

Hyperammonämie-induzierte Veränderungen im zerebralen Transkriptom und Proteom

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Alina Schrimpf-Nossenkis

geb. Schrimpf

aus Marl

Düsseldorf, Februar 2023

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

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Herr Prof. Dr. Dieter Häussinger
2. Herr Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 28. November 2023

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Fakultät eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. Häussinger für seine Unterstützung über den gesamten Zeitraum meiner Promotion und die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie durchführen zu können.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schmitt für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Boris Görg, der mein Projekt mit begleitet hat. Mit seiner fachlichen Kompetenz und durchgehenden Bereitschaft, Daten und Experimente umfassend zu diskutieren, hat er mich stets unterstützt. Weiterhin bin ich sehr dankbar für seine hilfreichen Anmerkungen und für das Gegenlesen der schriftlichen Ausführung meiner Dissertation.

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. Ayse Karababa für eine exzellente Einarbeitung, zahlreiche Unterstützungen und eine großartige Kollegin, die mir mit Rat und Tat immer zur Seite stand.

Herzlichen Dank ebenfalls an Herrn Dr. Hans-Jürgen Bidmon für seine Unterstützung und umfassende Einführung in die Präparation und Parzellierung von Mausgehirnen.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dr. Gereon Poschmann für seine Hilfe bei der Auswertung der Proteomanalyse, fachlichen Diskussionen, hilfreichen Anregungen und Bereitschaft den MS-Abschnitt meiner Dissertation gegenzulesen.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Dr. Jutta Kollet für Ihre Hilfe bei der Auswertung der Transkriptomanalyse und ihrer Bereitschaft den Transkriptom-Abschnitt meiner Dissertation gegenzulesen.

Lieben Dank an Olivia Knappe, für die stets angenehme und produktive Zusammenarbeit. Ich freue mich sehr, dass Du Deine Doktorarbeit im Rahmen dieses Projekts angefertigt hast. Vielen Dank für Dein Einverständnis Teile Deiner Daten mit in diese Arbeit aufnehmen und diskutieren zu dürfen.

Vielen herzlichen Dank ebenfalls an die außerordentliche technische Assistentin Michaela Fastrich, die immer zur Stelle war, mich bei Problemen fachlich und menschlich unterstützte. Vielen Dank für Deine Hilfe, die Du immer, ohne zu zögern angeboten hast, ungeachtet von Mehrarbeit oder Überstunden. Vielen lieben Dank für eine tolle Zusammenarbeit vom ersten Tag an!

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei meinen anderen Kollegen aus der experimentellen Hepatologie für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und Hilfestellungen unabhängig der

Arbeitsgruppenzugehörigkeit. Besonders möchte ich mich bei meinen Kollegen*innen, Torsten Janssen, Nicole Eichhorst, Vanessa Herbertz und Julia Pauli bedanken, für Eure zahlreichen Unterstützungen im Laboralltag, in der Zellkultur, bei der Präparation von Zellen und der Durchführung von Experimenten.

Im Besonderen möchte ich mich an dieser Stelle bei meinen Eltern Margarete und Frank Schrimpf bedanken, die mich immer unterstützt und während meiner gesamten Schullaufbahn, meines Studiums und letztlich während meiner Promotionszeit an mich geglaubt haben. Ihr wart bei der Bewältigung aller Hürden an meiner Seite, ohne Euch wäre ich nicht so weit gekommen!

Abschließend bedanke ich mich bei meinem Ehemann Ilja Nossenkis für seine unumstößliche Unterstützung, seinen Glauben an mich, seine Stärke und die Schulter zum Anlehnen. Du hast mich angefeuert und immer wieder motiviert mein Bestes zu geben!

Danke!

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

In Abstract-Form und als virtueller Vortrag auf der Tagung der deutschen Gesellschaft zum Studium der Leber/ *German Association of the Study of the Liver* (GASL) am 29.01.2021:

Lecture session III: Metabolism (inklusive NAFLD),

Titel: „*Identification of hyperammonemia-induced changes of the cerebral transcriptome and proteome*“.

In Abstract-Form und als ePoster-Session auf dem internationalen Leber Kongress *International Liver CongressTM* 23.-26.06.2021:

ePoster session: Gut microbiota and liver disease, Molecular and cellular biology,

Autoren: Olivia Knappe, Alina Schrimpf, Ayse Karababa, Linda Czeszewski, Hans-Jürgen Bidmon, Tom Lüdde, Dieter Häussinger, Boris Görg

Posternummer: PO-1357

Titel: „*Role of ASCT2 and KGA for ammonia-induced astrocyte senescence*“.

Erschienen bei *Analytical Biochemistry SI: Brain and Hepatic Encephalopathy*:

Anal Biochem. 2022 Mar 15; 641:114548. doi: 10.1016/j.ab.2022.114548. Epub 2022 Jan 12.

PMID: 35032459

Autoren: Alina Schrimpf, Olivia Knappe, Natalia Qvartskhava, Gereon Poschmann, Kai Stühler, Tom Lüdde, Dieter Häussinger, Boris Görg

Titel: „*Hyperammonemia-induced changes in the cerebral transcriptome and proteome*“.

Zusammenfassung

Die hepatische Enzephalopathie (HE) ist eine lebensbedrohliche Komplikation bei akuten oder chronischen Leberfunktionsstörungen. Die Symptome der HE umfassen Beeinträchtigungen von Motorik und Kognition in unterschiedlicher Schwere. In der Pathogenese der HE ist Ammoniak ein Haupttoxin. Die hierdurch im Gehirn hervorgerufenen molekularen Veränderungen sind jedoch nur unvollständig verstanden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Genexpressionsunterschiede und Änderungen der Spiegel spezifischer Proteine im Gehirn der leberspezifischen Glutamin Synthetase-Knockout Maus (LGS-KO) zu identifizieren. Diese Tiere zeigen eine lebenslange chronische Hyperammonämie in Abwesenheit eines Leberschadens und eignen sich daher insbesondere dafür Auswirkungen einer reinen Hyperammonämie auf das Gehirn zu untersuchen. In Transkriptom- und Proteomanalysen wurden im zerebralen Kortex, Hippocampus und Zerebellum der LGS-KO-Mäuse 214, 44 und 163 Gene sowie 4, 34 und 15 Proteine gefunden, deren Expression oder Spiegel signifikant verändert waren gegenüber den Wildtyp-Kontrollen. Die identifizierten Genexpressionsänderungen im zerebralen Kortex wurden hauptsächlich der RNA-Prozessierung zugeordnet.

Für weiterführende Untersuchungen wurden die Methyltransferase CARM1, das RNA-bindende Protein TROVE2, der Eisenchelator LCN2 und der Glutamintransporter ASCT2 selektiert. Immunfluoreszenzanalysen zeigten CARM1, TROVE2, LCN2 und ASCT2 in Astrozyten im Gehirn von Maus und Ratte und in Rattenastrozyten *in vitro*. Die Inkubation von kultivierten Rattenastrozyten mit Ammoniumchlorid (NH_4Cl , 5 mM) veränderte die Expression und Spiegel der selektierten Kandidaten in ähnlicher Weise wie im Gehirn der LGS-KO-Mäuse. Untersuchungen zur Funktionalität wiesen außerdem auf eine Bedeutung der durch NH_4Cl -induzierten Änderungen der Proteinspiegel von CARM1 und ASCT2 für Astrozyten-Seneszenz, von LCN2 für die intrazelluläre Eisenhomöostase und von TROVE2 für die RNA-Qualitätskontrolle. ASCT2 und LCN2 Proteinspiegel waren ebenfalls im zerebralen Kortex von Ammoniumazetat-intoxizierter Ratten (4,5 mmol/Kg Körpergewicht, 24 h) erhöht. TROVE2 und ASCT2 mRNA-Spiegel waren signifikant erhöht in humanen *post mortem* Hirngewebe von Patienten mit Leberzirrhose und HE.

Die Untersuchungen und Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmalig umfassende Änderungen im zerebralen Transkriptom und Proteom von LGS-KO-Mäusen, die potenziell bedeutsam sind für Hyperammonämie-induzierte Hirnfunktionsstörungen.

Abstract

Hepatic encephalopathy (HE) is a severe complication of acute or chronic liver dysfunction. The symptoms are motoric and cognitive impairments in different degrees. The pathogenesis of HE is triggered by ammonia as a main toxin. The molecular alterations evoked by hyperammonemia-induced cerebral impairment are not fully understood and a matter of current research.

The aim of the present study was to identify expression alterations in the brain of the liver-specific glutamine synthetase knockout mice (LGS-KO) on gene and protein levels. These animals suffer a lifelong chronic hyperammonemia in absence of any liver damage. Therefore, they represent a sufficient animal model for an experimental approach to investigate the effects of pure hyperammonemia on the brain. In transcriptomics and proteomics of the cerebral cortex, hippocampus, and the cerebellum of LGS-KO mice 214, 44 and 163 genes and 4, 34 and 15 proteins with significantly altered expression or abundance in comparison to the wildtype controls could be detected. The identified gene expression alterations could be categorized to RNA-processing.

For further experiments methyltransferase CARM1, RNA-binding protein TROVE2, iron chelator LCN2 as well as glutamine transporter ASCT2 were selected. Immunofluorescence analyses showed the expression of CARM1, TROVE2, LCN2 and ASCT2 in astrocytes from mouse and rat brain and rat astrocytes *in vitro*. Treating cultured astrocytes with ammonium chloride (NH₄Cl, 5 mM) displayed similar tendencies of the selected candidates on gene and protein level accordingly to the observed alterations in the brain of LGS-KO mice. Further experiments on the functionality of the selected targets suggest a role of CARM1 and ASCT2 for senescence, LCN2 for disturbed iron homeostasis and TROVE2 for RNA quality control in ammonium chloride-exposed cultured astrocytes. The protein levels of ASCT2 and LCN2 were further elevated in the cerebral cortex of ammonium acetate intoxicated rats (4.5 mmol/kg body weight, 24 h). TROVE2 and ASCT2 mRNA levels were significantly elevated in human *post mortem* brain tissue samples from patients with liver cirrhosis and HE.

The results of the present study show previously unknown ammonia-induced changes in the cerebral transcriptome and proteome of the LGS-KO mice. Additionally, potential functional consequences for the selected targets for hyperammonemia-induced brain dysfunctions and HE could be revealed.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	III
Danksagung.....	IV
Publikationen.....	VI
Zusammenfassung.....	VII
Abstract	VIII
Inhaltsverzeichnis.....	IX
Abbildungsverzeichnis	XII
Tabellenverzeichnis.....	XIV
Medienverzeichnis	XIV
Abkürzungen	XV
1 Einleitung	1
1.1 Lebererkrankungen und Hepatische Enzephalopathie (HE)	1
1.1.1 Klassifizierung der HE	1
1.1.2 Diagnostik der HE.....	3
1.1.3 Hyperammonämie und HE.....	4
1.1.4 Astrozytenschwellung bei HE.....	6
1.1.5 Osmotischer und oxidativer/ nitrosativer Stress bei HE	7
1.1.6 Therapieansätze und Prognose der HE.....	9
1.2 Zellproliferation	9
1.3 Zelluläre Seneszenz.....	11
1.3.1 Einfluss von Ammoniak auf die Proliferation von Astrozyten	12
1.3.2 Die Methyltransferase CARM1	13
1.4 Genexpressionsänderungen bei HE.....	13
1.4.1 RNA-Oxidation bei der HE.....	16
1.4.2 Das RNA-bindende Protein TROVE2	17
1.5 Zelluläre Eisenhomöostase.....	17
1.5.1 Eisenhomöostase bei der HE.....	19
1.5.2 Das Eisenbindende Protein LCN2.....	20
1.6 Mitochondrien, Ammoniaktoxizität und HE.....	21
1.6.1 Der Aminosäuretransporter ASCT2.....	22
1.7 Die leberspezifische GS-Knockout Maus als chronisches Hyperammonämie-Modell	22
2 Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.2 Methoden.....	32

2.2.1	Mäuse und Ratten.....	32
2.2.2	Genotypisierung der Mäuse	32
2.2.3	Isolierung von <i>post mortem</i> Hirnmaterial aus adulten Mäusen.....	34
2.2.4	Ammoniakmessung im Blut von Mäusen	35
2.2.5	Rattenmodell zur akuten Hyperammonämie	35
2.2.6	Präparation, Kultivierung und experimentelle Behandlung von Astrozyten aus dem zerebralen Kortex von Ratten.....	36
2.2.7	Knockdown von TROVE2 mittels <i>small-interfering</i> RNA.....	37
2.2.8	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	37
2.2.9	Quantitative PCR (qPCR)	39
2.2.10	Western Blot-Analyse	40
2.2.11	Immunfluoreszenzanalysen	44
2.2.12	Mikroskopie	46
2.2.13	Massenspektrometrie (MS)	47
2.2.14	Gene Ontology (GO).....	50
2.2.15	Microarray-Analyse in Maushirngeweben.....	50
2.2.16	Bioinformatische Auswertung von Microarray-Daten von humanen <i>post mortem</i> Hirnproben	53
2.2.17	Überprüfung der Vitalität von Astrozyten	53
2.2.18	Statistische Testung.....	54
3	Ergebnisse	56
3.1	Validierung des leberspezifischen Glutamin-Synthetase Knockouts und einer Hyperammonämie in LGS-KO-Mäusen	56
3.2	Identifikation von Änderungen im Transkriptom und Proteom von LGS-KO-Mäusen mittels Transkriptom- und Proteomanalyse.....	57
3.3	Bioinformatische Analyse verändert-exprimierter Gene im Gehirn von LGS-KO-Mäusen und Vergleich der Transkriptom- und Proteomanalysen.....	59
3.4	Validierung in den Transkriptom- und Proteomanalysen verändert vorgefundener Protein- und mRNA-Spezies mittels Western Blot-Analyse und qPCR.....	62
3.5	Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Gehirn von Maus und Ratte.....	70
3.6	Effekte von NH ₄ Cl auf die mRNA- und Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten	83
3.6.1	LCN2.....	83
3.6.2	ASCT2.....	83
3.6.3	CARM1	84
3.6.4	TROVE2.....	84
3.7	Effekte einer akuten Ammoniumazetatintoxikation auf die LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 Proteinspiegel im zerebralen Kortex der Ratte	89
3.8	Mechanismen und potenzielle Konsequenzen durch Ammoniak veränderter LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 Proteinspiegel in kultivierten Astrozyten.....	91
3.8.1	Das Eisenionen-bindende Protein LCN2	91
3.8.2	Der Glutamintransporter ASCT2	92

3.8.3	Die Methyltransferase CARM1	95
3.8.4	Das RNA-bindende Protein TROVE2	97
3.9	Lcn2, Asct2, Carm1 und Trove2 mRNA-Spiegel in humanen <i>post mortem</i> Hirnproben von Zirrhose Patienten mit und ohne HE.....	104
4	Diskussion	106
4.1	Quantitativ veränderte mRNA- und Protein-Spezies im zerebralen Kortex, Hippocampus und Zerebellum der LGS-KO-Maus	106
4.2	Im Gehirn der LGS-KO-Maus veränderte biologische Prozesse	107
4.3	Regulation des LCN2-Proteins durch intrazelluläre freie Eisenionen	109
4.4	Rolle des ASCT2 für oxidativen- und ER-Stress und Seneszenz in mit Ammoniak- inkubierten Astrozyten	111
4.5	Die Rolle von CARM1 für oxidativen und ER-Stress sowie Seneszenz	112
4.6	Die Bedeutung von TROVE2 für die RNA-Qualitätskontrolle	114
4.7	Limitationen der vorliegenden Arbeit	116
5	Ausblick	117
	Literaturverzeichnis.....	XVII
	Anhang	XXXII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassifizierung und Einteilung der hepatischen Enzephalopathie (HE) in Schweregrade.	4
Abbildung 2: Ausbildung eines geringgradigen zerebralen Ödems bei der HE.	7
Abbildung 3: Pathomechanismus der hepatischen Enzephalopathie.	8
Abbildung 4: Darstellung der Signalwege zellulärer Seneszenz und der Zellzyklus-Phasen G1, S, G2, M und G0.	12
Abbildung 5: Einflüsse von oxidativem/ nitrosativem Stress auf die Genexpressionsänderung.	15
Abbildung 6: Regulation der zellulären Eisenhomöostase.	19
Abbildung 7: Western Blot-Analyse der Glutamin-Synthetase in Leberproteinproben von WT und LGS-KO-Mäusen.	56
Abbildung 8: Transkriptom- und Proteomanalysen in unterschiedlichen Gehirnregionen von WT- und LGS-KO-Mäusen.	58
Abbildung 9: Funktionelle Gruppierung von differentiell-exprimierten Genen im zerebralen Kortex in LGS-KO-Mäusen	60
Abbildung 10: Hirnregionen- und RNA/ Protein-übergreifender Vergleich differentiell-exprimierter Gene und von Proteinen deren Spiegel in LGS-KO-Mäusen verändert ist.	62
Abbildung 11: mRNA- und Proteinspiegel von Carm1, Trove2, Lcn2 und Asct2 im zerebralen Kortex von WT und LGS-KO-Mäusen.	64
Abbildung 12: mRNA- und Proteinspiegel von Carm1, Trove2, Lcn2 und Asct2 im Hippocampus von WT- und LGS-KO-Mäusen.	66
Abbildung 13: mRNA- und Proteinspiegel von Carm1, Trove2, Lcn2 und Asct2 im Zerebellum von WT- und LGS-KO-Mäusen.	68
Abbildung 14: CARM1, TROVE2, LCN2 und ASCT2 Proteinspiegel im Gehirn von LGS-KO-Mäusen.	69
Abbildung 15: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im zerebralen Kortex in Wildtyp-Mäusen.	71
Abbildung 16: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Hippocampus von Wildtyp-Mäusen.	72
Abbildung 17: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Corpus callosum in Wildtyp-Mäusen.	73
Abbildung 18: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Zerebellum von Wildtyp-Mäusen.	74
Abbildung 19: Überprüfung potenzieller Sekundärantikörper-vermittelter unspezifischer Anfärbungen im Gehirn von Wildtyp-Mäusen.	76
Abbildung 20: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im zerebralen Kortex von Wistar-Ratten.	78

Abbildung 21: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Hippocampus von Wistar-Ratten.	79
Abbildung 22: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Corpus callosum von Wistar-Ratten.	80
Abbildung 23: Überprüfung potenzieller Sekundärantikörper-vermittelter unspezifischer Anfärbungen im Rattengehirn.	82
Abbildung 24: Effekte von NH ₄ Cl auf die mRNA- und Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten.	87
Abbildung 25: Effekte der HE-relevanten Faktoren TNF α , Diazepam und CH ₃ NH ₃ Cl auf die Proteinspiegel von LCN, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten.	88
Abbildung 26: Effekte einer Ammoniumazetatbehandlung auf die Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im zerebralen Kortex der Ratte.	90
Abbildung 27: Effekte von NH ₄ Cl und des Eisenchelators BIP auf die Proteinspiegel von LCN2 in Proteinlysaten kultivierter Rattenastrozyten und im Zellkulturüberstand.....	92
Abbildung 28: Effekte des ASCT2-Hemmstoffes O-Benzyl-L-Serin in unbehandelten und mit NH ₄ Cl-inkubierten Astrozyten auf die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand sowie den mRNA-Spiegeln von HO1, grp78, Gadd45 α und p21.	94
Abbildung 29: Effekte einer CARM1-Inhibition auf die Zellmorphologie, LDH-Freisetzung und mRNA-Spiegel von Surrogatmarkern von oxidativem und ER-Stress sowie Seneszenz in kultivierten Rattenastrozyten.....	96
Abbildung 30: Effekte eines TROVE2-Knockdowns mittels TROVE2-siRNA in unbehandelten und mit NH ₄ Cl-inkubierten Astrozyten auf die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand.	98
Abbildung 31: Effekte eines TROVE2-Knockdowns mittels TROVE2-siRNA auf die mRNA-Spiegel von Surrogatmarkern für oxidativem und ER-Stress in kultivierten Rattenastrozyten.	99
Abbildung 32: Effekte eines TROVE2-Knockdowns auf durch NH ₄ Cl-herbeigeführte Veränderungen im Proteom kultivierter Rattenastrozyten.....	101
Abbildung 33: Effekte eines siRNA-vermittelten Knockdowns von TROVE2 in unbehandelten und mit NH ₄ Cl-inkubierten Astrozyten auf die Oxidation von RNA und die Zellkernmorphologie.	103
Abbildung 34: Expression von Lcn2, Asct2, Carm1 und Trove2 mRNA-Spiegel in humanen <i>post mortem</i> Hirnproben von Kontrollen und Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne HE.	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In der Arbeit verwendete Chemikalien und Substanzen.	24
Tabelle 2: In der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien, Materialien und Kits.	26
Tabelle 3: In der Arbeit verwendete Geräte.	28
Tabelle 4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper. mAb: monoclonal antibody, pAb: polyclonal antibody	29
Tabelle 5: Nukleotidsequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer. for: forward, rev: reverse.	30
Tabelle 6: Ablauf der PCR im Thermocycler für die Genotypisierung der Mäuse.....	33
Tabelle 7: Ablauf der qPCR zur Bestimmung von Genexpressionen.	39
Tabelle 8: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome.	44
Tabelle 9: Effekte von NH_4Cl auf die Lcn2, Asct2, Carm1 und Trove2 mRNA-Expression in kultivierten Rattenastrozyten- Zeitabhängigkeit.	85
Tabelle 10: Effekte von NH_4Cl auf die Carm1, Trove2, Lcn2 und Asct2 mRNA-Spiegel Expressionsveränderungen in kultivierten Rattenastrozyten- Konzentrationsabhängigkeit. ...	85
Tabelle 11: Effekte von NH_4Cl auf die Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten- Zeitabhängigkeit.....	86
Tabelle 12: Effekte von NH_4Cl auf die Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten- Konzentrationsabhängigkeit.....	86
Tabelle 13: Effekte von $\text{TNF}\alpha$, Diazepam und MeNH_3Cl auf die Proteinspiegel von LCN2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten.	88

Medienverzeichnis

Medium 1: PCR-Ansatz. For: forward, rev: reverse.	32
Medium 2: 50×TAE-Puffer	33
Medium 3: Proteinlyse-Puffer.....	34
Medium 4: cDNA-Synthese Ansatz.....	38
Medium 5: qPCR-Ansatz. For: forward, rev: reverse.	39
Medium 6: Auftrag-Puffer (2×SDS-Puffer/1M DTT)	41
Medium 7: Polyacrylamid-Gele 10%, 12% und Sammelgel	41
Medium 8: Elektrophoresepuffer	42
Medium 9: 10×Transferpuffer	42
Medium 10: 10×TBS	43
Medium 11: TBS-T	43
Medium 12: Testlösung für die LDH-Messung	54

Abkürzungen

5'-UTR	<i>5' untranslated region</i>
8OH(d)G	8-Hydroxy-(desoxy)-Guanosin
8OHG	8-Hydroxy-Guanosin
Ab	<i>Antibody</i>
AlbCre ⁺	<i>Albumin promoter-controlled expression of cre recombinase</i>
ALS	<i>Amyotrophic lateral sclerosis</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ASCT2	<i>L-alanine/L-serine/L-cysteine transporter 2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BIP	2,2'-bipyridin
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C ₁₂ -FDG	C ₁₂ -Fluorescein-di-β-D-Galactopyranosid
CARM1	Co-Aktivator assoziierte Arginin Methyltransferase 1
CARM1 ^I	CARM1-Inhibitor
CD14	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinases</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CFF	<i>Critical flicker frequency</i>
ChAT	<i>Choline-acetyl-transferase</i>
Cy	Cyanin
D1R	<i>D1 dopamine receptor</i>
ddH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMT1	<i>Divalent metal transporter1</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
E2F	Transkriptionsfaktor E2F
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
Eph/ EphR	Ephrin/ Ephrinrezeptor
ER	Endoplasmatisches Retikulum

FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
Fe ²⁺ / Fe ³⁺	Zweiwertige/ dreiwertige Eisenionen
Fe-S-Cluster	Eisen-Schwefel-Cluster
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GABA	γ -Aminobuttersäure
GADD45 α	<i>Growth-arrest and DNA damage-inducible protein 45 α</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GLAST	<i>Glutamate/aspartate transporter</i>
GLS1/ KGA	<i>Kidney-type glutaminase</i>
GLS2	<i>Liver-type glutaminase</i>
Glu ^{f/f}	<i>Floxed glutamine synthetase gene alleles</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
GORilla	<i>Gene Ontology enRiChment anaLysis and visuaLizAtion tool</i>
GRP78	<i>Glucose regulated protein 78</i>
GS	Glutamin Synthetase
GSC	<i>Glasgow-Coma-Scale</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
HE	Hepatische Enzephalopathie
HFS-LTP	<i>High-frequency stimulation-induced long-term potentiation</i>
HO1	Häm Oxygenase 1
HPRT1	<i>Hypoxanthine ribosyl transferase 1</i>
HRPOD	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSC	<i>Hepatic stellate cell</i>
Iba1	<i>Ionized calcium-binding protein 1</i>
IgG	Immunglobulin G
IR	Immunoreaktivität
IL	Interleukin
IRE	<i>Iron regulating elements</i>
IRP	<i>Iron responsive proteins</i>
ISHEN	<i>International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen metabolism</i>

LCN2/ NGAL	<i>Lipocalin-2/ Neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
LDH	<i>Lactat-Dehydrogenase</i>
LFQ	<i>Label-free quantification</i>
LGS-KO	<i>Liver specific glutamine synthetase knockout</i>
LTP	<i>Long-term portentiation</i>
M1R	<i>Type 1 muscarinic cholinergic receptor</i>
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
miRNA	<i>Micro RNA</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
Mrp4	<i>Multidrug resistance protein 4</i>
MSO	<i>L-methionine sulfoximine</i>
MT-1/ 2	<i>Metallothioneinen 1und 2</i>
MTF-1	<i>Metal-responsive transcription factor 1</i>
mTORC1	<i>Mammalian target of rapamycin complex 1</i>
NADH+H ⁺	<i>Nikotinamidadenindinukleotid+Hydridion</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
NH ₄ Ac	<i>Ammoniumazetat</i>
NH ₄ Cl	<i>Ammoniumchlorid</i>
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
NMDAR	<i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>
Nox4	<i>NADPH-Oxidase 4</i>
Nrf2	<i>NF-E2-related factor 2</i>
p16	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
p21	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1</i>
p53	<i>Tumor suppressor protein 53</i>
pAb	<i>Polyclonal antibody</i>
PBR	<i>Peripheral-type benzodiazepine receptor</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>

PPAR α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-α</i>
pRb	<i>Retinoblastom protein</i>
PRMT	<i>Protein arginine methyltransferase</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RBP	RNA-bindende Proteine
rcf	Relative Zentrifugalkraft
RIN	<i>RNA integrity numbers</i>
RNase	Ribonuklease
RNS	<i>Reactive nitrogen species</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rRNA	Ribosomale RNA
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase
SASP	<i>Senescence-associated secretory phenotype</i>
SDHA	<i>Succinate dehydrogenase complex, subunit A</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
SMS	<i>Senescence-messaging secretome</i>
SP1	<i>Specificity protein 1</i>
TIPPS	Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer <i>stentshunt</i>
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TROVE2/Ro60	<i>TROVE domain family member 2</i>
Ubtf1	<i>Upstream Binding Transcription Factor 1</i>
UV	Ultraviolettes Licht
WFM	Weitfeldmikroskopie
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Lebererkrankungen und Hepatische Enzephalopathie (HE)

Weltweit sterben schätzungsweise zwei Millionen Menschen pro Jahr an Lebererkrankungen, etwa eine Hälfte davon durch Komplikationen einer Leberzirrhose und die andere Hälfte durch virale Hepatitis und hepatozelluläres Karzinom [1].

Die hepatische Enzephalopathie (HE) tritt als Komplikation bei Patienten mit akuter oder chronischer Leberschädigung auf und äußert sich in neurologischen und motorischen Beeinträchtigungen [2]. Schätzungsweise 30-70% aller Leberzirrhose Patienten entwickelt eine HE und mehr als 95% aller HE-Fälle sind auf eine Leberzirrhose zurückzuführen [3-5]. Die häufigsten Ursachen einer Leberzirrhose sind chronische Infektionen mit viralen Hepatitiden (57%) und Alkoholabusus (40%) [6, 7]. Eine HE, die in Folge einer akuten Leberschädigung auftritt, manifestiert sich klinisch vorwiegend durch eine Hirndrucksymptomatik [8, 9]. Im Falle einer chronischen Lebererkrankung treten Vigilanzstörungen, neurologische und psychiatrische wie auch motorische Symptome auf [8, 9].

1.1.1 Klassifizierung der HE

Die HE wird entsprechend ihrer Ätiologie in drei unterschiedlichen Typen eingeteilt (Abbildung 1). Bei den eher seltenen Typen A und B ist die HE Folge eines akuten Leberversagens oder eines portosystemischen Bypass [9, 10]. Bei der häufigsten Form der HE, dem Typ C, liegt eine chronische Lebererkrankung als Ursache der HE vor [9, 10]. Entsprechend der Dauer und Häufigkeit der auftretenden Symptome kann die Typ C HE weiter unterteilt werden. Bei der episodischen Form liegt meist ein präzipitierender Faktor vor. Diese Form tritt spontan auf und kann nach Besserung der Symptomatik erneut auftreten. Im Gegensatz hierzu kann die Symptomatik der HE auch persistieren. Bei der subklinischen oder minimalen HE (mHE) ist die Symptomatik nicht offenkundig. Es treten geringfügige Verhaltensänderungen und diskrete psychomotorische Veränderungen auf, die nur mit psychometrischen Tests nachweisbar sind [10]. Bei circa 20-80% der Patienten mit Leberzirrhose wurde eine mHE diagnostiziert [11-13]. Ein Problem bei der Diagnose der mHE ist insbesondere, dass die unterschiedlichen Testverfahren nicht standardisiert sind und deren Testergebnisse häufig nicht übereinstimmen und kein Goldstandard für die Diagnose existiert

[14]. Somit wurde auf der *International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen metabolism* (ISHEN)-Konferenz eine neue Einteilung der HE etabliert, um zwischen den klinisch unauffälligen HE-Graden (HE0, mHE, HE I, HE II) und der höhergradigen HE unterscheiden zu können, die die Grade III und IV umfassen [9, 15].

Bei der HE werden die Schweregrade nach den sogenannten West-Haven-Kriterien unterschieden (Abbildung 1) [10, 16]. Der HE Grad 0 ist klinisch unauffällig. Die mHE äußert sich in kognitiven Defiziten, die nur durch psychometrische Tests nachweisbar sind. Bei dem HE Grad I können Symptome wie leichte mentale Verlangsamung, Euphorie- und Angstzustände, verminderte Aufmerksamkeit und Rechenleistung sowie erhöhte Reizbarkeit und eine gestörte Feinmotorik vorliegen. Beim HE Grad II kann eine zeitliche und räumliche Desorientierung, eine leichte Persönlichkeitsstörung sowie lethargisches und apathisches Verhalten vorliegen. Außerdem können motorische Störungen auftreten, die als „*Flapping*“-Tremor bezeichnet werden [8]. Hier können zur Diagnose veränderte Hirnströme mittels Elektroenzephalographie erkannt und gemessen werden, die mit zunehmendem Grad der HE eine Erniedrigung der mittleren dominanten Frequenz aufzeigen [8]. Beim HE Grad III zeigen die betroffenen Patienten klinische Symptome einer Somnolenz, eine schwere Desorientiertheit, eine undeutliche Sprache und nur leichte Reaktionen auf verbale Reize. Beim Schweregrad IV einer HE ist der Patient komatös (*coma hepaticum*), nicht mehr ansprechbar und reagiert auf keine Sinnesreize. In diesem Stadium der Erkrankung kann der Hirntod eintreten [8]. Die Vigilanz in den Graden III und IV wird anhand der *Glasgow-Coma-Scale* (GSC) beurteilt [10].

1.1.2 Diagnostik der HE

Zur Diagnose der HE stehen verschiedene diagnostische Verfahren zur Verfügung [8]. Einen ersten Anhaltspunkt kann ein erhöhter Ammoniakspiegel im Blut von über 25 $\mu\text{mol/L}$ sein [17]. Dabei korreliert der Ammoniakspiegel im Blut von Leberzirrhose Patienten nur bedingt mit den HE-Graden und ist daher nicht alleinig zur Diagnose beziehungsweise dem Ausschluss einer HE ausreichend [8]. Beim akuten Leberversagen findet sich hingegen eine deutliche Korrelation von Blutammoniakspiegeln und Schweregrad der HE [18, 19].

Mit psychometrischen Tests kann eine minimale HE oder eine HE Grad I und II diagnostiziert werden. Hier können einfache Rechentests (Subtraktion und Addition) sowie die weiterverbreiteten und standardisierten Zahlenverbindung- und Liniennachfahrtests durchgeführt werden [8, 20]. Diese Tests weisen aber eine geringe Sensitivität und Spezifität auf und die Ergebnisse werden durch das Alter- und vom Bildungsstand beeinflusst. Aufgrund dessen werden psychometrische und computerpsychometrische Tests für die Diagnose kombiniert [8, 20, 21].

Die zerebrale Bildgebung mittels Computertomographie zeigt keine Auffälligkeiten bei HE und kann somit ebenfalls nur für differentialdiagnostische Zwecke angewendet werden. Hierüber kann zum Beispiel der Ausschluss erfolgen, dass eine zerebrale oder subdurale Blutung vorliegt [8, 22].

Die Elektroenzephalographie kann mit zunehmenden HE-Graden eine Erniedrigung der mittleren dominanten Frequenz aufzeigen, jedoch sind auch hier die Unterschiede nicht spezifisch und selten bei geringgradiger HE zu beobachten [8].

Im Gegensatz dazu ist die kritische Flimmerfrequenz-Analyse („*Critical flicker frequency*“, CFF) ein international etabliertes diagnostisches Verfahren [23]. Durch diesen Test wird die Diagnose einer HE mit hoher Sensitivität, einfach durchführbar und kostengünstig ermöglicht [14]. Hierbei wird eine Lichtquelle abwechselnd an- und ausgeschaltet, beginnend mit einer hohen Frequenz von 50 Hz, die nachfolgend kontinuierlich erniedrigt wird um 0,5 Hz pro Sekunde. Als Messwert gilt der Frequenzwert (CFF-Wert), bei dem der Patient das Flackern des Lichts erkennt und kein durchgehendes Licht mehr wahrnimmt [23]. Der CFF-Wert ist reproduzierbar und wird nicht durch Faktoren wie Alter, Zeitpunkt der Untersuchung, Bildungsstand oder Trainingseffekte der Patienten beeinflusst [11]. Der Schwellenwert, der

gesunde Patienten (HE0) von Patienten mit einer manifesten HE differenziert, beträgt 39 Hz [23]. Die Methode zeigt eine hohe Sensitivität von 98% und eine Spezifität von 94% [14].

Für die Anamnese werden das Vorliegen vorangehender HE-Episoden, Leberkrankheit so wie auch HE-präzipitierende Faktoren abgefragt [22]. Zusätzlich sollten andere Ursachen der Symptomatik ausgeschlossen werden, die gesondert behandelt werden müssen, wie zum Beispiel Hypoglykämie, Hypothyreose, Hypoxie oder Arzneimittelwirkungen [22].

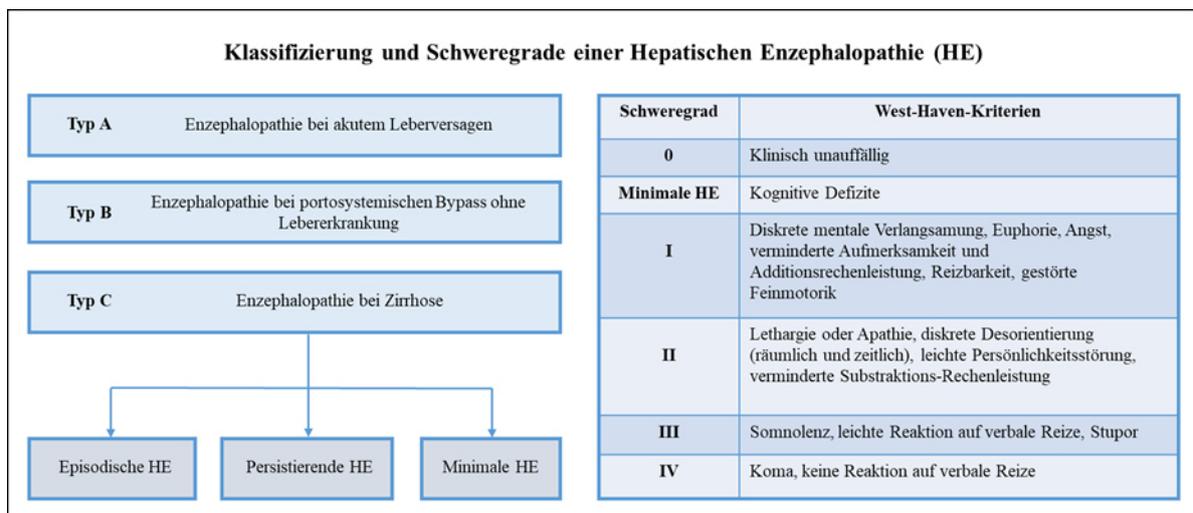


Abbildung 1: Klassifizierung und Einteilung der hepatischen Enzephalopathie (HE) in Schweregrade. Die verwendeten Informationen zur Darstellung wurden entnommen aus [8, 10, 16].

1.1.3 Hyperammonämie und HE

Zwischen Ammoniumionen und dem gasförmigen Ammoniak besteht ein Dissoziationsgleichgewicht. Nachfolgend wird der Begriff „Ammoniak“ synonym verwendet für Ammoniak und das Ammoniumion. Unter physiologischen Bedingungen liegt Ammoniak überwiegend als Ammoniumion (NH_4^+) vor. Ammoniak ist ein Zellgift und wirkt neurotoxisch. In der Fachwelt ist es allgemein anerkannt, dass erhöhte Serumammoniakspiegel eine bedeutende Rolle für die Pathogenese der HE spielen [17].

Im gesunden Organismus wird durchschnittlich circa 1000 mmol Ammoniak pro Tag beim Abbau von Aminosäuren gebildet [24]. Ein kleiner Teil davon wird wieder im Stoffwechsel für die Biosynthese von Glutamin und Alanin verwendet. Die normale Konzentration im portalen Blut beträgt etwa 300-600 $\mu\text{mol/L}$ und wird durch die gesunde Leber

auf etwa 20-30 $\mu\text{mol/L}$ reduziert [25]. Eine arterielle Ammoniakkonzentration von über 100 $\mu\text{mol/L}$ löst eine schwere HE mit einer Wahrscheinlichkeit von über 70% aus [26].

Ammoniak (NH_3) wird auch beim Abbau von Aminogruppen ($-\text{NH}_2$) aus Eiweißen und Nukleinsäuren im Darm freigesetzt. Über den Blutkreislauf wird dieser zur Leber transportiert und dort von den Hepatozyten für die Synthese von Harnstoff und Glutamin verwendet. Harnstoff wird in den periportalen Hepatozyten gebildet und kann über die Niere ausgeschieden werden. In den perizentralen *Scavenger*-Zellen wird aus Ammoniak und Glutamat unter Adenosintriphosphat (ATP)-Verbrauch Glutamin gebildet [27]. In einer gesunden Leber kann dadurch der über den Blutkreislauf in die Leber gelangte Ammoniak fast vollständig eliminiert werden.

In der zirrhotischen Leber kommt es zu einem ausgeprägten Verlust an funktionsfähigen Hepatozyten und einem narbenartigen Umbau des Gewebes. Dieser Umbau wird von den hepatischen Sternzellen (HSC) durch die Synthese von Matrixproteinen vermittelt [28]. In der Folge kommt es zur Anreicherung von Bindegewebe in der Leber und die Organfunktion sowie die Fähigkeit zur Ammoniakentgiftung nimmt ab.

Eine durch Leberzirrhose ausgelöste portale Hypertension (Pfortaderhochdruck) kann zur Bildung von Umgehungskreisläufen führen [29, 30]. Hierbei wird eine neue Gefäßverbindung geschaffen mit der Folge, dass das Blut aus Darm und Milz nicht mehr vollständig durch die Leber geleitet wird und der Pfortaderdruck sinkt. Dadurch werden im Blut gelöste Verbindungen wie der Ammoniak nicht mehr in der Leber metabolisiert.

Durch die beeinträchtigte Ammoniakentgiftung in der zirrhotischen Leber steigt der Ammoniakgehalt im Blut an (Hyperammonämie) (Abbildung 2). Der in den Blutkreislauf gelangte Ammoniak überwindet die Blut-Hirn-Schranke und gelangt in das Gehirn, wo er von der in den Astrozyten exprimierten Glutamin-Synthetase unter Energieverbrauch für die Bildung von Glutamin verwendet wird [31].

1.1.4 Astrozytenschwellung bei HE

Astrozyten stellen den Hauptanteil der nicht-neuronalen Zellen im humanen Gehirn mit fast 50% des humanen Gehirnvolumens [32]. Die Hyperammonämie ist mit einer gesteigerten Bildung und Akkumulation von Glutamin in den Astrozyten vergesellschaftet. Diese induziert eine Astrozytenschwellung und es kommt zur Ausbildung eines geringgradigen glialen Ödems [2, 8]. Die Ausbildung eines geringgradigen Hirnödems bei HE-Patienten wurde erstmalig mittels Magnetresonanz-spektroskopischen Untersuchungen von Häussinger und Kollegen nachgewiesen [2] und nachfolgend durch „*Quantitative Water Imaging*“ bestätigt [33].

Die erhöhte Glutaminakkumulation in den Astrozyten der HE-Patienten kann bis zu einem gewissen Grad durch die Osmolyt-Freisetzung von *Myo*-Inositol kompensiert werden. Die volumenregulatorische Kapazität der Astrozyten nimmt infolgedessen jedoch bei einer Hyperammonämie stetig ab, bis sie erschöpft ist und sich durch osmotische Schwellung der Astrozyten ein geringgradiges gliales Ödem ausbildet [2, 5, 34].

Neben Glutamin können eine Vielzahl weiterer heterogener HE-relevanter Faktoren eine Schwellung in Astrozyten auslösen. Unter dem Einfluss weiterer HE-relevanter Faktoren kann ein geringgradiges Hirnödem exazerbieren. So können die Einnahme von Sedativa, Hypnotika oder Neuroleptika, die vermehrte Bildung von Zytokinen und pro-inflammatorischen Proteinen, wie zum Beispiel *Tumor necrosis factor α* (TNF α) oder eine Hyponatriämie die HE deutlich verstärken [35].

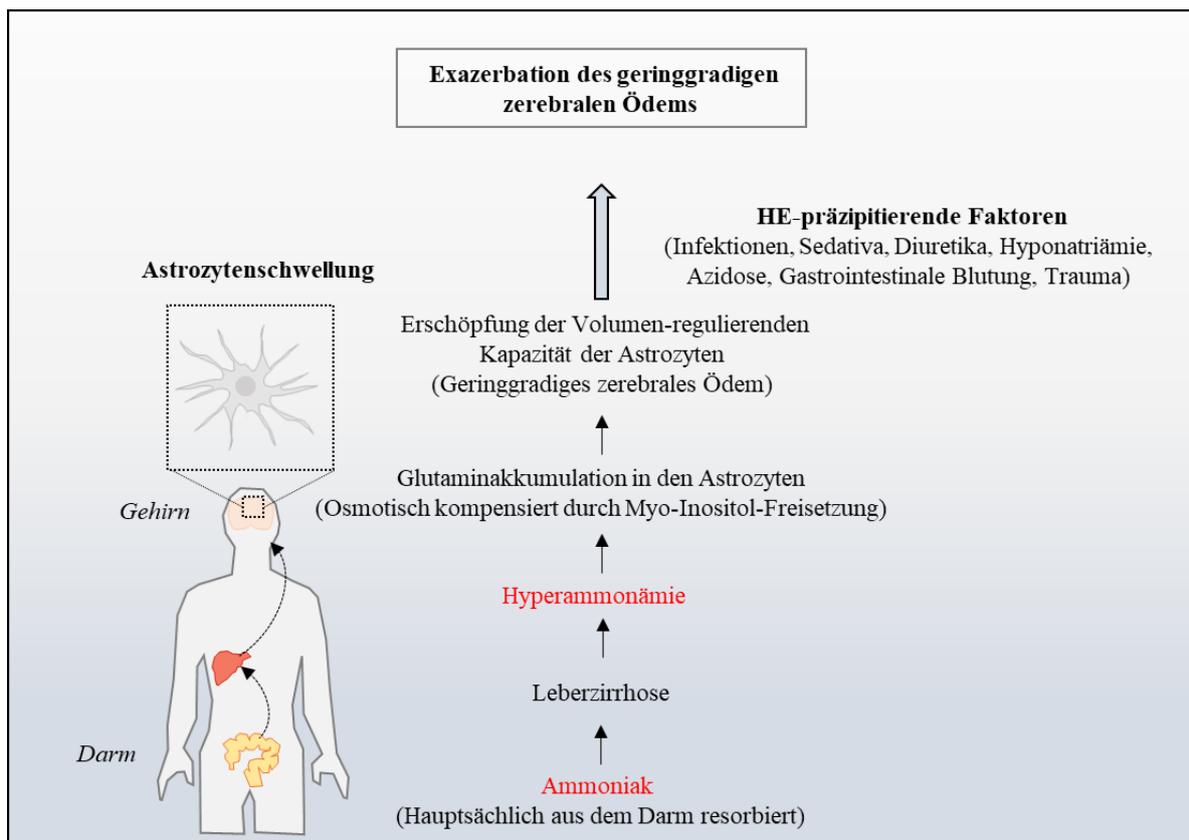


Abbildung 2: Ausbildung eines geringgradigen zerebralen Ödems bei der HE. Der hauptsächlich aus dem Darm resorbierte Ammoniak löst durch die gestörte Ammoniakentgiftung der zirrhotischen Leber eine Hyperammonämie aus. Dies führt zu einer Glutaminakkumulation in den Astrozyten, bis hin zur Erschöpfung der Volumen-regulierenden Kapazität der Astrozyten. Klinisch manifestiert sich die HE in Form eines geringgradigen Ödems, welches durch den Einfluss von HE-präzipitierenden Faktoren exazerbiert. Informationen zur Fertigung der Abbildung wurden entnommen aus [5].

1.1.5 Osmotischer und oxidativer/ nitrosativer Stress bei HE

Eine Gemeinsamkeit der heterogenen Gruppe der HE-relevanten Faktoren Ammoniak, proinflammatorische Zytokine, Benzodiazepine und Hypoosmolarität ist es, sowohl osmotischen als auch oxidativen/ nitrosativen Stress (*Reactive oxygen/ nitrogen species*; ROS/ RNS) in den Astrozyten zu induzieren [5, 36] (Abbildung 3). Während eine Zellschwellung bereits hinreichend für die Bildung von ROS/ RNS ist [36], können umgekehrt ROS/ RNS auch eine Zellschwellung in Astrozyten induzieren [37].

Dies deutet auf eine wechselseitige Verstärkung der Astrozytenschwellung und der Bildung von RNOS in den Astrozyten. Es wurde daher postuliert, dass es hierdurch zur Ausbildung eines *circulus vitiosus* kommt, in dessen Verlauf eine Reihe von Veränderungen im Astrozyten auftreten, die unterschiedliche biologische Prozesse wie zum Beispiel

Signalkaskaden oder die Genexpression beeinträchtigen. Zu den, durch den oxidativen/nitrosativen Stress vermittelten, funktionell bedeutsamen Veränderungen im Astrozyten zählen: Posttranslationale Proteinmodifikationen, wie Proteintyrosinnitrierung, Oxidation von RNA, Genexpressionsänderungen und Seneszenz [35]. In der Gesamtheit bewirken diese Veränderungen Störungen der Astrozytenfunktionen und sekundär dadurch auch neuronaler Funktionen. Die Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen wird beeinträchtigt und damit auch die synaptische Plastizität, was zur Störung oszillatorischer Netzwerke im Gehirn führt. Dies manifestiert sich in den neurologischen Symptomen der Patienten.

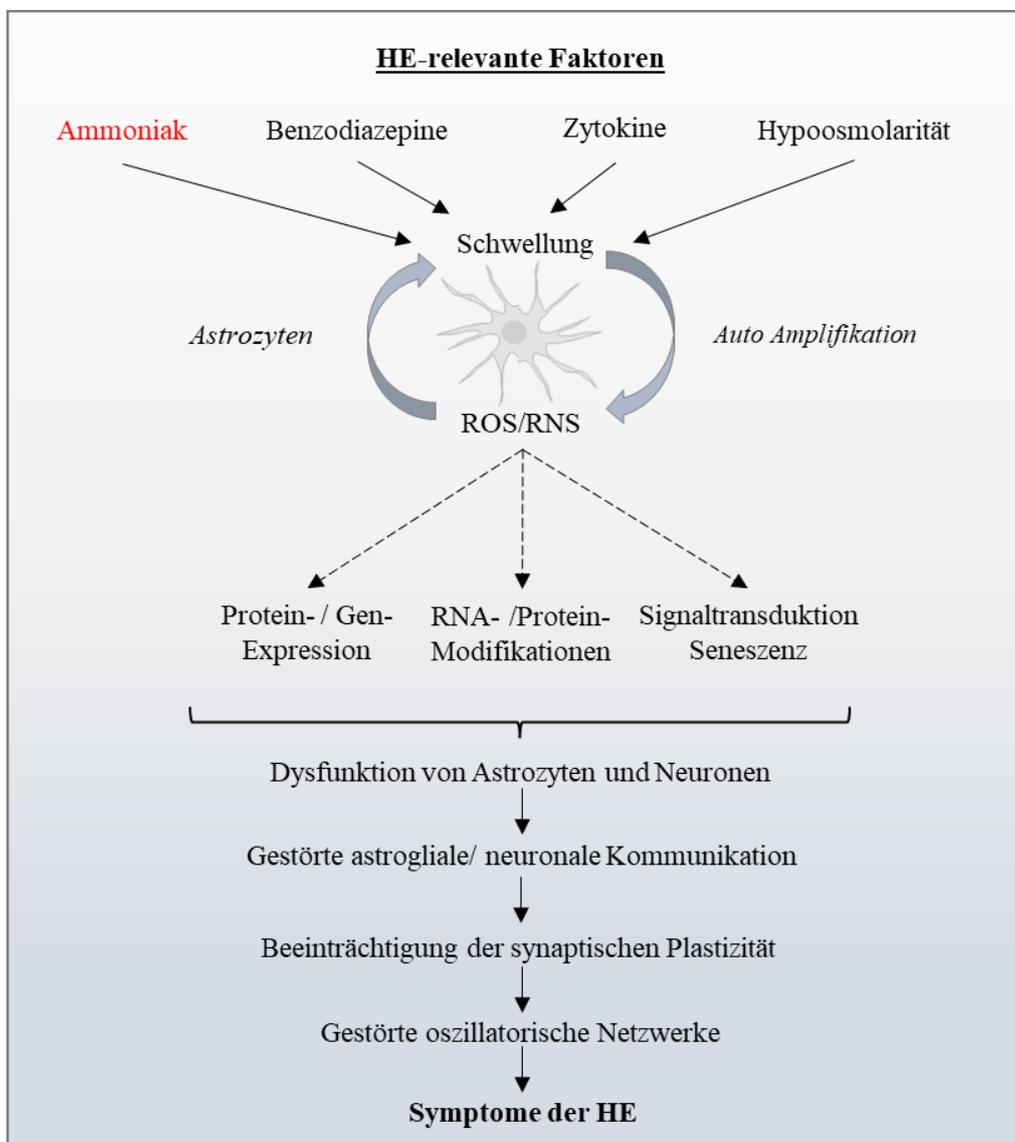


Abbildung 3: Pathomechanismus der hepatischen Enzephalopathie. HE-relevante Faktoren induzieren eine Astrozytenschwellung sowie die Bildung von reaktivem oxidativen/nitrosativen Stress (ROS/RNS), welche sich wechselseitig verstärken. Hierüber werden eine Reihe von Veränderungen herbeigeführt, die in der Gesamtheit Astrozyten- und hierüber

Neuronenfunktionen beeinträchtigen und in der Folge kognitive und motorische Störungen bei den Patienten bedingen. Das Schema wurde auf Grundlage von [2, 8, 35] erstellt.

