai A, Russo MA, Tafani M. SIRT5 regulation of ammonia-induced autophagy and mitophagy. *Autophagy* 2015;11:253-270.
133. Khan AA, Quigley JG. Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases. *Biochim Biophys Acta* 2011;1813:668-682.

134. Kress GJ, Dineley KE, Reynolds IJ. The relationship between intracellular free iron and cell injury in cultured neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. *J Neurosci* 2002;22:5848-5855.
135. Yu B, Wen L, Xiao B, Han F, Shi Y. Single Prolonged Stress induces ATF6 alpha-dependent Endoplasmic reticulum stress and the apoptotic process in medial Frontal Cortex neurons. *BMC Neurosci* 2014;15:115.
136. Wang QM, Yin XY, Duan ZJ, Guo SB, Sun XY. Role of the heme oxygenase/carbon monoxide pathway in the pathogenesis and prevention of hepatic encephalopathy. *Mol Med Rep* 2013;8:67-74.

7. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Häussinger für seine Unterstützung und die Möglichkeit, diese Arbeit in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchzuführen.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Boris Görg bedanken, für die hervorragende Betreuung, die ständige Einsicht meiner Probleme und Fragen, seine wertvollen Anregungen und Ideen und die langwierige Korrektur dieser Arbeit. Er führte mich immer wieder auf den richtigen Weg und hatte jederzeit Verständnis, wenn es mal länger gedauert hat.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an die wundervolle Dr. Ayşe Karababa für die super Unterstützung und Betreuung, die vielen lustigen Momente im Labor und die neu gewonnene Freundschaft auch über diese Zeit hinaus.

Natürlich gilt auch ein Dank meiner Kommilitonin Linda Czeszewski für die schöne Zeit im Labor, das gemeinsame Leiden beim Schreiben unserer Arbeiten und die kleinen Motivationsschübe, wenn ich mal wieder alles hinschmeißen wollte.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Torsten Janssen und Jessica Oenarto für die tolle Unterstützung und bleibenden Freundschaften.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Familie für die langjährige Unterstützung bedanken. Meinen Eltern Danièle Sartor und Claude Schütz die immer wieder an mich geglaubt haben. Ich danke zudem meinem Mann Matthias Köster für die liebevolle Betreuung meiner Tochter, was mir vorallem am Ende den Rücken freigehalten hat. Meinem Schwiegervater Dr. Gerd Köster für den eine Doktorarbeit doch irgendwie einfach

dazugehört und meiner Schwiegermutter Dr. Christine Köster für die das nicht so ist, aber die mich trotzdem immer unterstützt hat.