1.1.6 Therapieansätze und Prognose der HE

Als primärer Therapieansatz gilt es zunächst die HE-auslösenden Faktoren zu bestimmen und zu eliminieren. Ein wesentliches Ziel ist dabei den Blutammoniakspiegel des Patienten zu senken. Dafür kann die Ammoniakbildung im Darm durch die Einnahme von Antibiotika vermindert werden, wodurch die Population der Ammoniak-bildenden Bakterien vermindert wird. Auch eine Restriktion der Eiweißzufuhr über die Nahrung kann die Ammoniakbildung reduzieren. Die Einnahme von Laktulose oder Laktitol steigert den Säuregehalt im Darm und sorgt für eine verminderte Ammoniakresorption [38]. Das Antibiotikum Rifaximin kann als zusätzliches Therapeutikum zu Laktulose eingesetzt werden, um eine Wiederauftretende HE zu verhindern [9, 39]. Durch Verabreichung von L-Ornithin-L-Aspartat werden sowohl Ammoniakentgiftung als auch die klinische Symptomatik und die Hirnfunktion verbessert. Es beschleunigt den Harnstoffzyklus und senkt den Ammoniakgehalt, da es das Kohlenstoffgerüst für die Glutaminsynthese bereitstellt und der vorhandene Ammoniak leichter metabolisiert werden kann [38]. Auch das Stillen einer Magen-Darm-Blutung senkt die Proteolyse-vermittelte Ammoniakbildung.

Wenn die HE-auslösenden Faktoren eliminiert werden und die Ammoniakspiegel ausreichend vermindert werden, können die zerebralen Folgen der Ammoniakvergiftung prinzipiell nach Auflösung einer HE-Episode reversibel sein. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass dies häufig nicht der Fall ist und neurologische Beeinträchtigungen persistieren [40-42]. Die einzige derzeit verfügbare kurative Maßnahme stellt die Lebertransplantation dar.

1.2 Zellproliferation

Bei der Zellteilung wird die *Deoxyribonucleic acid* (DNA) zunächst dupliziert und anschließend ein Chromosomensatz auf die neu gebildete Tochterzelle übertragen (Abbildung 4). Durch den Zellzyklus wird die Zellproliferation reguliert, die für die Entwicklung von Organismen, das Wachstum von Gewebe und Organen und den Heilungsprozess bei Verletzungen essenziell ist.

Der Zyklus einer Zellteilung wird in vier verschiedene Phasen unterteilt. Während der Interphase wird die Zellteilung initiiert und die Zelle ist metabolisch aktiv. Beginnend mit der G1-Phase (*Gap 1*) bereitet sich die Zelle auf die Replikation der DNA vor, wächst auf die doppelte Größe an und generiert Zellorganellen [43]. In der S-Phase (*Synthesis*) wird das Genom im Nukleus verdoppelt und das Zentrosom für die spätere Teilung der DNA ausgebildet [43]. In der Übergangsphase G2 (*Gap 2*) bereitet sich die Zelle auf die folgende M-Phase (*Mitosis*) vor, indem die Zelle Proteine synthetisiert, die für die Mitose benötigt werden [43]. Für die Teilung durchläuft die Zelle die Zwischenschritte Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase und Telophase, in denen die Tochterzelle generiert, ein Chromosomensatz auf diese übertragen und die Zellen anschließend getrennt werden [44]. Nach der Teilung kann die Zelle einen neuen Zyklus durchlaufen oder in die Ruhephase (G0-Phase) eintreten, in der sie sich weder teilt noch wächst.

Die Initiierung und Regulation der Zellteilung erfolgt primär über Komplexe aus *Cyclin-dependent kinases* (CDK) und Cycline [45]. CDKs sind an verschiedenen Stadien der Zellteilung beteiligt und eine Inhibition kann das Einsetzen der Mitose verhindern. Die Regulierung erfolgt über die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten (CDK1), die aktivierend und hemmend wirken können [45]. Neben der Phosphorylierung der CDKs, ist deren Bindung an regulatorische *Cyclin*-Proteine maßgeblich wichtig für deren Aktivierung, da diese spezifische *Nuclear localisation signal* (NLS)-Sequenzen enthalten, die den Transport zum Nukleus gewährleisten [46].

Für die Zellteilung werden unterschiedliche Substrate durch die CDK phosphoryliert, wie zum Beispiel in der G1-Phase das *Retinoblastom protein* (pRB), welches an unterschiedlichen Stellen phosphoryliert werden kann. Die nicht-phosphorylierte Form bindet den Transkriptionsfaktor E2F und inaktiviert diesen [47]. Wenn E2F phosphoryliert wird, folgt dessen Freisetzung aus dem pRB/E2F-Komplex und aktiviert die Transkription spezifischer Gene, welche wichtig für die Fortführung des Zellzyklus sind [47]. Die wichtigsten Inhibitoren der G1- und S-Phase des Zellzyklus sind die Proteine p16 (INK4a CDK-Inhibitor 2A) und p21 (Waf1, Cif1 CDK-Inhibitor 1) [47, 48]. Durch Bindung der Cycline wird die Phosphorylierung von pRB durch die CDK verhindert, wodurch die Dissoziation von E2F unterbunden wird [47]. p21 bindet und inhibiert *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), welches an der DNA-Replikation und DNA-Reparatur beteiligt ist [47].

Das DNA-bindende Protein *Tumor suppressor protein 53* (p53) gilt als Checkpoint-Protein und fungiert als Tumor-Suppressor [47]. Bei einer DNA-Beschädigung wird p53 stabilisiert, wodurch das *p21*-Gen abgelesen wird. Dies führt zu einem Zellzyklusstopp oder induziert unter bestimmten Bedingungen Apoptose [49]. Wird das *p53*-Gen durch Mutation inhibiert, kann die Transkription von p21 nicht mehr reguliert werden. In dieser Situation kann der Zellzyklus nicht mehr arretiert werden und die Tumorgenese wird begünstigt [50].

1.3 Zelluläre Seneszenz

Bei der Seneszenz ist der Zellzyklus dauerhaft arretiert (Abbildung 4). Sie ist abzugrenzen von der transienten Ruhephase, in die Zellen nach der Zellteilung eintreten können.

Es werden zwei Formen der Seneszenz unterschieden, die replikative und die premature Seneszenz [51, 52]. Die replikative Seneszenz ist irreversibel und tritt altersbedingt ein [53]. Die Telomerenden von Chromosomen verkürzen sich fortschreitend als eine physiologische Folge genomischer Instabilität und DNA-Schäden [54]. Die premature Form hingegen kann reversibel sein, wenn die auslösenden Faktoren beseitigt werden [52]. Ursachen für die premature Seneszenz sind oxidativer Stress, ionisierende Strahlung, toxische Substanzen, mitochondriale Dysfunktion oder Onkogene [55].

Die Zellkerne seneszenten Zellen sind strukturell verändert durch eine verringerte Expression von Laminin B1 [53]. Gleichzeitig werden die Zellzyklusinhibitoren p16, p53 und p21 sowie *Growth-arrest and DNA damage-inducible protein 45 α* (Gadd45 α) verstärkt exprimiert. Diese gelten als Biomarker für Seneszenz [52]. Die *Mammalian target of rapamycin complex 1* (mTORC1) -Aktivität ist in seneszenten Zellen erhöht, wodurch die Autophagie inhibiert wird [56, 57]. Ein weiteres Merkmal ist die verstärkte Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase (SA- β -Gal) [58].

Seneszente Zellen sezernieren spezifische *micro RNAs* (miRNAs), Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen in einer Weise, die abhängig von der Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs ist. Diese Faktoren werden als *Senescence-associated secretory phenotype* (SASP) und *Senescence-messaging secretome* (SMS) bezeichnet und können autokrin wie auch parakrin wirken [53].

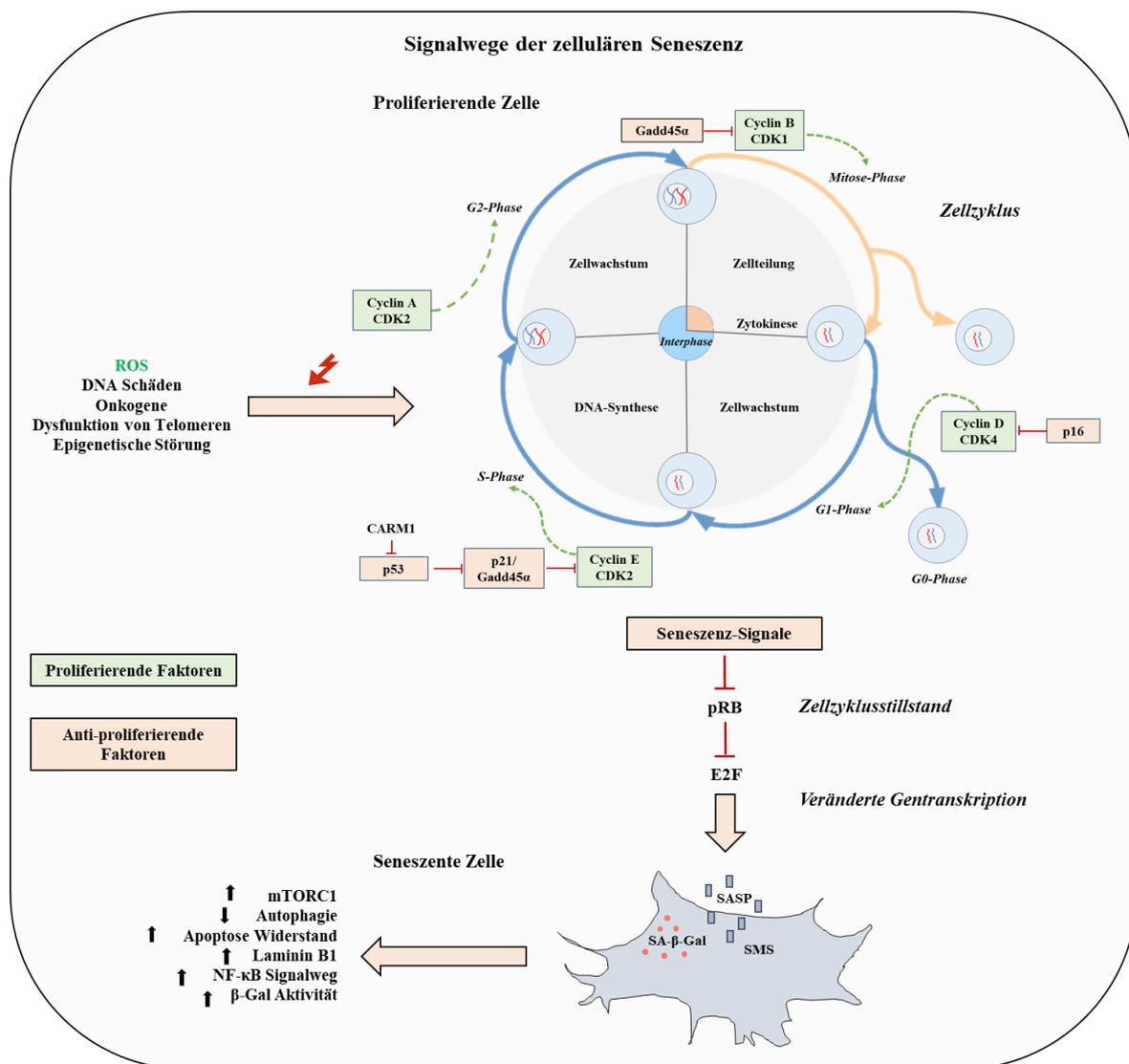


Abbildung 4: Darstellung der Signalwege zellulärer Seneszenz und der Zellzyklus-Phasen G1, S, G2, M und G0. Es werden die unterschiedlichen Phasen der Zellteilung regulierenden *Cyclin-dependent kinases* (CDKs), Cycline und anti-proliferativer Faktoren sowie Merkmale und Veränderungen seneszenten Zellen wie die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal), *Senescence-associated secretory phenotype* (SASP) und *Senescence-messaging secretome* (SMS) gezeigt. Die Abbildung wurde auf Grundlage von [47, 53, 59, 60] erstellt.

1.3.1 Einfluss von Ammoniak auf die Proliferation von Astrozyten

Die Inkubation kultivierter Astrozyten mit Ammoniak hemmt deren Proliferation und induziert premature Seneszenz [57]. Dies wird über die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale vermittelt, die über eine Aktivierung der p38 die Phosphorylierung der p53 induzieren, welche die Transkription von p21 und Gadd45a steigert [57, 61, 62].

Auch im Gehirn von Patienten mit HE wurden Biomarker für Seneszenz hochreguliert gefunden [61]. Somit stellt die Seneszenz einen wichtigen Aspekt für die Pathogenese der HE dar.

1.3.2 Die Methyltransferase CARM1

Die spezifische Arginin-Methylierung und Acetylierung von Histonen sind bedeutsam für die p53-abhängige Transkription von *p21* und *Gadd45α* und damit für die Induktion von Seneszenz [59, 63].

Die Methyltransferase *Coactivator-associated arginine methyltransferase 1* (CARM1) gehört zur Familie der *Protein arginine methyltransferases* (PRMT). Sie katalysiert die Methylierung von Arginin-Resten in verschiedenen Proteinen, wie zum Beispiel in Histonen und aktiviert dadurch die Transkription spezifischer Gene bei der Zellteilung [60, 64, 65].

CARM1 fungiert als Co-Aktivatoren bei der Transkription und ist in viele biologische Prozesse involviert, wie zum Beispiel Autophagie, mRNA-Spleißen, Ontogenese und spielt eine wichtige Rolle für die Entwicklung und Differenzierung von Zellen [66, 67]. CARM1 kann auch selbst posttranslational modifiziert werden durch O-GlcNAcylierung, Ubiquitinylierung oder Auto-Methylierung. Die Inhibition von CARM1 kann die Zellproliferation unterbrechen und Apoptose auslösen [68]. Daher wird CARM1 als therapeutisches Ziel und Biomarker für verschiedene Krebsarten intensiv beforscht [67].

Ob Änderungen der Expression oder Aktivität von CARM1 eine Rolle spielen für die durch Ammoniak-induzierte Seneszenz in Astrozyten, wurde bislang nicht untersucht.

1.4 Genexpressionsänderungen bei HE

Der durch Ammoniak in Astrozyten induzierte oxidative/ nitrosative Stress (ROS/ RNS) aktiviert eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wodurch die Expression verschiedener Gene beeinflusst wird, die potenziell eine Rolle für die Pathogenese der HE spielen (Abbildung 5).

Dazu gehören die Transkriptionsfaktoren *Specificity protein 1* (SP1) und der *Metal-responsive transcription factor 1* (MTF-1), die durch den Ammoniak- und Hypoosmolalität-induzierten nitrosativen Stress im Zellkern akkumulieren [69, 70]. Es wurde

gezeigt, dass dies auf einen Anstieg freier intrazellulärer Zinkionen zurückzuführen ist, die NO-induziert aus Zn^{2+} -Thiolat-Clustern aus Proteinen freigesetzt werden [69, 70]. Da erhöhte Spiegel an Zinkionen zytotoxisch wirken, stellt die MTF-1 abhängige Hochregulation von Zinkionen-bindenden Metallothioneinen (MT)-1 und -2 eine protektive Antwort dar [71]. Ebenfalls waren die mRNA-Spiegel von sechs MT-Isoformen signifikant hochreguliert in humanen *post mortem* Gehirnen von Patienten mit Leberzirrhose und HE, von denen einige mit den Ammoniakspiegeln im peripheren Blut korrelierten [72]. Auch die nukleäre Akkumulation von SP1 wird durch Ammoniak oder hypoosmotische Zellschwellung Zink-abhängig vermittelt. In mit hypoosmotischem Zellkulturmedium inkubierten Astrozyten wurden ebenfalls die mRNA-Spiegel des *Peripheral-type benzodiazepine receptor* (PBR) hochreguliert gefunden [70]. Die Hochregulation des PBR-Proteins konnte ebenfalls in Ammoniak-behandelten Astrozyten beobachtet werden [69]. Zudem waren auch PBR-Bindestellen im Gehirn von Patienten mit Leberzirrhose, die im hepatischen Koma starben, erhöht [73]. Da der PBR Cholesterol in die Mitochondrien importiert und dies essentiell für die Synthese von Neurosteroiden ist [74], könnte die Hochregulation des PBR im Zusammenhang mit erhöhten Neurosteroid-Spiegeln stehen, welche in *post mortem* Hirnen von Patienten mit Leberzirrhose und HE gefunden wurden [75, 76].

Neurosteroide sind Substrate des *Multidrug resistance protein 4* (Mrp4), welches durch die ROS/ RNS- induzierte Aktivierung des *Peroxisome proliferator-activated receptor- α* (PPAR α) in mit Ammoniak-behandelten Astrozyten heraufreguliert wird [77]. Eine Heraufregulation der Mrp4-mRNA und des Mrp4-Proteins wurde ebenfalls in *post mortem* Gehirnen von Patienten mit Leberzirrhose mit HE gefunden [77]. Auch die γ -Aminobuttersäure (GABA)- abhängige Neurotransmission in HE [78, 79] könnte eine Folge der PBR-abhängigen Synthese und Mrp4-vermittelten Freisetzung von Neurosteroiden aus Astrozyten sein. Ebenso triggert der oxidative/ nitrosative Stress mRNA-Expressionsveränderungen verschiedener Ephrinrezeptor (EphR) und Ephrin (Eph)- Isoformen, wobei diese Veränderungen ebenfalls in *post mortem* Gehirn von Patienten mit Leberzirrhose und HE nachgewiesen wurden [80]. Die bidirektionale Signalweiterleitung zwischen Astrozyten und Neuronen über EphR/ Eph moduliert die Expression der glialen Glutamattransporter und beeinflusst hierüber die synaptische Transmission [81, 82]. Daher könnten durch ROS/ RNS-vermittelte EphR-/ Eph-mRNA-Expressionsänderungen beeinträchtigte glutamaterger Neurotransmission und verringerte synaptische Plastizität in HE verursachen [80].

In einer vorangegangenen Studie wurden mittels Transkriptomanalysen 616 Genexpressionsveränderungen in humanen *post mortem* Gehirnen von Patienten mit Leberzirrhose und HE gefunden [72]. Diese sind an biologischen Prozessen wie oxidativem Stress, Mikroglia-Aktivierung und Proliferation beteiligt [72].

Neben veränderten Genexpressionsänderungen reguliert der durch Ammoniak-induzierte ROS auch spezifische miRNAs in Astrozyten *in vitro* herunter [83]. Diese, als neue Vertreter der Gruppe der „RedoxmiRs“ identifizierten miRNAs [83], beeinflussen mRNA-Spezies, deren Proteine in den Glutamintransport (*Solute carrier family 1 member 5*, Slc1a5/ ASCT2), die Glutaminolyse (*Kidney-type glutaminase*, GLS), oxidativen Stress und Seneszenz (Nox4) und Häm-Oxygenase (HO1) involviert sind. Dies lässt vermuten, dass die „RedoxmiRs“ eine wichtige Rolle für Genexpressionsänderungen spielen, die bedeutsam für die Pathogenese der HE sind.

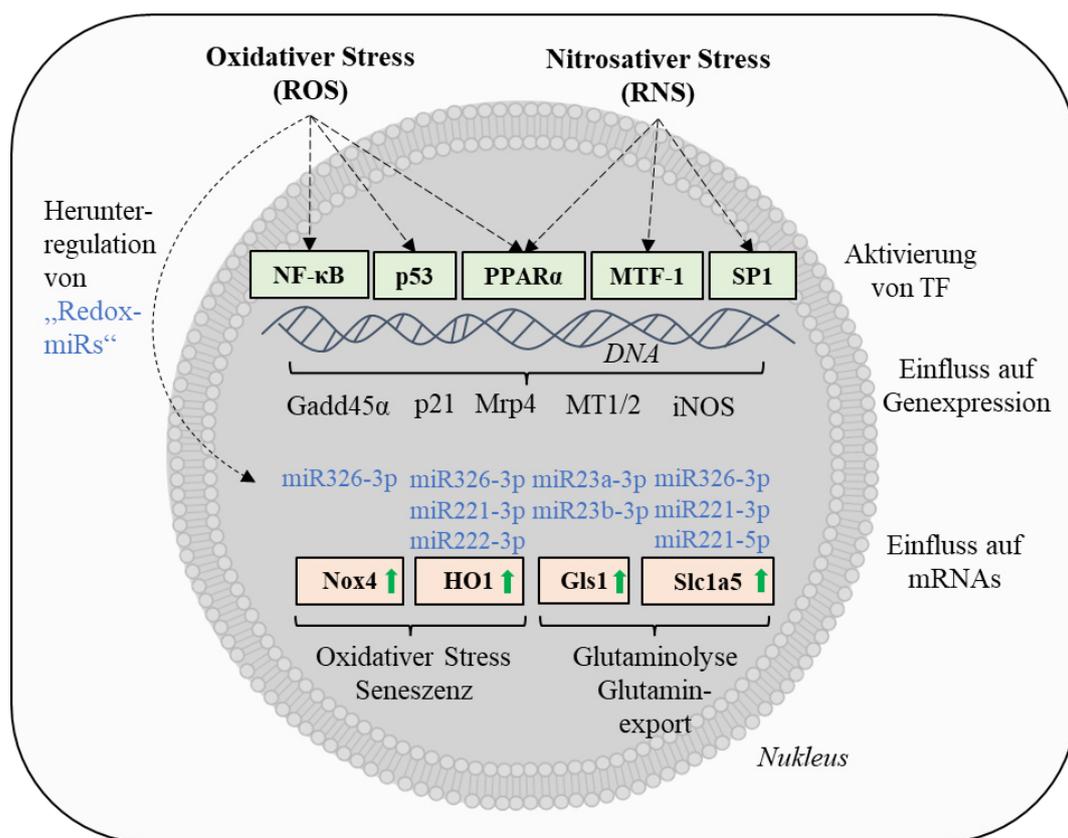


Abbildung 5: Einflüsse von oxidativem/ nitrosativem Stress auf die Genexpressionsänderung. Ammoniak aktiviert die Transkriptionsfaktoren (TF) NFκB, p53, *Peroxisome proliferator-activated receptor-α* (PPARα), *Metal-responsive transcription factor 1* (MTF-1) und *Specificity protein 1* (SP1). Dadurch wird die Genexpression von Gadd45α, p21, Mrp4, MT1/2 iNOS beeinflusst. Durch die Ammoniak-vermittelte Herunterregulation spezifischer miRNAs („RedoxmiRs“) wird die Genexpressionen der Target-mRNAs Nox4, HO1, Gls1 und Slc1a5 beeinflusst, was sich auf den oxidativen Stress, Seneszenz, Glutaminolyse und Glutaminexport

auswirkt. Informationen zur Erstellung der Abbildung wurden den folgenden Quellen entnommen [37, 84].

1.4.1 RNA-Oxidation bei der HE

Neben den zuvor beschriebenen Genexpressionsänderungen induziert Ammoniak über die Bildung von oxidativ/nitrosativen Stress die Oxidation von RNA durch Heraufregulation der HO1 und der NADPH-Oxidase 4 (Nox4) [85, 86]. Dabei wird die Base Guanin zu 8-oxo-Guanin oxidiert. Da RNAs als Einzelstrang vorliegen und nicht von assoziierten Proteinen geschützt werden, sind sie im Vergleich zur DNA leichter angreifbar durch reaktive Stick- und Sauerstoffspezies [87]. Dennoch ist die RNA-Oxidation spezifisch und konnte beim astroglialen *Glutamate/aspartate transporter* (GLAST) und der 18S ribosomalen RNA, aber nicht bei der abundanten β -Aktin RNA in mit Ammoniak-behandelten Astrozyten gefunden werden. [85]. Die Oxidation der RNA kann mistranslatierte Proteine hervorbringen, deren Funktion beeinträchtigt ist, oder deren Translation inhibieren [88].

Im Gegensatz zur Oxidation der DNA ist gegenwärtig unklar, ob oxidierte RNA „repariert“ werden kann. Die Akkumulation oxidiertes RNA bei zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer spricht jedoch zumindest dafür, dass putative Reparaturmechanismen unter bestimmten pathologischen Bedingungen nicht effektiv sind. Auch in humanen *post mortem* Hirnproben von Leberzirrhose Patienten mit HE wurden erhöhte Spiegel oxidiertes RNA im zerebralen Kortex gefunden [86].

In Tiermodellen zur HE wurde im zerebralen Kortex, neben in Astrozyten, auch in Neuronen und dort, unter anderem auch an Synapsen eine ausgeprägte RNA-Oxidation nachgewiesen [85]. Diese Untersuchungen haben die Hypothese begründet, dass die RNA-Oxidation die Proteinsynthese an Synapsen beeinträchtigen könnte und damit Synapsen unfähig werden sich zu restrukturieren. Da dies essenziell ist für synaptische Plastizität, Lernen und Gedächtnis, wurde vermutet, dass kognitive Beeinträchtigungen bei der HE auch Folge zerebraler RNA-Oxidation sein können [85].

1.4.2 Das RNA-bindende Protein TROVE2

Wie im vorherigen Abschnitt bereits erwähnt, ist derzeitig unklar, ob Reparatur- und/oder Qualitätskontrollmechanismen existieren, über die oxidierte RNA prozessiert wird. Das rRNA-bindende Protein TROVE2/Ro60 ist in Qualitätskontrollen von RNA wie Stabilisierung, Prozessierung und Qualitätskontrolle nicht-kodierender RNAs involviert [89] und kann fehlgefaltete oder mistranslatierte ribosomale RNA degradieren [90, 91]. Dabei bildet TROVE2/Ro60 einen Komplex mit dem La-Protein und Y-RNA [89]. Das La-Protein fungiert als RNA-bindendes Protein, welches die Reifung von Transkripten vermittelt, die von der RNA-Polymerase III synthetisiert wurden sowie von anderen nicht-kodierenden RNAs [92]. Y-RNAs werden von der RNA-Polymerase III synthetisiert und sind kleine, nicht-kodierende RNAs, die an der DNA-Replikation beteiligt sind [91].

TROVE2-inaktivierende Autoantikörper werden bei Menschen mit dem Sjögren-Syndrom und systemischem Lupus Erythematodes gefunden [93]. Beide Erkrankungen gehen mit entzündlich-rheumatischen Symptomen und schweren Polyneuropathien einher [94, 95]. Beim Lupus werden auch zentralnervöse Störungen, wie beeinträchtigt Gedächtnis gefunden [96].

Ob TROVE2 auch oxidierte RNA und hier insbesondere oxidierte ribosomale RNAs binden kann, ist derzeitig unklar.

1.5 Zelluläre Eisenhomöostase

Eisenionen sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt, dazu zählen zum Beispiel Sauerstofftransport, Energiemetabolismus und DNA-Synthese (Abbildung 6) [97]. Ungebundene Eisenionen können durch Bildung reaktiver Sauerstoffspezies DNA, Proteine und Lipide beschädigen. Insbesondere der Bildung hochreaktiver Hydroxylanion-Radikale, in der sogenannten Fenton-Reaktion, wird eine kausative Rolle für neurologische Störungen bei einer Vielzahl neurodegenerativer Erkrankungen zugesprochen [98].

Die Eisenhomöostase wird in der Zelle streng über die Aufnahme, Abgabe und Speicherung reguliert. Die Abgabe zweiwertiger Eisenionen (Fe^{2+}) erfolgt exklusiv über den Transmembrantransporter Ferroportin [97]. Die Funktion von Ferroportin ist gekoppelt an die Ferroxidasen Hephaestin und Ceruloplasmin, die mit Ferroportin interagieren. Damit der

Export erfolgen kann, werden zweiwertige Eisenionen zu dreiwertigem Eisen (Fe^{3+}) oxidiert [97]. Die genauen Mechanismen der Interaktion zwischen dem Transmembrantransporter und den beiden Enzymen sind derzeit unklar. Das Peptid Heparin kann den Export von Eisenionen aus den Zellen durch Bindung und nachfolgenden Abbau von Ferroportin hemmen [99]. Dieser Mechanismus spielt eine wichtige Rolle für die Regulation der systemischen Eisenspiegel, indem es die Abgabe von resorbierten Eisenionen aus der Darmmukosa in die Blutzirkulation hemmt [100]. Im Blutplasma liegt dreiwertiges Eisen gebunden an Transferrin vor, welches über den Transferrinrezeptor gebunden und von der Zelle aufgenommen werden kann [101]. Die Aufnahme von freien Eisenionen in Zellen kann auch über *Divalent metal transporter 1* (DMT1) erfolgen [97].

In der Zelle werden ungebundene freie zweiwertige Eisenionen im Eisenspeicherprotein Ferritin komplexiert oder in Mitochondrien importiert, wo sie für die Synthese von Häm oder die Bildung von Eisen-Schwefel-Clustern (Fe-S-Cluster) verwendet werden. Intrazelluläres Häm kann durch die HO1 in Biliverdin, CO und Fe^{2+} überführt werden [102].

Die intrazelluläre Eisenhomöostase wird post-translational über *Iron responsive proteins* (IRP) gesteuert, welche die Translation von mRNAs für Proteine des Eisenmetabolismus wie DMT1, Ferritin, Ferroportin und Transferrin hemmen [103]. Bei einer geringen intrazellulären Eisenkonzentration binden IRP mit hoher Affinität an *Iron regulating elements* (IRE) in der mRNA und inhibieren hierüber deren Translation [103]. Hierdurch wird die intrazelluläre Eisenspeicherung und der Export blockiert. Ist die intrazelluläre Konzentration freier Eisenionen hoch, vermindert die Bindung von Eisenionen an die IRPs deren Affinität für IREs und steigert dadurch die Translation von Eisenionen-bindenden oder -transportierenden Proteinen. Hierüber werden, eine Akkumulation freier Eisenionen und potenziell damit einhergehende oxidative Schädigungen in der Zelle verhindert.

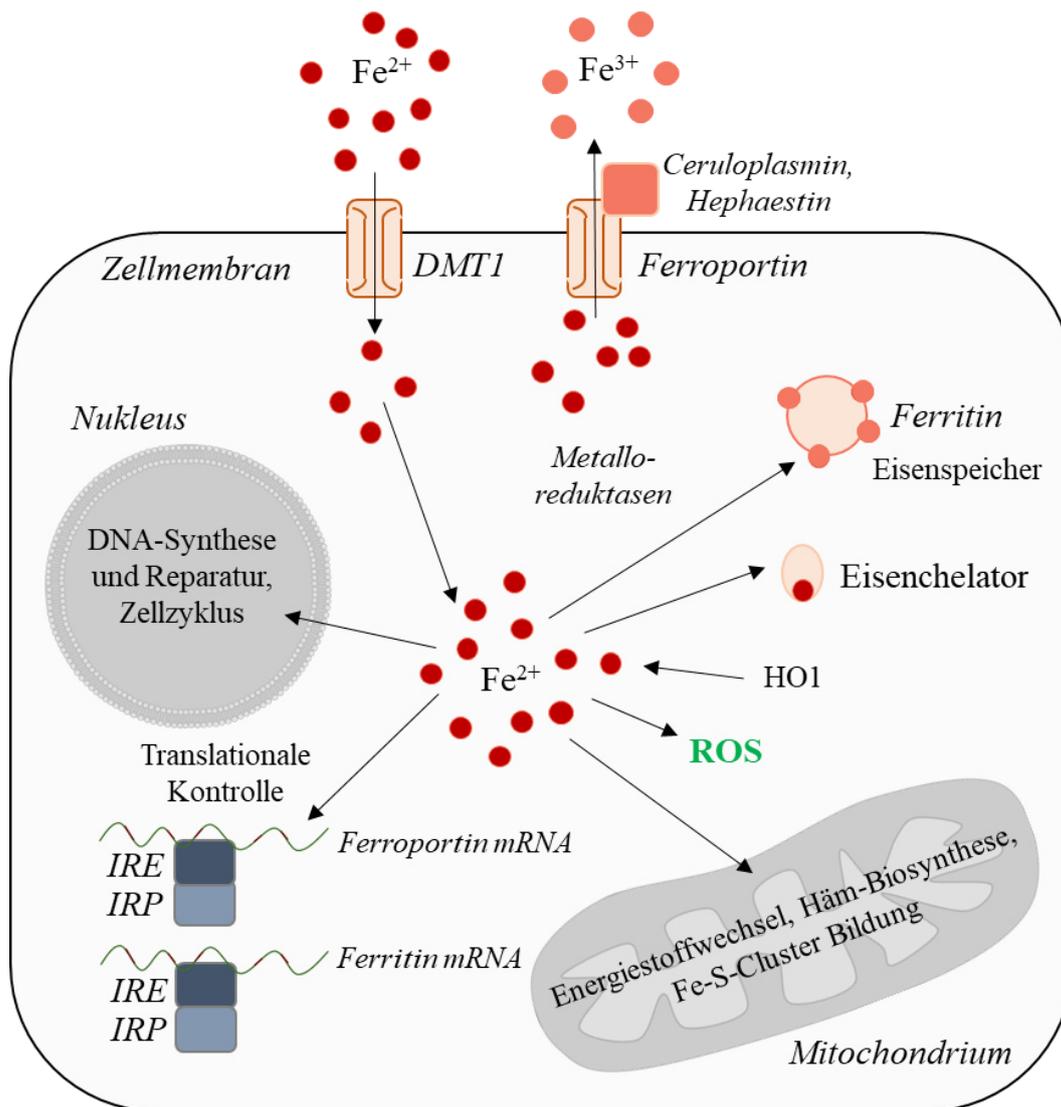


Abbildung 6: Regulation der zellulären Eisenhomöostase. Die intrazelluläre Konzentration freier Eisenionen wird durch Im- (DMT1, Transferrinrezeptor) und Export (Ferroportin), Speicherung (Ferritin) reguliert und durch Einbau (Häm-Biosynthese) bzw. Freisetzung (Hämoxigenase) aus Proteinen beeinflusst. Informationen zur Abbildung wurden [104] entnommen.

1.5.1 Eisenhomöostase bei der HE

Astrozyten bilden gemeinsam mit Endothelzellen die Blut-Hirn-Schranke und können Eisenionen aus der Blutzirkulation aufnehmen und an andere Zellen im zentralen Nervensystem (ZNS) weitergeben. [98].

Neuere Untersuchungen zeigen, dass Ammoniak in kultivierten Astrozyten die intrazellulären Spiegel freier Eisenionen in Mitochondrien und in Lysosomen/Autophagosomen steigert. Auch die Spiegel des im Zytosol lokalisierten Ferritins sind in

Ammoniak-inkubierten Astrozyten *in vitro* erhöht [61]. Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, dass auch im Zytosol die Spiegel freier Eisenionen ansteigen, da die Translation von Ferritin, wie oben beschrieben, durch IRPs reguliert wird. Daneben steigert Ammoniak die mRNA- und Proteinspiegel der HO1, die aus Häm zweiwertige Eisenionen freisetzt [61]. Weitere Untersuchungen legen nahe, dass die erhöhten Spiegel freier Eisenionen in den mit Ammoniak-inkubierten Astrozyten die Bildung von oxidativem Stress über die Fenton-Reaktion vermitteln und dies Seneszenz in den kultivierten Rattenastrozyten induziert.

Auch in *post mortem* Hirnproben von zwei unabhängigen Kohorten von Leberzirrhose Patienten mit HE wurde ein geringer, aber signifikanter Anstieg der Ferritin-mRNA und weiterer Gene, die für Proteine, die in den Eisenstoffwechsel involviert sind, beobachtet [61]. Es wurde daher vermutet, dass die Hochregulation der Biomarker für oxidativen Stress [86] und Seneszenz [57] im Gehirn von Zirrhose Patienten mit HE im Zusammenhang mit einer Dysregulation der Eisenhomöostase im Gehirn der HE-Patienten steht.

1.5.2 Das Eisenbindende Protein LCN2

Freie Eisenionen können intrazellulär toxische Wirkungen auf die Zelle ausüben und oxidativen Stress induzieren. Damit dieser Prozess nicht stattfindet, werden freie Eisenionen an Komplexe gebunden. Dies geschieht insbesondere durch Komplexierung im Eisenspeicherprotein Ferritin. Darüber hinaus gibt es weitere Eisenionen-bindende Proteine, wie das Lipocalin-2 (LCN2). LCN2 oder auch *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) genannt, ist ein hoch affiner Eisen-Chelator, der an der Homöostase beteiligt ist [105]. Dieses Protein wird im Rahmen der Akut-Phase-Reaktion gebildet und spielt bei der angeborenen Immunität eine wichtige Rolle, wo es durch Chelierung von Eisenionen das Wachstum von Bakterien begrenzen kann [106]. Im Darm limitiert LCN2 auf diese Weise das Wachstum der Darmflora und wirkt hierüber anti-inflammatorisch [107]. LCN2 wird auch als Biomarker für Entzündungsreaktionen und Infektionen genutzt, wo gesteigerte LCN2 Proteinspiegel beobachtet werden [108].

Im Gehirn hat LCN2 Entzündungs-unabhängige Funktionen. Hier beeinflusst es die synaptische Dichte, die neuronale Erregbarkeit und die Signalweiterleitung [109]. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. LCN2 wurde bereits im Zusammenhang mit den Pathogenesen von neurologischen Erkrankungen, wie

beispielsweise vaskulärer Demenz und *Amyotrophic lateral sclerosis* (ALS) untersucht, in denen die LCN2 Proteinspiegel signifikant erhöht gefunden wurden [110, 111].

LCN2 wurde bislang nicht im Zusammenhang mit zerebraler Dysfunktion bei der HE untersucht.

1.6 Mitochondrien, Ammoniaktoxizität und HE

Mitochondrien spielen für den Energiestoffwechsel eine bedeutsame Rolle und sind der Ort, an dem die oxidative Decarboxylierung, der Citratzyklus und die Endoxidation in der Atmungskette stattfinden. In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass die HE mit einer Beeinträchtigung des zerebralen Energiestoffwechsels in Mitochondrien assoziiert ist [112, 113]. Dies geht einher mit morphologischen Änderungen der Mitochondrien, die charakteristisch für dysfunktionale Mitochondrien sind: Fragmentierung und Schwellung [114].

Diese Auffälligkeiten sind ebenfalls charakteristisch für seneszente Zellen [115]. In dysfunktionalen Mitochondrien ist die Effizienz der oxidativen Phosphorylierung, als Maß für die Energiegewinnung durch Bildung von Adenosintriphosphat (ATP) in der Atmungskette vermindert und dies geht einher mit einer gesteigerten Bildung von ROS. Durch die Reduktion von Sauerstoffmolekülen (O_2) werden hochreaktive Sauerstoffmetabolite wie Superoxidionen, Peroxide und Hydroxylradikale gebildet. Diese können die mitochondriale DNA schädigen, da sie nicht von Histonen geschützt werden und sich in relativer Nähe zur Elektronentransportkette befinden. Folglich kann die Zelle weniger Energiesubstrate synthetisieren und somit laufen Energie-abhängige Prozesse in der Zelle verlangsamt ab [116].

Eine ganze Reihe von an Zellkulturen *in vitro*, aber auch in Tiermodellen zur HE *in situ* erhobenen Befunde legen nahe, dass die Bildung von ROS in den Mitochondrien bei HE gesteigert ist [85, 117]. Von großer Bedeutung ist hierbei insbesondere, dass Ammoniak die mitochondriale ROS-Bildung in kultivierten Astrozyten Glutaminsynthese-abhängig induziert [57]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch unklar, jedoch wurde vermutet, dass die mitochondriale Glutaminolyse ursächlich für die mitochondriale Dysfunktion und ROS-Bildung ist [117].

Das aufgenommene Glutamin wird dabei durch die Glutaminase zu Glutamat, unter Abspaltung von Ammoniak, desamidiert. Dies kann prinzipiell durch zwei Isozyme der Glutaminase bewerkstelligt werden: Die *Glutaminase kidney-type* (GLS1/KGA) und die

Glutaminase liver-type (GLS2). Beide Isozyme wurden mittlerweile in Astrozyten im Hirn der Ratte und des Menschen nachgewiesen [118, 119].

1.6.1 Der Aminosäuretransporter ASCT2

Der Aminosäuretransporter *L-alanine/L-serine/L-cysteine transporter 2* (ASCT2) oder *Solute carrier family 1 a 5* (Slc1a5) hat ein breites Substratspektrum und transportiert alle neutralen Aminosäuren zu denen auch das Glutamin gehört [120]. In kultivierten Rattenastrozyten kann dieser als Exporter fungieren und Glutamin aus der Zelle in den Extrazellularraum transportieren [121, 122]. Daneben existiert eine ASCT2-Variante, die eine N-terminale mitochondriale Lokalisationssequenz besitzt und hierüber in Mitochondrien zu finden ist. Diese Variante kann Glutamin in die Mitochondrien hineintransportieren [123]. Der ASCT2 wird insbesondere in Tumoren stark hochreguliert, um Glutamin zu importieren und es wird vermutet, dass dies der Glutaminabhängigkeit und dem erhöhten Energiebedarf von Tumoren geschuldet ist [124]. Somit kann der ASCT2 als Im- und Exporter fungieren. Die zelluläre Lokalisation und Funktion von ASCT2 im Maus- und Rattengehirn sind nur wenig erforscht. Untersuchungen am Mausgehirn haben gezeigt, dass der ASCT2 exklusiv in Neuronen exprimiert wird [125]. Vergleichende Untersuchungen an der Ratte konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Bislang existieren keine Untersuchungen zur Rolle des ASCT2 für den Glutamintransport bei der HE.

1.7 Die leberspezifische GS-Knockout Maus als chronisches Hyperammonämie-Modell

In der Literatur ist eine Reihe von Tiermodellen beschrieben, an denen die Auswirkungen einer chronischen Hyperammonämie auf zerebrale Funktionen untersucht wurden [126-130]. Dabei ist die Hyperammonämie jedoch meist mit einem Leberschaden verbunden, der zum Beispiel durch Applikation von lebertoxischen Substanzen induziert wird. Da der Leberschaden oft verbunden ist mit Entzündungsreaktionen in der Leber und weiteren Veränderungen, die prinzipiell auf das Gehirn wirken können, eignen sich diese Modelle nur begrenzt, um Effekte der Hyperammonämie auf die Gehirnfunktion zu untersuchen.

Häussinger *et al.* [131] etablierten ein transgenes Mausmodell, bei dem eine Hyperammonämie durch einen leberspezifischen Glutamin-Synthetase-Knockout (LGS-KO) induziert wird. Diese Maus ist inzwischen als Tiermodell zum Studium der Auswirkungen einer chronischen Hyperammonämie außerordentlich geeignet [131-134]. Hierfür wurden unter dem Albumin-Promotor Cre-Rekombinase exprimierende Mäuse mit einer Linie verpaart, bei denen das GS-Gen „gefloxt“ wurde. Der Knockout der GS findet exklusiv in der Leber statt und vermindert die Kapazität der Leber Ammoniak zu entgiften [131]. Die GS-Expression im Gehirn der Tiere ist nicht verändert und der Harnstoffzyklus ist nicht beeinträchtigt [131].

Bei den LGS-KO-Mäusen sind die Ammoniakspiegel im Blut im Vergleich zu den AlbCre-Wildtyp (WT) Mäusen signifikant erhöht, im Alter von 9 Wochen und 1 Jahr [131]. In *post mortem* Gehirnschnitten wurde verstärkter oxidativer Stress im zerebralen Kortex, Hippocampus und Zerebellum nachgewiesen [131]. Dieselben Marker wurden ebenfalls verstärkt exprimiert in *post mortem* humanen Gehirnen nachgewiesen von Patienten mit Leberzirrhose mit HE [86]. Die LGS-KO-Mäuse zeigen Verhaltensauffälligkeiten, wie zum Beispiel ein verringertes Angstempfinden und eine gesteigerte Lokomotion auf [131, 133, 134]. Darüber hinaus wurde bei diesen Tieren eine gestörte synaptische Plastizität und beeinträchtigte Neurotransmission gefunden [133, 134]. Diese Veränderungen stimmen prinzipiell mit motorischen und kognitiven Beeinträchtigungen bei Patienten mit Leberzirrhose mit HE überein, was die Eignung des Tiermodells als Untersuchungsmodell für zerebrale Veränderungen bei HE nahelegt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien, Substanzen, Verbrauchsmaterialien, Materialien und Kits sowie Geräte sind in Tabelle 1-3 aufgelistet. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie Primer sind in Tabelle 4 und 5 aufgelistet.

Tabelle 1: In der Arbeit verwendete Chemikalien und Substanzen.

Chemikalie oder Substanz	Firma	Bestellnummer
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma	#10197777001
2',2'-Bipyridin (BIP)	Fluka	#14454
β-Glycerophosphat	Roth	#6847.1
β-Mercaptoethanol	Roth	#4227.2
Acrylamid Mix (30%)	Appllichem PanReac	#A4983
Agarose	Biozym	#840004
Allstars Negative Control siRNA	QIAGEN	#1027281
Ammoniumazetat (NH ₄ Ac)	Merck	#101116
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Sigma	#A9434
Ammoniumpersulfat (APS)	SERVA	#13376
Ammonium Test Kit II	Hitado	#ME31210010601
Bafilomycin A1	Merck	#196000
Bovine serum albumin (BSA)	Roche	#10774111103
Bradford Reagenz	BioRad	#5000006
Bromphenolblau (1%)	Roth	#A512.1
C ₁₂ -FDG (Fluorescein-di-β-D-galactopyranoside)	Invitrogen	#D2893
CARM1-Inhibitor (CARM1 ¹)	Sigma	#217531
Chemilumineszenz Substrat	Promega	#W1015
cOmplete™ Protease Inhibitor	Roche	#11697498001
Diazepam	Sigma	#D0899
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	#D8418
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco Life Technologies	#31885-23

DMEM + GlutaMAX™-I	Gibco Life Technologies	#2185-25
dNTP Mix (10 nM)	Promega	#U1511
Essigsäure	VWR	#6519
Ethylendiamtetraessigsäure (EDTA)	Roth	#CN34.1
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraessigsäure (EGTA)	Roth	#3054.3
Ethanol (100%)	VWR	#1.07017
Ethidiumbromid	Roth	#7870.2
Fetal bovine serum Superior (FBS)	Biochrom	#S0415
Fluoromount-G	Southern Biotech	#0100-01
Glycin	Merck	#104201
Glucosamin hydrochlorid	Sigma	#G4875
Glycerol	Merck	#356352
GoTaq DNA-Polymerase	Promega	#M3001
GoTaq Reaction Buffer Green (5×)	Promega	#M7911
GoTaq SYBR® Green Mix	Promega	#A6002
HiPerfect Transfection Reagent	QIAGEN	#301705
Hoechst34580	Life Technologies	#11584876
Isopropanol	VWR	#1.09634
Kohlenstoffdioxid (CO ₂)	Linde	#2450114
Mass Ruler Low Range DNA Ladder	MBI Fermentas	#SM0248
Methanol	Merck	#113351
Methylammoniumchlorid (MeNH ₃ Cl)	Merck	# S6896120542
miRNeasy-Kit	QIAGEN	#74106
N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma	# 411019
NADH-Dinatriumsalz	Roche	#10107735001
Natriumchlorid (NaCl)	VWR	#0241
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma	# 11667289001
Natriumfluorid (NaF)	Sigma	#215309
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck	#106462
Natriumorthovanadat	Sigma	#S6508

Natriumdiphosphat	Sigma	#S6422
Nuclease-freies Wasser	Promega	#P1193
Paraformaldehyd (PFA) 16%	Thermo Scientific	#28908
PCR Purification Kit	QIAGEN	#28006
Penicillin/Streptomycin	Gibco	#15140-122
Phosphate buffered saline (PBS) w/ Ca^{2+} and Mg^{2+}	PanBiotech	#P04-35500
Phosphate buffered saline (PBS) w/o Ca^{2+} and Mg^{2+}	PanBiotech	#P04-36500
Ponceau S Solution (0,2%)	SERVA	#33427.01
Pyridoxal isonicotinoyl hydrazone (PIH)	ChemCruz [®]	#sc-204192
Pyruvat	Merck	#P2256
Reverse Transcription Kit	QIAGEN	#205313
Salzsäure (30%)	Merck	#101514
Saponin	Sigma	#S7900
siRNA TROVE2 (Rn_LOC304833_1)	QIAGEN	#SI01670795
Smart Ladder DNA-Marker	Eurogentec	#MW-1700-02
Stickstoff	Linde	#2210172
TNF- α (Tumor necrosis factor α) human	Sigma	#SRP3177
Triethanolamin	Merck	#T58300
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	VWR	# 1.08387.0500
Triton-X-100	Sigma	#11332481001
Trypsin-Lösung (0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA in PBS w/o Ca^{2+} and Mg^{2+})	Cytogen	#10-023
Tumor necrosis factor α human (TNF- α)	Sigma	#SRP3177
Tween-20	Merck	#822184
Zaponlack	Roth	#6804

Tabelle 2: In der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien, Materialien und Kits.

Verbrauchsmaterial/ Material	Firma
6/ 24/96-Well Platte	greiner bio-one
Aluminiumfolie	Sigma
Falcon Tubes (15 mL, 50 mL)	Falcon

Falcon Tube Ständer	Falcon
Glasplättchen rechteckig/ rund	Hecht Assistent
Glasplatten	Sigma
Gummi-Abstandshalter für die Gelelektrophorese	Sigma
Handschuhe	Abena
Ibidi μ -dish glass bottom dishes (\varnothing 35mm)	Ibidi
Kämme für die Gelelektrophorese (14er Taschen)	Sigma
Klammern für die Gelelektrophorese	Sigma
Küvetten	Sarstedt
Mappe für Objektträger	CEESEM
MatTek glass bottom dishes (\varnothing 60mm)	MatTek Corporation
Mikroschraubröhre (2 mL)	Sarstedt
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare Life Sciences
Objektträger	Engelbrecht
Ölstift	Kisker Biotech GmbH & Co. KG
Parafilm	Bisom
Pasteurpipetten	Brand
PCR-Ständer	Sarstedt
PCR-Strips	Star Lab
Pipetten (10, 100, 1000 μ L)	Eppendorf
Pipettenspitzen (10, 100, 200, 1000 μ L)	Tip One
Pistill	Fisher Scientific
Rasierklingen	Leica
Reaktionsgefäße weiß (1,5, 2, 5 mL)	Eppendorf
Reaktionsgefäße braun (0,5, 2 mL)	Eppendorf
Reaktionsgefäß Ständer	Sarstedt
Rührstab	Sarstedt
Safe Lock Tubes (1,5 mL)	Eppendorf
Shredder Säulen	QIAGEN
Spritzen (50 mL)	Braun
Sealing Foil	4titude

Sterilfilter (20 µm)	Sarstedt
Stripetten (5, 10, 25, 50 mL)	greiner bio-one
Tücher	WEPA Professional GmbH
Whatman-Papier	GE Healthcare Life Sciences
Zellkultur Schalen (6 cm, 10 cm)	Falcon
Zellkulturflaschen (T25, T75)	greiner bio-one
Zellschaber	Falcon und SPL
Zellsieb (40 µm)	Falcon
Zellzählkammer	Marienfeld GmbH & Co. KG
Kits	
cDNA Synthese Kit	Biozym
DNeasy Blood and Tissue Kit	QIAGEN
Gel Purification Kit	QIAGEN
RNeasy Kit	QIAGEN

Tabelle 3: In der Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Firma
Agarosegelkammer	Biometra
Ammoniakmessgerät (Ammonia Checker II)	Hitado
Autoklav DB-23	Systec
BioRAD Entwickler ChemiDoc MP	BioRAD
Blotting-Kammer	Biometra
Eismaschine	Icematic
Elektrophorese-Kammer	Biometra
Feinwaage KERN 770	Jägetechnik
Cell Observer.Z1	ZEISS
Gefrierschrank -20°C Comfort	LIEBHERR
Gel Dokumentationssystem	Vilber Lourmat
Heizblock Thermomixer Comfort/ Compact 1,5 mL	Eppendorf
Incubator HERA Cell 150	HERA
Kryotom CM3050S	LEICA

LSM880	ZEISS
Kühlschrank Premium	LIEBHERR
Magnetrührer MR2000	Heidolph
Mikroskop AXIO Vert.1	ZEISS
NanoDrop Typ ND1000	Peqlab
Pipetteboy	Accupetta
Power Supply Standard Power Pad 25	Biometra
Pumpe 505S	Watson Marlow
qPCR-Cycler	Thermo Fisher
Rollschüttler RM5	CAT
Schneidbrett 561	Dahle
Schüttler 3017	GFL
Sterilbank	ANTARES
Sterilbank EPS600	Pharmacia Biotech
Spektrometer Ecom6122	Eppendorf
Thermoblock	Eppendorf
Thermocycler	Eppendorf
Ultraschallsonde UP50H	Hielscher
UV-Lampe (Detektion)	Peqlab
UV-VIS Device Ultrospe 2100 Pro	Amersham Biosciences
Vakuumkonzentrator (Concentrator Plus)	Eppendorf
Vii A7qPCR Cycler	Applied Biosystems Life Technologies
Vortexer	Heidolph
Waage KERN 440-47N	Jägetechnik
Wärmebad P5 IDC10	HAAKE
Wärmebad TW20	JULABO
Zentrifuge 25417R/ 5424R/ 5418	Eppendorf

Tabelle 4: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper. mAb: monoclonal antibody, pAb: polyclonal antibody

Epitop	Wirt	Klonalität	Bestellnummer	Firma
8-OH(d)G	<i>mouse</i>	mAb	#12501	QED
ASCT2	<i>rabbit</i>	pAb	#5345S	Cell Signaling

CARM1	<i>rabbit</i>	pAb	#ABIN753793	Antibodies Online
GAPDH	<i>mouse</i>	mAb	#H86504M	Meridian
GFAP	<i>mouse</i>	mAb	#G3893	Sigma
LCN2	<i>rabbit</i>	pAb	#ab63929	Abcam
TROVE2/Ro60	<i>rabbit</i>	pAb	#ab194004	Abcam
<i>mouse</i> IgG (ALEXA Fluor488 konjugiert)	<i>goat</i>	pAb	#115-547-003	Jackson
<i>mouse</i> IgG (ALEXA Fluor647 konjugiert)	<i>goat</i>	pAb	#111-605-045	Jackson
<i>mouse</i> IgG (FITC konjugiert)	<i>goat</i>	pAb	#115-095-166	Jackson
<i>mouse</i> IgG (HRPOD konjugiert)	<i>goat</i>	pAb	#1706516	BioRad
<i>rabbit</i> IgG (Cy3 konjugiert)	<i>donkey</i>	pAb	#711-166-152	Jackson
<i>rabbit</i> (HRPOD konjugiert)	<i>donkey</i>	pAb	#AP182P	Merck

Tabelle 5: Nukleotidsequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer. for: forward, rev: reverse.

Primername	Spezies	Sequenz (5' → 3' Orientierung)
AlbCre for [131]	<i>mouse</i>	CTG TCA CTT GGT CGT GGC AGC
AlbCre rev [131]	<i>mouse</i>	GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA
ASCT2 for [135]	<i>mouse</i>	TGG CCA GCA AGA TTG TGG AGA T
ASCT2 rev [135]	<i>mouse</i>	TTT GCG GGT GAA GAG GAA GT
ASCT2 for	<i>rat</i>	TCC TCT TTA CCC GCA AAA AC
ASCT2 rev	<i>rat</i>	CCA CAC CAT TCT TCT CCT CTA C
CARM1 for	<i>mouse</i>	CGC CCT CTA CAG CCA TGA AG
CARM1 rev	<i>mouse</i>	GTC CGC TCA CTG AAC ACA GA
CARM1 for	<i>rat</i>	CTA CTG CCT ACG ACC TGA GC
CARM1 rev	<i>rat</i>	TTG ACA ATC CCT GTG TTG GCT

GADD45 α for	<i>rat</i>	TCT GTT GCG AGA ACG ACA TC
GADD45 α rev	<i>rat</i>	TGT GAT GAA TGT GGG TTC GT
GRP78 for	<i>rat</i>	CAA CTC ACG TCC AAC CCG GAG AA
GRP78 rev	<i>rat</i>	TGT CTT GGT TTG CCC ACC TCC G
GS for [131]	<i>mouse</i>	GCT TAG GAT GGG TTA CTC TTC CAA GG
GS rev [131]	<i>mouse</i>	ATC ATC ATC TCC CTT CTC CCA TTC C
HO1 for	<i>rat</i>	CGG CCC TGG AAG AGG AGA TAG
HO1 rev	<i>rat</i>	CGA TGC TCG GGA AGG TGA AAA
HPRT1 for	<i>rat</i>	TGC TCG AGA TGT CAT GAA GGA
HPRT1 rev	<i>rat</i>	CAG AGG GCC ACA ATG TGA TG
LCN2 for	<i>mouse</i>	CCA TCT ATG AGC TAC AAG AGA ACA AT
LCN2 rev	<i>mouse</i>	TCT GAT CCA GTA GCG ACA GC
LCN2 for [136]	<i>rat</i>	GAT GTT GTT ATC CTT GAG GCC C
LCN2 rev [136]	<i>rat</i>	CAC TGA CTA CGA CCA GTT TGC C
P21 for	<i>rat</i>	GAG GCC TCT TCC CCA TCT TCT
P21 rev	<i>rat</i>	AAT TAA GAC ACA CTG AAT GAA GGC TAA G
SDHA for	<i>mouse</i>	CTT CGC TGG TGT GGA TGT CA
SDHA rev	<i>mouse</i>	GTG GGA ATC CCA CCC ATG
TROVE2 for	<i>mouse</i>	TGC AAG CCT TAG ATG CTG CT
TROVE2 rev	<i>mouse</i>	TGT CCG TGT AAC CAC CAT GC
TROVE2 for	<i>rat</i>	CAT GGG CTC CGA GGA AAG TT
TROVE2 rev	<i>rat</i>	ACC ACT GAC ATC AAC AGC CA

2.2 Methoden

2.2.1 Mäuse und Ratten

Die Mäuse und Ratten wurden in der ZETT (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben) der Heinrich-Heine-Universität gehalten. Neben einem 12 h-Licht/12 h-Dunkelzyklus und einer Umgebungstemperatur von 20-24°C hatten die Tiere uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Nahrung. Die Pflege der Tiere erfolgte gemäß den Bestimmungen der EU-Richtlinie 2010/63/EU. Die durchgeführten Tierversuche wurden durch das LANUV (Landesamt für Natur, Umwelt- und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen) genehmigt (AZ: 84-02.04.2015.A237 und AZ: 84-02.04.2015.A342).

2.2.2 Genotypisierung der Mäuse

Zunächst wurden die Proben (Schwanzspitzen für eine Nachgenotypisierung, Ohrstanzen für neugeborene Tiere) in dem DNeasy Blood & Tissue Kit-enthaltenen „ATL“-Puffer mit Proteinase K über Nacht bei 56°C unter Schütteln im Thermoblock entsprechend den Herstellerangaben inkubiert. Hierbei wurde das Gewebe durch den Lyse-Puffer („ATL“-Puffer) aufgeschlossen und Proteine durch die Proteinase K in kleinere Peptide aufgespalten. Anschließend wurden 200 µL „AL“-Puffer und 200 µL Ethanol hinzugegeben und die Lösung bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Bei diesem Schritt wurden die Zell- und Kernmembranen aufgeschlossen („AL“-Puffer) und die in den Zellen enthaltene DNA präzipitiert (Ethanol). Der Überstand, der die präzipitierte DNA enthielt, wurde abgenommen und auf eine Spin Säule gegeben, auf dessen Membran die DNA bindet. Nach erneutem Zentrifugieren bei 8000 rpm für 1 min wurde die Säule mit Wasch-Puffern („AW1“ und „AW2“) gewaschen, um zelluläre Bestandteile aus der Probe zu entfernen. Die isolierte DNA wurde in RNase freies H₂O eluiert. Die isolierte DNA wurde mittels PCR (*polymerase chain reaction*) amplifiziert. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist Medium 1 zu entnehmen.

Medium 1: PCR-Ansatz. For: forward, rev: reverse.

Substanz	Menge pro Ansatz
5× Puffer	5 µL
dNTPs	0,5 µL
Primer for	0,75 µL

Primer rev	0,75 µL
Taq-Polymerase (Go-Taq Promega)	0,25 µL
RNase freies H ₂ O	17,75 µL

Es wurden 23 µL Mastermix und 2 µL DNA-Probe gemischt. Für jede DNA-Probe wurde jeweils eine PCR mit AlbCre (*Albumin promoter-controlled Cre recombinase gene*) und eine mit GS (*Glutamine synthetase*)-Primern durchgeführt. Die folgenden Primer-Paare wurden verwendet (siehe Tabelle 5): GS: for-GCT TAG GAT GGG TTA CTC TTC CAA GG, rev-ATC ATC ATC TCC CTT CTC CCA TTC C; AlbCre: for-CTG TCA CTT GGT CGT GGC AGC, rev-GTC CAA TTT ACT GAC CGT ACA. Die aufgereinigte DNA (1 µg) wurde in einem Thermocycler unter den folgenden PCR -Einstellungen amplifiziert (Tabelle 6):

Tabelle 6: Ablauf der PCR im Thermocycler für die Genotypisierung der Mäuse.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94°C	3 min	33
Hybridisierung	60°C	60 s	
Elongation	72°C	20 s	

Die PCR-Produkte und der SmartLadder-Marker wurden in einem 1,5% (w/v) Ethidiumbromid enthaltenden Agarosegel aufgetragen und die Gelelektrophorese wurde bei 130 Volt durchgeführt. Die Zusammensetzung des verwendeten TAE-Puffers ist in Medium 2 enthalten. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden unter UV-Licht detektiert.

Medium 2: 50×TAE-Puffer

Substanz	Menge (ad 1L)
Tris	242 g
0,5 M EDTA (pH 8)	100 mL
Essigsäure (100%)	57,1 mL

2.2.3 Isolierung von *post mortem* Hirnmaterial aus adulten Mäusen

Das Hirngewebe wurde aus adulten männlichen Mäusen der LGS-KO-Linie (AlbCre⁺/Glu1^{fl/fl}) und den zugehörigen Kontrollen, die die Wildtyp (WT)-GS exprimieren (Glu1^{fl/fl}) mit einem mittleren Alter von 12 Wochen präpariert. Die Präparation der Tiere wurde mit Hilfe von Herrn Dr. Bidmon und Frau Eichhorst durchgeführt. Die Tiere wurden mit einer letalen Dosis Pentorbital sediert und mittels physiologischer Kochsalzlösung transkardial perfundiert. Am Ende der Perfusion wurde das Tier dekapitiert, die Haut am Schädel entfernt und die Schädeldecke aufgebrochen, sodass das Gehirn entnommen werden konnte. Eine Hälfte des Gehirns wurde für die Präparation des zerebralen Kortex, Hippocampus, Zerebellums, Thalamus und Striatums verwendet. Unmittelbar nach der Präparation wurden die Gewebeproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die andere Gehirnhälfte wurde in Zamboni-Fixativ inkubiert (4% (w/v) Paraformaldehyd und 15% (v/v) gesättigte Pikrin-Säure in 0,1 M PBS, pH 7,2) und in 25% Sucrose (v/v) in PBS kryokonserviert, bevor 50 µm dicke Kryoschnitte für Färbexperimente mit einem Kryotom angefertigt wurden.

Für die Proteomanalyse der verschiedenen Hirnregionen wurde Hirngewebe vom zerebralen Kortex, Zerebellum und Hippocampus für die weitere Analyse an das Biomedizinische Forschungszentrum, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf (BMFZ) übergeben.

Zur Herstellung von Proteinlysaten für weitere Analysen wurde das jeweilige Gewebe auf Eis aufgetaut und mit 300 µL Proteinlyse-Puffer versetzt. Die Zusammensetzung ist in Medium 3 enthalten.

Medium 3: Proteinlyse-Puffer

Substanz	Menge (ad 200 mL mit ddH ₂ O)	Endkonzentration
Tris	2 mL	20 mM
NaCl	5,6 mL	140 mM
NaF	0,084 g	0,42 g/L
Na-Pyrophosphat (10×H ₂ O)	0,880 g	4,4 g/L
EDTA	400 µL	2 mM
EGTA	400 µL	2 mM
Na-Vanadat (ortho-vanadat)	0,040 g	0,2 g/L
β-Glycerophosphat	0,880 g	4,4 g/L

Danach wurde das Gewebe mit einem Pistill homogenisiert. Das Gewebe wurde für etwa 10 s mit Ultraschall behandelt, um die Lipidmembran der Zellen aufzuschließen. Anschließend wurde das Gewebe für 10 min bei 20000 rcf und 4°C zentrifugiert. Sedimentierte Bestandteile wurden verworfen, der Überstand abgenommen, 1:10 mit Proteinlyse-Puffer verdünnt und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Von jedem Tier wurde nach der Gewebepräparation eine Probe der Schwanzspitze entnommen, daraus DNA isoliert und der Genotyp des Tieres überprüft.

2.2.4 Ammoniakmessung im Blut von Mäusen

Weiterhin wurden 20 µL Vollblut intrakardial entnommen und zur Bestimmung des Ammoniak-Gehalts unverzüglich mittig auf einen Messstreifen des Ammonia Test Kit II von Hitado pipettiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Teststreifen in das Ammoniakmessgerät „Ammonia Checker II“ eingeführt und die Messung gestartet.

2.2.5 Rattenmodel zur akuten Hyperammonämie

Effekte einer akuten Ammoniakbelastung wurden an 8 Wochen alten männlichen Wistar-Ratten (Durchschnittsgewicht: 276 ± 5 g, Janvier Labs) durch intraperitoneale Verabreichung von Ammoniumazetat (4,5 mmol/Kg Körpergewicht) untersucht [137]. Die Präparation der Tiere wurde von Herrn Dr. Bidmon durchgeführt. Den Kontroll-Tieren wurde das Solvenz (0,9%ige Kochsalzlösung) injiziert. 24 h nach der Injektion wurden die Tiere mit einer letalen Dosis Pentorbital anästhetisiert, transkardial mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert und der zerebrale Kortex aus dem Gehirn präpariert. Aus dem Gewebe wurden Proteinlysate durch Zugabe von Proteinlyse-Puffer und durch Homogenisierung mit einem Pistill hergestellt. Die Lysate wurden 10 s mit Ultraschall behandelt und anschließend für 10 min bei 20000 rcf und 4°C zentrifugiert, um Zell- und Geweberückstände zu entfernen. Der Überstand mit der löslichen Fraktion wurde für weitere Analysen verwendet.

2.2.6 Präparation, Kultivierung und experimentelle Behandlung von Astrozyten aus dem zerebralen Kortex von Ratten

In vorherigen Studien hat sich die Präparation und Isolation von primären Astrozyten aus neugeborenen Ratten als geeignetes Modell zur *in vitro* Untersuchung von Ammoniaktoxizität herausgestellt [85, 138].

Für die Herstellung von Astrozytenkulturen wurde Hirngewebe von 3-5 neugeborenen Ratten (P0-P3) verwendet. Zunächst wurden die Tiere dekapitiert und die Schädelhaut entfernt. Nachdem die Schädeldecke geöffnet war, wurde das Gehirn vorsichtig entnommen. Mit einem Skalpell wurde zwischen den beiden Gehirnhälften oberflächlich eingeschnitten und nachfolgend beide Hemisphären des zerebralen Kortex freigelegt und abgetrennt. Das Hirngewebe wurde unmittelbar in eiskaltes PBS gegeben, die Hirnhaut entfernt und anschließend mit Hilfe eines Skalpells zerkleinert.

Die Proben wurden in 500 μ L PBS aufgenommen und die Gewebesuspension mit DMEM (mit Penicillin/Streptomycin) auf 10 mL aufgefüllt. Mit Pasteurpipetten wurde das Gewebe durch mehrmaliges Pipettieren unter Vermeidung von Luftblasenbildung mechanisch weiter zerkleinert, bis die Suspension homogen war. Diese wurde durch ein 40 μ m Zellsieb gegeben, um größere Zellklumpen zu entfernen und anschließend bei 400 \times g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 15 mL DMEM (mit Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und anschließend in T75-Flaschen ausgesät. Die so hergestellte Hirnzellkultur wurde für 2 Wochen in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, bis sie konfluent gewachsen waren. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 900 rpm und 37°C geschüttelt, um verbliebene Mikroglia aus der Kultur zu entfernen. Am nächsten Tag wurden die verbliebenen Zellen mit DMEM ohne FCS gewaschen und 5 mL Trypsin (0,05%) zugegeben, für 5 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und danach durch Klopfen mechanisch abgelöst („Splitten“). Auf die 5 mL Trypsin-haltige Zellsuspension wurden 25 mL DMEM (1000mg/l D-Glucose mit GlutaMAX™) mit 10% FBS gegeben und davon wurde jeweils 10 mL auf eine neue T75-Flasche gegeben. Es folgte eine 2-wöchige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Das Medium wurde alle 2-3 Tage ausgetauscht. Die konfluent gewachsenen Astrozyten wurden daraufhin erneut im Verhältnis 1:3 auf 100 mm Schalen gesplittet und für weitere 2 Wochen in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert, bevor sie experimentell behandelt wurden.

Vor Beginn des Experiments wurden die Zellen dreimal mit DMEM ohne FBS gewaschen und für weitere 30 min in FBS-freiem DMEM inkubiert. Die Zellen blieben entweder unbehandelt (Kontrollen) oder wurden mit den jeweils angegebenen Substanzen für 30 min vorinkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen entweder nicht weiter behandelt (Kontrollen) oder es wurde NH_4Cl in der angegebenen Konzentration in das Kulturmedium gegeben und die Zellen für den angegebenen Zeitraum weiterkultiviert.

2.2.7 Knockdown von TROVE2 mittels *small-interfering* RNA

Für die Transfektion der Zellen mit siRNA (*small interfering* RNA) wurde zunächst das Wachstumsmedium entfernt und durch DMEM ohne FBS ersetzt. Als Kontrolle wurde AllStars-siRNA (Negativkontrolle) verwendet. Die TROVE2- und ASCT2-siRNA wurde mit DMEM ohne FBS angesetzt (20 mmol/L) und für 30 s vorsichtig invertiert. HiPerfect wurde mit Hungermedium in einem Verhältnis von 1:3,2 gemischt und mit einem Vortexer dreimal aufeinanderfolgend für jeweils 10 s gemischt. Beide Lösungen wurden zusammengegeben und das Reaktionsgefäß vorsichtig dreimal invertiert und für 10 min bei RT ohne Schütteln inkubiert, damit sich die siRNA an möglichst vielen freien Stellen an der Außenseite der Mizellen aufgrund der entgegengesetzten Ladungen binden kann. Danach wurde das Gemisch tropfenweise auf die Zellen pipettiert und 24 h inkubiert (37°C, 5% CO_2), damit die beladenen Mizellen in die Zellen integriert werden. Anschließend wurde das Transfektionsmedium zweimal mit DMEM ohne FBS gewaschen und im Anschluss der Versuch gestartet.

2.2.8 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Für die Quantifizierung von mRNA-Spiegeln wurde zunächst Gesamt-RNA aus den Proben isoliert und anschließend durch eine reverse Transkription in doppelsträngige cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben und dann mittels quantitativer PCR (qPCR) analysiert.

RNA wurde aus Gewebe oder kultivierten Rattenastrozyten mit den RNeasy Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Für den Aufschluss wurde Lyse-Puffer („RLT“) mit Mercaptoethanol (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) versetzt, um das Gewebe und die Membranen der Zellen und Zellkerne aufzubrechen und endogene RNasen zu inaktivieren. Das Lysat wurde nachfolgend auf eine „Shredder Säule“ (Qia-Shredder) gegeben und entsprechend den Herstellerangaben

zentrifugiert. Anschließend wurde die Probe im Verhältnis 1:1 mit 70% Ethanol gemischt, um die RNA zu präzipitieren. Für die weitere Aufreinigung der präzipitierten RNA wurden die Proben nachfolgend auf die „Spin Säulen“ des Herstellers gegeben und zentrifugiert. Dabei haftet die RNA an der Filtermembran. Durch Waschpuffer wurden in der Säule verbliebene Zellrückstände entfernt. Anschließend wurde die Säule mit dem RPE-Puffer gewaschen, um verbliebene Salze zu entfernen und die RNA mit RNase freiem Wasser eluiert. Die Reinheit und Konzentration der isolierten RNA wurde mittels NanoDrop1000 bestimmt. Die Qualität der RNA kann anhand der Adsorptionskurve beurteilt werden. Eine optimale Reinheit entspricht einem Adsorptionsquotienten bei $\lambda=260 \text{ nm} / 280 \text{ nm}$ von 1,8-2,0. Mithilfe der Konzentrationsbestimmung wurde die einzusetzende Menge der Probe für die cDNA-Synthese berechnet.

Die Einzelstrang cDNA-Synthese erfolgte durch Einsatz des Biozym cDNA-Synthese Kit unter Verwendung von 1 μg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 μL pro Ansatz. Der eingesetzte RNase-Inhibitor fungiert als nicht-kompetitiver RNase-Inhibitor. Die Zusammensetzung des cDNA-Synthese Ansatzes ist in Medium 4 enthalten.

Medium 4: cDNA-Synthese Ansatz

Substanz	Menge	Finale Konzentration
dNTP-Mix (je 10 mM)	2 μL	1 mM (je dNTP)
RNase-Inhibitor (40 U/ μL)	0,5 μL	1 U/ μL
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ (10 μM)	0,5 μL	0,25 μM
5 \times cDNA Synthese Puffer	4 μL	1 \times
RNA (isoliert)	0,1-1 μg (optimal 1 μg)	
Reverse Transkriptase	1 μL	10 U/ μL
RNase freies Wasser	variabel	
Endvolumen	20 μL	

Die Synthese erfolgte in einem Thermoblock bei 55°C für 30 min. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Enzyme bei 99°C (5 min) inaktiviert wurden.

2.2.9 Quantitative PCR (qPCR)

Die synthetisierte Doppelstrang-DNA wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green markiert und auf dem Prinzip der quantitativen Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR) amplifiziert. SYBR[®] Green bindet bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge $\lambda=494$ nm an doppelsträngige DNA und emittiert bei einer Wellenlänge von $\lambda=521$ nm. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt nach jedem Amplifikationszyklus der PCR. Der Anstieg der Fluoreszenz ist hierbei proportional zur Menge der gebildeten Amplifikate [139]. Die Quantifizierung erfolgt in der exponentiellen Phase, da hier die Menge der gebildeten PCR-Produkte pro durchlaufenden Zyklus verdoppelt wird. Der verwendete *threshold* wird automatisch vom ViiA7 qPCR Cycler bestimmt [140]. Das entsprechende Pipettierschema für den qPCR-Ansatz ist in Medium 5 enthalten.

Medium 5: qPCR-Ansatz. For: forward, rev: reverse.

Substanz	Menge
Primer for (100 pmol/ μ L)	1,0 μ L
Primer rev (100 pmol/ μ L)	1,0 μ L
RNase freies Wasser	9,3 μ L
Template cDNA (10 ng)	1,2 μ L
2 \times SYBR [®] Green PCR Master Mix	12,5 μ L

Aus diesem Ansatz wurden zweimal 25 μ L für die Doppelbestimmung in eine 96-Well Platte pipettiert und mit dem ViiA7 qPCR Cycler analysiert. Der Ablauf des qPCR-Programms ist in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Ablauf der qPCR zur Bestimmung von Genexpressionen.

qPCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	50°C	2 min	40
Denaturierung	95°C	10 min	
Hybridisierung	95°C	15 s	
Elongation	60°C	1 min	

Jede Probe und jedes Gen wurden im Duplikat gemessen und ein Mittelwert aus den Einzelwerten gebildet. Der Mittelwert der Zyklusanzahl der Ziel-mRNA-Amplifikation

(ΔC_T -Wert Zielgen) wurde von dem Mittelwert der Zyklusanzahl des Haushaltsgens abgezogen (ΔC_T -Wert Haushaltsgen) und die Zweierpotenz gebildet ($2^{-\text{Differenz } \Delta C_T}$). Dieser Wert zeigt den Expressionsunterschied des Zielgens an. SDHA wurde als Haushaltsgen in Mausgewebeproben und HPRT1 in Rattengewebeproben verwendet. SDHA wurde als Haushaltsgen für Mausproben auf Grundlage einer vorherigen Studie ausgewählt [131]. Durch Verwendung von NormFinder und BestKeeper wurde HPRT1 als stabilstes exprimiertes Gen in verschiedenen Rattengeweben identifiziert [141]. Genexpressionsänderungen nach experimenteller Behandlung wurden relativ zur entsprechenden Kontrolle angegeben. Alle PCR-Primer Sequenzen der verwendeten Primer für qPCR sind in Tabelle 5 enthalten. Neu generierte Primer wurden zunächst probeweise in einer qPCR eingesetzt und nach Auftrennung des PCR-Produkts in einem Agarosegel mittels Gel Purification Kit von QIAGEN aufgereinigt. Anschließend wurde die Probe durch das BMFZ sequenziert und mit der Sequenzdatenbank von NCBI abgeglichen, um die Spezifität der Primer zu überprüfen.

Um ausschließen zu können, dass Artefakte wie zum Beispiel Primer-Dimere bei der PCR gebildet wurden, wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse von dem ViiA7 qPCR Cycler durchgeführt. Hierbei wird die doppelsträngige DNA durch langsames Erhitzen zum „Schmelzen“ gebracht und denaturiert. Die Fluoreszenzsignale werden kontinuierlich gemessen. Die Schmelztemperatur ist spezifisch für die Amplifikate. Durch das Aufbrechen des Doppelstrangs löst sich der fluoreszierende Farbstoff SYBR[®] Green was einen Abfall des Fluoreszenzintensität zur Folge hat. Bei einer erfolgreichen Amplifikation eines PCR-Produktes zeigt der Schmelzkurvenverlauf einen einzigen Peak auf.

2.2.10 Western Blot-Analyse

Zum qualitativen und quantitativen Nachweis von Proteinen in den kultivierten Rattenastrozyten wurden die behandelten Zellen auf Eis mit kaltem PBS (w/o) gewaschen. Nach Zugabe von 200 μL Proteinlyse-Puffer (Medium 3) wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und anschließend 10 s mit Ultraschall behandelt, um die Lipidmembran aufzubrechen. Die Suspension wurde bei 20000 rcf für 10 min und bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration im Überstand mittels Bradford-Methode spektrometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=595$ nm mit einem UV-VIS-Spektrometer gemessen [142]. Jede Probe wurde dreifach gemessen und die Extinktionswerte gemittelt. Die Messung erfolgte in einer Einwegküvette mit dem

Mischungsverhältnis 1:200 (Proteinprobe/Bradford-Reagenz). Nach der Bestimmung der Konzentrationen wurden für die Western Blot-Analyse pro Probe 80 µg Protein eingesetzt.

Die jeweilige Proteinprobe wurde mit 20 µL Auftrag-Puffer versetzt und für 3 min bei 95°C denaturiert. Pro Lane wurden 80 µg Protein eingesetzt. Die Zusammensetzung des Auftrag-Puffers ist in Medium 6 enthalten.

Medium 6: Auftrag-Puffer (2×SDS-Puffer/1M DTT)

Substanz	Menge
SDS (10%)	18 mL
ddH ₂ O (destilliertes Wasser)	4,5 mL
1 M Tris (pH 6,8)	4,5 mL
Glycerol	9 mL
Bromphenolblau (1%)	6 mL
Verdünnung	800 µL + 200 µL 1M DTT

Für die Western Blot-Analyse von Zellkulturüberständen wurden 2 mL Medium am Ende der Experimente abgenommen. Die Überstände wurden 4,5 h bei 30°C in einem Vakuumkonzentrator auf ein Volumen von etwa 500 µL eingengt. 80 µL Probe wurden mit 20 µL Auftragspuffer versetzt und anschließend in SDS-PAA-Gelen (SDS-Polyacrylamid) aufgetrennt.

Als Molekulargewichtsmarker wurde der Precision Plus Protein Standard von BioRad verwendet. Zur Auftrennung wurden in Abhängigkeit der Molekulargewichtsgröße der nachzuweisenden Proteine SDS-PAA Gele mit den Konzentrationen 10% (TROVE2, CARM1, ASCT2) und 12% (LCN2) angesetzt. Die Zusammensetzungen der jeweiligen Trenn- und Sammelgele sind in Medium 7 enthalten.

Medium 7: Polyacrylamid-Gele 10%, 12% und Sammelgel

Substanz	10% SDS-PAA	12% SDS-PAA	Sammelgel
H ₂ O	1,9 mL	1,6 mL	0,66 mL
30% Acrylamid Mix	1,7 mL	3,2 mL	0,17 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3 mL	1,3 mL	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	-	0,13 mL
10% SDS	0,05 mL	0,05 mL	0,01 mL

10% APS	0,05 mL	0,05 mL	0,001 mL
TEMED	0,002 mL	0,002 mL	0,001 mL

Die Proben liefen in das Sammelgel bei einem angelegten Strom von 80 Volt ein und wurden nachfolgend bei 120 Volt im Trenngel aufgetrennt. Je kleiner die Proteine (kDa-Größe), desto schneller migrieren sie durch das Gel. Die Zusammensetzung des verwendeten Elektrophoresepuffers ist in Medium 8 gezeigt. Dieser bewirkt, dass die Gele nicht austrocknen und der angelegte Strom durch das Gel fließen kann.

Medium 8: Elektrophoresepuffer

Substanz	Menge (ad 5 L)
SDS	25 g
Tris	75,5 g
Glycin	470 g

Die in dem Gel enthaltenen Proteine wurden in einem „Semidry“-Blot-Aufbau unter Anlegen einer Spannung auf eine Nitrozellulose-Membran für 1,5 h übertragen. Die im Gel enthaltenen positiv-geladenen Proteine wandern in Richtung der Membran, da an der darunter befindlichen Blotting-Kammer eine negative Spannung angelegt ist. Die angelegte Spannung ergibt sich aus der folgenden Formel 1.

Formel 1:

$$mA = \text{Länge Membran (cm)} \times \text{Breite Membran (cm)} \times 0,8$$

Die Zusammensetzungen der verwendeten Transfer- und Waschpuffer sind in Medium 9-11 enthalten.

Medium 9: 10×Transferpuffer

Substanz	Menge (ad 5 L)
SDS	15 g
Tris	290 g
Glycin	145 g

Medium 10: 10×TBS

Substanz	Menge (ad 5 L, pH 7,6)
Tris	120 g
NaCl	435 g

Medium 11: TBS-T

Substanz	Menge (ad 5 L, pH 7,6)
10× TBS	120 g
ddH ₂ O	435 g
Tween-20	10 mL

Im Anschluss wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Lösung angefärbt, um die gleichmäßige Übertragung der Proteine aus dem Gel und die Probenbeladung zu überprüfen. Die Membran wurde für 1 h bei RT mit Blocklösung (5% BSA in TBS-T; *tris buffered saline-tween 20*) inkubiert, um proteinfreie Stellen auf der Membran abzusättigen und eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Die Primärantikörper wurden über Nacht bei 4°C inkubiert (TROVE2 1:10000 CARM1 1:1000, LCN2 1:1000 ASCT2 1:1000 in TBS-T + 5% BSA). Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T am folgenden Tag wurden die Membranen mit *horseradish-peroxidase* (HRPOD)-gekoppelten gegen *rabbit*- oder *mouse*-IgG gerichtete Sekundärantikörper (1:10000 in TBS-T + 5% BSA) bei RT für 1 h inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit TBS-T entfernt. Durch die Aktivität der HRPOD entsteht Chemilumineszenz im sichtbaren Wellenlängenbereich. Diese wurde mittels dem ChemiDoc MP BioRad Detektionsgerät detektiert und mit der Image Lab Software ausgewertet.

Für die Überprüfung der Beladung wurden die Membranen nachfolgend für 1 h bei RT mit einer Lösung inkubiert, in der Antikörper gegen GAPDH gelöst waren (1:10000 in TBS-T + 5% BSA). Die Proteinspiegel wurden jeweils mittels Image Lab Software densitometriert und die *raw digital signal intensities* für die Quantifizierung verwendet. Die Expressionsspiegel der Zielproteine wurden zur entsprechenden GAPDH Intensität normalisiert und in Relation zur entsprechenden Kontrolle angegeben.

2.2.11 Immunfluoreszenzanalysen

Die Immunfluoreszenzanalyse beruht auf dem Prinzip der Proteinmarkierung durch primäre Antikörper, die spezifisch an das Zielprotein binden. Ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper, an dem ein Fluorochrom gekoppelt ist, kann durch Licht einer spezifischen Wellenlänge angeregt werden. Die im Fluorochrom angeregten Elektronen emittieren Photonen mit einer geringeren Energie, die detektiert werden kann. Eine Übersicht der Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome ist in Tabelle 8 enthalten.

Tabelle 8: Anregungs- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome.

Fluorochrom	Anregungsmaximum	Emissionsmaximum
ALEXA Fluor 488	493 nm	519 nm
ALEXA Fluor 647	651 nm	667 nm
Cy3	550 nm	570 nm
FITC	492 nm	520 nm
Hoechst34580	371 nm	440 nm

Immunfluoreszenzanalysen an Astrozyten

Für Immunfluoreszenzanalysen an kultivierten Rattenastrozyten wurden Astrozyten, die auf einer 100 mm Schale kultiviert wurden, zweimal mit PBS (w/o) gewaschen und für 5 min mit 5 mL Trypsin im Inkubator inkubiert. Danach wurden 17 mL DMEM+10% FBS hinzugegeben und jeweils 1 mL von der erhaltenen Zellsuspension auf MatTex-Zellkulturschalen aus Glas (Ø 60 mm), Ibidi-Zellkulturschalen aus Glas/Plastik (Ø 35 mm) oder Deckgläsern ausgesät. Die Zellen wurden weiterkultiviert, bis eine Konfluenz von etwa 80-90% erreicht war, und im Anschluss die Experimente gestartet.

Am Ende des Experiments wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS (w/o) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol (-20°C) oder 4% Paraformaldehyd für 5 min bei RT fixiert und erneut zweimal mit kaltem PBS (w/o) gewaschen. Das Blockieren erfolgte mit 5% BSA und 0,1% Triton-X-100 (gelöst in PBS (w/o)) für 30 min bei RT. Die Primärantikörper wurden in PBS (w/o) mit 5% BSA angesetzt und jeweils für 2 h bei RT inkubiert (TROVE2 (1:1200), CARM1 (1:400), LCN2 (1:100), ASCT2 (1:100) und 8-OHG (1:250)). Anschließend wurden die Zellen dreimal

mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nachfolgend wurden die Zellen für 1 h bei RT mit Hoechst34580 (1:5000) und FITC- oder Cy3-konjugierten Sekundäntikörpern inkubiert, die gegen *mouse*- oder *rabbit*-IgG (1:200) gerichtet waren und die in PBS (w/o) mit 5% BSA gelöst wurden. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit PBS (w/o) überschichtet und mit dem Cell Observer.Z1 von ZEISS und Epifluoreszenzmikroskopie untersucht.

Die anti-8OH(d)G Immunreaktivität wurde ausgewertet, in dem die *raw fluorescence intensities* mittels Fiji Software gemessen und quantifiziert wurden [143]. Die Fluoreszenzintensitäten wurden auf die Anzahl der Zellkerne in dem jeweiligen Bild normalisiert. Die Fluoreszenzintensitäten in den AllStars siRNA-transfizierten Zellen wurden gleich 1 gesetzt und die bei den anderen Konditionen gemessenen Fluoreszenzintensitäten sind in Relation dazu angegeben. Für die Quantifizierung von pyknotischen Zellkernen, die kondensiertes Chromatin enthalten, wurden die Zellkerne mittels *Analyse Particles* Funktion der Fiji Software gezählt [143]. Die pyknotischen Zellkerne sind in Relation zu allen Zellkernen angegeben, die in dem analysierten Bild enthalten sind.

Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase-Aktivität mit C₁₂-FDG in Astrozyten

Seneszente Zellen zeigen eine erhöhte *senescence-associated β -galactosidase* (SA- β -Gal) Aktivität, die bei einem pH-Optimum von 6,0 detektiert werden kann. Für die Messung der SA- β -Gal-Aktivität wird dafür eine Alkalisierung von Lysosomen mit Bafilomycin A1 durchgeführt [144]. Als fluorogenes Substrat der SA- β -Gal wurde 5-Dodecanoylamino fluorescein di- β -D-Galactopyranosid (C₁₂-FDG) verwendet. Das angewendete Protokoll beruht auf der folgenden Quelle [144].

Zur lysosomalen Alkalisierung wurde das Medium abgesaugt und frisches DMEM ohne FBS mit 100 mM Bafilomycin A1 (gelöst in DMSO) hinzugegeben und die Zellen für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde C₁₂-FDG (gelöst in DMSO, Stockkonzentration 20 mM) 1:10 verdünnt in DMEM ohne FBS und davon wurden 33 μ L auf 2 mL DMEM auf Zellen gegeben und für weitere 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 10 min vor Ablauf der Inkubation wurde Hoechst34580 (1:5000) hinzugegeben, um die Zellkerne zu

färben. Die Zellen wurden dreimal mit PBS (w/o) gewaschen und direkt im Anschluss mit dem Observer.Z1 von ZEISS aufgenommen.

Die C₁₂-FDG-Fluoreszenz wurde ausgewertet, in dem die *raw fluorescence intensities* mittels Fiji Software gemessen und quantifiziert wurden [143]. Anschließend wurde die gemessene Fluoreszenz auf die Anzahl der Zellkerne normalisiert, die in dem analysierten Bild enthalten sind. Die Fluoreszenzintensitäten der Kontrolle wurden gleich 1 gesetzt und die Fluoreszenzintensitäten der behandelten Zellen in Relation dazu angegeben.

Fluoreszenzanalysen an Gehirnschnitten von Maus und Ratte

Die präparierten Hirnhemisphären von Mäusen und Ratten wurden mit einem Kryotom in horizontaler Schnittrichtung mit 50 µM Schichtdicke geschnitten und in PBS (w/o) aufgenommen. Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte fünfmal mit PBS (w) für 10 min gewaschen und anschließend in Blocklösung (PBS w/ + 10% BSA und 1% Saponin) für 1 h bei RT und unter langsamem Schütteln inkubiert. Die Schnitte wurden dann in PBS (w/ mit 2% BSA und 0,1% Saponin) für 48 h bei 4°C mit Antikörper gegen TROVE2 (1:1.200), CARM1 (1:400), LCN2 (1:100), ASCT2 (1:100) und/oder GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (1:400) inkubiert. Die Ko-Färbung mit GFAP diente zur Markierung von Astrozyten [145]. Anschließend wurden die Schnitte erneut fünfmal mit PBS w/ gewaschen und für weitere 24 h bei 4°C mit Hoechst34580 (1:5000) und FITC-, ALEXA Fluor 488- oder ALEXA Fluor 647-konjugierten Sekundärantikörpern, die gegen *mouse*- oder *rabbit*-IgG (1:200) gerichtet waren, inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte erneut fünfmal mit PBS (w) gewaschen, auf Objektträger aufgezogen und mit Fluoromount-G eingedeckelt und die Deckgläser mit Zaponlack fixiert.

2.2.12 Mikroskopie

Epifluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Cell ObserverZ.1 (ZEISS) durchgeführt. Die Bilder wurden mit einem LD LCI Plan-Apochromat 25×/0,8 Imm Korr DIC M27 Objektiv unter Verwendung von Wasser als Immersionsmittel und einer AxioCamMR3 aufgenommen. Die Bilder wurden mit der AxioVision Software akquiriert und prozessiert.

Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Die konfokale Laserscanning Mikroskopie wurde mittels LSM880 (ZEISS) durchgeführt. Zur Anregung der Fluorochrome wurden drei Laser mit den Wellenlängen 405, 488 und 543 nm verwendet. Die Bilder wurden mit einem Plan-Apochromat 40×/24° Objektiv aufgenommen und mit der ZEN2.0 Software prozessiert.

2.2.13 Massenspektrometrie (MS)

Die Mausgehirnproben aus den Regionen zerebraler Kortex, Hippocampus und Zerebellum (WT und LGS-KO, jeweils n=4) und in PBS (w/o) geerntete Rattenastrozyten (4 Gruppen, jeweils n=5) wurden zur Quantifizierung unterschiedlich abundanter Proteine in den untersuchten Proben massenspektrometrisch analysiert.

Die massenspektrometrische Proteomanalyse besteht aus verschiedenen Schritten. Zunächst werden die Proteine aus Gewebe oder Zellen isoliert und mittels „In-Gel“-Verdau für die Analyse vorbereitet. Da die massenspektrometrische Analyse aus ganzen Proteinen weniger sensitiv ist und sich die Gesamtmasse für die Identifizierung nicht eignet, werden die Proteine enzymatisch in Peptide gespalten. In einem weiteren Schritt werden die Peptide einzeln chromatografisch aufgetrennt, um dann mittels Elektrospray-Ionisationsquelle in kleinen hochgeladenen Tröpfchen vernebelt zu werden. Nach der Vernebelung werden mehrfach protonierte Peptide in das Massenspektrometer eingeleitet und dort weiter analysiert. Bei der Tandem-Massenspektrometrie werden zunächst Vorläuferionenspektren (MS1) aufgenommen. Anschließend werden einzelne Vorläuferionen isoliert, fragmentiert und Fragmentspektren (MS2 oder MS/MS) aufgenommen. Durch den computerbasierten Abgleich mit Informationen aus einer Proteinsequenz-Datenbank lassen sich anschließend Peptide und Proteine identifizieren. [146]

Die quantitative Analyse erfolgte durch LFQ (*label free quantification*) auf Ebene der Vorläuferionenintensitäten [147, 148]. Die Proteomanalysen wurden durch das BMFZ der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchgeführt.

Probenvorbereitung

Die Gewebeproben oder Zellen wurden durch Zugabe eines Lysispuffer aufgeschlossen, mit Ultraschall behandelt und abzentrifugiert. Dadurch wurden zelluläre Rückstände aus den

Proben entfernt. Im Überstand befanden sich die extrahierten Proteine. Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Pierce 660 nm Protein Assay bestimmt. Es wurden 5 µg Protein jeder Probe auf ein 4-12%iges Bis-Tris-PAA-Gel aufgetragen und mit einer Laufweite von etwa 5 mm für die „one-shot“ Analyse aufgetrennt. Zusätzlich wurden 2 µg Protein jeder Probe auf ein Gel aufgetragen und für über 1 h der Größe nach aufgetrennt. Die einzelnen Banden wurden anschließend per Silberfärbung eingefärbt. Anhand des entstandenen Bandenmusters kann beurteilt werden, ob die Proteine eventuell degradiert vorliegen und eine weitere Prozessierung der Proben dadurch nicht möglich ist.

Sind die Proteine nicht degradiert, so wurden die Protein-enthaltenen Gelstücke aus dem ersten Gel ausgeschnitten, gewaschen und weiter prozessiert durch Proteinreduktion mit 10 mM Dithiothreitol und Alkylierung mit 55 mM Iodacetamid. Weiterhin wurden die Proteine durch 0,1 µg Trypsin (in 100 mM Ammoniumhydrogencarbonat gelöst in Wasser) enzymatisch verdaut (16 h, 37°C). Die resultierenden Peptide wurden zweifach mit einer 1:1 (v/v) Mischung aus Acetonitril und 0,1% Trifluoressigsäure aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurden die Peptide getrocknet und in 0,1% Trifluoressigsäure resuspendiert.

Chromatografische Auftrennung

Die extrahierten Peptide wurden durch Flüssigchromatographie physikalisch aufgetrennt. Hierbei sind die Peptide in der mobilen Phase gelöst und wechselwirken je nach Beschaffenheit unterschiedlich stark mit der unpolaren stationären Phase. Je stärker die Wechselwirkung, desto länger verbleibt das Peptid in der Säule.

Für die „one-shot“ Analyse wurden 500 ng der extrahierten Peptide pro Lauf mit einem Ultimate 3000 RSLC (*Rapid Separation Liquid Chromatography*) System chromatographisch aufgetrennt. Zunächst wurden die Peptide durch eine *Trap*-Säule (3 µm C18-Säulenmaterial Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 75 µm Innendurchmesser, 2 cm Länge) für 10 min mit 0,1% Trifluoressigsäure als mobile Phase konzentriert. Weiterhin wurden die Peptide in einer analytischen Säule bei 60°C aufgetrennt (2 µm C18-Säulenmaterial Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 75 µm Innendurchmesser, 25 cm Länge) bei einem 2 h-Gradienten von 4 bis 40% Lösung B (Lösung A: 0,1% (v/v) Ameisensäure in Wasser, Lösung B: 0,1% (v/v) Ameisensäure, 84% (v/v) Acetonitril in Wasser) wird die Polarität der mobilen Phase über den genannten Zeitraum verändert.

Massenspektrometrische Analyse

Die Gewebeproben wurden mit einem Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer analysiert [147]. Vorläuferionenspektren wurden in der Orbitalfalle des Instruments aufgenommen und anschließend wurde eine datenabhängige Top-10 Methode angewendet. Bis zu 10 Vorläufer-Ionen wurden durch den eingebauten Quadrupol ausgewählt und durch kollisionsinduzierte Dissoziation mit höherer Energie fragmentiert. Die Fragmentspektren wurden in der Orbitalfalle aufgenommen. Für die Analyse der Rattenastrozyten wurde ein Fusion Lumos Hybrid Massenspektrometer mit aktiviertem erweitertem Peak-Erkennungsmodus verwendet. Im ersten Schritt wurden Vorläuferionenmassenspektren in der Orbitalfalle im Profilmodus aufgenommen (Auflösung 120.000, Massenbereich 200-2.000 m/z, maximale Füllzeit 60 ms, Zielwert für automatische Verstärkungsregelung 250.000). Im zweiten Schritt wurden für maximal 2 s Vorläuferionen (Ladungsstatus Plus 2- Plus 7, Minimalintensität 5.000) durch den Quadrupol innerhalb eines 1,6 m/z Isolationsfensters isoliert, durch kollisionsinduzierte Dissoziation fragmentiert und Fragmentspektren in der linearen Ionenfalle aufgenommen („*rapid*“ Scan Rate, maximale Füllzeit 50 ms, Zielwert für die automatische Verstärkungsregelung 10.000). Bereits fragmentierte Vorläuferionen wurden von der weiteren Isolation für die nächsten 60 s ausgeschlossen.

Computergestützte Massenspektrometrische Datenanalyse

Die Identifizierung und Quantifizierung der Peptide und Proteine basierend auf der markierungsfreien Quantifizierung von massenspektrometrischen Vorläuferionen-Intensitäten wurde mit der MaxQuant Software ausgeführt (MPI für Biochemie, Planegg, Deutschland) [149]. Die MaxQuant Version 1.6.2.10 wurde für die Analyse des zerebralen Kortex und der Zerebellum-Proben verwendet sowie die Versionen 1.6.3.4 für die Analyse der Hippocampus-Proben und 1.6.10.43 für die Analyse der Rattenastrozyten. Die Suchen wurden auf Basis von Sequenz-Datasets durchgeführt, die von der UniProtKB Proteom Sektion heruntergeladen wurden: *Mus musculus* UP000000589 (zerebraler Kortex und Zerebellum: 52548 Proteinsequenzen wurden am 18. Januar 2018 heruntergeladen; Hippocampus: 53451 Sequenzen am 10. August 2018 heruntergeladen) und *Rattus norvegicus* UP000002494 (Astrozyten: 29951 Proteinsequenzen am 26. März 2020 heruntergeladen). Die Carbaminomethylierung der Cysteine wurde als fixiert angenommen und die Methioninoxidierung und N-terminale Acetylierung der Proteine als variable Modifikationen.

Die markierungsfreie Quantifizierung LFQ- sowie die „*match between runs*“-Funktionen waren aktiviert. Die Proteine und Peptide wurden akzeptiert bei einer Falscherkennungsrate (FDR, *false discovery rate*) von 1%. Nur Proteine, die mit mindestens zwei verschiedenen Peptiden identifiziert wurden und mindestens drei (vier bei den Rattenastrozyten) valide quantitative Werte in mindestens einer Gruppe aufzeigten, wurden für weitere Berechnungen und Kalkulationen verwendet. Die massenspektrometrischen Proteomdaten wurden durch das ProteomeXchange Consortium via PRIDE unter PXD022312 öffentlich zugänglich gemacht [150].

2.2.14 Gene Ontology (GO)

Enriched gene ontology (GO) Zusammenhänge wurden innerhalb der differentiell exprimierten Proteine durch das Tool „*Gene Ontology enrichment analysis and visualization tool*“ (Gorilla) unter Verwendung der zwei Listen-Optionen (in ihrer Häufigkeit veränderte Proteine gegen alle erfassten Proteine) miteinander analysiert [151].

2.2.15 Microarray-Analyse in Maushirngeweben

Die Transkriptomanalysen im Mausgehirn wurden mittels Genexpressions-Microarrays durchgeführt. Für die Hybridisierung der Transkripte wird die labile RNA zunächst in die stabilere cDNA umgeschrieben. Die DNA-Moleküle werden enzymatisch durch Restriktions-Endonukleasen fragmentiert und die Fragmente an das Fluorophor gekoppelt (Streptavidin-phycoerythrin Konjugat). Die Fragmente binden auf dem Chip an immobilisierte, komplementäre Oligonukleotidproben. Die ungebundenen Fragmente werden durch Waschen entfernt. Durch Anregung der hybridisierten fluoreszenzmarkierten cDNA-Fragmente mit einer spezifischen Wellenlänge wird eine Fluoreszenz induziert, die detektiert werden kann. Im aufgenommenen Fluoreszenzemissionsmuster kann computerbasiert bestimmt werden, an welcher Lokalität und in welcher Intensität die Fluoreszenzsignale detektiert werden. Aus der Position der gebundenen Fluoreszenzsignale lässt sich die Identität des Transkripts bestimmen, da die Position der Oligonukleotidproben auf dem Array bekannt ist [152]. Die Intensität des Signals erlaubt Rückschlüsse auf die Menge der gebundenen cDNA-Moleküle und dadurch auf die Transkriptionslevel [152].

Die Microarray-Analyse wurde von der IMG Laboratories GmbH unter Nutzung des Affymetrix Clariom™ S Array in Kombination mit zufälligem Priming durchgeführt. Durch die Nutzung von zufälligen Primern werden alle RNAs für die cDNA-Synthese abgedeckt. RNA wurde aus dem zerebralen Kortex, Hippocampus und Zerebellum der Mausgehirnproben mit dem RNeasy Lipid Tissue Kit isoliert. Dabei wurde ein DNase-Verdau auf der Säule entsprechend den Herstellerangaben eingeschlossen. Die aufgereinigte RNA wurde mit dem NanoDrop ND-1000 quantifiziert und die RNA *integrity* der Proben wurde mit dem 2100 Bioanalyser verifiziert. Die RIN-Werte (*RNA integrity numbers*) der Proben von WT- und LGS-KO-Maus waren in den einzelnen Hirnregionen nicht signifikant unterschiedlich ($8,63 \pm 0,02$ vs. $8,60 \pm 0,04$ (zerebraler Kortex), $8,58 \pm 0,02$ vs. $9,08 \pm 0,23$ (Hippocampus) und $8,98 \pm 0,05$ vs. $8,78 \pm 0,08$ (Zerebellum)). Die für die Durchführung der Microarray-Analysen vom Hersteller vorgegebenen Anforderungen für Mindestmenge, Reinheit und RIN-Werte waren erfüllt. Affymetrix empfiehlt eine Mindestmenge an cDNA von $> 6 \mu\text{g}$ um den Hybridisierungsschritt optimal durchzuführen. Weiterhin sollte für die geforderte Reinheit der Quotient von A260/A280 bei $\geq 1,9$ liegen, um eine Abwesenheit von kontaminierenden Proteinen anzuzeigen und der A260/A230 sollte bei $\geq 2,0$ liegen, um andere organische Verunreinigungen auszuschließen. Die RIN-Werte liegen in einem Bereich von 1-10. Ein RIN-Wert von 10 zeigt eine exzellente RNA-Qualität an, wohingegen ein RIN-Wert von 1 eine massive Degradation anzeigt.

Jede Probe wurde auf einem separaten Affymetrix Clariom™ S Array hybridisiert. Die Arrays wurden nach einem *one-color* Hybridisierungsprotokoll hybridisiert und die Signale mit dem Affymetrix GeneChip® 3000 Scanner detektiert. Die erhaltenen Daten wurden nachfolgend mit der Affymetrix GeneChip® Command Console Scan Control Software v4.0.0.1567 prozessiert.

Die aus den Microarrays erhaltenen Daten wurden weiterhin von Frau Dr. Jutta Kollet (Miltenyi Biotec BV & Co. KG, Bergisch Gladbach, Deutschland) analysiert. Zunächst wurde die Homogenität der Intensitätsprofile der verschiedenen Arrays bestimmt, der Hintergrund angepasst und zwischen den Arrays normalisiert. Das Ausbleiben von technischen Artefakten wie Ausreißern und sogenannten *Batch*-Effekten wurde durch Untersuchung der Verteilung der Intensitäten aller Proben mittels Boxplot- und Pearson's Korrelationsanalysen evaluiert. Für die Normalisierung wurde der *Signal Space Transformation Robust Multi-Array algorithm* (SST-RMA) angewendet, um variierende globale Signalintensitäten des Microarray auf einen uniformen Level anzupassen, um die einzelnen Microarrays für die *downstream* Analyse

vergleichen zu können [153]. Normalisierte Intensitätswerte wurden \log_2 -transformiert und für weitere statistische Analysen verwendet. Um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, wurde ein zweiseitiger Studentischer T-Test mit gleichen Varianzen durchgeführt. Multiples Testen wurde mit der Benjamini und Hochberg-Methode kontrolliert [154]. Gene, die mindestens eine 1,3-fache Expressionsänderung und einem unangepassten p-Wert gleich oder kleiner 0,05 aufwiesen, wurden als differentiell exprimiert im Vergleich von WT- und LGS-KO-Maus angesehen. Zusätzlich wurden die Gene in allen Proben mit höheren Expressionen nach detektierbarer Expression gefiltert. Nur Gene, die eine Mindestintensität über 5% aller Intensitätswerte in mindestens zwei Proben der Gruppe mit höherer Expression überschritten, verblieb in der finalen Liste der signifikant veränderten Gene. Die Ergebnisse der Gen Array Analyse wurden bei dem öffentlichen genomischen Datenspeicher “*Gene Expression Omnibus*” (GEO, Zugangsnummer: GSE159625) von NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) hochgeladen.

Für eine funktionelle Gruppenanalyse wurde das gesamte Datenset einer „*Genset enrichment*“ Analyse unterzogen, unter Nutzung der CAMERA-Methode aus dem „*R package limma*“ [155]. Die CAMERA-Methode wurde auf die Ergebnisse eines linearen Regressionsmodells und moderater T-Statistik (Bayes fit) angewendet, um zu evaluieren, welchen Expressionstrend die Gene in dem getesteten Anreicherungs-Genset haben. Die C5 Gene Ontology (GO) Gensetkollektion der MSigDB (<http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb>) wurde für die Anreicherung von Genen getestet. Für diese Art der Analyse wurden die Transkript-Intensitäten auf ein Genlevel summiert, sofern mehrere Proben für ein Gen vorlagen, sodass in der Folge die hieraus gewonnenen Statistiken und *Fold changes* von den Ergebnissen aus der oben erwähnten differentiell exprimierten Genanalyse leicht abweichen. Mit der CAMERA-Methode wurden der p-Wert und eine *False discovery rate* (FDR) als Indikator für eine signifikante Anreicherung für die Gensets berechnet. Außerdem wurde dokumentiert, ob die Mehrzahl der Gene des jeweiligen Gensets zwischen den Vergleichsgruppen differentiell höher oder niedriger exprimiert ist.

2.2.16 Bioinformatische Auswertung von Microarray-Daten von humanen *post mortem* Hirnproben

In der vorliegenden Arbeit wurden Datensätze reanalysiert, die in früheren Genexpressionsanalysen gewonnen wurden [72, 80]. Die Genarray-Daten sind öffentlich zugänglich auf Servern des NCBI (Gene Expression Omnibus, Zugangsnummern GSE41919 und GSE57193) deponiert.

Die diesen Datensätzen zugrundeliegenden Untersuchungen wurden von Miltenyi Biotec BV & Co. KG (Bergisch Gladbach, Deutschland) mittels AgilentTM *whole human genome microarray* unter Verwendung von RNA aus humanen *post mortem* Hirngewebe durchgeführt und bioinformatisch ausgewertet

Das Alter der Kontrollpatienten und der Patienten mit Leberzirrhose mit und ohne HE war nicht signifikant unterschiedlich. Für weitere Patienteninformationen siehe [61]. Das Gehirngewebe stammte aus dem zerebralen Kortex (Kohorte 1/ Europäische Kohorte: Grenze parietaler und occipitaler Kortex; Kohorte 2/ Australische Kohorte: *Gyrus fusiformis*).

Das Hirngewebe wurde von dem Körper-Spende-Programm der Fakultät für Anatomie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf oder über das NSW BTRC (*Australian Brain Donor Program New-South Wales Brain Tissue Resource Centre*) der Universität von Sydney, Australien zur Verfügung gestellt. Die Spender oder deren Angehörige haben dem Körper-Spende-Programm der Fakultät für Anatomie der Universität Düsseldorf eine schriftliche Einwilligung erteilt, Gewebe für wissenschaftliche Untersuchungszwecke zu verwenden. Der Aufklärungs- und Einwilligungsprozess der Spender, deren Gehirngewebe vom NSW BTRC zur Verfügung gestellt wurde, ist in der nachfolgenden Quelle detailliert beschrieben [156].

2.2.17 Überprüfung der Vitalität von Astrozyten

Für die Überprüfung toxischer Wirkungen der experimentellen Behandlung auf Astrozyten wurde die Aktivität der Laktat-Dehydrogenase (LDH) im Zellkulturmedium gemessen. Durch den Zelltod und den damit einhergehenden Strukturverlust der Doppellipidmembran der Zellen wird die LDH ins Zellkulturmedium freigesetzt. Die Aktivität der LDH kann photometrisch bestimmt werden und eine erhöhte Aktivität deutet auf einen

erhöhten Zelluntergang hin. Diese Methode erlaubt jedoch nicht zu unterscheiden, ob die Zellen aufgrund einer Apoptose, Nekrose oder eines anderen Zelltods zugrunde gegangen sind.

Für den Assay wurden 500 μL Testlösung und 400 μL Probe gemischt und die Absorption bei 365 nm in einem Spektrometer (Ecom6122, Eppendorf) gemessen. Die LDH baut Pyruvat zu Laktat unter Verbrauch von $\text{NADH}+\text{H}^+$ ab. Dabei ist die Abnahme der NADH-Absorption ein Maß für die Aktivität der LDH. Jede Probe wurde 2 min gemessen und dadurch die zeitliche Kinetik der LDH-Aktivität bestimmt. Die Zusammensetzung der Testlösung ist in Medium 12 enthalten.

Medium 12: Testlösung für die LDH-Messung

Substanz	Menge
Pyruvat	5 mg
NADH	7,5 mg
TRA (Triethanolamin)-Puffer (100 mM, pH 7,6)	50 mL

2.2.18 Statistische Testung

Alle statistischen Tests wurden an Untersuchungsgruppen mit mindestens drei unabhängigen Messwerten durchgeführt. Die genaue Anzahl der in den Tests verwendeten Messwerten ist in der jeweiligen Bild- bzw. Tabellenunterschrift aufgeführt. Unabhängig bedeutet dabei, dass die Messwerte von Untersuchungen stammen, die an Astrozytenkulturen durchgeführt wurden, die aus unterschiedlichen Ratten präpariert wurden. Bei Experimenten, die an Leber- oder Hirngewebe durchgeführt wurden, stammte das Untersuchungsmaterial aus unterschiedlichen Mäusen bzw. Ratten. Jeder unabhängige Messwert ist in den Grafiken als einzelner Punkt dargestellt. Die Mittelwerte aller Messwerte sind wie in der jeweiligen Bildunterschrift aufgeführt entweder als arithmetisches oder geometrisches Mittel angegeben. Die in den Tabellen 9-13 angegebenen Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel \pm Standardfehler des Mittelwerts (*standard error of the mean*, SEM).

Die statistische Testung wurde wie in den zu den jeweiligen Abbildungen und Tabellen angegebenen Bildunterschriften beschrieben durchgeführt. Die Daten der jeweiligen Untersuchungsgruppen wurden auf Gaußsche Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft.

Zwei Untersuchungsgruppen wurden bei Normalverteilung der Messwerte mittels zweiseitigem Studentischen T-Test bzw. dem Welch-Test bei Vorliegen ungleicher Varianzen getestet. Dabei wurde berücksichtigt, ob die Messwerte der Gruppen gepaart oder ungepaart waren. Bei nicht normalverteilten Daten wurde eine statistische Analyse mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführt.

Wurden mehr als zwei Messwertgruppen statistisch miteinander verglichen, wurde unter Berücksichtigung, ob die Messwerte gepaart und normalverteilt waren und sich die Varianzen der Gruppen statistisch unterschieden, eine einfaktorielle Varianzanalyse (*One-way-analysis of variance*, *One-way-ANOVA*) mit Tukey's oder Dunnet's *post hoc*-Test, Friedmann-Test mit Greenhouse-Korrektur oder Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's *post hoc*-Test durchgeführt. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

Die Daten der Transkriptom- und Proteomanalysen wurden wie in den jeweiligen Bildunterschriften angegeben mittels Studentischem T-Test oder ANOVA ausgewertet. Zusätzlich wurden die p-Werte durch Einbeziehung der Falscherkennungsrate (*false discovery rate*, FDR) mit Hilfe der Benjamini-Hochberg Methode korrigiert [154]. Die Reanalyse der aus den Genarrays stammenden Daten humaner *post mortem* Hirnproben erfolgte durch Normalisierung der mRNA-Spiegel aller untersuchten Proben auf das geometrische Mittel der in der Kontrollgruppe gefundenen Werte. Als Signifikanzkriterien wurde hier eine Veränderung des Mittelwerts in der jeweiligen Untersuchungsgruppe von dem $\geq 1,5$ -fachen des Mittelwerts der Kontrollgruppe und ein p-Wert von $\leq 0,05$ festgelegt. Die statistische Testung erfolgte hierbei mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse mit multiplem Vergleich und Tukey's *post hoc*-Test oder dem Kruskal-Wallis-Test.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung des leberspezifischen Glutamin-Synthetase Knockouts und einer Hyperammonämie in LGS-KO-Mäusen

Der Knockout des Glutamin-Synthetase-Gens in AlbCre⁺/GluI^{fl/fl}-Mäusen wurde routinemäßig durch qPCR-Analysen in den in der Zucht befindlichen Tieren sowie nach Tötung der Tiere zum zweiten Mal überprüft. Die GS-Spiegel in den Lebern der GluI^{fl/fl}- (WT) und AlbCre⁺/GluI^{fl/fl}-(LGS-KO) Mäuse wurden durch Western Blot-Analysen überprüft. Wie in Abbildung 7 zu erkennen, wird die Glutamin-Synthetase in den Lebern der LGS-KO-Mäuse nicht exprimiert.

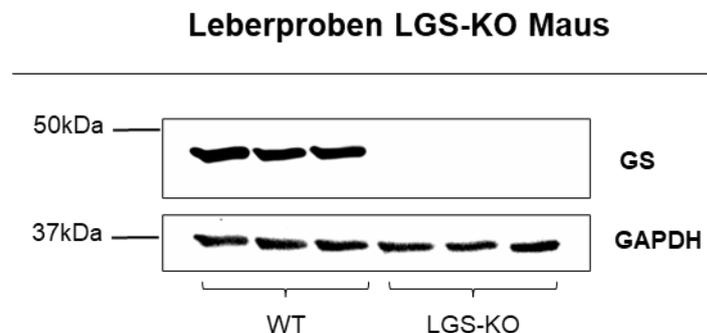


Abbildung 7: Western Blot-Analyse der Glutamin-Synthetase in Leberproteinproben von WT und LGS-KO-Mäusen. Die Leberproben aus den WT- und LGS-KO-Mäusen wurden, wie im Material und Methoden Kapitel beschrieben, gewonnen und für die Herstellung von Proteinlysaten für die Western Blot-Analyse verwendet (n=3 Mäuse). GAPDH wurde als Beladungskontrolle verwendet. Die Daten wurden publiziert in [157].

Die Ammoniakspiegel im peripheren Blut wurden mit dem Ammonia-Checker II gemessen. Im Vollblut der LGS-KO-Mäuse waren die Ammoniakspiegel gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht (LGS-KO: 140,2±39,4; WT: 72,0±20,6 µmol/L, n=6, p-Wert=0,03, statistisch ausgewertet mittels Studentischer T-Test und zweiseitiger Testung).

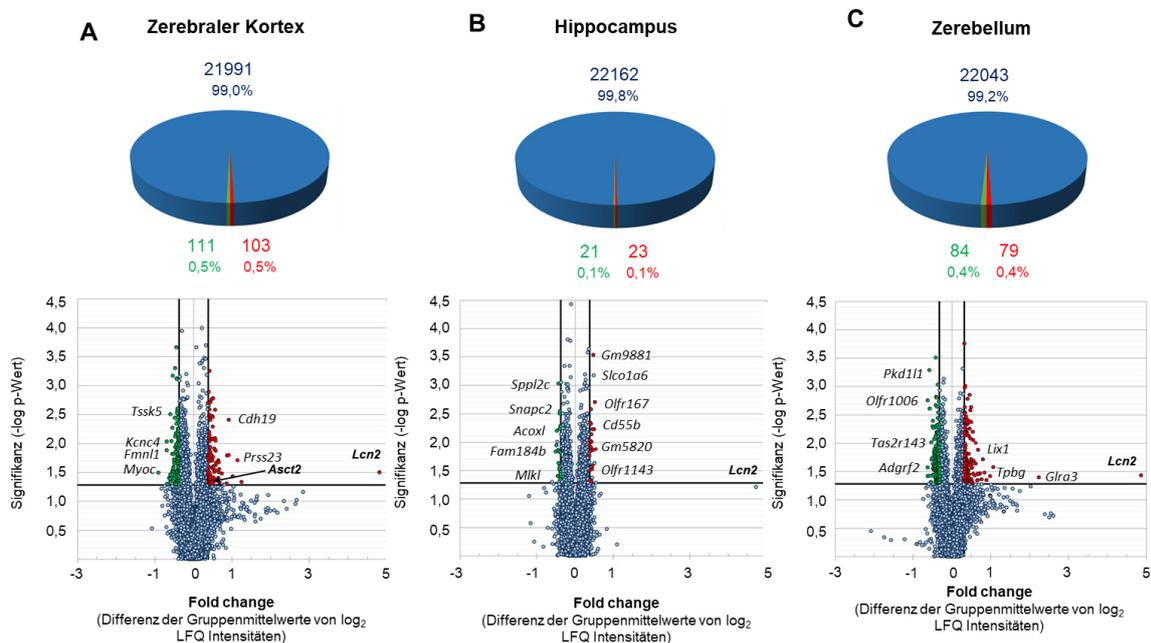
3.2 Identifikation von Änderungen im Transkriptom und Proteom von LGS-KO-Mäusen mittels Transkriptom- und Proteomanalyse

Für genomweite Analysen verändert-exprimierter Gene und Proteine im Gehirn der LGS-KO-Maus wurden Hirnproben aus den Regionen zerebraler Kortex, Hippocampus und Zerebellum entnommen und mit diesen Genarray- und Proteomanalysen durchgeführt. Die verstärkt, erniedrigt oder unverändert exprimierte Gene und Proteine in den unterschiedlichen Hirnregionen der LGS-KO-Mäuse sind nachfolgend grafisch in Kuchendiagrammen veranschaulicht (Abbildung 8). Weiterhin wurden die Daten der Transkriptom- und Proteomanalysen in Vulkanplots dargestellt (Abbildung 8). Diese erleichtern die Identifizierung von Genen und Proteinen, die zugleich einen hohen *Fold Change* aufweisen und statistisch signifikant verändert in den LGS-KO-Mäusen vorlagen. Signifikant erhöhte oder erniedrigte mRNA- oder Proteinspiegel sind rot bzw. grün dargestellt.

Zur Auswertung der Transkriptomanalyse wurden Einschlusskriterien einer mindestens 1,3-fachen Änderung der Expressionsspiegel und ein statistisches Signifikanzniveau von $p\text{-Wert} \leq 0,05$ gewählt. Unter diesen Bedingungen waren 214 Gene im zerebralen Kortex, 44 Gene im Hippocampus und 163 Gene im Zerebellum verändert exprimiert (Abbildung 8 A-C, Anhang Tab. 1). Die Anzahl der erhöht oder erniedrigt exprimierten Gene ist in den drei untersuchten Regionen ähnlich. Abgesehen von Lipocalin-2 (*Lcn2*), welches durchschnittlich 30-fach erhöht in allen untersuchten Hirnregionen war, sind die restlichen Genexpressionsänderungen deutlich geringer.

In den Proteomanalysen waren die Spiegel von 4, 36 und 15 Proteine in den Proteinproben aus dem zerebralen Kortex, Hippocampus und Zerebellum von LGS-KO-Mäusen signifikant gegenüber den WT Mäusen unterschiedlich (Abbildung 8 D-F, Anhang Tabelle 2). Hier wurden Einschlusskriterien eine mindestens 2-fache Expressionsänderung und ein $p\text{-Wert}$ von $\leq 0,05$ gesetzt. Gegenüber den WT-Kontrollen war *CARM1* am stärksten erniedrigt und *TROVE2* am stärksten erhöht im zerebralen Kortex der LGS-KO-Mäuse.

Transkriptomanalyse LGS-KO Maus



Proteomanalyse LGS-KO Maus

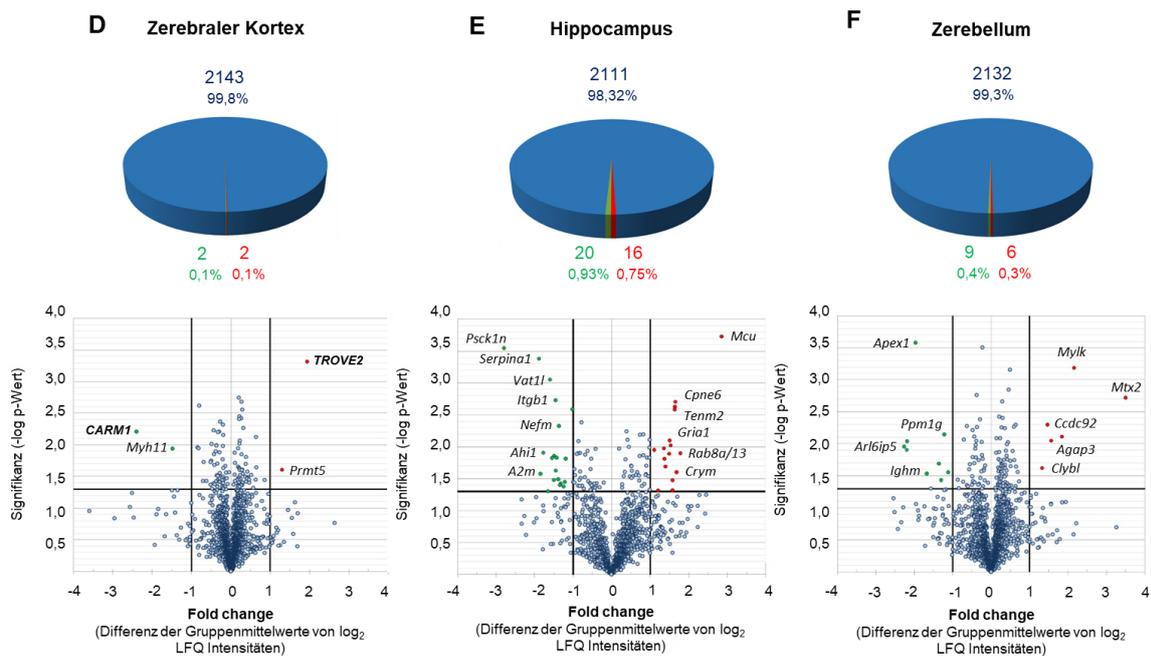


Abbildung 8: Transkriptom- und Proteomanalysen in unterschiedlichen Gehirnregionen von WT- und LGS-KO-Mäusen. mRNA oder Protein wurde aus dem zerebralen Kortex (A, D), Hippocampus (B, E) oder Zerebellum (C, F) aus WT oder LGS-KO-Mäusen isoliert. Die Genexpression- oder Proteinspiegel wurden durch Affymetrix Clariom™ S Array bzw. mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Expressionsspiegel von einzelnen Genen oder Proteinen in LGS-KO-Mäusen sind relativ zu den WT-Mäusen angegeben und in einem Kuchendiagramm (jeweils oben) zusammengefasst oder in einem Vulkanplot (jeweils unten) dargestellt, indem einzelne Gene (A-C) oder Proteine (D-F) durch Punkte repräsentiert werden. Gene oder Proteine mit geringeren oder höheren Expressionsspiegel in LGS-KO-Mäusen sind als grüne oder rote Punkte farblich dargestellt. Signifikanzniveau: $\geq 1,3$ -fache Veränderung (A-

C), ≥ 2 -fache Veränderung (D-F) und $p \leq 0,05$ ($n=4$; 2-seitiger Studentischer T-Test). Die Daten wurden publiziert in [157].

3.3 Bioinformatische Analyse verändert-exprimierter Gene im Gehirn von LGS-KO-Mäusen und Vergleich der Transkriptom- und Proteomanalysen

Um biologische Prozesse zu identifizieren, die in der LGS-KO-Maus verändert sind, wurde eine GSEA-Analyse (*CAMERA gene set enrichment analysis*) unter Verwendung der GO-Datenbank (*gene ontology*) durchgeführt (Abbildung 9, Anhang Tabelle 3, 4). Hieraus geht hervor, dass insbesondere Gene im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus verstärkt exprimiert waren, die funktionell dem „RNA Splicing“ und der „mRNA Prozessierung“ zugeordnet werden können (Abbildung 9 A, B).

Kein Gen oder Protein war in allen drei untersuchten Hirnregionen signifikant verändert und nur 1 (*Gkn3*) oder 3 Gene (*Lcn2*, *Twf1*, *Cadm1*) waren gleichsam im zerebralen Kortex und Hippocampus oder Zerebellum der LGS-KO-Maus verändert (Abbildung 10 A). Weiterhin gibt es keine Übereinstimmungen zwischen verändert exprimierten Genen und den jeweiligen korrespondierenden Proteinen in den untersuchten Regionen (Abbildung 10 B).

Aus der funktionellen Gruppierung differentiell-exprimierter Gene in den drei untersuchten Hirnregionen geht hervor, dass die detektierten Genexpressionsveränderungen im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus im Zusammenhang stehen mit biologischen Prozessen wie dem „Energiemetabolismus“, der „Signalweiterleitung“, der „Zellzyklusregulation“, dem „ER-Stress“ sowie der „RNA-Prozessierung“ (Abbildung 10 C). Genexpressionsveränderungen im Zerebellum stehen im Zusammenhang mit „Metabolismus“, „Signalweiterleitung“, „oxidativen Stress“ und „Eisenmetabolismus“ (Abbildung 10 C). Im Hippocampus konnten nur wenige biologische Prozesse identifiziert werden, deren Expressionsänderungen zugeordnet werden konnten, wie zum Beispiel die „Regulation des mitotischen Spindelapparats“ (Abbildung 10 C). Die Analysen zeigen weiterhin, dass die zerebralen Genexpressionsänderungen in der LGS-KO-Maus Hirnregionen-spezifisch auftreten.

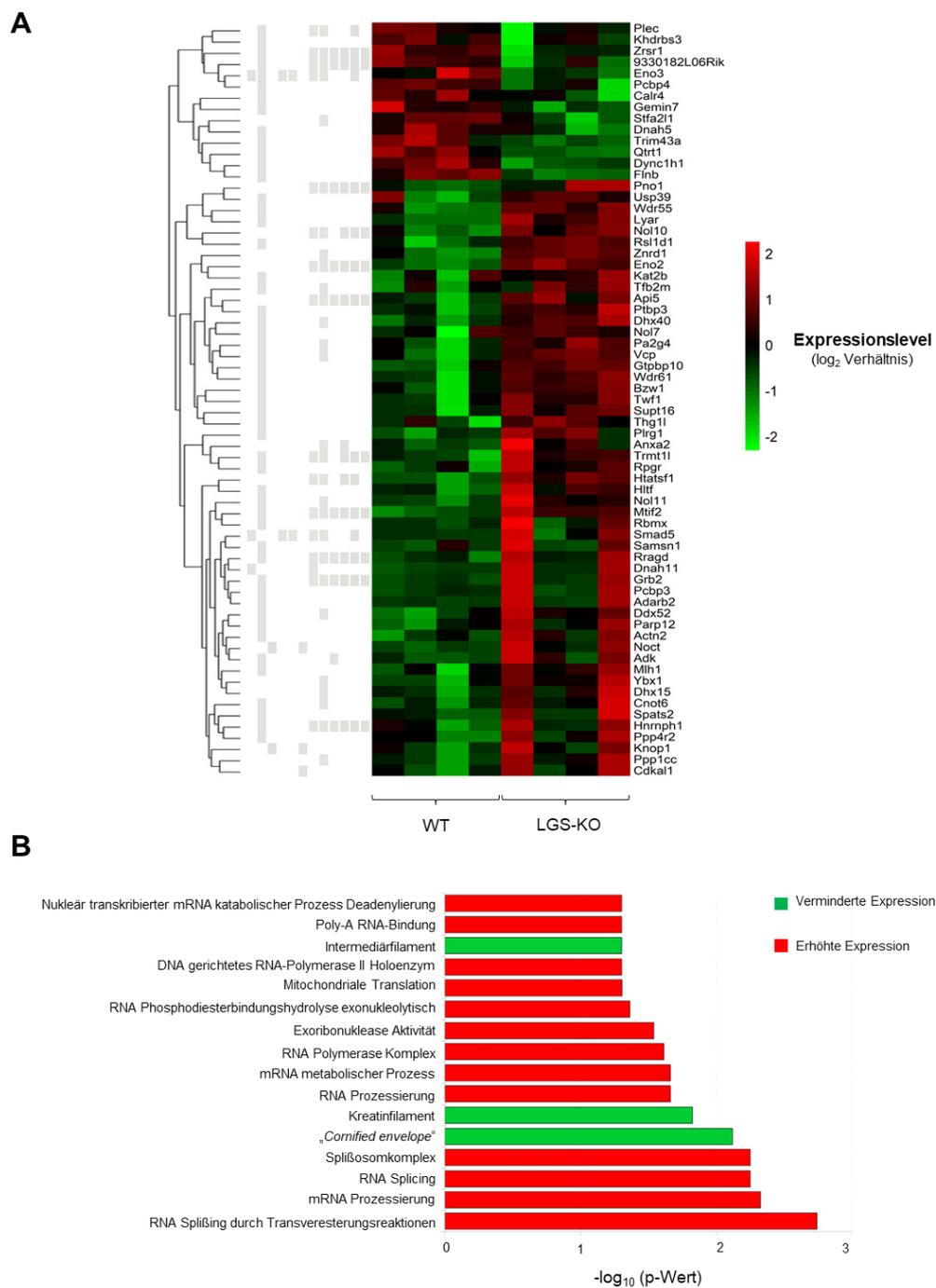
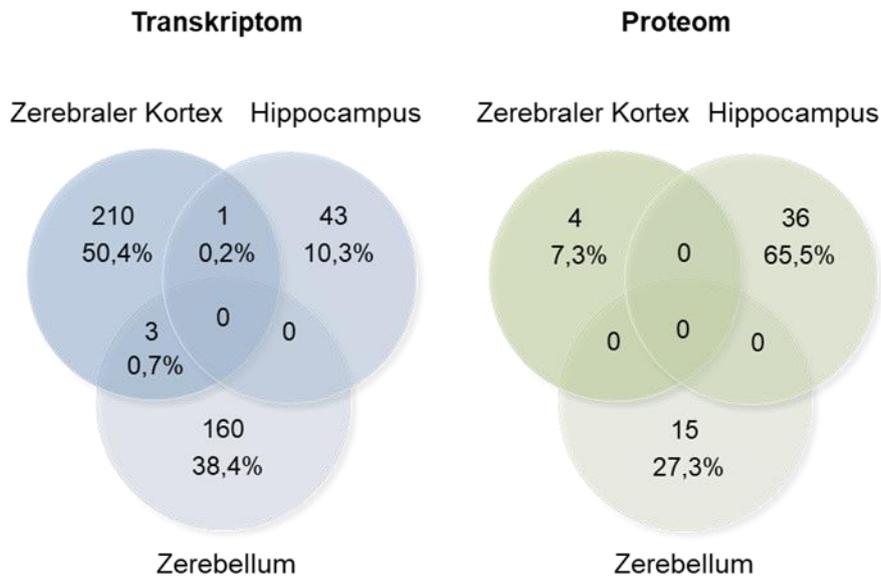
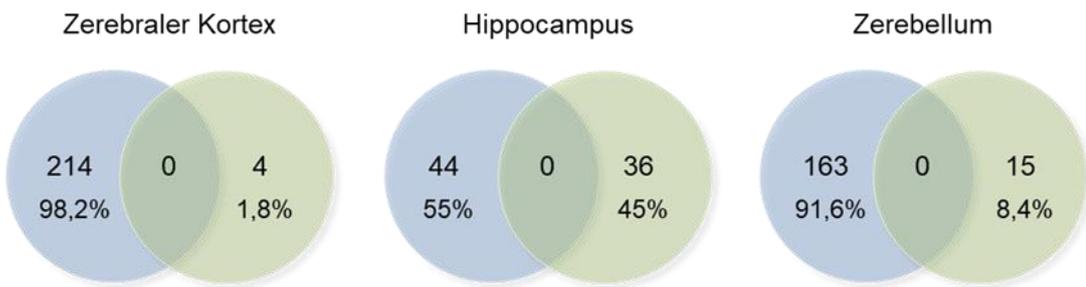


Abbildung 9: Funktionelle Gruppierung von differentiell-exprimierten Genen im zerebralen Kortex in LGS-KO-Mäusen (A) *Cluster Heatmap* von differentiell-exprimierten Genen und deren Bezug zu den häufigsten vorkommenden GO-Kategorien als *Cluster* dargestellt (T-Statistik, *Bayes Fit*; Anhang Tabelle 4) von WT- und LGS-KO-Mäusen (jeweils n=4). Eine rote oder grüne Farbe zeigt eine höhere bzw. niedrigere Expression des jeweiligen Gens in der entsprechenden Maushirnprobe in Bezug auf den Median aller Proben. (B) Am häufigsten vorkommende biologische Kategorien der C5 GO-Kollektion repräsentiert durch Genexpressionsveränderungen im zerebralen Kortex von LGS-KO-Mäusen verglichen mit WT-Mäusen. Grüne Balken repräsentieren eine verminderte Expression, rote Balken repräsentieren eine erhöhte Expression. Die Daten wurden publiziert in [157].

A



B



C

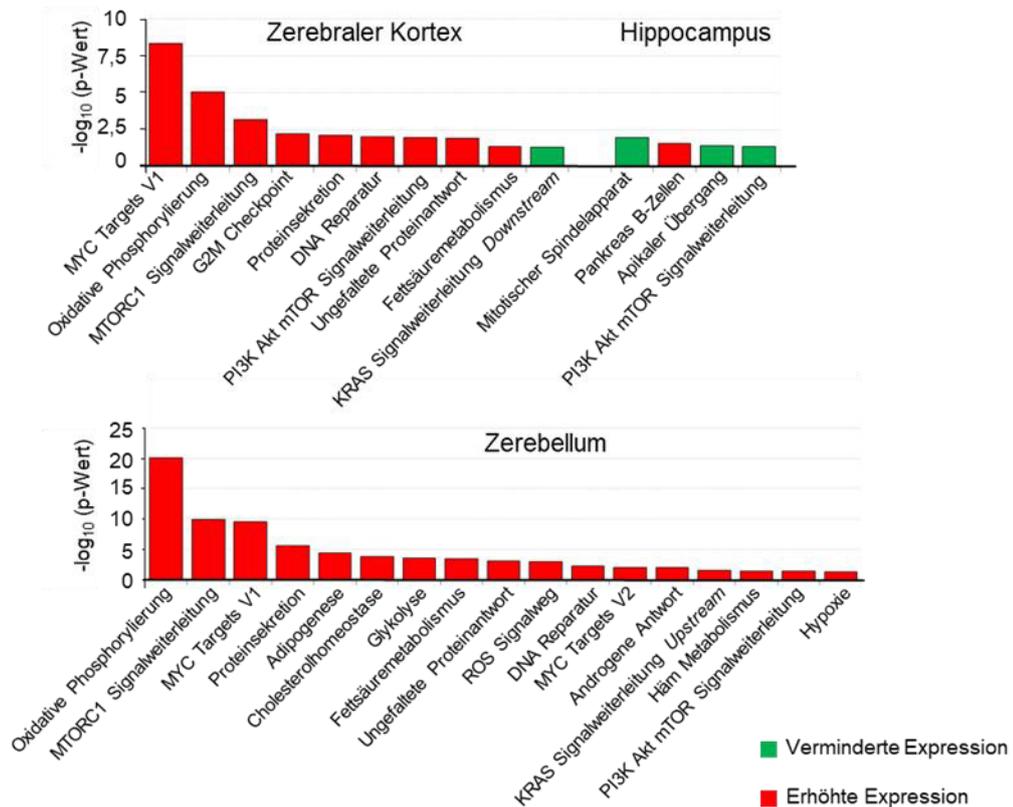


Abbildung 10: Hirnregionen- und RNA/ Protein-übergreifender Vergleich differentiell-exprimierter Gene und von Proteinen deren Spiegel in LGS-KO-Mäusen verändert ist. (A) Differentiell-exprimierte Gene (blau) und Proteine mit verändertem Spiegel (grün) im zerebralen Kortex, Hippocampus und Zerebellum von LGS-KO-Mäusen sind in Venn-Diagrammen dargestellt. Die Prozentangaben geben den relativen Anteil der differentiell exprimierten Gene und von Proteinen deren Spiegel in den LGS-KO-Mäusen verändert waren in Relation zu allen gemessenen Transkripten bzw. identifizierten Proteinen an. (B) Schnittmenge von Gen- und Proteinspezies, deren Expression bzw. Abundanz verändert gefunden wurde in Transkriptom- (blau) und Proteomanalysen (grün) im zerebralen Kortex, Hippocampus bzw. Zerebellum. (C) GSEA und funktionelle Gruppierung differentiell exprimierter Gene in den unterschiedlichen Hirnregionen (GO HALLMARK Genset). Grüne Balken repräsentieren eine verminderte Expression, rote Balken repräsentieren eine erhöhte Expression im Vergleich von LGS-KO- mit WT-Mäusen (n=4; 2-seitiger Studentischer T-Test). Die Daten wurden publiziert in [157].

3.4 Validierung in den Transkriptom- und Proteomanalysen verändert vorgefundener Protein- und mRNA-Spezies mittels Western Blot-Analyse und qPCR

Für weiterführende Untersuchungen wurden jeweils 2 in LGS-KO-Mäusen differentiell exprimierte Gene und 2 Proteine deren Spiegel unterschiedlich war, ausgewählt. Die Selektion erfolgte dabei aufgrund der Größe der relevanten Änderung und Annahme, dass diese potenziell relevant sein könnten für die zerebrale Ammoniaktoxizität. Die Funktionen des zerebralen Kortex sind besonders betroffen bei der HE und daher wurden die weiteren Analysen an diesem Hirngewebe vorgenommen.

Das Gen *Lcn2*, welches für den Eisenchelator Lipocalin-2 kodiert, weist die stärkste Genexpressionsveränderung in allen drei untersuchten Gehirnregionen auf (Abbildung 8 A-C). *Lcn2* war durchschnittlich 30-fach erhöht in allen untersuchten Hirnregionen der LGS-KO-Maus, wohingegen die restlichen Genexpressionsänderungen deutlich geringer verändert waren (Abbildung 8 A-C). Unter diesen Genen wurde der Alanin-Cystein-Serin-Transporter 2 (*ASCT2*) identifiziert, der im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus gegenüber den WT Mäusen 1,4-fach erhöht war (Abbildung 8 A). Weiterhin wurden aus der Proteomanalyse die Proteine *CARM1* und *TROVE2* für weitere Untersuchungen ausgewählt. Diese waren im zerebralen Kortex der LGS-KO-Mäuse gegenüber den WT Mäusen am stärksten erniedrigt bzw. erhöht (Abbildung 8 D).

Die *Asct2* mRNA im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus liegt im Genchip signifikant erhöht vor, wohingegen in der qPCR eine tendenzielle Erhöhung detektiert wurde (Abbildung 11 A, B). Das ASCT2 Protein wurde in der Proteomanalyse des zerebralen Kortex nicht gefunden. In der Western Blot-Analyse wurde hingegen eine signifikante Verminderung der ASCT2 Proteinspiegel detektiert (Abbildung 11 C, Abbildung 14).

Die Expression von *Lcn2* mRNA im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus liegt im Genchip signifikant erhöht vor und dies konnte in der qPCR bestätigt werden (Abbildung 11 A, B). Die Western Blot-Analyse zeigte, dass das LCN2 Protein im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus signifikant erhöht war (Abbildung 11 C, Abbildung 14). Das LCN2 Protein konnte in den Proteomanalysen nicht identifiziert werden.

Die *Carm1* mRNA-Spiegel im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus waren auf Basis der Genchip-Analyse unverändert (Abbildung 11 A). Dies wurde in der qPCR bestätigt (Abbildung 11 B). Dahingegen wurde eine signifikante Verminderung der CARM1 Proteinspiegel in der Proteomanalyse detektiert, die in der Western Blot-Analyse bestätigt wurde (Abbildung 11 C, Abbildung 14).

In der Genarray-Analyse war die Genexpression von *Trove2* nicht verändert (Abbildung 11 A), was durch die qPCR bestätigt wurde (Abbildung 11 B). Die Proteomanalyse zeigte, dass die Proteinspiegel von TROVE2 im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus gegenüber den WT Mäusen signifikant erhöht waren. Dieses Ergebnis wurde in der Western Blot-Analyse bestätigt (Abbildung 11 C, Abbildung 14).

Zerebraler Kortex Maus (WT/ LGS-KO)

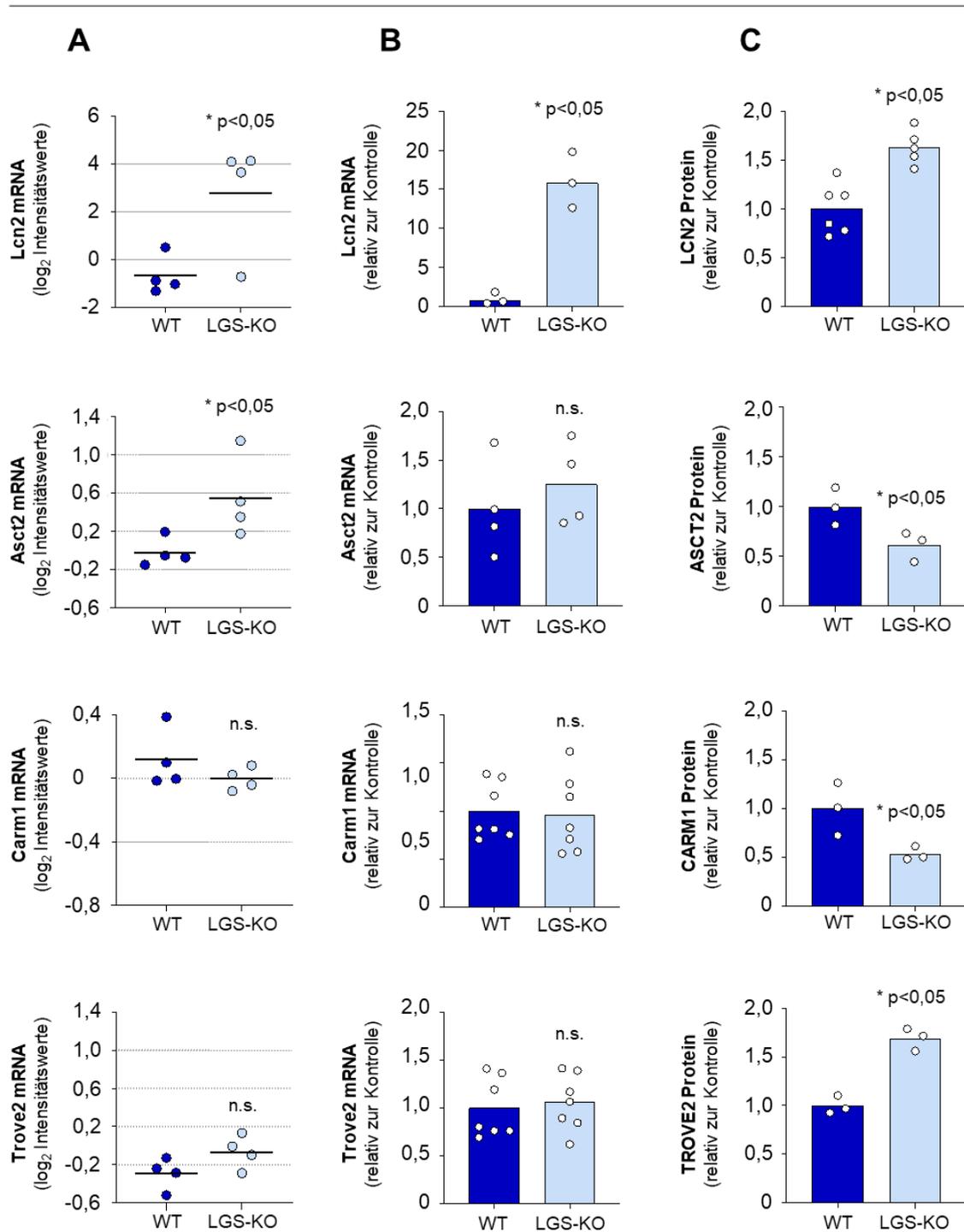


Abbildung 11: mRNA- und Proteinspiegel von Carm1, Trove2, Lcn2 und Asct2 im zerebralen Kortex von WT und LGS-KO-Mäusen. Die mRNA-Spiegel wurden mittels Genchip Array (A) und qPCR (B) gemessen. Die Proteinspiegel wurden mittels Western Blot-Analysen gemessen und durch densitometrische Analyse quantifiziert (C). Bei der qPCR wurden die mRNA-Spiegel der Zielgene auf die der Haushaltsgene normalisiert (B) und bei den Western Blot-Analysen wurden die Signalintensitäten der Zielproteine auf die der GAPDH normalisiert (C). Die Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und mRNA- und Proteinspiegel in den

LGS-KO-Mäusen wurden in Relation dazu angegeben. Die Mittelwerte werden als geometrisches Mittel (A) oder arithmetisches Mittel (B, C) angegeben. Für statistische Analysen wurde der 2-seitige Studentische T-Test durchgeführt. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich (n=3-7). WT: Glu1^{fl/fl} Mäuse LGS-KO: AlbCre⁺/Glu1^{fl/fl} Mäuse. Die Daten zu Lcn2, Carm1 und Trove2 wurden publiziert in [157].

Die Asct2 mRNA im Hippocampus der LGS-KO-Maus liegt im Genchip unverändert vor, wohingegen in der qPCR eine signifikante Erniedrigung gefunden wurde (Abbildung 12 A, B). Das ASCT2 Protein wurde in der Proteomanalyse des Hippocampus nicht identifiziert. Auch in der Western Blot-Analyse wurde auf Proteinebene kein Unterschied gefunden (Abbildung 12 C, Abbildung 14).

Die Genchip-Analysen zeigten, dass die Expression von Lcn2 mRNA im Hippocampus der LGS-KO-Maus tendenziell stärker exprimiert war (p=0,06), was in der qPCR nicht bestätigt wurde (Abbildung 12 A, B). In der Proteomanalyse des Hippocampus der LGS-KO-Maus wurde LCN2 nicht identifiziert und auch in der Western Blot-Analyse wurde kein Unterschied gefunden (Abbildung 12 C, Abbildung 14).

Die Genchip-Analysen zeigten, dass die Expression von Carm1 mRNA im Hippocampus der LGS-KO-Maus unverändert war (Abbildung 12 A). Dies wurde in der qPCR prinzipiell bestätigt, auch wenn hier eine leichte Tendenz zu einer Erniedrigung der Carm1 mRNA-Spiegel zu sehen ist (Abbildung 12 B). Die CARM1 Proteinspiegel sind nach den Daten der Proteomanalyse im Hippocampus nicht signifikant verändert, was in der Western Blot-Analyse bestätigt wurde (Abbildung 12 C, Abbildung 14).

Die Genexpression von Trove2 war entsprechend der Genchip-Analysen im Hippocampus der LGS-KO-Mäuse nicht verändert (Abbildung 12 A). Dies wurde in der qPCR prinzipiell bestätigt (Abbildung 12 B). Auch die TROVE2 Proteinspiegel wurden in der Proteomanalyse des Hippocampus unverändert gefunden, was durch die Western Blot-Analysen bestätigt wurde (Abbildung 12 C, Abbildung 14).

Hippocampus Maus (WT/ LGS-KO)

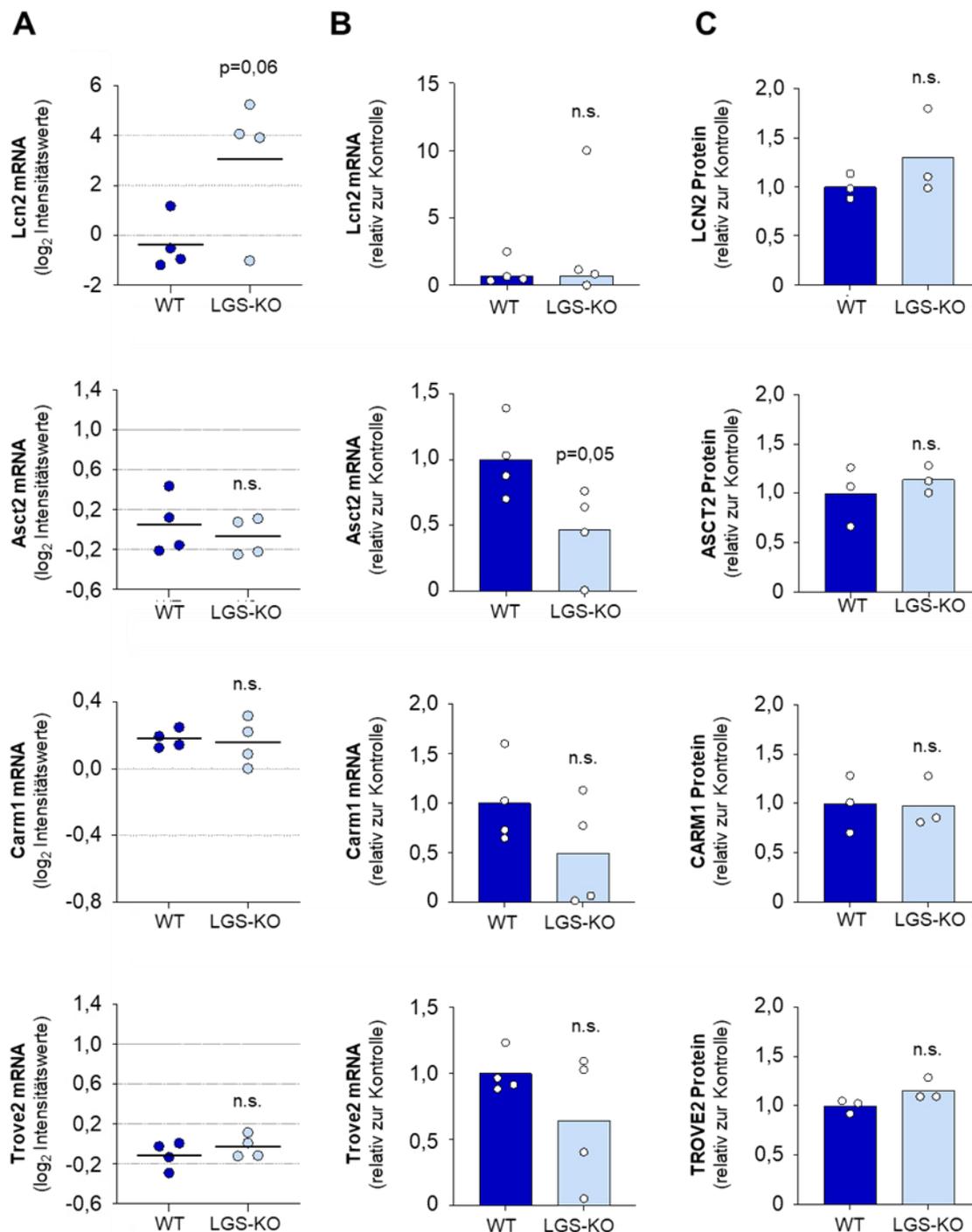


Abbildung 12: mRNA- und Proteinspiegel von Carm1, Trove2, Lcn2 und Asct2 im Hippocampus von WT- und LGS-KO-Mäusen. Die mRNA oder Proteinspiegel von WT- und LGS-KO-Mäusen wurden mittels Genchip-Array (A) und qPCR (B) und Proteinspiegel wurden mittels Western Blot- und densitometrischer Analyse gemessen (C). Bei der qPCR-Analyse wurden die Spiegel der Zielgene auf die des Haushaltsgens normalisiert (B). Die Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und mRNA- und Proteinspiegel in LGS-KO-Mäusen wurden relativ zu den WT-Kontrollen angegeben. Die statistischen Analysen wurden mit dem 2-seitigen Studentischen T-Test durchgeführt. *: statistisch signifikant verändert zur Kontrolle. n.s.: nicht

signifikant verändert zur Kontrolle (n=3-4). Mittelwerte werden angegeben als geometrisches Mittel (A) oder arithmetisches Mittel (B, C). WT: Glu1^{fl/fl} Mäuse; LGS-KO: Alb-Cre⁺/Glu1^{fl/fl} Mäuse. Die Daten zu Lcn2, Carm1 und Trove2 wurden publiziert in [157].

Die Asct2 mRNA im Zerebellum der LGS-KO-Maus liegt im Genchip unverändert vor, wohingegen in der qPCR eine tendenzielle Erniedrigung gefunden wurde (Abbildung 13 A, B). Das ASCT2 Protein wurde in der Proteomanalyse des Zerebellum nicht identifiziert, wohingegen durch die Western Blot-Analyse eine marginale Erhöhung gefunden wurde (Abbildung 13 C, Abbildung 14).

Die Genchip-Analysen zeigten, dass die Expression von Lcn2 mRNA im Zerebellum der LGS-KO-Maus signifikant erhöht exprimiert vorliegen, was in der qPCR nicht bestätigt wurde (Abbildung 13 A, B). In der Proteomanalyse des Zerebellum der LGS-KO-Maus wurde LCN2 nicht identifiziert und auch in der Western Blot-Analyse wurde keine Veränderung gefunden (Abbildung 13 C, Abbildung 14).

Die Genchip-Analysen zeigten, dass die Expression von Carm1 mRNA im Zerebellum der LGS-KO-Maus unverändert war (Abbildung 13 A). Dies wurde in der qPCR bestätigt (Abbildung 13 B). Die CARM1 Proteinspiegel sind nach den Daten der Proteomanalyse im Zerebellum nicht signifikant verändert, wohingegen in der Western Blot-Analyse eine tendenzielle Erhöhung gefunden wurde (p=0,08) (Abbildung 13 C, Abbildung 14).

Die Genexpression von Trove2 war entsprechend der Genchip-Analysen im Zerebellum der LGS-KO-Mäuse nicht verändert (Abbildung 13 A). Dem entgegen wurden die Trove2 mRNA-Spiegel in der qPCR signifikant erhöht gefunden (Abbildung 13 B). Auch die TROVE2 Proteinspiegel wurden in der Proteomanalyse des Zerebellum unverändert gefunden, was durch die Western Blot-Analysen bestätigt wurde (Abbildung 13 C, Abbildung 14).

Zerebellum Maus (WT/ LGS-KO)

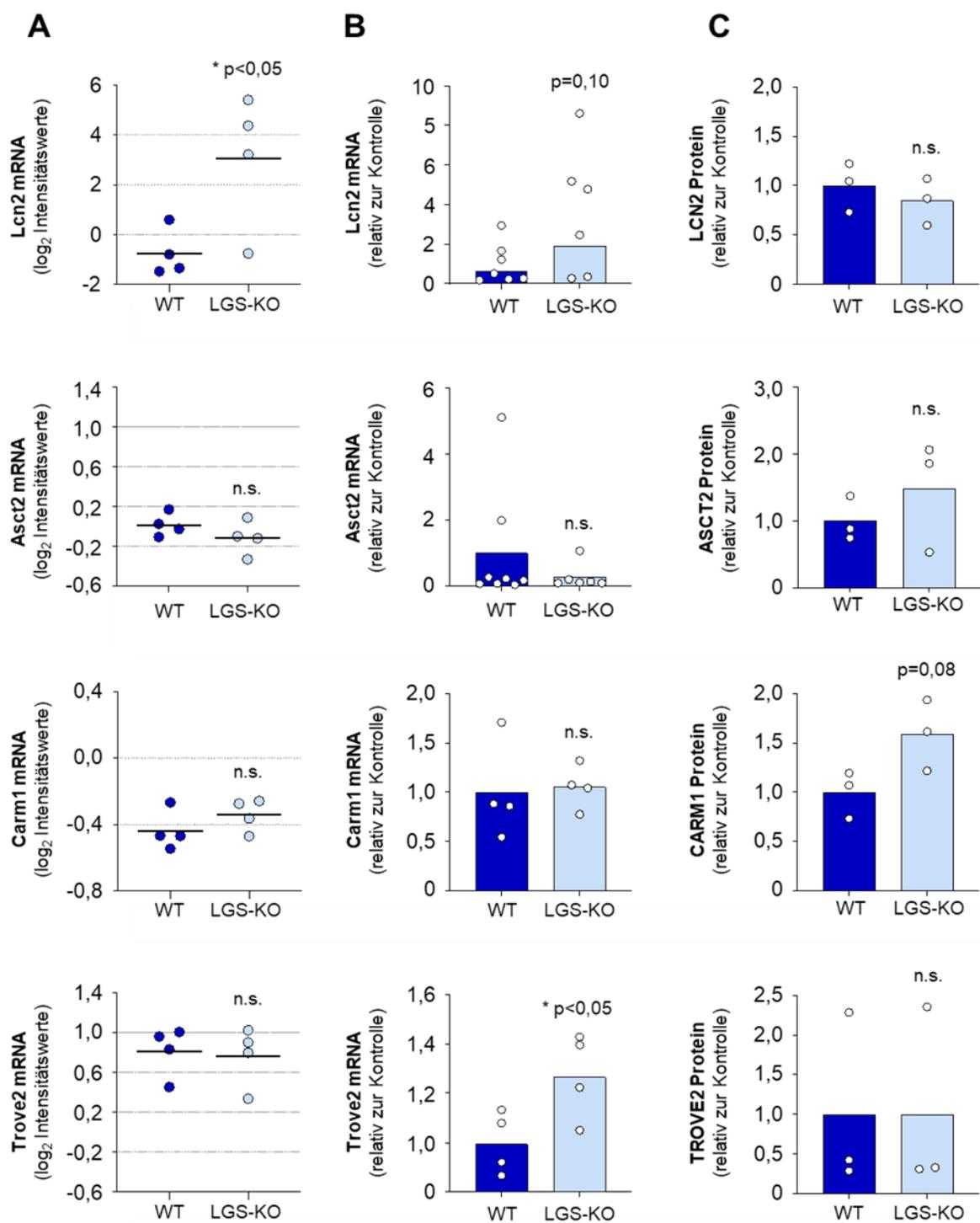


Abbildung 13: mRNA- und Proteinspiegel von Carm1, Trove2, Lcn2 und Asct2 im Zerebellum von WT- und LGS-KO-Mäusen. Die mRNA oder Proteinspiegel von WT- und LGS-KO-Mäusen wurden mittels Genchip-Array (A) und qPCR (B) und Proteinspiegel wurden mittels Western Blot- und densitometrischer Analyse gemessen (C). Bei der qPCR-Analyse wurden die Spiegel der Zielgene auf die des Haushaltsgens normalisiert (B). Die Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und mRNA- und Proteinspiegel in LGS-KO-Mäusen wurden relativ zu den WT-Kontrollen angegeben. Die statistischen Analysen wurden mit dem 2-seitigen

Studentischen T-Test durchgeführt. *: statistisch signifikant verändert zur Kontrolle. n.s.: nicht signifikant verändert zur Kontrolle (n=3-4). Mittelwerte werden angegeben als geometrisches Mittel (A) oder arithmetisches Mittel (B, C). WT: $\text{Glu}^{\text{fl/fl}}$ Mäuse LGS-KO: $\text{AlbCre}^+/\text{Glu}^{\text{fl/fl}}$ Mäuse. Die Daten zu *Lcn2*, *Carm1* und *Trove2* wurden publiziert in [157].

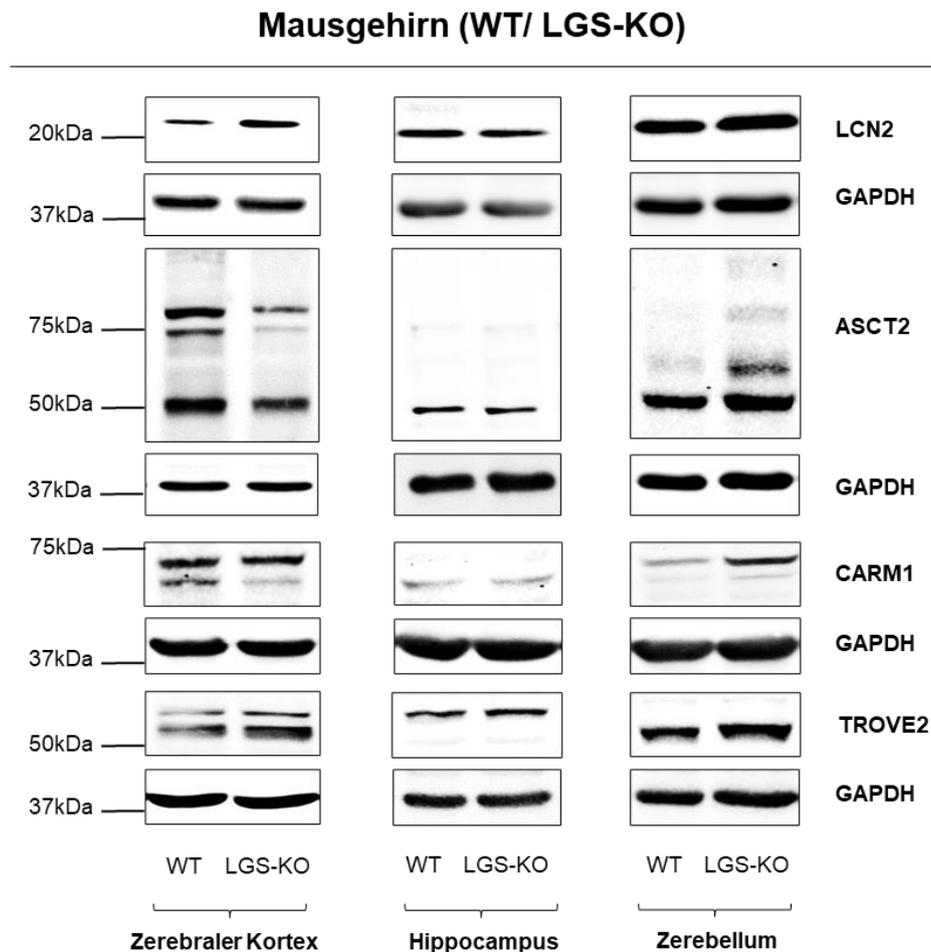


Abbildung 14: CARM1, TROVE2, LCN2 und ASCT2 Proteinspiegel im Gehirn von LGS-KO-Mäusen. Die Proteinlysate wurden aus dem zerebralen Kortex, Hippocampus und Zerebellum von WT- und LGS-KO-Mäusen präpariert und die Proteinspiegel der ausgewählten Kandidaten durch Western Blot-Analysen untersucht. Es werden repräsentative Blots von WT- und LGS-KO-Mäusen gezeigt. GAPDH wurde als Beladungskontrolle verwendet. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

3.5 Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Gehirn von Maus und Ratte

In weiterführenden Experimenten wurde mittels Immunfluoreszenzanalysen untersucht, in welchen unterschiedlichen Hirnregionen von WT-Mäusen und -Ratten die Kandidaten LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 vorkommen. Hierfür wurden Gehirnschnitte aus der Maus und Ratte mit dem Astrozyten-Marker GFAP ko-gefärbt und Immunfluoreszenzanalysen in verschiedenen Hirnregionen mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie durchgeführt. In diesen Untersuchungen konnten Neurone ohne zusätzliche Anfärbung eines Neuronen-spezifischen Markers aufgrund der gut abgrenzbaren Morphologie der neuronalen Somata von anderen Zellen unterschieden werden.

In der Maus waren die Immunreaktivitäten (IR) von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 deutlich in zellulären Strukturen erkennbar, wohingegen die IR von ASCT2 im zerebralen Kortex, Hippocampus und Corpus callosum diffus waren (Abbildung 15-17). Die Immunreaktivitäten von LCN2, CARM1 und TROVE2 sind in neuronalen Somata und auch in GFAP-exprimierenden Astrozyten erkennbar. Die diffuse Verteilung der ASCT2 Immunreaktivität erschwerte die Lokalisation von ASCT2 in Neuronen und Astrozyten in den unterschiedlichen Gehirnregionen deutlich. Dies war insbesondere im zerebralen Kortex der Fall, da hier die ASCT2-IR zwar mit der von GFAP überlagerte, aber nicht ausgeprägter als im umliegenden GFAP-negativen Bereich war (Abbildung 15). Im Hippocampus, Corpus callosum und Zerebellum wurde hingegen eine gegenüber dem umgebenden Gewebe verstärkte ASCT2-IR gefunden, die mit der GFAP-IR überlagerte (Abbildung 16-18).

Diese Analysen zeigen, dass LCN2, CARM1 und TROVE2 in Neuronen und Astrozyten im zerebralen Kortex, Hippocampus, Corpus callosum und Zerebellum der Maus exprimiert werden. ASCT2 wurde im Zerebellum auch in einigen Astrozyten gefunden.

Zerebraler Kortex (Maus)

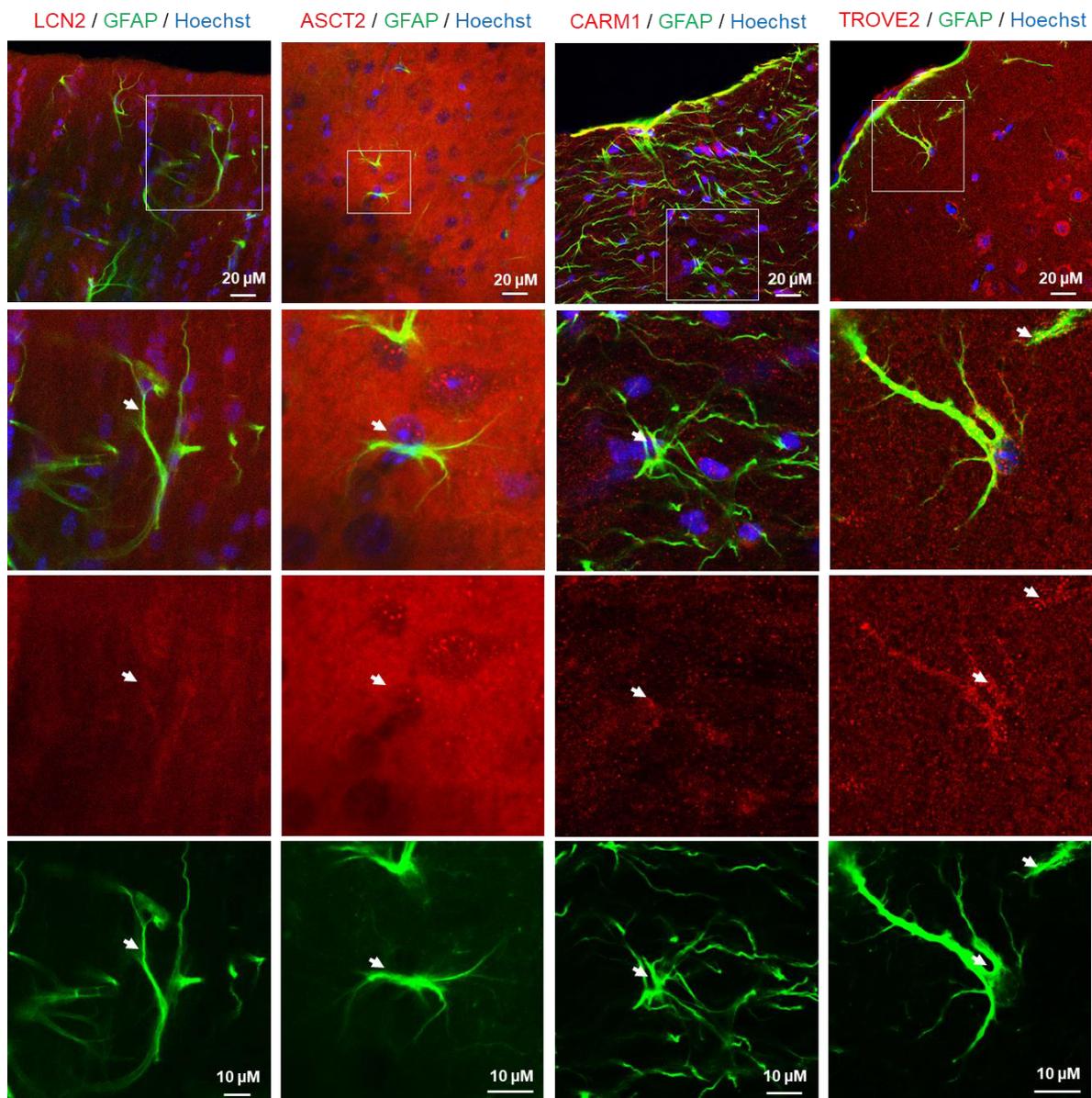


Abbildung 15: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im zerebralen Kortex in Wildtyp-Mäusen. 50 µm dicke Hirnschnitte Zamboni-fixierter Maushirne wurden frei flottierend mit gegen LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 (rot)- gerichteten Antikörpern inkubiert. Astrozyten wurden mit Antikörpern gegen GFAP (grün) und Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst34580 (blau) angefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie. Die in den Übersichtsbildern mit einer Box markierten Bereiche wurden mittels Zoom-Funktion des LSM880 gescannt und die erhaltenen Vergrößerungen jeweils darunter angeordnet. Ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

Hippocampus (Maus)

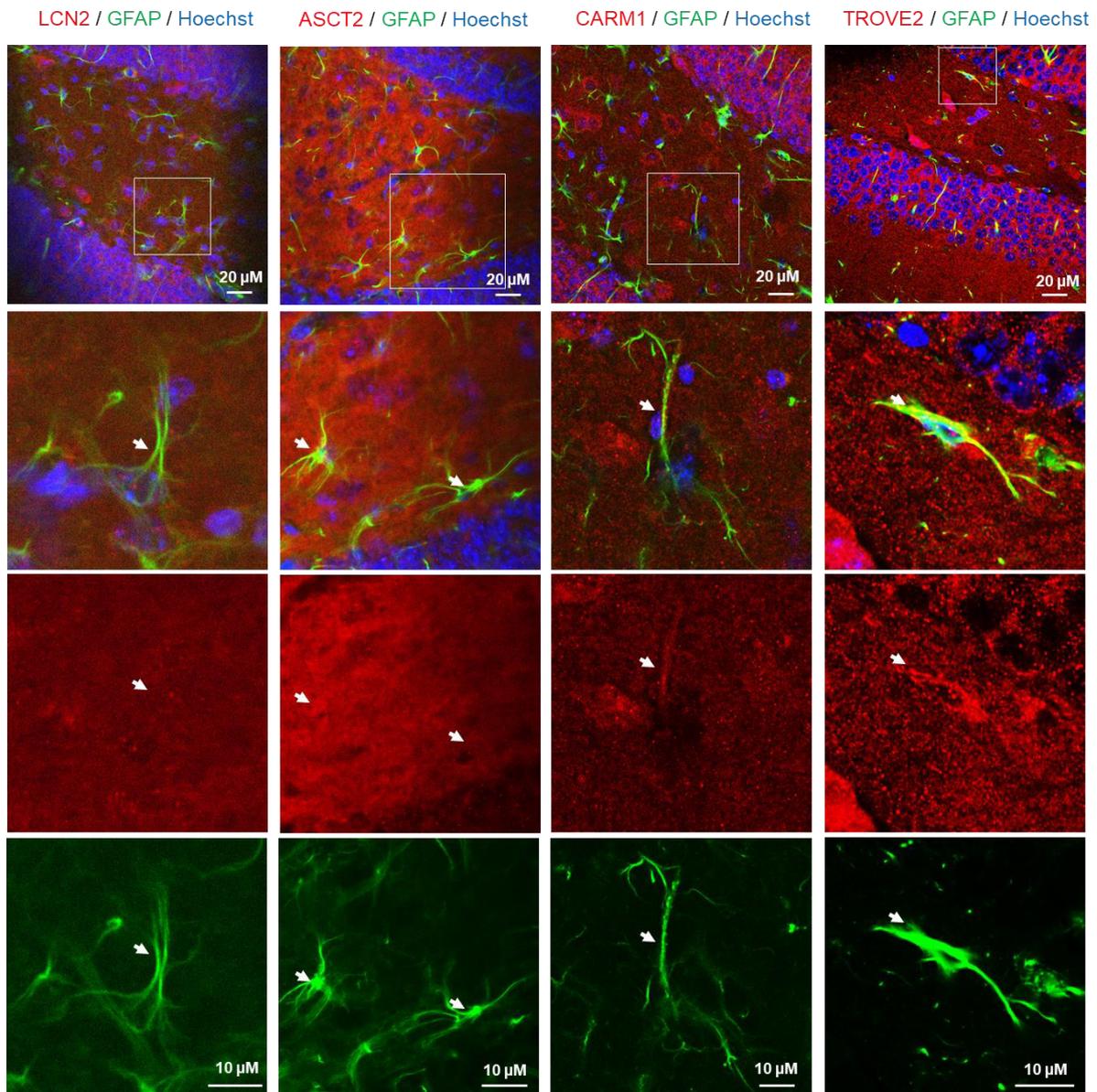


Abbildung 16: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Hippocampus von Wildtyp-Mäusen. 50 µM dicke Hirnschnitte Zamboni-fixierter Maushirne wurden frei flottierend mit gegen LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 (rot)- gerichteten Antikörpern inkubiert. Astrozyten wurden mit Antikörpern gegen GFAP (grün) und Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst34580 (blau) angefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie. Die in den Übersichtsbildern mit einer Box markierten Bereiche wurden mittels Zoom-Funktion des LSM880 gescannt und die erhaltenen Vergrößerungen jeweils darunter angeordnet. Ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

Corpus callosum (Maus)

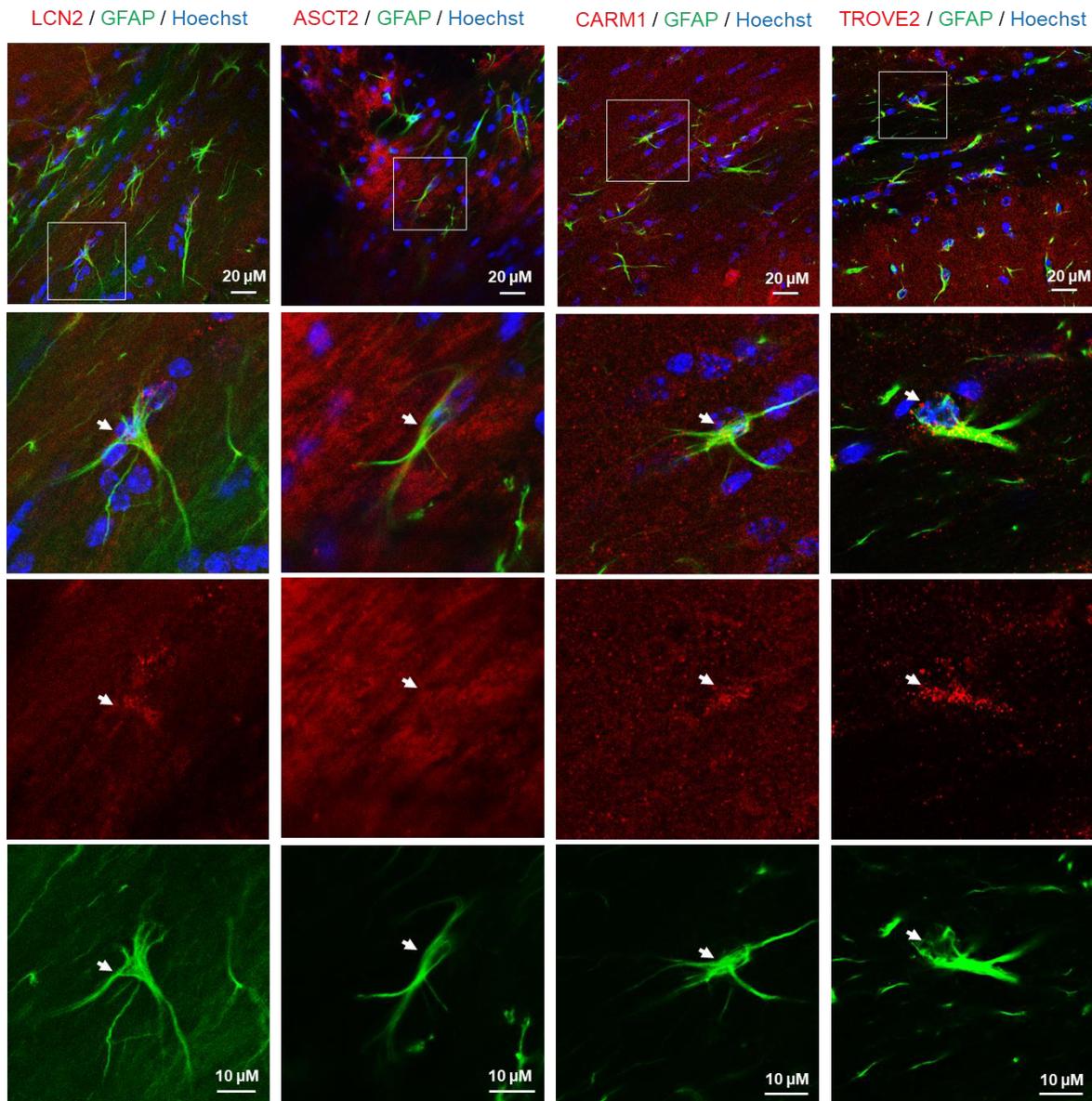


Abbildung 17: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Corpus callosum in Wildtyp-Mäusen 50 µm dicke Hirnschnitte Zamboni-fixierter Maushirne wurden frei flottierend mit gegen LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 (rot)- gerichteten Antikörpern inkubiert. Astrozyten wurden mit Antikörpern gegen GFAP (grün) und Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst34580 (blau) angefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie. Die in den Übersichtsbildern mit einer Box markierten Bereiche wurden mittels Zoom-Funktion des LSM880 gescannt und die erhaltenen Vergrößerungen jeweils darunter angeordnet. Ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

Zerebellum (Maus)

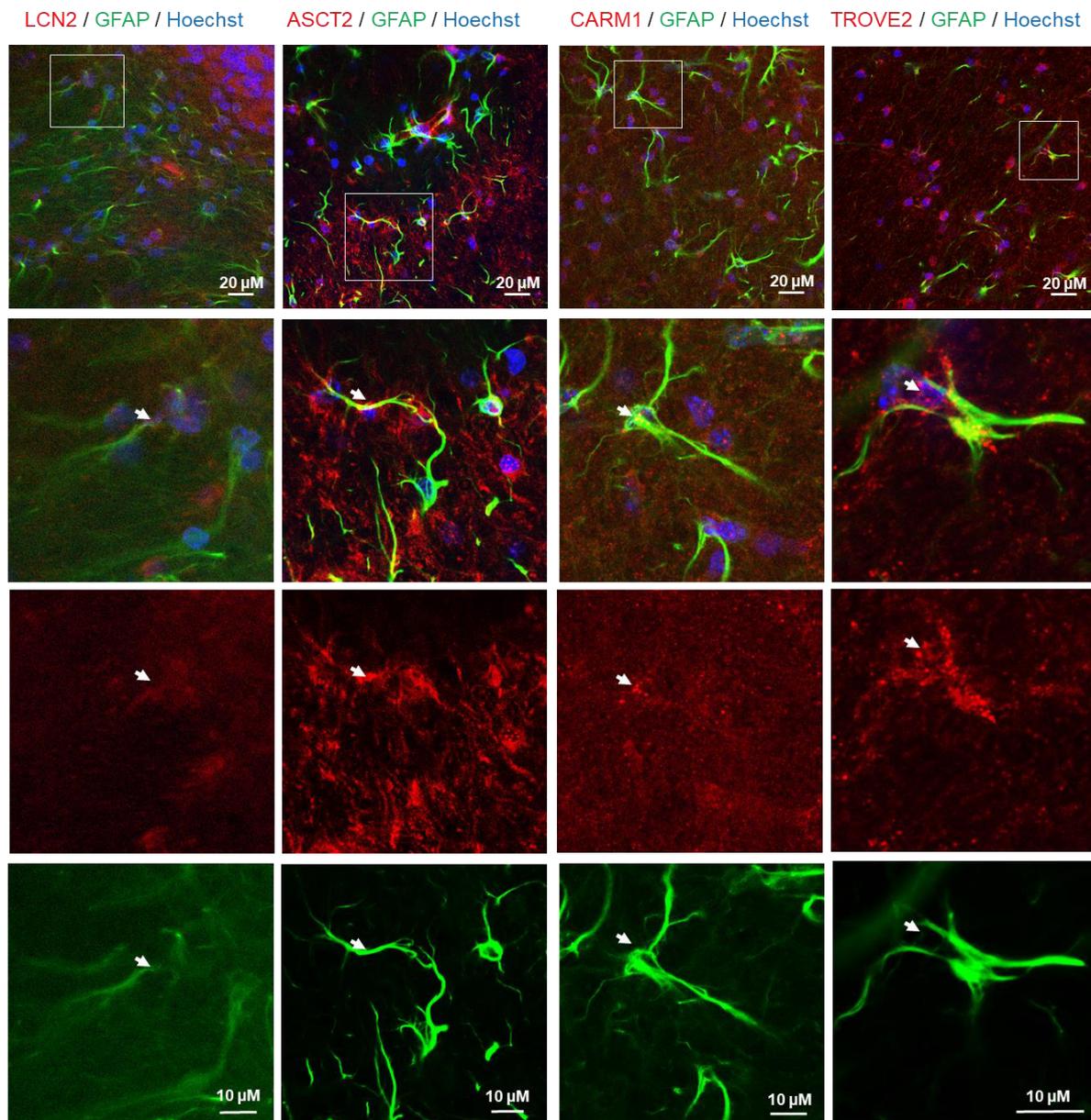


Abbildung 18: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Zerebellum von Wildtyp-Mäusen. 50 µM dicke Hirnschnitte Zamboni-fixierter Maushirne wurden frei flottierend mit gegen LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 (rot)- gerichteten Antikörpern inkubiert. Astrozyten wurden mit Antikörpern gegen GFAP (grün) und Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst34580 (blau) angefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie. Die in den Übersichtsbildern mit einer Box markierten Bereiche wurden mittels Zoom-Funktion des LSM880 gescannt und die erhaltenen Vergrößerungen jeweils darunter angeordnet. Ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

Zum Ausschluss von Färbeartefakten, die auf eine unspezifische Bindung der Sekundärantikörper zurückzuführen ist, wurden Sekundärantikörperkontrollen durchgeführt (Abbildung 19). Im Vergleich zu den mit Primärantikörpern behandelten Schnitten, wurde in den ausschließlich mit Sekundärantikörpern durchgeführten Färbungen keine rote oder grüne Fluoreszenz unter vergleichbaren Detektionsbedingungen detektiert. Diese Befunde zeigen, dass die nach Färbung von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 erhaltenen Immunofluoreszenzen nicht auf einer unspezifischen Bindung der jeweiligen Sekundärantikörper an das Mausgewebe beruhen. Bei diesen Untersuchungen wurde die Fluoreszenz einerseits mit konfokaler Laserscanning Mikroskopie oder dem ChemiDoc MP BioRad Detektionssystem erfasst. Das letztere System ermöglicht es die IR in den Gehirnschnitten *in toto* zu erfassen und global über den gesamten Schnitt zu vergleichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die spezifische IR von der IR, die vom Sekundärantikörper ausgeht, klar abgegrenzt werden kann.

Sekundärantikörper-Färbungen (Maus)

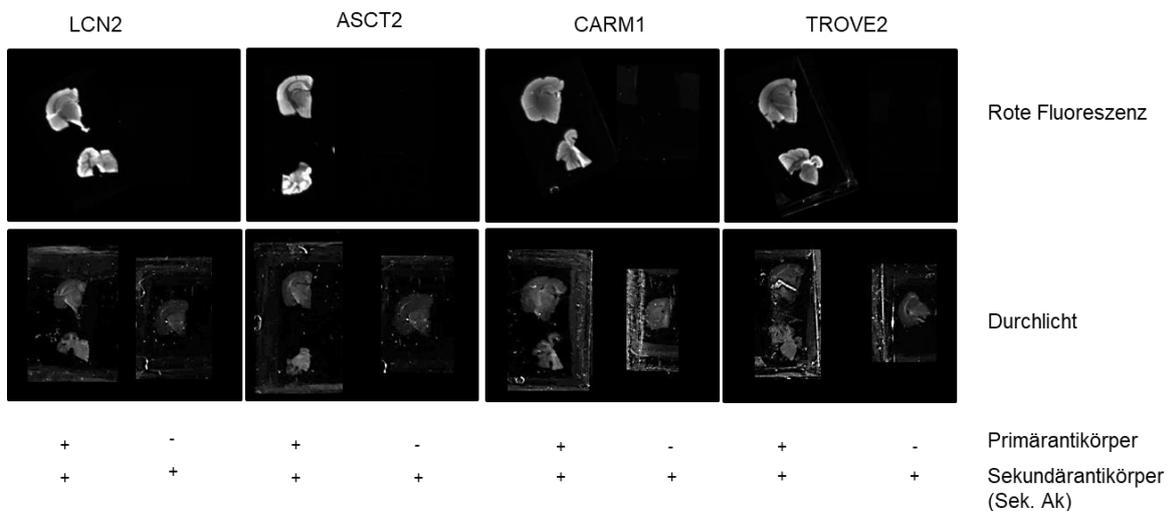
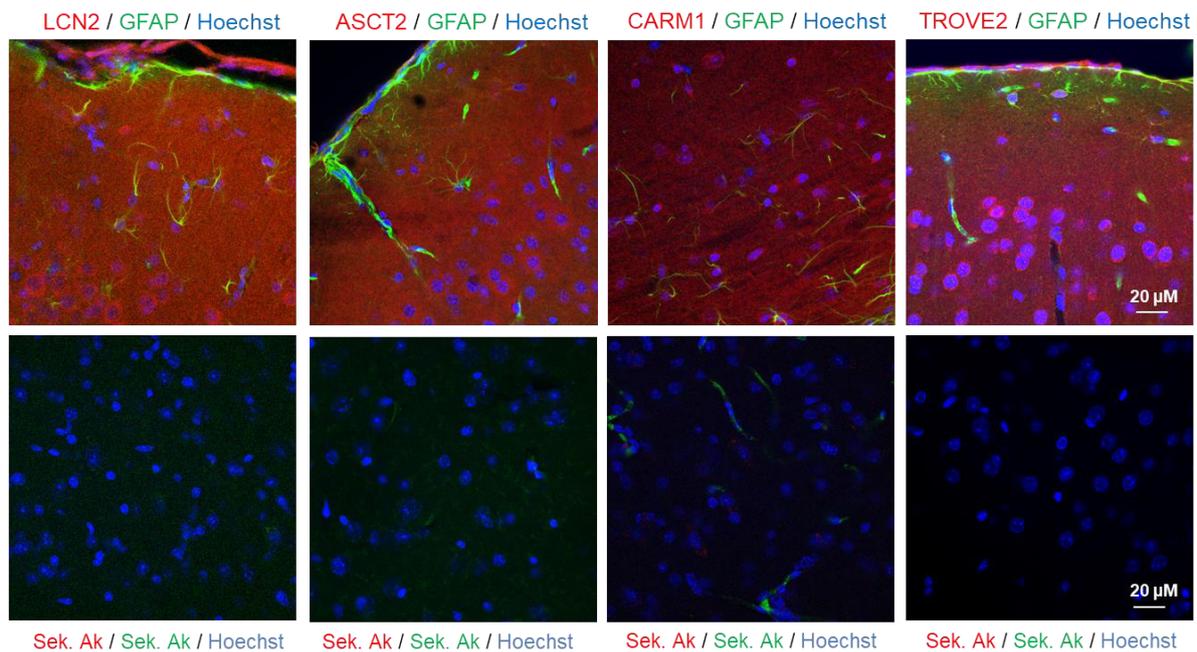


Abbildung 19: Überprüfung potenzieller Sekundärantikörper-vermittelter unspezifischer Anfärbungen im Gehirn von Wildtyp-Mäusen. 50 μM dicke Hirnschnitte Zamboni-fixierter Maushirne wurden frei flottierend mit oder ohne gegen LCN2, ASCT2, CARM1 oder TROVE2 (rot)- und jeweils GFAP (grün)-gerichteten Antikörpern inkubiert. Alle Hirnschnitte wurden nachfolgend mit der entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper-Kombination angefärbt. Zusätzlich wurden Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst34580 (blau) angefärbt. Oben: Detektion der Fluoreszenzen der jeweiligen Fluorochrome mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie im zerebralen Mauskortex. Unten: Detektion der Rotfluoreszenz im Zerebrum und Zerebellum mittels ChemiDoc MP Imagers. Ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

In weiteren Experimenten wurden die Proteine LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 in Gehirnschnitten von adulten Wistar-Ratten mittels Immunfluoreszenzanalyse untersucht.

In der Ratte wurde eine ausgeprägte LCN2-, CARM1- und TROVE2-IR im zerebralen Kortex, Hippocampus und Corpus callosum in neuronalen Somata und GFAP-exprimierenden Astrozyten gefunden (Abbildung 20-22).

Während eine deutliche ASCT2-IR in allen untersuchten Hirnregionen in Neuronen gefunden wurde, war ASCT2 im zerebralen Kortex und Corpus callosum, aber nicht im Hippocampus in Astrozyten lokalisiert.

Die diffuse Verteilung der ASCT2-IR im Hippocampus erschwerte die Lokalisation von ASCT2 in Astrozyten deutlich (Abbildung 21). Die ASCT2-IR überlagerte sich zwar mit der von GFAP, aber nicht ausgeprägter als im umliegenden GFAP-negativen Bereich, wodurch eine astrogliale Lokalisation gestützt würde. Im zerebralen Kortex und Corpus callosum wurde hingegen eine gegenüber dem umgebenden Gewebe verstärkte ASCT2-IR gefunden, die mit der GFAP-IR überlagerte (Abbildung 20, 22).

Diese Analysen zeigen, dass LCN2, CARM1 und TROVE2 in Neuronen und Astrozyten im zerebralen Kortex, Hippocampus und Corpus callosum der Ratte exprimiert werden. ASCT2 wurde in Neuronen und Astrozyten im zerebralen Kortex und Corpus callosum der Ratte exprimiert.

Die Untersuchungen wurden auch am Rattengehirn durchgeführt, da in nachfolgenden Untersuchungen die Wirkung von Ammoniak auf die Genexpression und Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten durchgeführt wurde.

Zerebraler Kortex (Ratte)

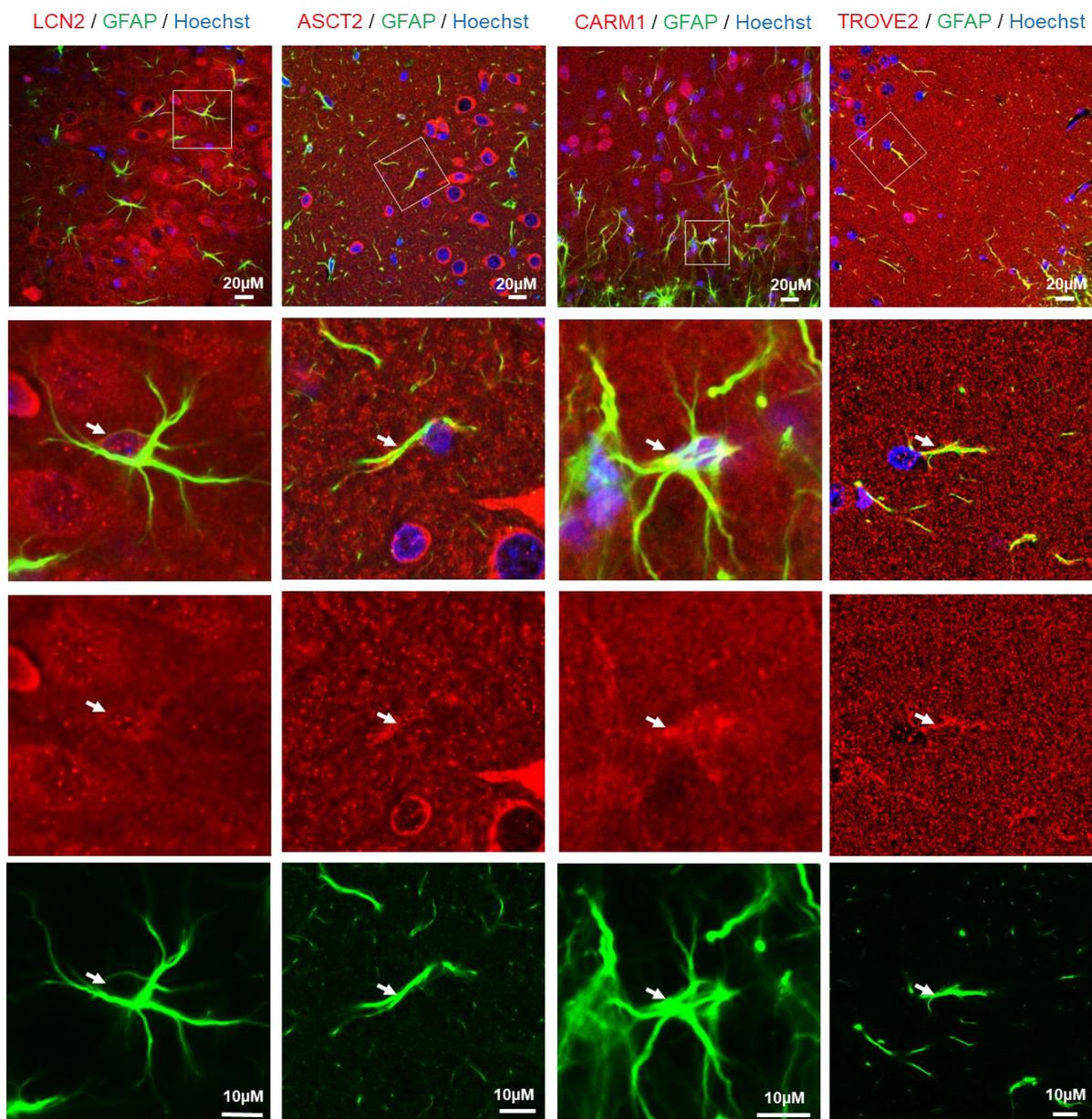


Abbildung 20: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im zerebralen Kortex von Wistar-Ratten. 50 µM dicke Hirnschnitte Zamboni-fixierter Rattenhirne wurden frei flottierend mit gegen LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 (rot)- gerichteten Antikörpern inkubiert. Astrozyten wurden mit Antikörpern gegen GFAP (grün) und Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst34580 (blau) angefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie. Die in den Übersichtsbildern mit einer Box markierten Bereiche wurden mittels Zoom-Funktion des LSM880 gescannt und die erhaltenen Vergrößerungen jeweils darunter angeordnet. Ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

Hippocampus (Ratte)

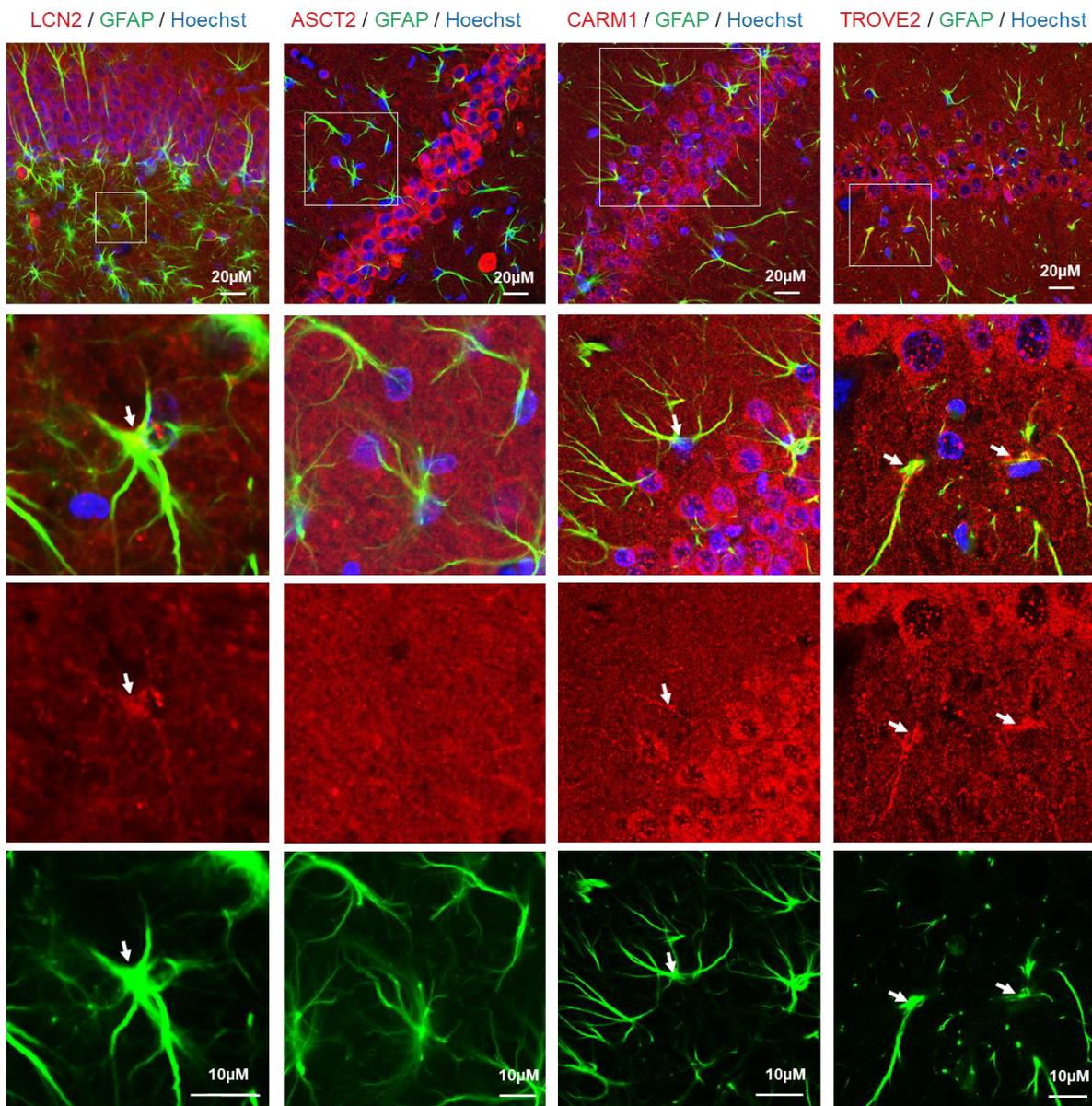


Abbildung 21: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Hippocampus von Wistar-Ratten. 50 μM dicke Hirnschnitte Zamboni-fixierter Rattenhirne wurden frei flottierend mit gegen LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 (rot)-gerichteten Antikörpern inkubiert. Astrozyten wurden mit Antikörpern gegen GFAP (grün) und Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst34580 (blau) angefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie. Die in den Übersichtsbildern mit einer Box markierten Bereiche wurden mittels Zoom-Funktion des LSM880 gescannt und die erhaltenen Vergrößerungen jeweils darunter angeordnet. Ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

Corpus callosum (Ratte)

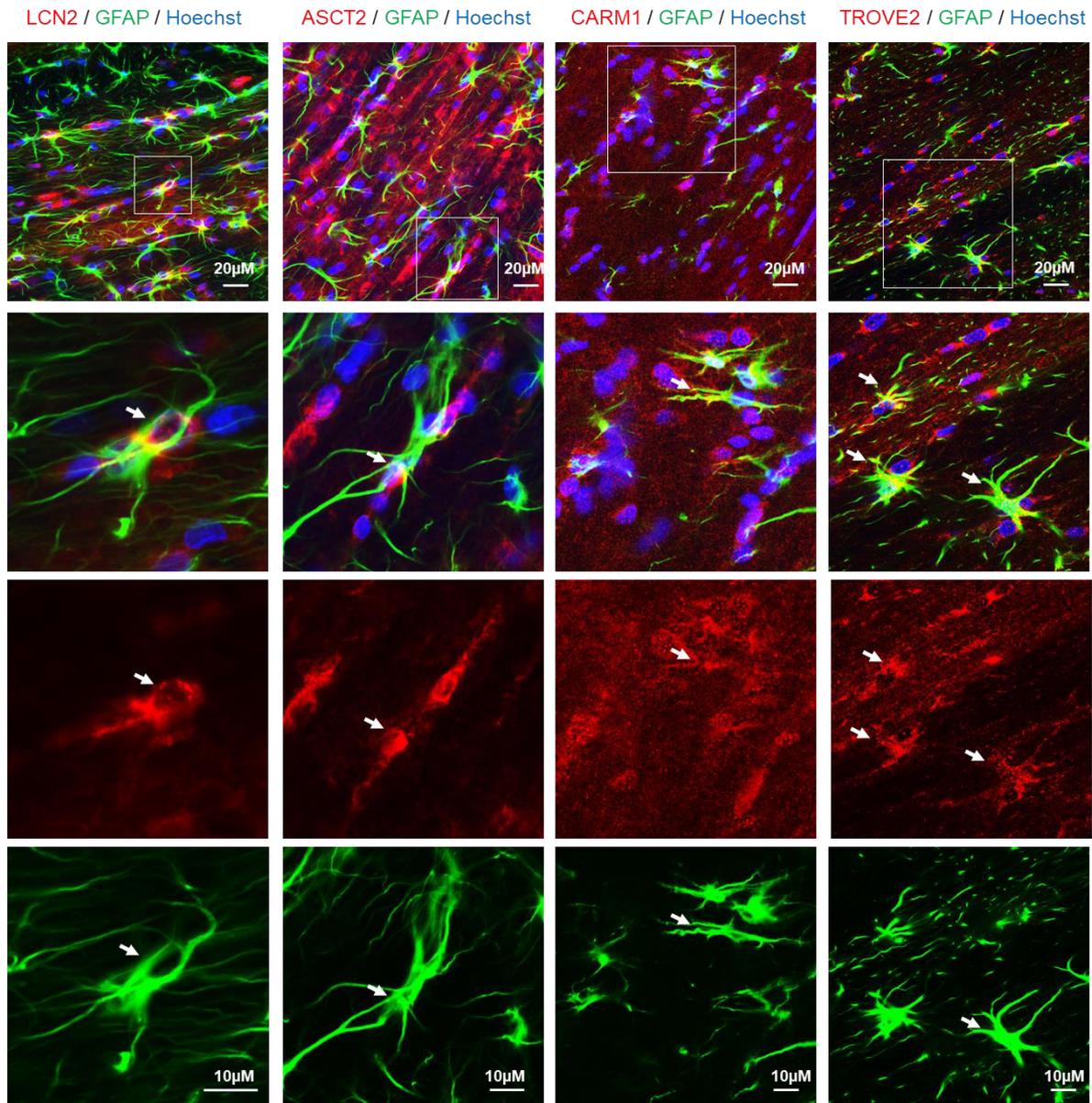


Abbildung 22: Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im Corpus callosum von Wistar-Ratten. 50 μM dicke Hirnschnitte Zamboni-fixierter Rattenhirne wurden frei flottierend mit gegen LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 (rot)- gerichteten Antikörpern inkubiert. Astrozyten wurden mit Antikörpern gegen GFAP (grün) und Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst34580 (blau) angefärbt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der konfokalen Laserscanning Mikroskopie. Die in den Übersichtsbildern mit einer Box markierten Bereiche wurden mittels Zoom-Funktion des LSM880 gescannt und die erhaltenen Vergrößerungen jeweils darunter angeordnet. Ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Versuchen ist gezeigt. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

Zum Ausschluss von Färbeartefakten, die auf eine unspezifische Bindung der Sekundärantikörper zurückzuführen sind, wurden Sekundärantikörperkontrollen durchgeführt (Abbildung 23). Im Vergleich zu den mit den Primärantikörpern behandelten Schnitten wurde in den ausschließlich mit den Sekundärantikörpern durchgeführten Färbungen keine rote oder grüne Fluoreszenz unter vergleichbaren Detektionsbedingungen detektiert. Diese Befunde zeigen, dass die nach Färbung von LCN, ASCT2, CARM1 und TROVE2 erhaltenen Immunfluoreszenzen nicht auf einer unspezifischen Bindung der jeweiligen Sekundärantikörper an das Rattengewebe beruhen. Bei diesen Untersuchungen wurde die Fluoreszenz einerseits mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie oder dem ChemiDoc MP BioRad Detektionssystem erfasst. Das letztere System ermöglicht es die IR in den Gehirnschnitten *in toto* zu erfassen und global über den gesamten Schnitt zu vergleichen.

Sekundärantikörper-Färbungen (Ratte)

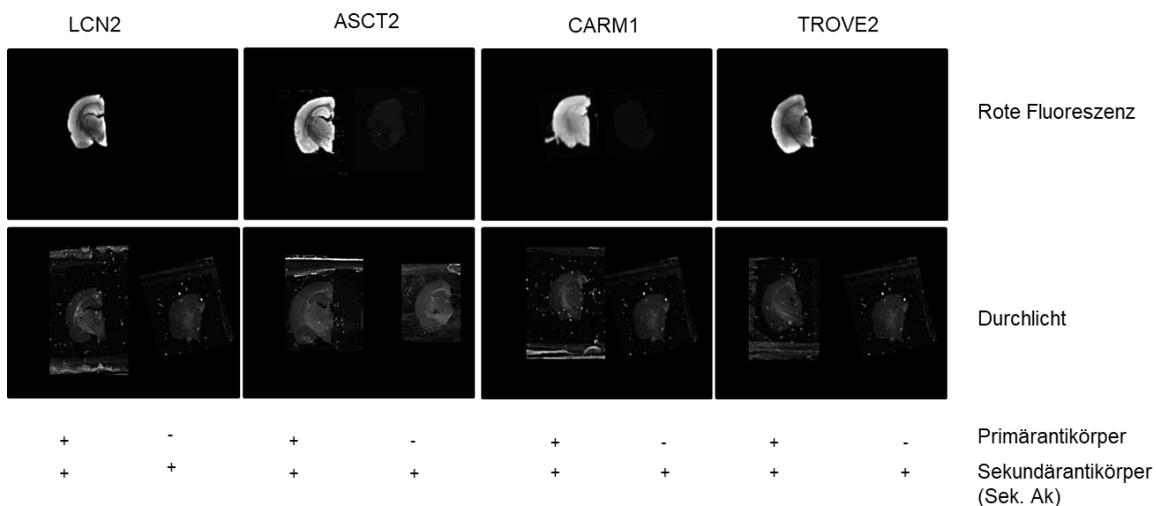
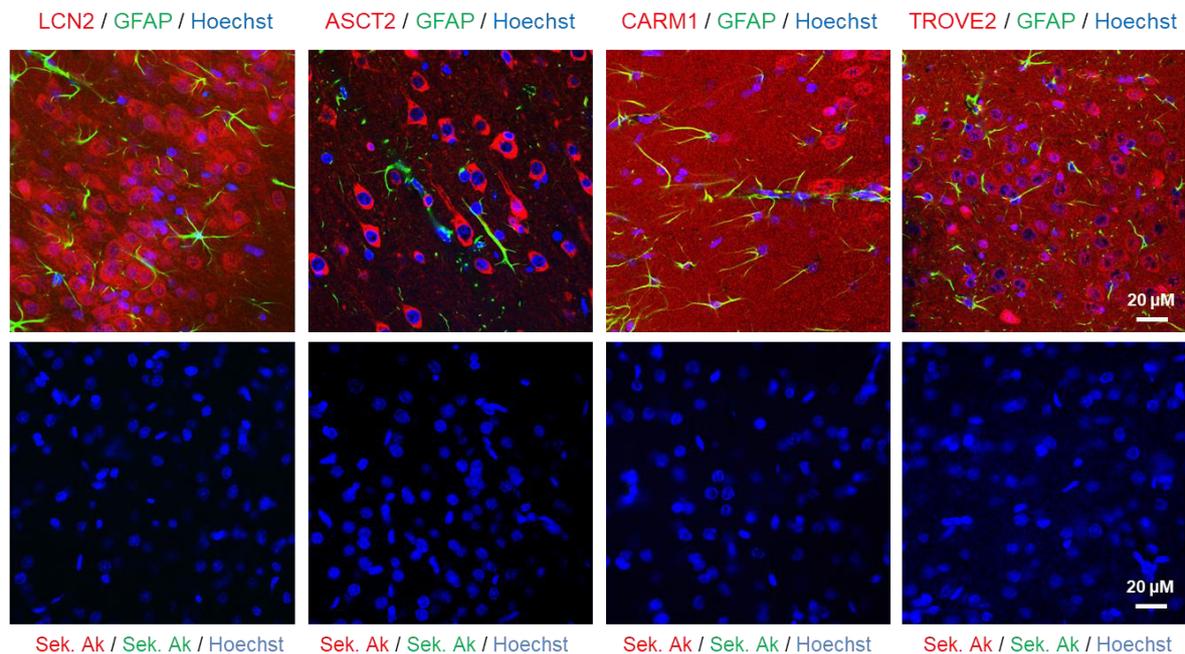


Abbildung 23: Überprüfung potenzieller Sekundärantikörper-vermittelter unspezifischer Anfärbungen im Rattengehirn. 50 μM dicke Hirnschnitte Zamboni-fixierter Rattenhirne wurden frei flottierend mit oder ohne gegen LCN2, ASCT2, CARM1 oder TROVE2 (rot)- und jeweils GFAP (grün)-gerichteten Antikörpern inkubiert. Alle Hirnschnitte wurden nachfolgend mit den entsprechenden Fluoreszenz-gekoppelten Sekundärantikörper-Kombinationen angefärbt. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit dem DNA-Farbstoff Hoechst34580 (blau) angefärbt. Oben: Detektion der Fluoreszenzen der jeweiligen Fluorochrome mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie im zerebralen Mäusekortex. Unten: Detektion der Rotfluoreszenz im Zerebrum und Zerebellum mittels ChemiDoc MP Imagers. Ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

3.6 Effekte von NH₄Cl auf die mRNA- und Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten

In einem weiteren Schritt wurden die Spiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 auf mRNA- und Proteinebene in unbehandelten und mit NH₄Cl-inkubierten kultivierten Rattenastrozyten *in vitro* analysiert. Etwaige zeit- und konzentrationsabhängige Effekte von NH₄Cl wurden mittels qPCR, Westen-Blot-Analyse und Immunfluoreszenzanalyse untersucht.

3.6.1 LCN2

In der Genarray-Analyse der LGS-KO-Mäuse lag LCN2 etwa 30-fach erhöht im zerebralen Kortex vor. Durch die Inkubation kultivierter Rattenastrozyten mit NH₄Cl wurden die *Lcn2* mRNA-Spiegel nicht signifikant verändert (Abbildung 24 A). Die *Lcn2* mRNA-Spiegel stiegen zwar tendenziell zeit- und konzentrationsabhängig nach Inkubation der kultivierten Rattenastrozyten mit NH₄Cl an, jedoch waren die Veränderungen nicht signifikant verändert zu den unbehandelten Kontrollen (Tabelle 9, 10).

In der Proteomanalyse der LGS-KO-Mäuse wurde das LCN2 Protein nicht identifiziert. Dementgegen wurde ein signifikanter Anstieg der LCN2 Proteinspiegel in kultivierten Rattenastrozyten nach Inkubation mit NH₄Cl (5 mM, 72 h) gefunden (Abbildung 24 B). Eine zeitabhängige Veränderung der LCN2 Proteinspiegel wurde nicht detektiert (Tabelle 11). Zusätzlich stiegen die LCN2 Proteinspiegel konzentrationsabhängig bei 0,5 mM NH₄Cl (72 h) (Tabelle 12). Der signifikante Anstieg an LCN2 Proteinspiegel nach 72 h Inkubation mit 5 mM NH₄Cl wurde Immunfluoreszenzanalyse bestätigt (Abbildung 24 C).

3.6.2 ASCT2

In der Genarray-Analyse der LGS-KO-Mäuse lag ASCT2 1,4-fach erhöht im zerebralen Kortex vor. Durch die Inkubation kultivierter Rattenastrozyten mit NH₄Cl wurden die *Asct2* mRNA-Spiegel signifikant verändert (Abbildung 24 A). Die *Asct2* mRNA-Spiegel waren signifikant erhöht in kultivierten Rattenastrozyten durch die Inkubation mit NH₄Cl (5 mM) nach

24, 48 und 72 h (Tabelle 9). Durch die Inkubation mit 1,0 und 2,5 mM NH_4Cl (72 h) wurden die *Asct2* mRNA-Spiegel konzentrationsabhängig signifikant erhöht (Tabelle 10).

Das ASCT2 Protein wurde in der Proteomanalyse der LGS-KO-Mäuse nicht im zerebralen Kortex gefunden. Dementgegen stiegen die ASCT2 Proteinspiegel in kultivierten Rattenastrozyten nach Inkubation mit NH_4Cl (5 mM, 72 h) signifikant an (Abbildung 24 B). Die ASCT2 Proteinspiegel waren nach 24, 48 und 72 h Exposition mit 5 mM NH_4Cl signifikant erhöht. Ebenfalls induzierten NH_4Cl -Konzentrationen von 1,0 und 2,5 mM (72 h) signifikant erhöhte ASCT2 Proteinspiegel (Tabelle 11, 12). Somit wurden die ASCT2 mRNA- und Proteinspiegel durch die Inkubation mit NH_4Cl (5 mM, 72 h) signifikant erhöht (Abbildung 24 A, B). Diese Hochregulation wurde ebenfalls in Immunfluoreszenzanalysen bestätigt (Abbildung 24 C).

3.6.3 CARM1

Die *Carm1* mRNA-Spiegel lagen in der Genarray-Analyse der LGS-KO-Maus im zerebralen Kortex unverändert vor. Durch die Inkubation kultivierter Rattenastrozyten mit NH_4Cl wurden die *Carm1* mRNA-Spiegel nicht signifikant verändert (Abbildung 24 A). Die *Carm1* mRNA-Spiegel lagen nach einer Inkubation mit 5 mM NH_4Cl (24 h) erhöht vor und nahmen zeitabhängig tendenziell ab (Tabelle 9). Konzentrationsabhängig wurden keine veränderten *Carm1* mRNA-Spiegel gefunden (Tabelle 10).

In der Proteomanalyse der LGS-KO-Mäuse lag CARM1 signifikant im zerebralen Kortex verringert vor. Dieser Befund wurde durch Western Blot-Analysen bestätigt (Abbildung 24 B). Ebenfalls sanken die CARM1 Proteinspiegel tendenziell zeit- und konzentrationsabhängig (Tabelle 11, 12). Die signifikante Verringerung von CARM1-Protein durch die Inkubation mit NH_4Cl (5 mM, 72 h) wurde durch Immunfluoreszenzanalysen ebenfalls bestätigt (Abbildung 24 C).

3.6.4 TROVE2

In der Genarray-Analyse der LGS-KO-Mäuse war die Genexpression von *Trove2* im zerebralen Kortex nicht verändert. Durch die Inkubation kultivierter Rattenastrozyten mit NH_4Cl wurden die *Trove2* mRNA-Spiegel signifikant erhöht (Abbildung 24 A). Zusätzlich

stiegen die Trove2 mRNA-Spiegel zeit- und konzentrationsabhängig in kultivierten Rattenastrozyten an (Tabelle 11, 12).

In der Proteomanalyse der LGS-KO-Mäuse lag TROVE2 signifikant erhöht im zerebralen Kortex vor. Dieser Befund wurde durch Western Blot-Analysen bestätigt (Abbildung 24 B). Die Ammoniak-Inkubation kultivierter Rattenastrozyten steigerte ebenfalls die TROVE2 Proteinspiegel zeit- und konzentrationsabhängig (Tabelle 11, 12). Die durch Inkubation mit NH₄Cl (5 mM, 72 h) signifikant erhöhten Proteinspiegel wurden durch Immunfluoreszenzanalysen bestätigt (Abbildung 24 C).

Tabelle 9: Effekte von NH₄Cl auf die Lcn2, Asct2, Carm1 und Trove2 mRNA-Expression in kultivierten Rattenastrozyten- Zeitabhängigkeit. Die Quantifizierung der mRNA-Spiegel erfolgte per qPCR. Die mRNA-Spiegel von Lcn2, Asct2, Carm1 und Trove2 in NH₄Cl-inkubierten Astrozyten sind in Relation zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Studentischen T-Tests (n=4-16; 2-seitige Testung) identifiziert. *: Statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich. Die Daten zu Asct2 wurden von Olivia Knappe erhoben. Die Daten zu Lcn2, Carm1 und Trove2 wurden publiziert in [157].

mRNA	NH ₄ Cl (5 mM)		
	24 h	48 h	72 h
Lcn2	0,82 ± 0,28 n.s.	1,30 ± 0,35 n.s.	1,39 ± 0,35 n.s.
Asct2	2,19 ± 0,52 *	2,98 ± 0,46 *	4,65 ± 0,90 *
Carm1	1,33 ± 0,10 *	1,23 ± 0,19 n.s.	1,11 ± 0,08 n.s.
Trove2	1,33 ± 0,15 n.s.	1,29 ± 0,10 *	1,39 ± 0,07 *

Tabelle 10: Effekte von NH₄Cl auf die Carm1, Trove2, Lcn2 und Asct2 mRNA-Spiegel Expressionsveränderungen in kultivierten Rattenastrozyten- Konzentrationsabhängigkeit. Die Quantifizierung der mRNA-Spiegel erfolgte per qPCR. Die mRNA-Spiegel von Lcn2, Asct2, Carm1 und Trove2 in NH₄Cl-inkubierten Astrozyten sind in Relation zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollen angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des Studentischen T-Tests (n=6-11; 2-seitige Testung) identifiziert. *: Statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich. n.u.: nicht untersucht. Die Daten zu Asct2 wurden von Olivia Knappe erhoben. Die Daten zu Lcn2, Carm1 und Trove2 wurden publiziert in [157].

mRNA	NH ₄ Cl (72 h)			
	0,5 mM	1,0 mM	2,5 mM	5,0 mM
Lcn2	1,02 ± 0,13 n.s.	1,09 ± 0,13 n.s.	1,36 ± 0,27 n.s.	1,397 ± 0,356 n.s.
Asct2	n.u.	1,28 ± 0,11 *	1,41 ± 0,12 *	4,65 ± 0,90 *
Carm1	0,96 ± 0,08 n.s.	1,00 ± 0,09 n.s.	1,08 ± 0,07 n.s.	1,11 ± 0,08 n.s.
Trove2	1,07 ± 0,04 n.s.	1,28 ± 0,11 *	1,16 ± 0,05 *	1,39 ± 0,07 *

Tabelle 11: Effekte von NH_4Cl auf die Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten- Zeitabhängigkeit. Proteinspiegel wurden mittels Western Blot- und densitometrischer Analyse quantifiziert. Die in mit NH_4Cl -inkubierten Astrozyten gefundenen LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 Proteinspiegel sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen angegeben. Als Beladungskontrolle diente das GAPDH Protein. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mithilfe des Studentischen T-Tests (n=3-9; 2-seitige Testung) identifiziert. *: Statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich. Die Daten zu ASCT2 wurden von Olivia Knappe erhoben. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

Protein	NH_4Cl (5 mM)		
	24 h	48 h	72 h
LCN2	1,08 ± 0,08 n.s.	1,23 ± 0,12 n.s.	1,29 ± 0,06 *
ASCT2	1,21 ± 0,06 *	1,31 ± 0,12 *	1,71 ± 0,15 *
CARM1	0,86 ± 0,11 n.s.	0,75 ± 0,23 n.s.	0,73 ± 0,06 *
TROVE2	1,14 ± 0,08 n.s.	1,39 ± 0,02 *	1,66 ± 0,08 *

Tabelle 12: Effekte von NH_4Cl auf die Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten- Konzentrationsabhängigkeit. Proteinspiegel wurden mittels Western Blot- und densitometrischer Analyse quantifiziert. Die in mit NH_4Cl -inkubierten Astrozyten gefundenen LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 Proteinspiegel sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen angegeben. Als Beladungskontrolle diente das GAPDH Protein. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mithilfe des Studentischen T-Tests (n=3-9; 2-seitige Testung) identifiziert. *: Statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich. n.u.: nicht untersucht. Die Daten zu ASCT2 wurden von Olivia Knappe erhoben. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

Protein	NH_4Cl (72 h)			
	0,5 mM	1,0 mM	2,5 mM	5,0 mM
LCN2	1,51 ± 0,08 *	n.u.	n.u.	1,29 ± 0,06 *
ASCT2	n.u.	1,48 ± 0,12 *	1,71 ± 0,34 n.s.	1,71 ± 0,15 *
CARM1	1,16 ± 0,17 n.s.	1,15 ± 0,30 n.s.	0,94 ± 0,10 n.s.	0,73 ± 0,06 *
TROVE2	1,04 ± 0,04 n.s.	1,18 ± 0,07 *	1,32 ± 0,08 *	1,66 ± 0,08 *

Kultivierte Rattenastrozyten

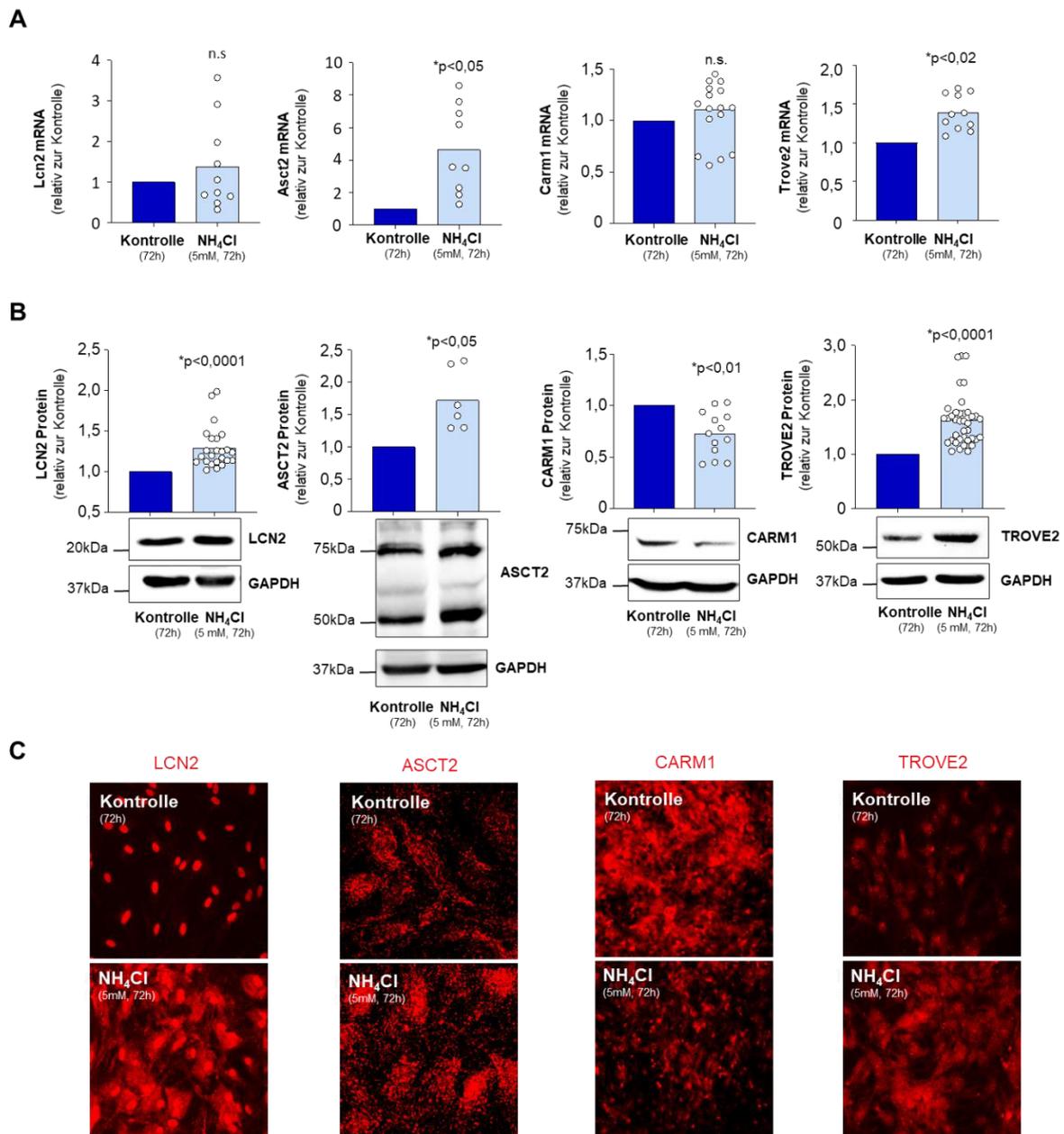


Abbildung 24: Effekte von NH_4Cl auf die mRNA- und Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten. Astrozyten wurden mit 5 mM NH_4Cl für 72 h inkubiert und mRNA- und Proteinspiegel wurden mittels qPCR (A) bzw. Western Blot-Analyse untersucht und densitometrischer Analyse quantifiziert (B). Immunfluoreszenzanalysen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten (C). Ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Experimenten für jede Bedingung ist gezeigt. Bei der qPCR wurden die Genexpressionen von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 auf die Expressionsspiegel des Haushaltgens HPRT1 normalisiert (A). Bei den Western Blot-Analysen wurden die Signalintensitäten von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 auf die der GAPDH normalisiert (B). Unbehandelte Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und mRNA- sowie Proteinspiegel in NH_4Cl -behandelten Astrozyten sind in Relation dazu angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mithilfe des Studentischen T-Tests (2-seitige Testung) identifiziert. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur

unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. Jeder in den Balkendiagrammen dargestellte Punkt entspricht einem unabhängigen Experiment ($n=3-34$). Die Daten zu ASCT2 wurden von Olivia Knappe erhoben. Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

Die Inkubation der kultivierten Rattenastrozyten mit weiteren HE-relevanten Faktoren wie $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/mL, 72 h), Diazepam (10 μM , 72 h) und $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5 mM, 72 h) beeinflussten die Proteinspiegel von LCN2, CARM1 und TROVE2 nicht (Abbildung 25, Tabelle 13).

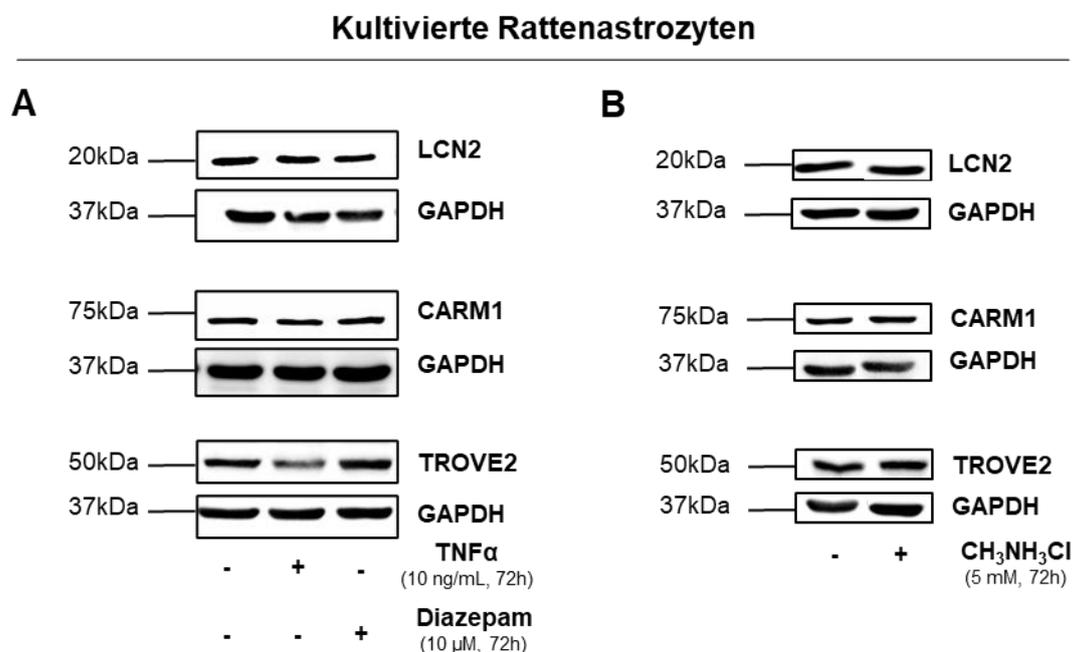


Abbildung 25: Effekte der HE-relevanten Faktoren $\text{TNF}\alpha$, Diazepam und $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ auf die Proteinspiegel von LCN, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten. Quantifizierung der LCN2, CARM1 und TROVE2 Proteinspiegel in unbehandelten oder mit (A) $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/mL, 72 h) bzw. Diazepam (10 μM , 72 h) oder (B) $\text{CH}_3\text{NH}_3\text{Cl}$ (5 mM, 72 h)-inkubierten kultivierten Rattenastrozyten. Proteinspiegel wurden mittels Western Blot- und densitometrischer Analyse untersucht. Bei den Western Blot-Analysen wurden die Signalintensitäten von LCN2, CARM1 und TROVE2 auf die der GAPDH normalisiert. Die Daten zu $\text{TNF}\alpha$ und Diazepam wurden publiziert in [157].

Tabelle 13: Effekte von $\text{TNF}\alpha$, Diazepam und MeNH_3Cl auf die Proteinspiegel von LCN2, CARM1 und TROVE2 in kultivierten Rattenastrozyten. Proteinspiegel wurden mittels Western Blot- und densitometrischer Analyse untersucht. Die Proteinspiegel in den experimentell-behandelten Proben sind in Relation zu den unbehandelten Kontrollen angegeben. Als Beladungskontrolle diente GAPDH. *: Statistisch signifikant unterschiedlich zur

unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich (*one-way* ANOVA mit Messwiederholung und Dunnet's *post hoc* Test mit multiplem Vergleich oder 2-seitigem Studentischen T-Test; n=3-7). n.u.: nicht untersucht. Die Daten zu TNF α und Diazepam wurden publiziert in [157].

	72 h		
Protein	TNF α (10 ng/mL)	Diazepam (10 μ M)	CH ₃ NH ₃ Cl (5 mM)
LCN2	1,26 \pm 0,11 n.s.	0,83 \pm 0,16 n.s.	1,13 \pm 0,12 n.s.
ASCT2	n.u.	n.u.	n.u.
CARM1	1,04 \pm 0,15 n.s.	1,00 \pm 0,23 n.s.	1,42 \pm 0,49 n.s.
TROVE2	0,84 \pm 0,04 n.s.	0,89 \pm 0,03 n.s.	1,28 \pm 0,15 n.s.

3.7 Effekte einer akuten Ammoniumazetatintoxikation auf die LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 Proteinspiegel im zerebralen Kortex der Ratte

Die Effekte einer akuten Hyperammonämie auf die zerebralen Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 wurden an adulten Ratten untersucht, denen einmalig intraperitoneal 4,5 mmol/Kg Körpergewicht Ammoniumazetat (NH₄Ac) verabreicht wurde. Die Tiere wurden nach 24 h getötet, der zerebrale Kortex präpariert und für die Herstellung von Proteinlysaten verwendet. Die nachfolgenden Western Blot-Analysen zeigen, dass die Proteinspiegel von LCN2 und ASCT2 in den mit NH₄Ac-behandelten Ratten signifikant höher als in den Kontrolltieren war (Abbildung 26). Die CARM1 Proteinspiegel sinken tendenziell und die TROVE2 Proteinspiegel steigen tendenziell im zerebralen Kortex der mit NH₄Ac-behandelten Tiere an. Diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 26).

Zerebraler Kortex (Ratte)

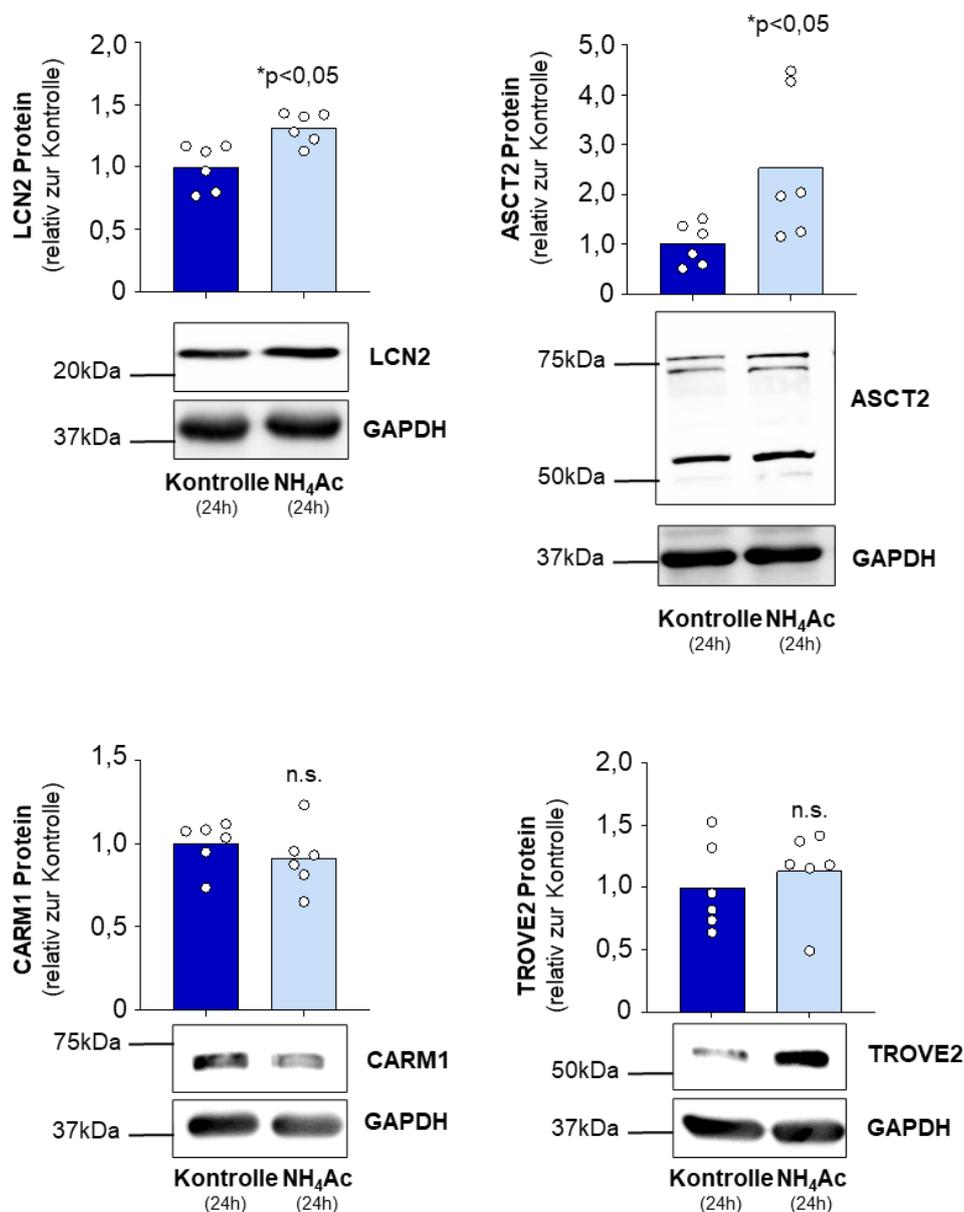


Abbildung 26: Effekte einer Ammoniumazetatbehandlung auf die Proteinspiegel von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 im zerebralen Kortex der Ratte. Quantifizierung der LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 Proteinspiegel in unbehandelten oder mit NH₄Ac (4,5 mmol/Kg Körpergewicht, 24 h) -behandelten Ratten. Proteinspiegel wurden mittels Western Blot-Analyse untersucht und densitometrischer Analyse quantifiziert. Bei den Western Blot-Analysen wurden die Signalintensitäten von LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 auf die der GAPDH normalisiert. Die Kontrollen wurden mit der Solvenz Lösung von Ammoniumazetat behandelt. Die Proteinspiegel in den Kontrollen wurden gleich 1 gesetzt und die Proteinspiegel in den mit NH₄Ac-behandelten Ratten in Relation dazu angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mithilfe des Studentischen T-Tests (2-seitige Testung) und dem Mann-Whitney-Test identifiziert. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. Jeder in den

Balkendiagrammen dargestellte Punkt entspricht einem unabhängigen Experiment (n=6). Die Daten zu LCN2, CARM1 und TROVE2 wurden publiziert in [157].

3.8 Mechanismen und potenzielle Konsequenzen durch Ammoniak veränderter LCN2, ASCT2, CARM1 und TROVE2 Proteinspiegel in kultivierten Astrozyten

3.8.1 Das Eisenionen-bindende Protein LCN2

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass die Inkubation kultivierter Rattenastrozyten mit NH_4Cl die intrazellulären Spiegel freier Eisenionen erhöht [61, 83]. Da LCN2 freies Eisen cheliert, wurde mithilfe des Eisenchelators 2',2'-Bipyridin (BIP) untersucht, ob die beobachtete Hochregulation von LCN2 Protein in den mit NH_4Cl -inkubierten Astrozyten eine Folge der Hochregulation freier Eisenionen ist.

Wie in Abbildung 27 erkennbar ist, steigerte die Inkubation kultivierter Rattenastrozyten mit NH_4Cl (5 mM, 72 h) die LCN2-Proteinspiegel im Zelllysat, wohingegen die Inkubation mit BIP (150 μM , 72 h) die basalen LCN2-Proteinspiegel verringerte. Verglichen mit den Zellen, die mit BIP behandelt wurden, waren die LCN2-Proteinspiegel in den Lysaten, die mit BIP+ NH_4Cl inkubiert wurden nicht höher, aber gegenüber den unbehandelten Astrozyten verringert.

Das LCN2-Protein war im Zellkulturmedium-Überstand der mit BIP, NH_4Cl oder BIP+ NH_4Cl inkubierten Astrozyten gegenüber der Kontrolle tendenziell, aber nicht signifikant, erhöht (Abbildung 27).

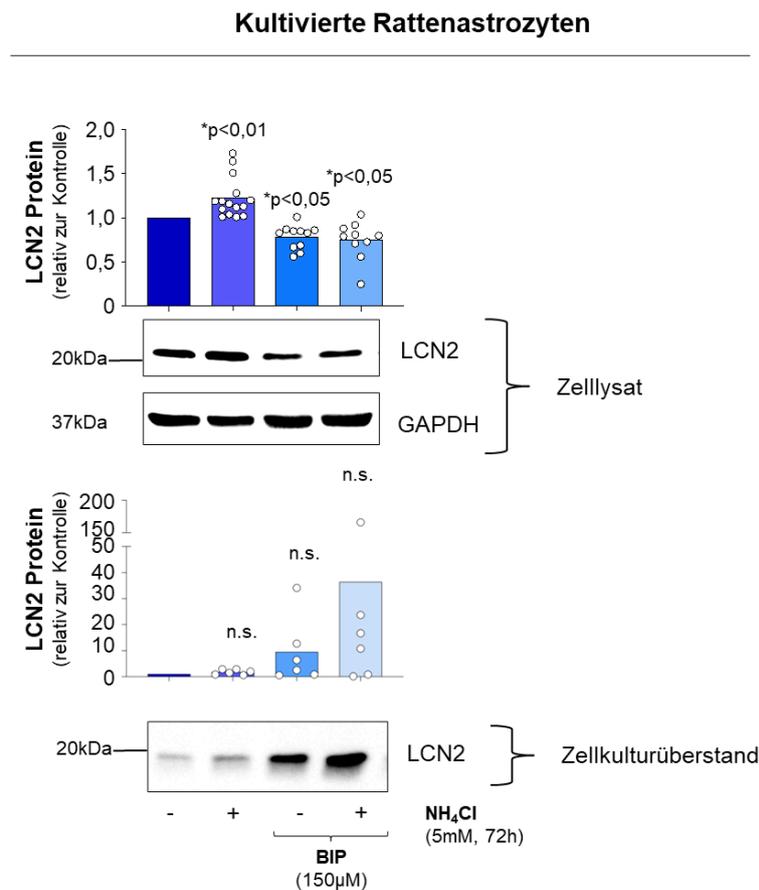


Abbildung 27: Effekte von NH₄Cl und des Eisenchelators BIP auf die Proteinspiegel von LCN2 in Proteinlysaten kultivierter Rattenastrozyten und im Zellkulturüberstand. LCN2-Protein wurde in Proteinlysaten und im Zellkulturüberstand mittels Western Blot-Analysen detektiert und die Proteinspiegel densitometrisch quantifiziert. Bei den Western Blot-Analysen der Zelllysate wurden die Signalintensitäten von LCN2 auf die der GAPDH normalisiert. Unbehandelte Kontrollen wurden auf 1 gesetzt und die Proteinspiegel in den mit BIP-behandelten Astrozyten in Relation dazu angegeben. Die Statistische Analyse wurde mittels *one-way* ANOVA, Kruskal-Wallis-Test und Friedman-Test, gefolgt von Dunn's *post hoc* durchgeführt. *: statistisch signifikant verändert gegenüber der unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant verändert. Jeder in den Balkendiagrammen dargestellte Punkt entspricht einem unabhängigen Experiment (n=6-15). Die Daten wurden publiziert in [157].

3.8.2 Der Glutamintransporter ASCT2

Frühere Studien zeigten, dass die Inkubation kultivierter Rattenastrozyten mit NH₄Cl die intrazellulären Glutamin-Spiegel erhöht und Glutamin-vermittelten oxidativen und ER-Stress sowie Seneszenz induziert [57, 61]. Hierbei wurde eine mitochondriale Glutaminolyse als Trigger für oxidativen Stress diskutiert. In nachfolgenden Experimenten wurde daher eine Beteiligung des mitochondrialen Glutamintransporters ASCT2 an der Ammoniak-vermittelten Induktion von oxidativem und ER-Stress sowie Seneszenz untersucht.

Initial wurden Effekte einer Hemmung von ASCT2 mit O-Benzyl-L-Serin (BS, 10 mM, 24 h) auf die Viabilität kultivierter Astrozyten untersucht. Wie in Abbildung 28 erkennbar ist, steigerte weder die Inkubation der Astrozyten mit NH_4Cl , BS oder beiden Substanzen die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand nach 24 h. Dies deutet darauf hin, dass weder NH_4Cl noch BS in Ab- oder Anwesenheit von NH_4Cl toxisch auf die Astrozyten wirkt.

Um die Bedeutung des ASCT2 für durch NH_4Cl -vermittelten oxidativen und ER-Stress sowie Seneszenz zu überprüfen, wurden die mRNA-Spiegel von HO1, grp78, Gadd45 α und p21 mittels qPCR gemessen. BS hemmte die durch NH_4Cl -induzierte Hochregulation von HO1, grp78 und Gadd45 α vollständig (Abbildung 28 B). Demgegenüber steigerte BS bereits in Abwesenheit von NH_4Cl die mRNA-Spiegel von p21 aber verhinderte einen weiteren durch NH_4Cl -vermittelten Anstieg (Abbildung 28 B).

Kultivierte Rattenastrozyten

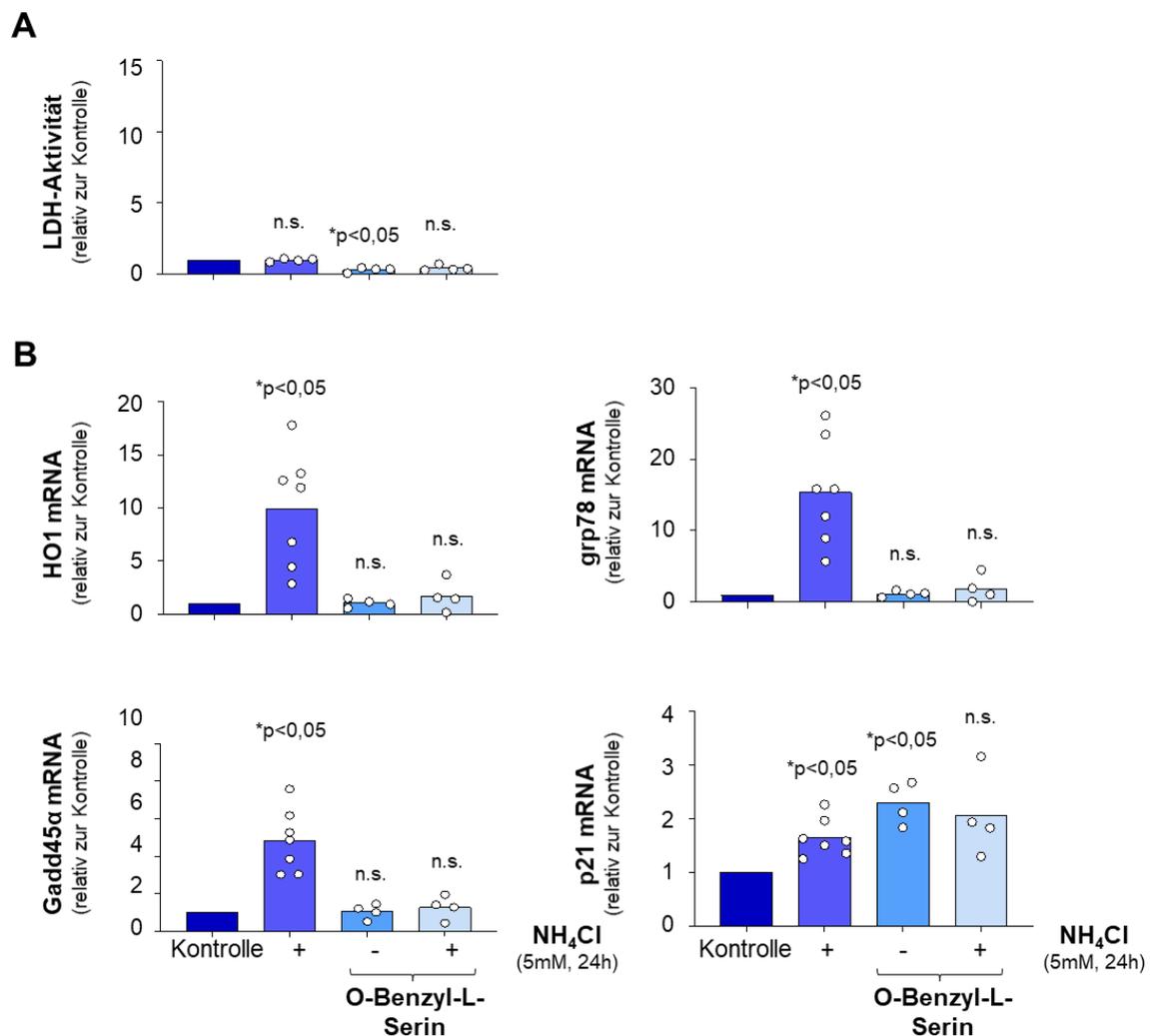


Abbildung 28: Effekte des ASCT2-Hemmstoffes O-Benzyl-L-Serin in unbehandelten und mit NH₄Cl-inkubierten Astrozyten auf die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand sowie den mRNA-Spiegeln von HO1, grp78, Gadd45α und p21. Die Zellen wurden wie angegeben mit O-Benzyl-L-Serin und oder NH₄Cl inkubiert oder blieben unbehandelt. (A) Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. (B) Quantifizierung der mRNA-Spiegel von HO1, grp78, GADD45α und p21. In jeder Probe wurden die Expressionsspiegel von HO1, grp78, p21 und Gadd45α auf die des Haushaltsgens HPRT1 normalisiert. Die Genexpressionsspiegel in den mit NH₄Cl und/oder O-Benzyl-L-Serin -behandelten Astrozyten sind relativ angegeben zu denen, die in den jeweiligen Kontrollen gefunden wurden. Die Statistische Analyse wurde mittels *one-way* ANOVA und Dunnet's *post hoc*-Test durchgeführt. *: statistisch signifikant verändert zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant verändert (n=4-7). Die Daten wurden von Olivia Knappe erhoben.

3.8.3 Die Methyltransferase CARM1

CARM1 fungiert als Co-Aktivatoren bei der Transkription spezifischer Gene und vermittelt Proliferation [64-67]. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass NH_4Cl in Rattenastrozyten *in vitro* Seneszenz induziert [57, 61]. Um zu untersuchen, ob die Herunterregulation von CARM1 in NH_4Cl -inkubierten Astrozyten die Viabilität kultivierter Astrozyten, oxidativen Stress, ER-Stress oder Seneszenz beeinflusst, wurden Rattenastrozyten in den nachfolgenden Untersuchungen *in vitro* mit CARM1-Inhibitor (CARM1^I) behandelt.

Hierfür wurden die kultivierten Astrozyten mit CARM1^I (Konzentrationen: 5 und 15 μM) für 24 h inkubiert und die Morphologie der Zellen wurde lichtmikroskopisch untersucht (Abbildung 29 A). Dabei zeigten sich in den mit dem Inhibitor inkubierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle auffällige morphologische Veränderungen. Die Zellkörper sind in den mit CARM1^I-behandelten Zellen abgerundet, zusammengezogen und kontrastreicher. Bei Verwendung von 15 μM CARM1^I war die Wachstumsfläche nicht mehr konfluent bewachsen und es waren deutliche Lücken im Zellrasen erkennbar.

Toxische Effekte der CARM1-Inhibition wurden durch Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand bestimmt. Während 5 μM CARM1^I keinen Effekt ausübte, steigerte 15 μM CARM1^I die LDH-Aktivität in den Zellkulturüberständen der Astrozyten mehr als 5-fach gegenüber den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 29 B).

In weiteren qPCR-Untersuchungen wurden Effekte von CARM1^I auf die Expression von Surrogatmarkern für oxidativen (HO1) und ER-Stress (grp78) und Seneszenz (p21, GADD45 α) untersucht. Die Inkubation der Astrozyten mit 5 und 15 μM CARM1^I steigerte die mRNA-Spiegel von HO1, grp78 und p21, aber nicht der von GADD45 α (Abbildung 29 C).

In einem weiteren Versuch wurde die Bildung des fluorogenen C_{12} -FDG durch die SA- β -Gal in mit 5 μM CARM1^I (24 h) inkubierten Astrozyten in einer Lebendzellfärbung untersucht. Die C_{12} -FDG-Fluoreszenz war in den mit CARM1^I-behandelten Astrozyten signifikant erhöht gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 29 D).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Inhibition von CARM1 die Morphologie der Astrozyten verändert und die Expression von Surrogatmarkern für oxidativen- und ER-Stress steigert und in der höheren Konzentration von 15 μM zytotoxisch auf die Astrozyten wirkt.

Kultivierte Rattenastrozyten

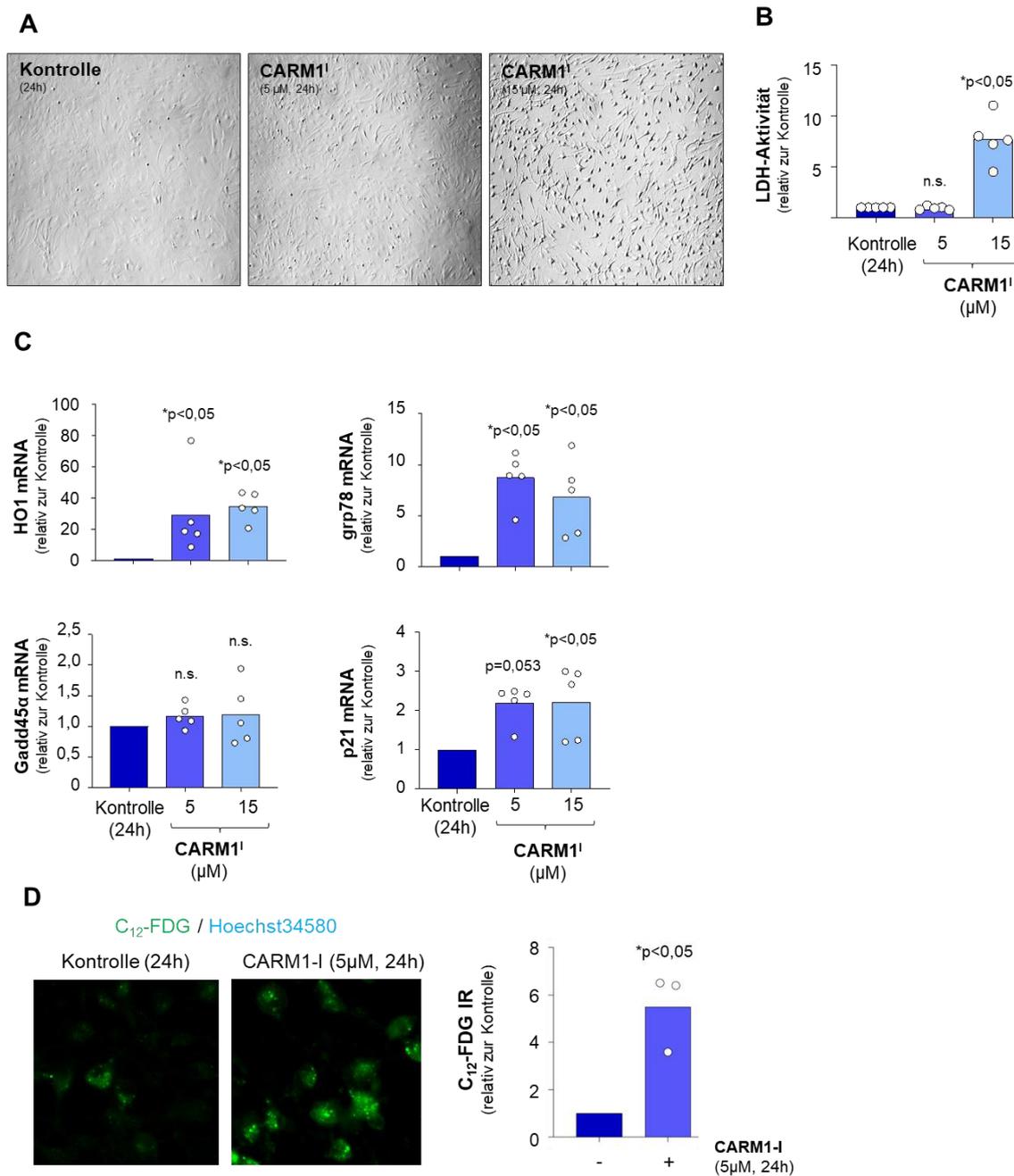


Abbildung 29: Effekte einer CARM1-Inhibition auf die Zellmorphologie, LDH-Freisetzung und mRNA-Spiegel von Surrogatmarkern von oxidativem und ER-Stress sowie Seneszenz in kultivierten Rattenastrozyten. Astrozyten wurden mit dem CARM1-Inhibitor (CARM1^I, 5 und 15 μ M) für 24 h inkubiert. (A) Lichtmikroskopische Analyse der Zellmorphologie. (B) Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. (C) Quantifizierung der mRNA-Spiegel von HO1, grp78, GADD45 α . Und p21. In jeder Probe wurden die Expressionsspiegel von HO1, grp78, p21 und Gadd45 α auf die des Haushaltsgens HPRT1 normalisiert. Die Genexpressionsspiegel in den mit CARM1^I-behandelten Astrozyten sind relativ angegeben zu denen, die in den jeweiligen Kontrollen gefunden wurden. (D) Fluoreszenzmikroskopische Analyse von C₁₂-FDG und Quantifizierung der Fluoreszenz bei Normalisierung auf die Zellzahl. Die unbehandelte Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Statistik: ANOVA mit multiplem Vergleich und Friedman-Test (Dunn's und Dunnett's *post hoc*-Test)

und 2-seitigem Studentischen T-Test. *: statistisch signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle. Jeder in den Balkendiagrammen dargestellte Punkt entspricht einem unabhängigen Experiment (n=3-5). Die Daten wurden publiziert in [157].

3.8.4 Das RNA-bindende Protein TROVE2

In folgenden Untersuchungen wurde eine mögliche Bedeutung des RNA-bindenden Proteins TROVE2 für durch Ammoniak-induzierten oxidativen und ER-Stress sowie Seneszenz in kultivierten Rattenastrozyten untersucht. Hierfür wurde TROVE2 in den Astrozyten mithilfe von siRNA herunterreguliert. Dafür wurden Zellen für 24 h entweder mit Kontroll-siRNA (AllStars) oder der gegen TROVE2 gerichteten siRNA inkubiert. Nachfolgend wurden die Astrozyten für 24 oder 72 h mit NH₄Cl (5 mM) inkubiert (Abbildung 30 A). Diese Behandlung steigerte die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand nicht (Abbildung 30 B).

qPCR-Untersuchungen zeigten, dass der Knockdown von Trove2 die Trove2 mRNA nach 24 h und die TROVE2 Proteinspiegel nach 72 h verminderte und die durch NH₄Cl (5 mM)-induzierte Steigerungen der Trove2 mRNA und des TROVE2 Proteins vollständig hemmte (Abbildung 30 A). Diese Behandlung hatte keinen Einfluss auf die durch NH₄Cl-gesteigerten mRNA-Spiegel von HO1, grp78, p21 und Gadd45 α (Abbildung 31).

Diese Ergebnisse zeigen, dass weder NH₄Cl noch eine siRNA-vermittelte Herunterregulation von TROVE2 noch die Kombination von beiden zytotoxisch auf die Astrozyten wirkt und dass eine Herunterregulation von TROVE2, die durch NH₄Cl-induzierte Hochregulation von oxidativen und ER-Stress Markern nicht hemmt.

Kultivierte Rattenastrozyten

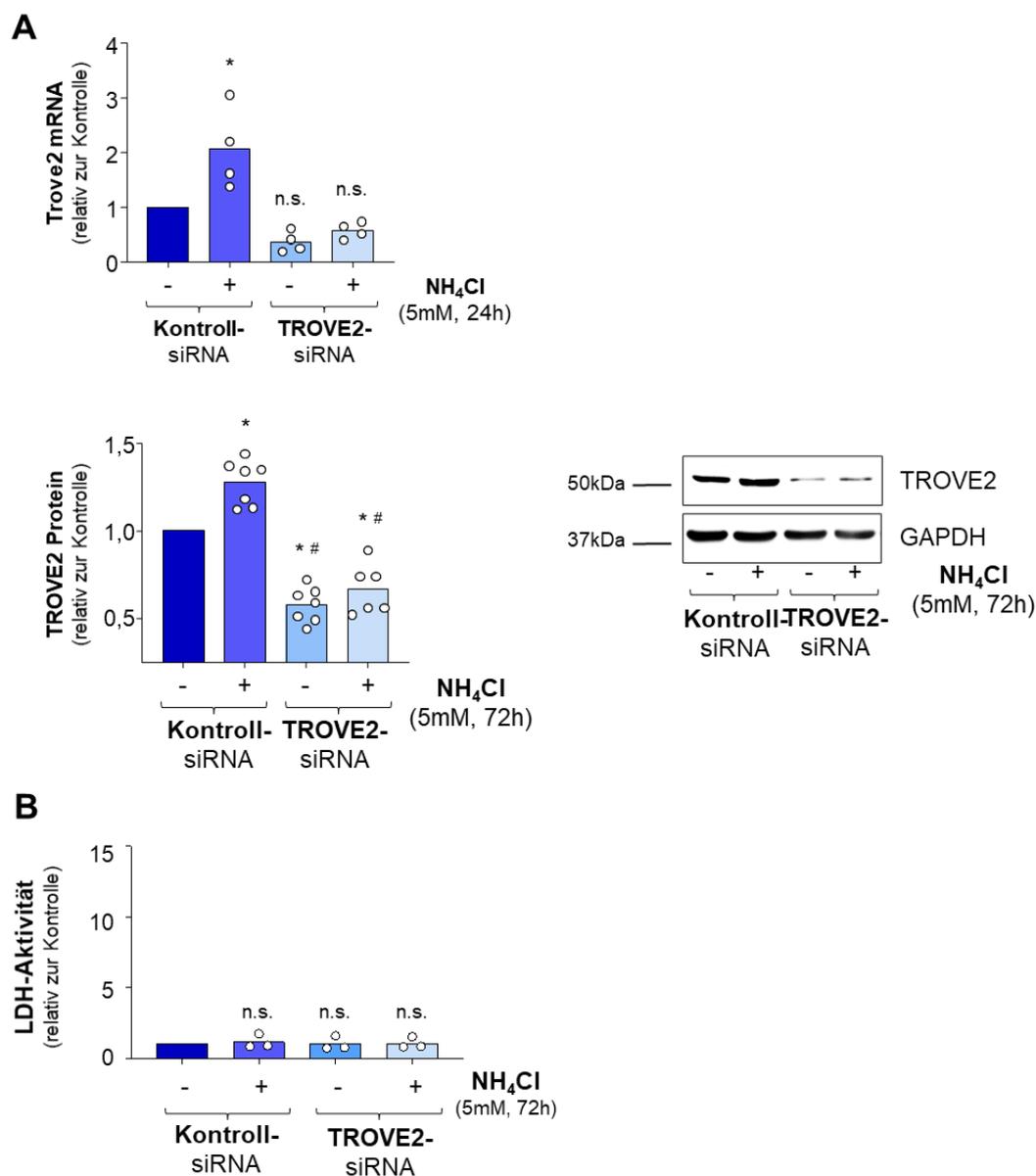


Abbildung 30: Effekte eines TROVE2-Knockdowns mittels TROVE2-siRNA in unbehandelten und mit NH₄Cl-inkubierten Astrozyten auf die LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. (A) Die Astrozyten wurden mit siRNA gegen TROVE2 oder mit Kontroll-siRNA (AllStars) für 24 h inkubiert und entweder unbehandelt oder mit 5 mM NH₄Cl für weitere 24 h oder 72 h inkubiert. Die Quantifizierung von TROVE2 mRNA- oder Proteinspiegel erfolgte durch qPCR oder Western Blot-Analysen. Proteinspiegel wurden mittels Western Blot- und densitometrischer Analyse quantifiziert. Bei den Western Blot-Analysen wurden die Signalintensitäten von TROVE2 auf die der GAPDH normalisiert. Kontroll-siRNA-behandelte Astrozyten wurden auf 1 gesetzt und die Proteinspiegel in den anderen Experimenten relativ dazu angegeben. (B) Bestimmung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. Statistik: *one-way* ANOVA mit Friedman-Test gefolgt vom Dunnet's *post hoc* multiplem Vergleichstest. *: statistisch signifikant verändert zur unbehandelten Kontrolle. n.s. nicht statistisch signifikant verändert zur Kontrolle. #: statistisch signifikant verändert zu NH₄Cl und Kontroll-siRNA-behandelten Astrozyten. n.s.: nicht statistisch signifikant verändert

zur Kontrolle. Jeder in den Balkendiagrammen dargestellte Punkt entspricht einem unabhängigen Experiment (n=3-7). Die Daten wurden publiziert in [157].

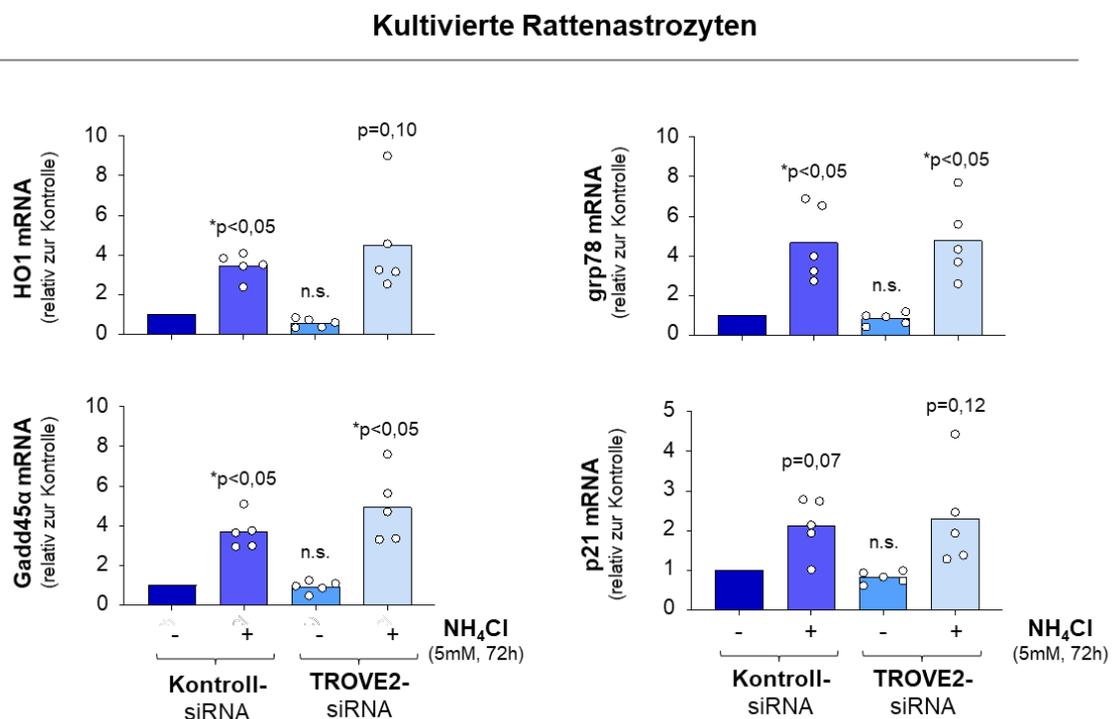


Abbildung 31: Effekte eines TROVE2-Knockdowns mittels TROVE2-siRNA auf die mRNA-Spiegel von Surrogatmarkern für oxidativem und ER-Stress in kultivierten Rattenastrozyten. Die Zellen wurden wie angegeben mit siRNA gegen TROVE2 oder mit Kontroll-siRNA (AllStars) für 24 h inkubiert und blieben entweder unbehandelt oder wurden mit 5 mM NH₄Cl für weitere 72 h inkubiert. Quantifizierung der mRNA-Spiegel von HO1, grp78, GADD45α und p21. In jeder Probe wurden die Expressionsspiegel von HO1, grp78, p21 und Gadd45α auf die des Haushaltsgens HPRT1 normalisiert. Die mRNA-Spiegel sind relativ angegeben zu den mit AllStars siRNA-transfizierten Kontrollen. Statistik: *one-way* ANOVA mit Messwiederholung und Geisser-Greenhouse Korrektur, gefolgt durch Dunnet's *post hoc* multiplem Vergleichstest. *: statistisch signifikant verändert zur unbehandelten Kontrolle. n.s.: nicht signifikant verändert. Jeder in den Balkendiagrammen dargestellte Punkt entspricht einem unabhängigen Experiment (n=4-7). Die Daten wurden publiziert in [157].

In weiteren Untersuchungen wurden Effekte eines TROVE2-Knockdowns auf durch NH₄Cl-induzierte Veränderungen des Proteoms in kultivierten Astrozyten untersucht (detaillierte Informationen zu den Ergebnissen sind im Anhang in den Tabellen 5, 6 vorhanden). Hierfür wurden Proteinlysate kultivierter Astrozyten einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen.

Die prozentualen Anteile hoch- oder herunterregulierter Proteine sind in Kuchendiagrammen dargestellt (Abbildung 32 A). Die Proteine, die nach NH_4Cl -Inkubation entweder in den mit Kontroll- oder TROVE2-siRNA transfizierten Zellen in signifikant geringerem oder größerem Umfang gefunden wurden, sind jeweils in den Vulkanplots grün oder rot dargestellt. Es wurden insgesamt 2401 Proteine in dieser Proteomanalyse detektiert (Abbildung 32 A).

Durch NH_4Cl in den mit Kontroll- oder TROVE2-siRNA transfizierten Zellen nicht bzw. quantitativ veränderte Proteine sind in Venn-Diagrammen in Abbildung 32 B dargestellt. Die Spiegel von 71 Proteinen wurden durch NH_4Cl ausschließlich in den mit Kontroll-siRNA-behandelten Astrozyten verändert. Davon waren 36 signifikant verringert und 35 signifikant erhöht im Vergleich zu den unbehandelten Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Die Spiegel von 84 Proteinen wurden durch NH_4Cl gleichsam in den mit Kontroll- oder TROVE2-siRNA-behandelten Zellen verändert. Davon waren 27 signifikant verringert und 57 signifikant erhöht.

56 Proteine waren exklusiv in den mit TROVE2-siRNA transfizierten Zellen signifikant verändert nach NH_4Cl -Inkubation. Davon waren die Spiegel von 23 signifikant verringert und von 33 signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle.

Die in TROVE2-siRNA transfizierten Zellen durch NH_4Cl quantitativ veränderten Proteine sind insbesondere an der „RNA- und DNA-Prozessierung“ beteiligt (Abbildung 32 C).

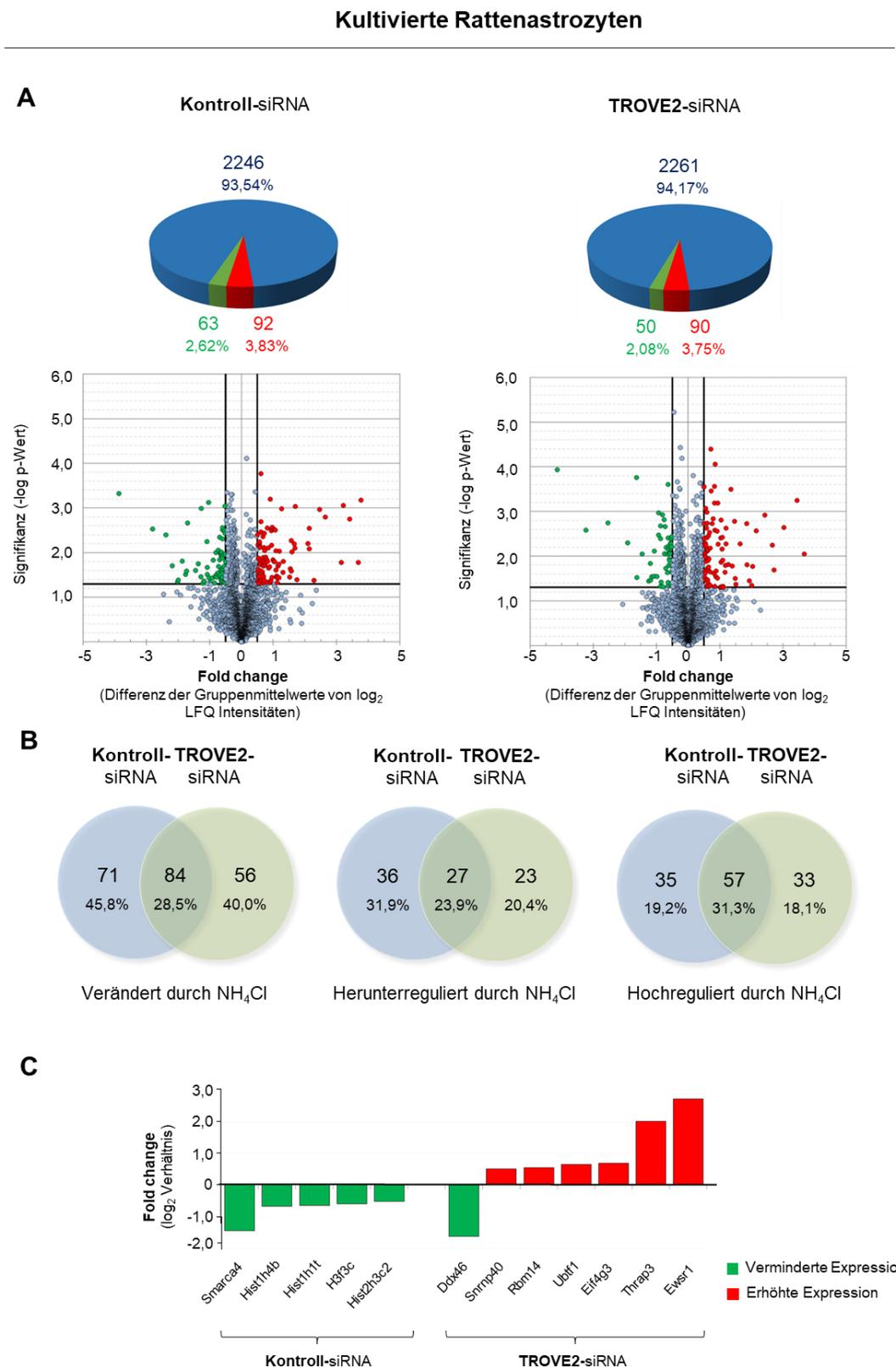


Abbildung 32: Effekte eines TROVE2-Knockdowns auf durch NH₄Cl-herbeigeführte Veränderungen im Proteom kultivierter Rattenastrozyten. Die Astrozyten wurden inkubiert für 24 h mit gegen TROVE2 gerichtete siRNA oder mit Kontroll-siRNA (AllStars) und blieben nachfolgend entweder unbehandelt oder wurden mit 5 mM NH₄Cl für weitere 72 h inkubiert.

Proteinspezies wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert und quantifiziert. (A) Effekte des siRNA-vermittelten Knockdowns von TROVE2 auf NH_4Cl -induzierte Veränderungen im Proteom. In den mit NH_4Cl -inkubierten Astrozyten quantitativ verändert gefundene Proteine sind relativ zu denen in der unbehandelten Kontrolle angegeben und in einem Kuchendiagramm (A, oben) und in einem Vulkanplot (A, unten) dargestellt. Jeder Punkt im Vulkanplot repräsentiert ein spezifisches Protein (A, unten). Proteine, die quantitativ geringer oder höher in den mit NH_4Cl -inkubierten Astrozyten gefunden wurden, sind durch grüne oder rote Punkte dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde durch eine $\geq 0,5$ -fache Veränderung gegenüber der jeweiligen unbehandelten Kontrolle und einem p-Wert $\leq 0,05$ ($n=4$; 2-seitiger Studentischer T-Test) festgelegt. (B) Vergleich von durch NH_4Cl -induzierten Änderungen der Proteinspiegel in mit Kontroll- oder mit TROVE2-siRNA-behandelten Astrozyten. (C) Proteine, die an der Transkription, Prozessierung und dem Transport von RNA beteiligt sind und deren Spiegel exklusiv durch NH_4Cl in mit Kontroll- oder TROVE2-siRNA inkubierten Astrozyten verändert war. Die Daten wurden publiziert in [157].

In weiteren Untersuchungen wurde überprüft, ob das in die RNA-Qualitätskontrolle involvierte Protein TROVE2 die intrazellulären Spiegel oxidierter RNA beeinflusst.

Hierfür wurden analog zu den oben beschriebenen Versuchen kultivierte Rattenastrozyten mit Kontroll (AllStars)- und TROVE2-siRNA und nachfolgend mit NH_4Cl (5 mM, 72 h) inkubiert. Danach wurde in den Zellen oxidierte DNA und oxidierte RNA durch Anfärbung mit einem Antikörper detektiert, der gegen 8-OH(d)G und 8-OHG gerichtet ist. Gegenüber den mit AllStars-siRNA inkubierten Kontrollen wurde in den mit TROVE2-siRNA inkubierten Zellen eine erhöhte 8-OH(d)G-Immunreaktivität gefunden (Abbildung 33). In vielen der mit TROVE2 siRNA-inkubierten Zellen war eine auffällige Änderung der Zellkernmorphologie beobachtbar. Diese Kerne waren kleiner und zirkulär gegenüber der eher „bohnenförmigen“ Morphologie, die in den Kontrollen beobachtet wurden und wie sie charakteristisch sind für pyknotische Zellkerne (Abbildung 33).

Kultivierte Rattenastrozyten

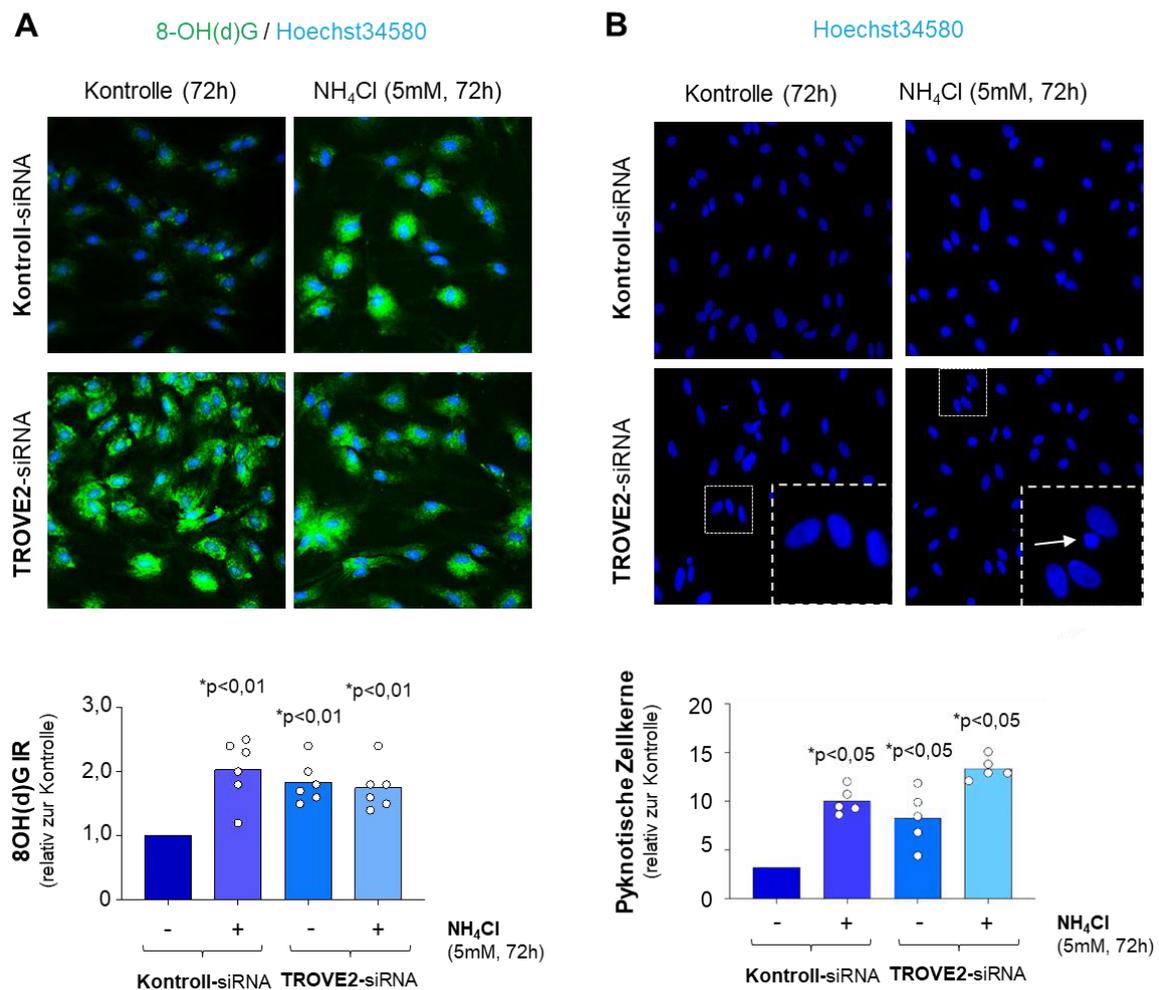


Abbildung 33: Effekte eines siRNA-vermittelten Knockdowns von TROVE2 in unbehandelten und mit NH₄Cl-inkubierten Astrozyten auf die Oxidation von RNA und die Zellkernmorphologie. Die Astrozyten wurden inkubiert für 24 h mit gegen TROVE2 gerichteter siRNA oder mit Kontroll-siRNA (AllStars) und blieben nachfolgend entweder unbehandelt oder wurden mit 5 mM NH₄Cl für weitere 72 h inkubiert. (A) Die Zellen wurden fixiert und nachfolgend mit einem gegen 8OH(d)G-gerichteten Antikörper und mit Hoechst34580 inkubiert. Ein repräsentatives Bild aus drei unabhängigen Experimenten für jede Bedingung ist gezeigt. Die 8OH(d)G-Immunreaktivitäten wurden quantifiziert und auf die Zellzahl normalisiert. (B) Darstellung der Zellmorphologie in der Übersicht und nach Vergrößerung durch Aufnahme der Hoescht34580 Fluoreszenz. Ein morphologisch veränderter Zellkern ist durch einen weißen Pfeil exemplarisch markiert. Die unbehandelten Kontrollen wurden gleich 1 gesetzt. Statistik: *one-way* ANOVA mit Messwiederholung, gefolgt durch Dunnet's multiplen Vergleich *post hoc*-Test *: statistisch signifikant verändert zur unbehandelten Kontrolle. Jeder in den Balkendiagrammen dargestellte Punkt entspricht einem unabhängigen Experiment (n=5-6). Die Daten wurden publiziert in [157].

3.9 Lcn2, Asct2, Carm1 und Trove2 mRNA-Spiegel in humanen *post mortem* Hirnproben von Zirrhose Patienten mit und ohne HE

Die mRNA-Spiegel von Lcn2, Asct2, Carm1 und Trove2 wurden in *post mortem* Hirnen von Zirrhose Patienten mit und ohne HE in Datensätzen untersucht, die aus zwei Transkriptomanalysen vorheriger Arbeiten hervorgegangen sind [72, 80]. Dabei wurden zwei unterschiedliche Patientenkohorten untersucht und entsprechend der Probenherkunft der HE-Patienten als „europäische“ (Abbildung 34 A) oder „australische“ Kohorte (Abbildung 34 B) benannt.

Die Analyse der Transkriptomdatensätze der europäischen Kohorte zeigte gegenüber den Patienten, die frei waren von einer Leber- und Gehirnerkrankung (Kontrollen) keinen Anstieg der Lcn2 mRNA-Spiegel in den Zirrhose Patienten mit und ohne HE. Demgegenüber war die Lcn2-mRNA in den Zirrhose Patienten mit HE in der australischen Kohorte tendenziell erhöht, erreichte jedoch mit einem p-Wert von 0,07 nicht das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ (Abbildung 34 A, B).

In der europäischen Kohorte waren die Asct2 mRNA-Spiegel in den Proben der Zirrhose Patienten mit HE gegenüber den Patienten, die frei waren von einer Leber- und Gehirnerkrankung (Kontrollen) signifikant höher (Abbildung 34 A). Ein ähnlicher Trend war auch in der australischen Kohorte erkennbar, allerdings wurde mit einem p-Wert von 0,10 nicht das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ erreicht (Abbildung 34 B). Diese ist möglicherweise auf die geringe N-Zahl von 4 Proben in jeder Gruppe zurückzuführen.

Die mittleren mRNA-Spiegel von Carm1 waren in den Proben der Patienten mit Leberzirrhose mit HE in beiden Kohorten niedriger als in der jeweiligen Kontrolle (Patienten ohne Leber- und Gehirnerkrankung), aber nicht statistisch signifikant unterschiedlich (Abbildung 34 A, B).

Gegenüber den jeweiligen Kontrollen (Patienten ohne Leber- und Gehirnerkrankung), waren die mRNA-Spiegel von Trove2 signifikant erhöht in den *post mortem* Hirnproben der Zirrhose Patienten mit HE in beiden untersuchten Kohorten (Abbildung 34 A, B).

Im Vergleich zwischen den *post mortem* Hirnproben der Zirrhose Patienten mit HE und den Zirrhose Patienten ohne HE gab es keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Spiegeln von Lcn2, Asct2, Carm1 und Trove2 in beiden untersuchten Kohorten (Abbildung 34 A, B).

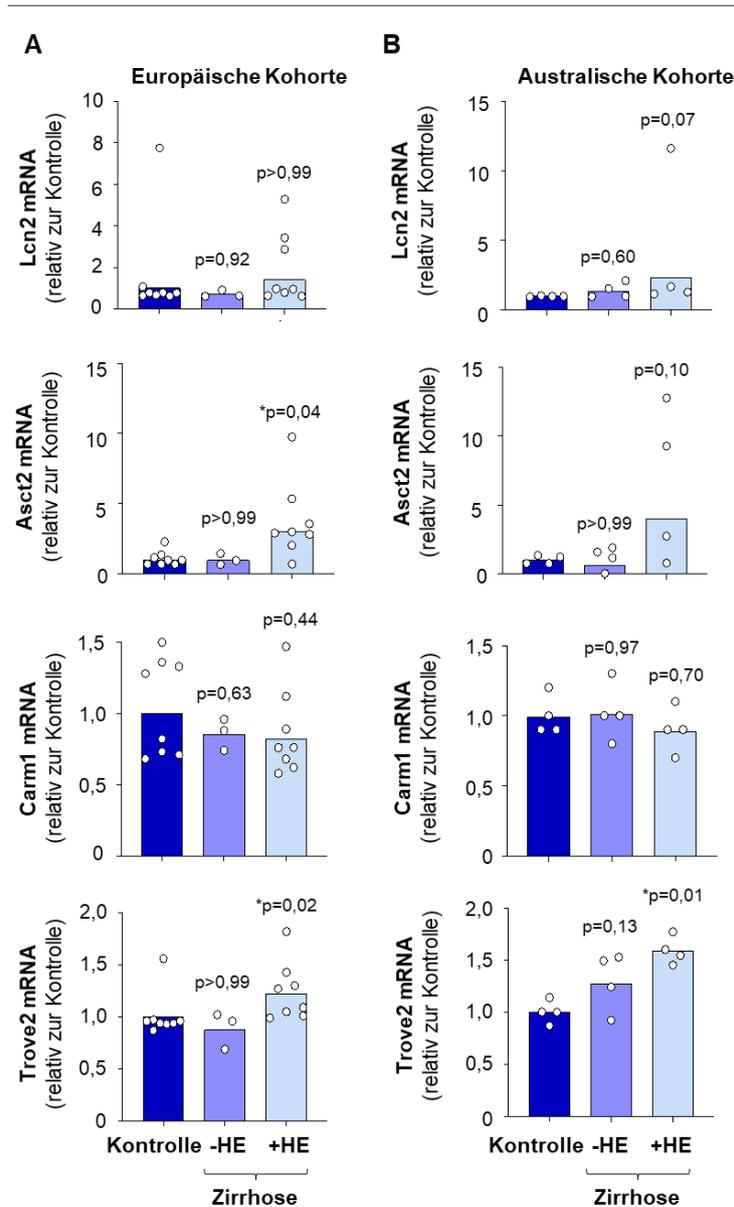
Humane *post mortem* Hirnproben

Abbildung 34: Expression von Lcn2, Asct2, Carm1 und Trove2 mRNA-Spiegel in humanen *post mortem* Hirnproben von Kontrollen und Patienten mit Leberzirrhose mit oder ohne HE. Die Lcn2, Asct2, Carm1 und Trove2 mRNA-Spiegel wurden durch Reanalyse von 2 vorhandenen Transkriptomdatensätzen, die aus Proben gewonnen wurden, die aus unabhängigen Kohorten stammten. Das Gehirngewebe wurde dem zerebralen Kortex entnommen, entweder an der Grenze parietaler/ occipitaler Kortex („europäische“ Kohorte) (A) oder dem *Gyrus fusiformis* („australische“ Kohorte) (B). Die mRNA-Spiegel aller Proben wurden normalisiert auf das geometrische Mittel der Kontrollgruppe. Die p-Werte wurden berechnet mit *one-way* ANOVA und multiplem Vergleich, gefolgt von Tukey's *post hoc*-Test oder Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Dunn's *post hoc*-Test (n=3-8). Die Daten zu Lcn2, Carm1 und Trove2 wurden publiziert in [157].

4 Diskussion

4.1 Quantitativ veränderte mRNA- und Protein-Spezies im zerebralen Kortex, Hippocampus und Zerebellum der LGS-KO-Maus

Bislang sind in der Literatur nur wenige Befunde zu quantitativen Änderungen von mRNA- und Proteinspezies im Gehirn der LGS-KO-Maus zu finden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels Transkriptom- und Proteomanalysen umfassende Änderungen im Transkriptom und Proteom zu identifizieren. Insgesamt wurden 214, 44 und 163 mRNA-Spezies sowie 4, 36 und 15 Proteine gefunden, die quantitativ signifikant im zerebralen Kortex, dem Hippocampus oder dem Zerebellum der LGS-KO-Maus verändert waren. Diese Unterschiede waren Hirnregionen-spezifisch und bislang völlig unbekannt.

Dabei waren die Ergebnisse der Transkriptom- und Proteom-Untersuchungen nicht kongruent. Die meisten korrespondierenden Proteine, die in unterschiedlicher Quantität im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus nachgewiesenen mRNA-Spezies, wurden nicht in der massenspektrometrischen Analyse gefunden. Nur 21 Proteinprodukte der 214 veränderten mRNA-Spezies konnten auch in der massenspektrometrischen Analyse charakterisiert werden. Diese waren aber quantitativ gegenüber den WT-Kontrollen unverändert. In der Proteomanalyse der Proben aus dem Hippocampus konnten die zu den 44 veränderten mRNA-Spezies korrespondierenden Proteine nicht identifiziert werden. Auch im Zerebellum wurden die meisten korrespondierenden Proteine zu den quantitativ unterschiedlich im Zerebellum der LGS-KO-Maus gefundenen mRNA-Spezies nicht in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert. Nur 14 Proteinprodukte der 163 veränderten mRNA-Spezies wurden auch in der Proteomanalyse gefunden. Diese waren jedoch quantitativ gegenüber den WT-Kontrollen nicht verändert.

Zu den 4 Protein-Spezies, die quantitativ unterschiedlich im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus vorlagen, wurden auch die korrespondierenden mRNA-Spezies in der Transkriptomanalyse gefunden. Von den 36 quantitativ unterschiedlich im Hippocampus der LGS-KO-Maus gegenüber dem WT gefundenen Protein-Spezies, wurden von 32 auch die korrespondierenden mRNAs in der Genarray-Analyse gemessen. In den Proben aus dem Zerebellum wurden von den 15 in den LGS-KO-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen quantitativ unterschiedlichen Proteinen, von insgesamt 13 Protein-Spezies die jeweils korrespondierende mRNA-Spezies in der Genarray-Analyse identifiziert.

Diese Ergebnisse könnten darauf zurückzuführen sein, dass die Genexpressionsänderungen nicht auf Proteinebene sichtbar werden oder die quantitative Änderung der Proteine auf posttranskriptionellen Mechanismen beruht. Darüber hinaus könnten die uneinheitlich vorgefundenen quantitativen Änderungen der Protein- und jeweiligen mRNA-Spezies auch fehlerhaften Ergebnissen der Transkription- bzw. Proteomanalyse oder unterschiedlichen Sensitivitäten der verwendeten Techniken zugesprochen werden.

Daher müssen im Einzelfall, so wie es in der vorliegenden Arbeit getan wurde, die in der Transkriptom- und Proteomanalyse gefundenen Änderungen für jede Spezies durch alternative Methoden wie qPCR bzw. Western Blot-Analyse überprüft werden. Die Analysen zeigten für die ausgewählten mRNA- und Protein-Spezies ASCT2 und LCN2 bzw. CARM1 und TROVE2, dass die im Genchip bzw. der Transkriptomanalyse gefundenen Änderungen in der LGS-KO-Maus nur teilweise bestätigt werden konnten. Während die an den Proben aus dem zerebralen Kortex gewonnenen Ergebnisse prinzipiell bestätigt werden konnten, waren die Ergebnisse der qPCR und des Western Blot mit Proben aus den anderen Hirnregionen teilweise nicht deckungsgleich mit den Daten der Transkriptom- und Proteomanalysen.

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde mit Proben aus dem zerebralen Kortex gearbeitet, da Störungen im zerebralen Kortex für kognitive Beeinträchtigungen bei der HE bedeutsam sein können.

4.2 Im Gehirn der LGS-KO-Maus veränderte biologische Prozesse

Die biologischen Prozesse, die den identifizierten Genexpressionsänderungen in der LGS-KO-Maus zugrunde liegen, stehen im Zusammenhang mit bereits etablierten Pathomechanismen der HE wie oxidativem Stress [86, 158], ER Stress [77, 159], Zellproliferation [61, 62, 160], Energie- [113] und Eisenmetabolismus [61].

In Übereinstimmung damit, sind Surrogatmarker für oxidativem Stress wie oxidierte RNA und Proteintyrosinnitrierung im zerebralen Kortex, dem Hippocampus und dem Zerebellum der LGS-KO-Maus gegenüber den WT-Kontrollen erhöht [131].

Die Untersuchungen der Proteom- und Transkriptomanalysen der vorliegenden Arbeit, die am Mausgehirn durchgeführt wurden, zeigen außerdem keine Veränderungen, die auf das Vorliegen einer zerebralen Inflammation hinweisen. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen

von Qvartskhava *et al.* [131] überein, die unveränderte mRNA- und Proteinspiegel der Mikrogliaaktivierungsmarker *Cluster of differentiation* (CD14) und dem *Ionized calcium-binding protein 1* (Iba1) und der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukine (IL) IL-1 β , IL6 und TNF- α im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus zeigen. Wie die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit außerdem zeigen, waren diese Marker auch im Hippocampus oder dem Zerebellum der LGS-KO-Mäuse unverändert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass bei den LGS-KO-Mäusen keine Neuroinflammation in diesen Hirnregionen vorliegt.

In einer früheren Arbeit von Chepkova *et al.* wurden an LGS-KO-Mäusen Untersuchungen zur synaptischen Plastizität und Neurotransmission durchgeführt, bei denen reduzierte Amplituden der *Long-term potentiation* (LTP) im Hippocampus und Striatum gefunden wurden.

In dieser Studie wurden signifikant verringerte mRNA-Spiegel der *N-methyl-D-aspartate receptor* (NMDAR)-Rezeptoruntereinheit GluN2B-mRNA im Hippocampus gefunden, welche die reduzierte *High-frequency stimulation-induced long-term potentiation* (HFS-LTP) im Hippocampus der LGS-KO-Maus und die beeinträchtigte synaptische Plastizität erklären [133]. Daneben wurden weitere Gene gefunden (mGluR1, A1R, B2m und HSP90), deren mRNA-Spiegel im Hippocampus der LGS-KO-Mäuse verändert waren [133].

Diese Unterschiede wurden in der hier vorliegenden Genarray-Analyse im Hippocampus jedoch nicht gefunden. Dies erklärt sich am ehesten dadurch, dass im Gegensatz zu den Genarray-Analysen, die quantitative mRNA-Analyse mittels qPCR, wie sie in der Chepkova-Arbeit durchgeführt wurden, bekanntermaßen erheblich sensitiver ist [161]. Die geringe Sensitivität von Genarray-Analysen erklärt möglicherweise auch die auffällig geringe Anzahl an Unterschieden im hippocampalen Transkriptom der LGS-KO-Mäuse, die in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden.

In der Arbeit von Chepkova *et al.* wurden zusätzlich im Striatum veränderte mRNA-Spiegel des *D1 dopamine receptor* (D1R), des *Type 1 muscarinic cholinergic receptor* (M1R) und des *Choline-acetyl-transferase* (ChAT) gefunden, welche möglicherweise die beeinträchtigte corticostriale Neurotransmission in den Gehirnen der LGS-KO-Mäuse erklärt [133].

Neben dem globalen Hirnregionen-spezifischem Vergleich quantitativer Änderungen von mRNA und Protein im Gehirn der LGS-KO-Mäuse konnte eine potenzielle Bedeutsamkeit

der selektierten Kandidaten im Hinblick auf etablierte Pathomechanismen der HE nachgewiesen werden.

4.3 Regulation des LCN2-Proteins durch intrazelluläre freie Eisenionen

In allen untersuchten Hirnregionen der LGS-KO-Maus lag die *Lcn2* mRNA quantitativ deutlich höher vor als in den WT-Kontrollen. Da der Eisenchelator LCN2 ein in den zellulären Eisenmetabolismus involviertes Protein ist und Ammoniak die intrazelluläre Eisenhomöostase beeinträchtigt und einen Anstieg der Spiegel an freien Eisenionen in den Astrozyten induziert, wurde LCN2 weitergehend untersucht.

In vitro Untersuchungen an kultivierten Rattenastrozyten zeigten eine signifikante Erhöhung der Proteinspiegel von LCN2 nach Ammoniak-Inkubation. Dies spricht dafür, dass eine systemische Hyperammonämie auch im Gehirn der LGS-KO-Mäuse für die dort beobachtete LCN2-Hochregulation verantwortlich sein könnte. Die basalen Expressionsspiegel wie auch die Ammoniak-induzierte Heraufregulation des LCN2-Proteins wurde vollständig durch den Eisenchelator BIP gehemmt.

Dies deutet daraufhin, dass die intrazellulären Spiegel an freien Eisenionen die Proteinspiegel von LCN2 beeinflussen. In diesem Sinne kann vermutet werden, dass die durch Ammoniak gesteigerten Spiegel an freien Eisenionen in den Astrozyten einen Anstieg der LCN2 Proteinspiegel vermitteln. LCN2 könnte freie Eisenionen chelieren und darüber die Spiegel an freien Eisenionen absenken.

Frühere Untersuchungen lassen vermuten, dass der Eisenionenexport über Ferroportin in den Astrozyten durch Ammoniak gehemmt wird [61]. Interessanterweise konnte das LCN2-Protein nach Behandlung der Zellen mit Eisenchelatoren erhöht im Zellkulturmedium und verringert in der Zelle nachgewiesen werden. Der Grund hierfür ist gegenwärtig unklar, aber es kann vermutet werden, dass über die Sekretion von LCN2 die Zelle dem Mangel an Eisenionen in der Zelle entgegenwirkt. Dies spricht auch dafür, dass die Hochregulation von LCN2 in der Zelle durch Ammoniak einen Schutzmechanismus darstellt, um überschüssiges Eisen zu binden. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da ungebundene Eisenionen über oxidativen Stress Seneszenz in Astrozyten induzieren [57, 61]. Die Steigerung der

LCN2-Proteinmenge in Astrozyten kann daher auch als Schutzmechanismus interpretiert werden, der Ammoniak-induzierter Seneszenz entgegenwirkt [61].

LCN2 ist ebenfalls an synaptischer Plastizität beteiligt und ein Knockdown von LCN2 führt zu gesteigertem Angstempfinden bei Mäusen [107, 109]. Damit könnten die erhöhten LCN2-Protein- und mRNA-Spiegel im zerebralen Kortex der LGS-KO-Mäuse das in früheren Untersuchungen bereits gefundene verringerte Angstempfinden der LGS-KO-Mäuse im „O-Maze“-Test erklären [131].

Eine Reihe von Studien belegt, dass erhöhte Spiegel an freien Eisenionen im Gehirn neurodegenerative Erkrankungen und Alterungsprozesse induzieren [98]. Dieser Mechanismus wird kausal für Beeinträchtigungen der kognitiven Fähigkeiten und Motorfunktionen bei Alzheimer, Parkinson und Huntington angenommen [162-164]. Auch eine erhöhte Eisenakkumulation in Gehirnen von Patienten mit Acaeruloplasminämie beeinträchtigt astrogliale und neuronale Funktionen und steht im Zusammenhang mit Neurodegeneration [165, 166].

Interessanterweise zeigen die bioinformatischen Analysen der vorliegenden Studie auch erhöhte *Lcn2* mRNA-Spiegel in *post mortem* Gehirnproben von Patienten mit Leberzirrhose und HE. Bei diesen Patienten wurden bereits in einer vergangenen Studie veränderte mRNA-Spiegel von in den Eisenstoffwechsel involvierten Genen gefunden, die auf eine Störung der zerebralen Eisenhomöostase bei Patienten mit Leberzirrhose und HE hinweisen [61]. Für eine erhöhte Konzentration freier Eisenionen spricht hier insbesondere die beobachtete Hochregulation des Eisenspeicherproteins Ferritin und der aus Häm Eisenionen-freisetzenden HO1 [61].

Deshalb kann vermutet werden, dass die Hochregulation von *Lcn2* mRNA auch im Gehirn der HE-Patienten einen potenziellen Schutzmechanismus darstellt, um über die Chelierung von ungebundenen freien Eisenionen oxidativem Stress und damit Seneszenz entgegenzuwirken.

4.4 Rolle des ASCT2 für oxidativen- und ER-Stress und Seneszenz in mit Ammoniak-inkubierten Astrozyten

Die *Asct2* mRNA-Spiegel lagen im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus höher vor als in den WT-Kontrollen. Auch die Ammoniak-Inkubation kultivierter Rattenastrozyten steigerte die ASCT2 mRNA- und Proteinspiegel, was darauf hindeutet, dass eine systemische Hyperammonämie auch im Gehirn der LGS-KO-Mäuse für die dort beobachtete ASCT2 Hochregulation verantwortlich sein könnte.

Da die Bildung dieses Glutamintransporters im Gehirn gesteigert ist, wurde der ASCT2 für weitergehende Untersuchungen ausgewählt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ASCT2 im Gehirn von Maus und Ratte exprimiert wird. Eine starke Expression wurde insbesondere in Neuronen beider Nager gefunden. In der Ratte wurde zudem der ASCT2 auch in Astrozyten im zerebralen Kortex nachgewiesen. In der Maus gelang hingegen kein eindeutiger Nachweis, da eine klare Abgrenzung gegenüber dem umliegenden Gewebe nicht möglich war. Diese Daten stimmen mit denen von Gliddon *et al.* überein, die ebenfalls ASCT2 im Mausgehirn nicht in Astrozyten gefunden haben [125].

Eine Reihe von Studien belegt, dass Rattenastrozyten den ASCT2 exprimieren [167-169]. Weiterhin gibt es Befunde, die vermuten lassen, dass die Kulturbedingungen einen Einfluss auf die ASCT2 mRNA- und Proteinspiegel in kultivierten Zellen haben [170]. Dies kann ein Anhaltspunkt dafür sein, dass metabolische Faktoren die Expression des ASCT2 in Astrozyten beeinflussen. Dies ist bereits bei Tumorzellen sehr lange bekannt, die den ASCT2 aufgrund eines erhöhten Glutaminbedarfs hochregulieren [171-173].

In der vorliegenden Arbeit wurde in kultivierten Astrozyten untersucht, welche Bedeutung der ASCT2 für durch Ammoniak-induzierten oxidativen Stress und ER-Stress und Seneszenz in Astrozyten *in vitro* hat. Dies wurde durch Verwendung des ASCT2-Hemmstoffs O-Benzyl-L-Serin (BS) untersucht. BS hemmte tatsächlich die Ammoniak-induzierte Hochregulation des oxidativen Stressmarkers HO1, des ER-Stressmarkers GRP78 sowie des Seneszenz-Markers GADD45 α .

Interessanterweise wurde in der Arbeit von Yoo *et al.* gezeigt, dass ASCT2 auch in Mitochondrien exprimiert werden kann und dort als Glutaminimporter fungiert [123]. Vor dem

Hintergrund, dass die mitochondriale Glutaminolyse bedeutsam für durch Ammoniak-induzierten oxidativen Stress ist [174], lassen diese Ergebnisse es möglich erscheinen, dass der ASCT2 den Import von Glutamin in die Mitochondrien in Ammoniak-behandelten Astrozyten vermittelt. Diese Annahme müsste durch weitere Untersuchungen belegt werden.

Die Asct2 mRNA-Spiegel waren auch in den untersuchten *post mortem* Gehirnprouben von Patienten mit Leberzirrhose und HE erhöht. Da bei diesen Patienten ebenfalls eine verstärkte Glutaminbildung in den Astrozyten anzunehmen ist, könnte der ASCT2 auch in diesen Zellen hochreguliert und potenziell bedeutsam sein für oxidativen und ER-Stress sowie Seneszenz bei der HE. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diesen Zusammenhang zu verifizieren oder falsifizieren.

4.5 Die Rolle von CARM1 für oxidativen und ER-Stress sowie Seneszenz

Die Proteinspiegel der Methyltransferase CARM1 waren im zerebralen Kortex der LGS-KO-Maus im Vergleich zum WT etwa 2-fach niedriger. CARM1 fördert die Zellproliferation, indem es die p53-vermittelte Transkription von p21 und Gadd45 α blockiert [59, 60]. Zudem methyliert CARM1 Transkriptionsfaktoren, die zur Ko-Aktivierung von Genen führt, die an der Zelldifferenzierung beteiligt sind [60, 64, 65]. Damit wirkt es der Seneszenz prinzipiell entgegen.

Die *in vitro* Untersuchungen an kultivierten Rattenastrozyten zeigten, dass die Proteinspiegel von CARM1 durch Inkubation mit Ammoniak signifikant verringert werden. Dies deutet darauf hin, dass die systemische Hyperammonämie in der LGS-KO-Maus auch ursächlich für die dort beobachtete CARM1-Herunterregulation sein könnte.

Um eine potenzielle Rolle der durch Ammoniak-induzierten Herunterregulation von CARM1 für die Induktion von Seneszenz in den Astrozyten zu untersuchen, wurden *in vitro* Experimente in kultivierten Rattenastrozyten durchgeführt, in denen die CARM1-Herunterregulation durch den CARM1-Inhibitor imitiert wurde. Dies resultierte in einer Expressionssteigerung der Seneszenz-Marker p21 und GADD45 α , wie sie in ähnlicher Weise auch in den mit NH₄Cl-inkubierten Astrozyten gefunden wurde. Dieser Befund kann

dahingehend interpretiert werden, dass die in den mit NH_4Cl -inkubierten Astrozyten beobachtete Herunterregulation von CARM1 die p53-abhängige Induktion von Seneszenz nicht ausreichend blockieren kann. Um diese Möglichkeit weitergehend zu untersuchen, müsste überprüft werden, ob NH_4Cl die CARM1 vermittelte Methylierung von p53 hemmt. In Übereinstimmung mit der Rolle von CARM1 für die Transkription Zellzyklus-inhibitorischer Gene, wurde eine gesteigerte p21-Expression und eine verringerte CARM1 Expression auch bei seneszenten Zellen beobachtet [57, 175].

Interessanterweise veränderte sich die Zellmorphologie der Astrozyten erheblich und die Aktivität der LDH im Zellkulturüberstand stieg deutlich an, wenn eine hohe CARM1-Inhibitorkonzentration gewählt wurde. Dies deutet darauf hin, dass der CARM1-Inhibitor in höheren Konzentrationen toxisch auf die Astrozyten wirkt. Dies könnte einerseits durch unspezifische Effekte des Inhibitors vermittelt sein, aber andererseits könnte dies die Folge einer vollständigen Hemmung von CARM1 in den Astrozyten sein und darauf hindeuten, dass CARM1 für die Vitalität der Astrozyten essenziell ist. Die letztere Vermutung erscheint aber fraglich, da bislang in CARM1-KO-Mäuse keine zerebralen Beeinträchtigungen beobachtet wurden [66, 176, 177].

Auch die durch Ammoniak-induzierte Heraufregulation der HO1, welche wiederum die Expression des ER-Stressmarkers GRP78 steigert [61], konnte alleinig durch Inkubation des CARM1-Inhibitors erzielt werden. Damit aktiviert CARM1-Inhibitor einen ähnlichen Signalweg, der in die Seneszenz der Astrozyten mündet, wie die Inkubation der Zellen mit NH_4Cl .

Interessanterweise wird die Transkription von GRP78 durch die Histon-Acetyltransferase p300 vermittelt [178], die als bekanntes Substrat der CARM1 gilt und eine Komplexbildung der transkriptionellen Aktivität von p300 entgegenwirkt [179]. Damit könnten die durch NH_4Cl in den Astrozyten verringerten CARM1 Proteinspiegel auch im Zusammenhang mit der Hochregulation von GRP78 stehen.

Die vorgestellten Ergebnisse unterstreichen eine Rolle für CARM1 bei der Zellzyklusprogression und legen eine Bedeutung für durch Ammoniak-induzierten oxidativen und ER-Stress sowie zelluläre Seneszenz nahe.

Eine Relevanz von CARM1 für die Pathogenese der HE wird auch dadurch verstärkt, dass die Carm1 mRNA-Spiegel im Gehirn von Patienten mit Leberzirrhose und HE tendenziell

verringert waren. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass CARM1 möglicherweise exklusiv in Astrozyten herunterreguliert ist, aber nicht in anderen Zelltypen und dadurch die relativen Änderungen verringert werden.

Zur Aufklärung der Rolle von CARM1 für die Pathogenese der HE sind weitergehende Untersuchungen notwendig. Hier könnte z.B. überprüft werden, ob eine Überexpression von CARM1 die durch Ammoniak-induzierte Seneszenz in den Astrozyten blockiert.

4.6 Die Bedeutung von TROVE2 für die RNA-Qualitätskontrolle

Die Proteinspiegel des RNA-bindenden Proteins TROVE2 waren in den Proteinproben des zerebralen Kortex der LGS-KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen ca. 2-fach erhöht. TROVE2 ist für die Qualitätskontrolle ribosomaler RNA bedeutsam und die Expression von TROVE2 wird durch oxidativen Stress gesteigert [90, 180]. Da Ammoniak in Astrozyten RNA-Oxidation und hier insbesondere auch die Oxidation ribosomaler RNA induziert, wurde die Rolle von TROVE2 weitergehend untersucht.

Die *in vitro* Untersuchungen an kultivierten Rattenastrozyten zeigten, dass die Proteinspiegel von TROVE2 durch Inkubation mit Ammoniak signifikant gesteigert werden. Dies spricht dafür, dass die systemische Hyperammonämie in der LGS-KO-Maus prinzipiell ursächlich sein könnte für die dort beobachtete Erhöhung der Proteinspiegel von TROVE2.

Durch Herunterregulation von TROVE2 mittels siRNA wurde die durch Ammoniak gesteigerte Expression der Seneszenzmarker p21 und GADD45 α nicht beeinflusst. In unbehandelten Astrozyten beeinflusste der Knockdown von TROVE2 die Expression dieser Marker nicht. Dies lässt vermuten, dass eine TROVE2-abhängige RNA-Qualitätskontrolle nicht im Zusammenhang mit der Induktion von Seneszenz steht.

Zur Identifikation von Prozessen, die durch den siRNA-vermittelten Knockdown von TROVE2 beeinflusst werden, wurde der Einfluss eines TROVE2-Knockdowns auf das Proteom unbehandelter und mit Ammoniak-inkubierten Astrozyten untersucht. Diese Analyse zeigte, dass die Spiegel von an RNA- und DNA-Prozessierungsprozessen beteiligten Proteinen durch den TROVE2 Knockdown verändert wurden. Während die Inkubation mit Ammoniak in den Kontroll-transfizierten Zellen Proteine herunterregulierten, die an der DNA-Replikation

beteiligt sind, wurden durch den TROVE2-Knockdown Proteine heraufreguliert, die am Transport, dem Splicing und der Transkription von RNA beteiligt sind.

Interessanterweise wurde durch den TROVE2-Knockdown das Protein *Upstream binding transcription factor 1* (Ubtfl) heraufreguliert, welches essenziell für die Transkription ribosomaler RNA ist [181]. Dieses könnte für den mit dem TROVE2-Knockdown einhergehenden Verlust der rRNA-Qualitätskontrolle substituieren.

Weiterhin wurden die Spiegel oxidierter RNA durch den Knockdown von TROVE2 erhöht, jedoch wurde die durch Ammoniak-induzierte Erhöhung nicht synergistisch gesteigert.

Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die ribosomale RNA den weitaus größten Anteil an allen oxidierten RNA-Spezies in den kultivierten Astrozyten hat. Möglicherweise konnte keine weitere Steigerung der Spiegel oxidierter RNA durch den TROVE2-Knockdown mit der für die Quantifizierung verwendeten Immunfluoreszenzanalyse detektiert werden.

Ein weiterer interessanter Aspekt war, dass sich die Zellkerne kultivierter Rattenastrozyten morphologisch veränderten nach Knockdown von TROVE2. Diese Veränderungen waren auch in den mit Ammoniak-inkubierten Zellen zu finden. Da die LDH-Freisetzung nicht erhöht war, ist nicht davon auszugehen, dass die Ursache für diese morphologischen Veränderungen Zelltod ist. Die beobachtete Chromatinkondensation könnte jedoch Folge sein von durch Ammoniak oder TROVE2-Knockdown induziertem oxidativem Stress. In diesem Zusammenhang wurden ähnliche morphologische Veränderungen des Zellkerns in anderen Zelltypen nach Behandlung mit Stressoren beobachtet, die ebenfalls oxidativen Stress induzieren [182, 183].

Über welchen Mechanismus TROVE2 durch Ammoniak in den Astrozyten hochreguliert wird, ist unbekannt. Es ist denkbar, dass Ammoniak TROVE2-reprimierende *microRNAs* herunterreguliert, so wie es bereits für die Hochregulation der HO1 gezeigt wurde [83]. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die Hochregulation von TROVE2 in Astrozytomzellen einhergeht mit einer verringerten Expression der TROVE2 mRNA-bindenden miRNA miR-128 [184].

Eine Relevanz von TROVE2 für die Pathogenese der HE wird auch dadurch nahegelegt, dass die Trove2 mRNA-Spiegel in *post mortem* Hirnproben von Patienten mit Leberzirrhose und HE signifikant erhöht vorlagen im Vergleich zu Patienten mit Leberzirrhose ohne HE und Kontrollpatienten.

4.7 Limitationen der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig globale Hirnregionen-spezifische Änderungen der LGS-KO-Maus auf mRNA- und Proteinebene identifiziert. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass im Rahmen dieser Studie nicht alle identifizierten Unterschiede spezifisch durch zusätzliche Techniken, wie der qPCR und Western Blot-Analyse validiert werden konnten.

Aufgrund der großen Anzahl an veränderten mRNA- und Protein-Spezies (417 mRNA- und 55 Protein-Spezies) konnte der Großteil der identifizierten Veränderungen nicht validiert werden.

Da es keine Überschneidungen zwischen den Transkriptom- und Proteomanalysen gab und sich die Ergebnisse dieser Analysen stark unterschieden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Proteom- und Transkriptomanalysen auch falsch-negative bzw. -positive Ergebnisse erbrachten. Dies muss im Einzelfall für jede Veränderung durch alternative Techniken geprüft werden.

Die Veränderungen der ausgewählten Kandidaten wurden zwar in den jeweiligen Hirnregionen jeweils mittels qPCR und Western Blot-Analyse validiert, jedoch bleibt offen, ob die beobachteten Veränderungen im Gehirn der LGS-KO-Mäuse auch in Astrozyten erfolgten. Dies könnte durch Immunfluoreszenzanalysen in weiteren Untersuchungen überprüft werden. Dabei könnte auch untersucht werden, ob die durch Ammoniak in Astrozyten induzierbaren Änderungen der Proteinspiegel der ausgewählten Kandidaten auch in anderen Hirnzellen erfolgen. Parallel dazu könnten weitere *in vitro* Experimente an Neuronen oder Mikroglia durchgeführt werden, ähnlich wie es für die Astrozyten in der vorliegenden Arbeit getan wurde.

Zudem sollten die an den *post mortem* humanen Hirnproben gemachten Beobachtungen mittels qPCR und Western Blot-Analyse validiert werden. Auch hier könnten Immunfluoreszenzanalysen an humanen fixierten Gehirnschnitten durchgeführt werden, um zelltypspezifische Änderungen der Kandidatenproteinspiegel zu untersuchen. Dies würde ebenso die Frage klären, ob die selektierten Kandidaten auch im menschlichen Gehirn in Astrozyten exprimiert werden.

5 Ausblick

Die umfassenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen bislang unbekannte Veränderungen im zerebralen Transkriptom und Proteom von hyperammonämischen leberspezifischen Knockout-Mäusen.

In weiterführenden Untersuchungen mussten aufgrund der begrenzten Bearbeitungsdauer des Themas Kandidaten selektiert werden. Die dabei unberücksichtigt-gebliebenen im Gehirn der LGS-KO-Mäuse gefundenen quantitativ veränderten individuellen mRNA- und Proteinspezies können eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen von zerebraler Ammoniaktoxizität darstellen. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Vielfalt der in den LGS-KO-Mäusen verändert vorgefundenen biologischen Prozesse. Dies offeriert außerdem die Möglichkeit, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Kontext anderer neurologischer Erkrankungen, bei denen ähnliche biologischen Prozesse verändert sind, zu betrachten.

Literaturverzeichnis

1. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *J Hepatol.* 2019;70(1):151-71.
2. Häussinger D, Laubenberger J, vom Dahl S, Ernst T, Bayer S, Langer M, et al. Proton magnetic resonance spectroscopy studies on human brain myo-inositol in hypo-osmolality and hepatic encephalopathy. *Gastroenterology.* 1994;107(5):1475-80.
3. Schomerus H, Schreiegg J. Prevalence of latent portasystemic encephalopathy in an unselected population of patients with liver cirrhosis in general practice. *Z Gastroenterol.* 1993;31(4):231-4.
4. Schepke M, Sauerbruch T. [Liver cirrhosis--case report]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2001;126(36):975.
5. Häussinger D, Sies H. Hepatic encephalopathy: clinical aspects and pathogenetic concept. *Arch Biochem Biophys.* 2013;536(2):97-100.
6. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol.* 2006;45(4):529-38.
7. Setiawan VW, Stram DO, Porcel J, Lu SC, Le Marchand L, Nouredin M. Prevalence of chronic liver disease and cirrhosis by underlying cause in understudied ethnic groups: The multiethnic cohort. *Hepatology.* 2016;64(6):1969-77.
8. Wettstein M, Kircheis G, Häussinger D. [Hepatic encephalopathy--diagnostics]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2003;128(50):2654-7.
9. Häussinger D, Dhiman RK, Felipo V, Görg B, Jalan R, Kircheis G, et al. Hepatic encephalopathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2022;8(1):43.
10. 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(3):716-21.
11. Romero-Gomez M, Cordoba J, Jover R, del Olmo JA, Ramirez M, Rey R, et al. Value of the critical flicker frequency in patients with minimal hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 2007;45(4):879-85.
12. Marchesini G, Zoli M, Dondi C, Cecchini L, Angiolini A, Bianchi FB, et al. Prevalence of subclinical hepatic encephalopathy in cirrhotics and relationship to plasma amino acid imbalance. *Dig Dis Sci.* 1980;25(10):763-8.

13. Groeneweg M, Moerland W, Quero JC, Hop WC, Krabbe PF, Schalm SW. Screening of subclinical hepatic encephalopathy. *J Hepatol*. 2000;32(5):748-53.
14. Kircheis G, Hilger N, Häussinger D. Value of critical flicker frequency and psychometric hepatic encephalopathy score in diagnosis of low-grade hepatic encephalopathy. *Gastroenterology*. 2014;146(4):961-9.
15. Bajaj JS, Cordoba J, Mullen KD, Amodio P, Shawcross DL, Butterworth RF, et al. Review article: the design of clinical trials in hepatic encephalopathy--an International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33(7):739-47.
16. Koff RS, Mullen KD. *Hepatic encephalopathy: Syndromes and therapies*. Edited by H.O. Conn and J. Bircher, 429 pp. Bloomington, IL: Medi-Ed Press, 1994. \$63.95. *Hepatology*. 1994;20(4):1099-100.
17. Khan A, Ayub M, Khan WM. Hyperammonemia Is Associated with Increasing Severity of Both Liver Cirrhosis and Hepatic Encephalopathy. *Int J Hepatol*. 2016;2016:6741754.
18. Ong JP, Aggarwal A, Krieger D, Easley KA, Karafa MT, Van Lente F, et al. Correlation between ammonia levels and the severity of hepatic encephalopathy. *Am J Med*. 2003;114(3):188-93.
19. Jayakumar AR, Norenberg MD. Hyperammonemia in Hepatic Encephalopathy. *J Clin Exp Hepatol*. 2018;8(3):272-80.
20. Weissenborn K, Ennen JC, Schomerus H, Rückert N, Hecker H. Neuropsychological characterization of hepatic encephalopathy. *J Hepatol*. 2001;34(5):768-73.
21. Weissenborn K. Diagnosis of Minimal HE-And the Temptation of Easy Solutions. *J Clin Exp Hepatol*. 2012;2(4):303-5.
22. Romero-Gomez M, Montagnese S, Jalan R. Hepatic encephalopathy in patients with acute decompensation of cirrhosis and acute-on-chronic liver failure. *J Hepatol*. 2015;62(2):437-47.
23. Kircheis G, Wettstein M, Timmermann L, Schnitzler A, Häussinger D. Critical flicker frequency for quantification of low-grade hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2002;35(2):357-66.
24. Walker V. Ammonia metabolism and hyperammonemic disorders. *Adv Clin Chem*. 2014;67:73-150.
25. Oja SS, Saransaari P, Korpi ER. Neurotoxicity of Ammonia. *Neurochem Res*. 2017;42(3):713-20.

26. Bernal W, Hall C, Karvellas CJ, Auzinger G, Sizer E, Wendon J. Arterial ammonia and clinical risk factors for encephalopathy and intracranial hypertension in acute liver failure. *Hepatology*. 2007;46(6):1844-52.
27. Häussinger D, Sies H, Gerok W. Functional hepatocyte heterogeneity in ammonia metabolism. The intercellular glutamine cycle. *J Hepatol*. 1985;1(1):3-14.
28. Williams EJ, Iredale JP. Liver cirrhosis. *Postgrad Med J*. 1998;74(870):193-202.
29. Sakurabayashi S, Sezai S, Yamamoto Y, Hirano M, Oka H. Embolization of portal-systemic shunts in cirrhotic patients with chronic recurrent hepatic encephalopathy. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 1997;20(2):120-4.
30. Carrion JA, Bellot P, Colmenero J, Garcia Pagan JC. Large spontaneous splenorenal shunt as a cause of chronic hepatic encephalopathy. *J Hepatol*. 2004;40(5):868.
31. Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science*. 1977;195(4284):1356-8.
32. Trentin AG. Thyroid hormone and astrocyte morphogenesis. *J Endocrinol*. 2006;189(2):189-97.
33. Shah NJ, Neeb H, Kircheis G, Engels P, Häussinger D, Zilles K. Quantitative cerebral water content mapping in hepatic encephalopathy. *Neuroimage*. 2008;41(3):706-17.
34. Häussinger D, Schliess F. Astrocyte swelling and protein tyrosine nitration in hepatic encephalopathy. *Neurochem Int*. 2005;47(1-2):64-70.
35. Häussinger D, Schliess F. Pathogenetic mechanisms of hepatic encephalopathy. *Gut*. 2008;57(8):1156-65.
36. Schliess F, Görg B, Häussinger D. Pathogenetic interplay between osmotic and oxidative stress: the hepatic encephalopathy paradigm. *Biol Chem*. 2006;387(10-11):1363-70.
37. Görg B, Schliess F, Häussinger D. Osmotic and oxidative/nitrosative stress in ammonia toxicity and hepatic encephalopathy. *Arch Biochem Biophys*. 2013;536(2):158-63.
38. Wettstein M, Häussinger D. [Hepatic encephalopathy--therapy]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2003;128(50):2658-60.
39. Bass NM, Mullen KD, Sanyal A, Poordad F, Neff G, Leevy CB, et al. Rifaximin treatment in hepatic encephalopathy. *N Engl J Med*. 2010;362(12):1071-81.
40. Rose CF, Amodio P, Bajaj JS, Dhiman RK, Montagnese S, Taylor-Robinson SD, et al. Hepatic encephalopathy: Novel insights into classification, pathophysiology and therapy. *J Hepatol*. 2020;73(6):1526-47.

41. Nardelli S, Allampati S, Riggio O, Mullen KD, Prakash R, Gioia S, et al. Hepatic Encephalopathy Is Associated with Persistent Learning Impairments Despite Adequate Medical Treatment: A Multicenter, International Study. *Dig Dis Sci*. 2017;62(3):794-800.
42. Riggio O, Ridola L, Pasquale C, Nardelli S, Pentassuglio I, Moscucci F, et al. Evidence of persistent cognitive impairment after resolution of overt hepatic encephalopathy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(2):181-3.
43. Pardee AB. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(4):1286-90.
44. Batty P, Gerlich DW. Mitotic Chromosome Mechanics: How Cells Segregate Their Genome. *Trends Cell Biol*. 2019;29(9):717-26.
45. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol*. 1998;35(6):461-78.
46. David-Pfeuty T, Nouvian-Dooghe Y. Human cyclin B1 is targeted to the nucleus in G1 phase prior to its accumulation in the cytoplasm. *Oncogene*. 1996;13(7):1447-60.
47. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003;36(3):131-49.
48. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell*. 1995;6(4):387-400.
49. Nataraj AJ, Trent JC, 2nd, Ananthaswamy HN. p53 gene mutations and photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol*. 1995;62(2):218-30.
50. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P. Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell*. 1995;82(4):675-84.
51. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011;192(4):547-56.
52. Raghuram GV, Mishra PK. Stress induced premature senescence: a new culprit in ovarian tumorigenesis? *Indian J Med Res*. 2014;140 Suppl:S120-9.
53. Calcinotto A, Kohli J, Zagato E, Pellegrini L, Demaria M, Alimonti A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol Rev*. 2019;99(2):1047-78.
54. Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*. 2008;27(20):2801-9.
55. McHugh D, Gil J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*. 2018;217(1):65-77.

56. Calcinotto A, Alimonti A. Aging tumour cells to cure cancer: "pro-senescence" therapy for cancer. *Swiss Med Wkly*. 2017;147:w14367.
57. Görg B, Karababa A, Shafigullina A, Bidmon HJ, Häussinger D. Ammonia-induced senescence in cultured rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Glia*. 2015;63(1):37-50.
58. Campaner S, Doni M, Hydbring P, Verrecchia A, Bianchi L, Sardella D, et al. Cdk2 suppresses cellular senescence induced by the c-myc oncogene. *Nat Cell Biol*. 2010;12(1):54-9; sup pp 1-14.
59. Lee YH, Bedford MT, Stallcup MR. Regulated recruitment of tumor suppressor BRCA1 to the p21 gene by coactivator methylation. *Genes Dev*. 2011;25(2):176-88.
60. Scoumanne A, Zhang J, Chen X. PRMT5 is required for cell-cycle progression and p53 tumor suppressor function. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(15):4965-76.
61. Görg B, Karababa A, Schutz E, Paluschinski M, Schrimpf A, Shafigullina A, et al. O-GlcNAcylation-dependent upregulation of HO1 triggers ammonia-induced oxidative stress and senescence in hepatic encephalopathy. *J Hepatol*. 2019;71(5):930-41.
62. Bodega G, Segura B, Ciordia S, Mena Mdel C, Lopez-Fernandez LA, Garcia MI, et al. Ammonia Affects Astroglial Proliferation in Culture. *PLoS One*. 2015;10(9):e0139619.
63. An W, Kim J, Roeder RG. Ordered cooperative functions of PRMT1, p300, and CARM1 in transcriptional activation by p53. *Cell*. 2004;117(6):735-48.
64. Blanc RS, Richard S. Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol Cell*. 2017;65(1):8-24.
65. Litt M, Qiu Y, Huang S. Histone arginine methylations: their roles in chromatin dynamics and transcriptional regulation. *Biosci Rep*. 2009;29(2):131-41.
66. O'Brien KB, Alberich-Jorda M, Yadav N, Kocher O, Diruscio A, Ebralidze A, et al. CARM1 is required for proper control of proliferation and differentiation of pulmonary epithelial cells. *Development*. 2010;137(13):2147-56.
67. Suresh S, Huard S, Dubois T. CARM1/PRMT4: Making Its Mark beyond Its Function as a Transcriptional Coactivator. *Trends Cell Biol*. 2021.
68. Majumder S, Liu Y, Ford OH, 3rd, Mohler JL, Whang YE. Involvement of arginine methyltransferase CARM1 in androgen receptor function and prostate cancer cell viability. *Prostate*. 2006;66(12):1292-301.
69. 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(12):1155-65.

70. Kruczek C, Görg B, Keitel V, Pirev E, Kröncke KD, Schliess F, et al. Hypoosmotic swelling affects zinc homeostasis in cultured rat astrocytes. *Glia*. 2009;57(1):79-92.
71. Vasak M. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol*. 2005;19(1):13-7.
72. 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(6):2436-47.
73. Lavoie J, Layrargues GP, Butterworth RF. Increased densities of peripheral-type benzodiazepine receptors in brain autopsy samples from cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 1990;11(5):874-8.
74. Papadopoulos V. Peripheral benzodiazepine receptor: structure and function in health and disease. *Ann Pharm Fr*. 2003;61(1):30-50.
75. Ahboucha S, Pomier-Layrargues G, Mamer O, Butterworth RF. Increased levels of pregnenolone and its neuroactive metabolite allopregnanolone in autopsied brain tissue from cirrhotic patients who died in hepatic coma. *Neurochem Int*. 2006;49(4):372-8.
76. Zaman SH. Endogenous steroids and pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Lancet*. 1990;336(8714):573-4.
77. Jördens MS, Keitel V, Karababa A, Zemtsova I, Bronger H, Häussinger D, et al. Multidrug resistance-associated protein 4 expression in ammonia-treated cultured rat astrocytes and cerebral cortex of cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Glia*. 2015;63(11):2092-105.
78. Ahboucha S, Butterworth RF. Pathophysiology of hepatic encephalopathy: a new look at GABA from the molecular standpoint. *Metab Brain Dis*. 2004;19(3-4):331-43.
79. Butterworth RF. Neurosteroids in hepatic encephalopathy: Novel insights and new therapeutic opportunities. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;160:94-7.
80. Sobczyk K, Jördens MS, Karababa A, Görg B, Häussinger D. Ephrin/Ephrin receptor expression in ammonia-treated rat astrocytes and in human cerebral cortex in hepatic encephalopathy. *Neurochem Res*. 2015;40(2):274-83.
81. Yang J, Luo X, Huang X, Ning Q, Xie M, Wang W. Ephrin-A3 reverse signaling regulates hippocampal neuronal damage and astrocytic glutamate transport after transient global ischemia. *J Neurochem*. 2014;131(3):383-94.
82. Filosa A, Paixao S, Honsek SD, Carmona MA, Becker L, Feddersen B, et al. Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nat Neurosci*. 2009;12(10):1285-92.

83. 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.
84. Häussinger D, Görg B. Oxidative-nitrosative stress and hepatic encephalopathy. In: *Oxidative Stress: Eustress and Distress* (Sies H, ed), Elsevier, Cambridge, Great Britain. 2019:669-93.
85. Görg B, Qvartrskhava N, Keitel V, Bidmon HJ, Selbach O, Schliess F, et al. Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology*. 2008;48(2):567-79.
86. Görg B, Qvartrskhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, et al. Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology*. 2010;52(1):256-65.
87. Schliess F, Görg B, Häussinger D. RNA oxidation and zinc in hepatic encephalopathy and hyperammonemia. *Metab Brain Dis*. 2009;24(1):119-34.
88. Liu Z, Chen X, Li Z, Ye W, Ding H, Li P, et al. Role of RNA Oxidation in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14).
89. Driedonks TAP, Nolte-'t Hoen ENM. Circulating Y-RNAs in Extracellular Vesicles and Ribonucleoprotein Complexes; Implications for the Immune System. *Front Immunol*. 2018;9:3164.
90. Boccitto M, Wolin SL. Ro60 and Y RNAs: structure, functions, and roles in autoimmunity. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2019;54(2):133-52.
91. Guglas K, Kolodziejczak I, Kolenda T, Kopczynska M, Teresiak A, Sobocinska J, et al. YRNAs and YRNA-Derived Fragments as New Players in Cancer Research and Their Potential Role in Diagnostics. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16).
92. Park JM, Kohn MJ, Bruinsma MW, Vech C, Intine RV, Fuhrmann S, et al. The multifunctional RNA-binding protein La is required for mouse development and for the establishment of embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 2006;26(4):1445-51.
93. Xue D, Shi H, Smith JD, Chen X, Noe DA, Cedervall T, et al. A lupus-like syndrome develops in mice lacking the Ro 60-kDa protein, a major lupus autoantigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(13):7503-8.
94. Perzynska-Mazan J, Maslinska M, Gasik R. Neurological manifestations of primary Sjogren's syndrome. *Reumatologia*. 2018;56(2):99-105.
95. Oomatia A, Fang H, Petri M, Birnbaum J. Peripheral neuropathies in systemic lupus erythematosus: clinical features, disease associations, and immunologic characteristics

- evaluated over a twenty-five-year study period. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(4):1000-9.
96. Panopalis P, Julian L, Yazdany J, Gillis JZ, Trupin L, Hersh A, et al. Impact of memory impairment on employment status in persons with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2007;57(8):1453-60.
 97. Chifman J, Laubenbacher R, Torti SV. A systems biology approach to iron metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2014;844:201-25.
 98. Ward RJ, Zucca FA, Duyn JH, Crichton RR, Zecca L. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2014;13(10):1045-60.
 99. Wang J, Pantopoulos K. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem J.* 2011;434(3):365-81.
 100. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol.* 2009;122(2-3):78-86.
 101. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. *Cell.* 2010;142(1):24-38.
 102. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(20):9285-9.
 103. Muckenthaler MU, Galy B, Hentze MW. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annu Rev Nutr.* 2008;28:197-213.
 104. Beguin Y, Aapro M, Ludwig H, Mizzen L, Osterborg A. Epidemiological and nonclinical studies investigating effects of iron in carcinogenesis--a critical review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014;89(1):1-15.
 105. Srinivasan G, Aitken JD, Zhang B, Carvalho FA, Chassaing B, Shashidharamurthy R, et al. Lipocalin 2 deficiency dysregulates iron homeostasis and exacerbates endotoxin-induced sepsis. *J Immunol.* 2012;189(4):1911-9.
 106. Xiao X, Yeoh BS, Vijay-Kumar M. Lipocalin 2: An Emerging Player in Iron Homeostasis and Inflammation. *Annu Rev Nutr.* 2017;37:103-30.
 107. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature.* 2004;432(7019):917-21.

108. Moschen AR, Adolph TE, Gerner RR, Wieser V, Tilg H. Lipocalin-2: A Master Mediator of Intestinal and Metabolic Inflammation. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(5):388-97.
109. Mucha M, Skrzypiec AE, Schiavon E, Attwood BK, Kucerova E, Pawlak R. Lipocalin-2 controls neuronal excitability and anxiety by regulating dendritic spine formation and maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(45):18436-41.
110. Llorens F, Hermann P, Villar-Pique A, Diaz-Lucena D, Nägga K, Hansson O, et al. Cerebrospinal fluid lipocalin 2 as a novel biomarker for the differential diagnosis of vascular dementia. *Nat Commun.* 2020;11(1):619.
111. Petrozziello T, Mills AN, Farhan SMK, Mueller KA, Granucci EJ, Glajch KE, et al. Lipocalin-2 is increased in amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve.* 2020;62(2):272-83.
112. Niknahad H, Jamshidzadeh A, Heidari R, Zarei M, Ommati MM. Ammonia-induced mitochondrial dysfunction and energy metabolism disturbances in isolated brain and liver mitochondria, and the effect of taurine administration: relevance to hepatic encephalopathy treatment. *Clin Exp Hepatol.* 2017;3(3):141-51.
113. Rama Rao KV, Norenberg MD. Brain energy metabolism and mitochondrial dysfunction in acute and chronic hepatic encephalopathy. *Neurochem Int.* 2012;60(7):697-706.
114. Kondadi AK, Anand R, Reichert AS. Functional Interplay between Cristae Biogenesis, Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial DNA Integrity. *Int J Mol Sci.* 2019;20(17).
115. Korolchuk VI, Miwa S, Carroll B, von Zglinicki T. Mitochondria in Cell Senescence: Is Mitophagy the Weakest Link? *EBioMedicine.* 2017;21:7-13.
116. El-Hattab AW, Craigen WJ, Scaglia F. Mitochondrial DNA maintenance defects. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2017;1863(6):1539-55.
117. Jayakumar AR, Rao KV, Murthy Ch R, Norenberg MD. Glutamine in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling. *Neurochem Int.* 2006;48(6-7):623-8.
118. Cardona C, Sanchez-Mejias E, Davila JC, Martin-Rufian M, Campos-Sandoval JA, Vitorica J, et al. Expression of Gls and Gls2 glutaminase isoforms in astrocytes. *Glia.* 2015;63(3):365-82.
119. Campos-Sandoval JA, Martin-Rufian M, Cardona C, Lobo C, Penalver A, Marquez J. Glutaminases in brain: Multiple isoforms for many purposes. *Neurochem Int.* 2015;88:1-5.

120. Scalise M, Pochini L, Console L, Losso MA, Indiveri C. The Human SLC1A5 (ASCT2) Amino Acid Transporter: From Function to Structure and Role in Cell Biology. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:96.
121. Gegelashvili M, Rodriguez-Kern A, Pirozhkova I, Zhang J, Sung L, Gegelashvili G. High-affinity glutamate transporter GLAST/EAAT1 regulates cell surface expression of glutamine/neutral amino acid transporter ASCT2 in human fetal astrocytes. *Neurochem Int.* 2006;48(6-7):611-5.
122. Bröer A, Brookes N, Ganapathy V, Dimmer KS, Wagner CA, Lang F, et al. The astroglial ASCT2 amino acid transporter as a mediator of glutamine efflux. *J Neurochem.* 1999;73(5):2184-94.
123. Yoo HC, Park SJ, Nam M, Kang J, Kim K, Yeo JH, et al. A Variant of SLC1A5 Is a Mitochondrial Glutamine Transporter for Metabolic Reprogramming in Cancer Cells. *Cell Metab.* 2020;31(2):267-83 e12.
124. Liu Y, Zhao T, Li Z, Wang L, Yuan S, Sun L. The role of ASCT2 in cancer: A review. *Eur J Pharmacol.* 2018;837:81-7.
125. Gliddon CM, Shao Z, LeMaistre JL, Anderson CM. Cellular distribution of the neutral amino acid transporter subtype ASCT2 in mouse brain. *J Neurochem.* 2009;108(2):372-83.
126. Gushiken T, Yoshimura N, Saheki T. Transient hyperammonemia during aging in ornithine transcarbamylase-deficient, sparse-fur mice. *Biochem Int.* 1985;11(5):637-43.
127. Rodrigo R, Jover R, Candela A, Compan A, Saez-Valero J, Erceg S, et al. Bile duct ligation plus hyperammonemia in rats reproduces the alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide in brain of cirrhotic patients. *Neuroscience.* 2005;130(2):435-43.
128. Chastre A, Belanger M, Nguyen BN, Butterworth RF. Lipopolysaccharide precipitates hepatic encephalopathy and increases blood-brain barrier permeability in mice with acute liver failure. *Liver Int.* 2014;34(3):353-61.
129. Butterworth RF, Giguere JF, Michaud J, Lavoie J, Layrargues GP. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Neurochem Pathol.* 1987;6(1-2):1-12.
130. Zhou Y, Zhou J, Li P, Xie Q, Sun B, Li Y, et al. Increase in P-glycoprotein levels in the blood-brain barrier of partial portal vein ligation /chronic hyperammonemia rats is mediated by ammonia/reactive oxygen species/ERK1/2 activation: In vitro and in vivo studies. *Eur J Pharmacol.* 2019;846:119-27.

131. Qvartrskhava N, Lang PA, Görg B, Pozdeev VI, Ortiz MP, Lang KS, et al. Hyperammonemia in gene-targeted mice lacking functional hepatic glutamine synthetase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(17):5521-6.
132. Hakvoort TB, He Y, Kulik W, Vermeulen JL, Duijst S, Ruijter JM, et al. Pivotal role of glutamine synthetase in ammonia detoxification. *Hepatology*. 2017;65(1):281-93.
133. Chepkova AN, Sergeeva OA, Görg B, Haas HL, Klöcker N, Häussinger D. Impaired novelty acquisition and synaptic plasticity in congenital hyperammonemia caused by hepatic glutamine synthetase deficiency. *Sci Rep*. 2017;7:40190.
134. Sergeeva OA, Chepkova AN, Görg B, Rodrigues Almeida F, Bidmon HJ, Haas HL, et al. Histamine-induced plasticity and gene expression in corticostriatal pathway under hyperammonemia. *CNS Neurosci Ther*. 2020;26(3):355-66.
135. Bhutia YD, Babu E, Ganapathy V. Interferon-gamma induces a tryptophan-selective amino acid transporter in human colonic epithelial cells and mouse dendritic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1848(2):453-62.
136. Bukosza EN, Kaucsar T, Godo M, Lajtar E, Tod P, Koncsos G, et al. Glomerular Collagen Deposition and Lipocalin-2 Expression Are Early Signs of Renal Injury in Prediabetic Obese Rats. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17).
137. 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(3):324-36.
138. Görg B, Morwinsky A, Keitel V, Qvartrskhava N, Schrör K, Häussinger D. Ammonia triggers exocytotic release of L-glutamate from cultured rat astrocytes. *Glia*. 2010;58(6):691-705.
139. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996;6(10):986-94.
140. 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(4):402-8.
141. Svingen T, Letting H, Hadrup N, Hass U, Vinggaard AM. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR (RT-qPCR) analysis of rat tissues under physiological and toxicological conditions. *PeerJ*. 2015;3:e855.
142. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

143. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012;9(7):676-82.
144. Debaq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc*. 2009;4(12):1798-806.
145. Zhu L, Ramboz S, Hewitt D, Boring L, Grass DS, Purchio AF. Non-invasive imaging of GFAP expression after neuronal damage in mice. *Neurosci Lett*. 2004;367(2):210-2.
146. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422(6928):198-207.
147. Grube L, Dellen R, Kruse F, Schwender H, Stühler K, Poschmann G. Mining the Secretome of C2C12 Muscle Cells: Data Dependent Experimental Approach To Analyze Protein Secretion Using Label-Free Quantification and Peptide Based Analysis. *J Proteome Res*. 2018;17(2):879-90.
148. Cox J, Hein MY, Lubner CA, Paron I, Nagaraj N, Mann M. Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(9):2513-26.
149. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol*. 2008;26(12):1367-72.
150. Vizcaino JA, Csordas A, del-Toro N, Dianes JA, Griss J, Lavidas I, et al. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(D1):D447-56.
151. Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*. 2009;10:48.
152. Govindarajan R, Duraiyan J, Kaliyappan K, Palanisamy M. Microarray and its applications. *J Pharm Bioallied Sci*. 2012;4(Suppl 2):S310-2.
153. Yu J, Cliften PF, Juehne TI, Sinnwell TM, Sawyer CS, Sharma M, et al. Multi-platform assessment of transcriptional profiling technologies utilizing a precise probe mapping methodology. *BMC Genomics*. 2015;16:710.
154. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)*. 1995;57(1):289-300.
155. Wu D, Smyth GK. Camera: a competitive gene set test accounting for inter-gene correlation. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(17):e133.

156. Sutherland GT, Sheedy D, Stevens J, McCrossin T, Smith CC, van Rooijen M, et al. The NSW brain tissue resource centre: Banking for alcohol and major neuropsychiatric disorders research. *Alcohol*. 2016;52:33-9.
157. Schrimpf A, Knappe O, Qvartskhava N, Poschmann G, Stühler K, Bidmon HJ, et al. Hyperammonemia-induced changes in the cerebral transcriptome and proteome. *Anal Biochem*. 2022;641:114548.
158. Murthy CR, Rama Rao KV, Bai G, Norenberg MD. Ammonia-induced production of free radicals in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res*. 2001;66(2):282-8.
159. Lu K, Zimmermann M, Görg B, Bidmon HJ, Biermann B, Klöcker N, et al. Hepatic encephalopathy is linked to alterations of autophagic flux in astrocytes. *EBioMedicine*. 2019;48:539-53.
160. Bobermin LD, Roppa RHA, Goncalves CA, Quincozes-Santos A. Ammonia-Induced Glial-Inflammation. *Mol Neurobiol*. 2020;57(8):3552-67.
161. Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, Xiao W, Hunkapiller KL, Blake J, et al. Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics*. 2006;7:59.
162. Sayre LM, Perry G, Harris PL, Liu Y, Schubert KA, Smith MA. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J Neurochem*. 2000;74(1):270-9.
163. Dexter DT, Wells FR, Agid F, Agid Y, Lees AJ, Jenner P, et al. Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. *Lancet*. 1987;2(8569):1219-20.
164. Bartzokis G, Lu PH, Tishler TA, Fong SM, Oluwadara B, Finn JP, et al. Myelin breakdown and iron changes in Huntington's disease: pathogenesis and treatment implications. *Neurochem Res*. 2007;32(10):1655-64.
165. Kaneko K, Hineno A, Yoshida K, Ohara S, Morita H, Ikeda S. Extensive brain pathology in a patient with aceruloplasminemia with a prolonged duration of illness. *Hum Pathol*. 2012;43(3):451-6.
166. Gonzalez-Cuyar LF, Perry G, Miyajima H, Atwood CS, Riveros-Angel M, Lyons PF, et al. Redox active iron accumulation in aceruloplasminemia. *Neuropathology*. 2008;28(5):466-71.
167. Yamamoto T, Nishizaki I, Furuya S, Hirabayashi Y, Takahashi K, Okuyama S, et al. Characterization of rapid and high-affinity uptake of L-serine in neurons and astrocytes in primary culture. *FEBS Lett*. 2003;548(1-3):69-73.

168. Foster AC, Farnsworth J, Lind GE, Li YX, Yang JY, Dang V, et al. D-Serine Is a Substrate for Neutral Amino Acid Transporters ASCT1/SLC1A4 and ASCT2/SLC1A5, and Is Transported by Both Subtypes in Rat Hippocampal Astrocyte Cultures. *PLoS One*. 2016;11(6):e0156551.
169. Dolinska M, Zablocka B, Sonnewald U, Albrecht J. Glutamine uptake and expression of mRNA's of glutamine transporting proteins in mouse cerebellar and cerebral cortical astrocytes and neurons. *Neurochem Int*. 2004;44(2):75-81.
170. Bröer A, Gauthier-Coles G, Rahimi F, van Geldermalsen M, Dorsch D, Wegener A, et al. Ablation of the ASCT2 (SLC1A5) gene encoding a neutral amino acid transporter reveals transporter plasticity and redundancy in cancer cells. *J Biol Chem*. 2019;294(11):4012-26.
171. Wang L, Liu Y, Zhao TL, Li ZZ, He JY, Zhang BJ, et al. Topotecan induces apoptosis via ASCT2 mediated oxidative stress in gastric cancer. *Phytomedicine*. 2019;57:117-28.
172. Marshall AD, van Geldermalsen M, Otte NJ, Lum T, Vellozzi M, Thoeng A, et al. ASCT2 regulates glutamine uptake and cell growth in endometrial carcinoma. *Oncogenesis*. 2017;6(7):e367.
173. Toda K, Nishikawa G, Iwamoto M, Itatani Y, Takahashi R, Sakai Y, et al. Clinical Role of ASCT2 (SLC1A5) in KRAS-Mutated Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8).
174. Albrecht J, Norenberg MD. Glutamine: a Trojan horse in ammonia neurotoxicity. *Hepatology*. 2006;44(4):788-94.
175. Pang L, Tian H, Chang N, Yi J, Xue L, Jiang B, et al. Loss of CARM1 is linked to reduced HuR function in replicative senescence. *BMC Mol Biol*. 2013;14:15.
176. Kim J, Lee J, Yadav N, Wu Q, Carter C, Richard S, et al. Loss of CARM1 results in hypomethylation of thymocyte cyclic AMP-regulated phosphoprotein and deregulated early T cell development. *J Biol Chem*. 2004;279(24):25339-44.
177. Yadav N, Cheng D, Richard S, Morel M, Iyer VR, Aldaz CM, et al. CARM1 promotes adipocyte differentiation by coactivating PPARgamma. *EMBO Rep*. 2008;9(2):193-8.
178. Baumeister P, Luo S, Skarnes WC, Sui G, Seto E, Shi Y, et al. Endoplasmic reticulum stress induction of the Grp78/BiP promoter: activating mechanisms mediated by YY1 and its interactive chromatin modifiers. *Mol Cell Biol*. 2005;25(11):4529-40.
179. Bao J, Rousseaux S, Shen J, Lin K, Lu Y, Bedford MT. The arginine methyltransferase CARM1 represses p300*ACT*CREMtau activity and is required for spermiogenesis. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(9):4327-43.

180. Sim S, Weinberg DE, Fuchs G, Choi K, Chung J, Wolin SL. The subcellular distribution of an RNA quality control protein, the Ro autoantigen, is regulated by noncoding Y RNA binding. *Mol Biol Cell*. 2009;20(5):1555-64.
181. Toro C, Hori RT, Malicdan MCV, Tiffit CJ, Goldstein A, Gahl WA, et al. A recurrent de novo missense mutation in UBTF causes developmental neuroregression. *Hum Mol Genet*. 2018;27(4):691-705.
182. Barcena C, Osorio FG, Freije JM. Detection of nuclear envelope alterations in senescence. *Methods Mol Biol*. 2013;965:243-51.
183. Lukasova E, Kovarik A, Bacikova A, Falk M, Kozubek S. Loss of lamin B receptor is necessary to induce cellular senescence. *Biochem J*. 2017;474(2):281-300.
184. Xu J, Liu Y, Guo S, Ma S, Xiao L, Wei N, et al. Expression Profile of MiR-128 in the Astrocytoma Patients and Cell Lines. *Mol Neurobiol*. 2016;53(7):4631-7.

Anhang

Anhang Tabelle 1: Differentiell exprimierte Gene im zerebralen Kortex, Hippocampus und Zerebellum von LGS-KO-Mäusen. Die analysierte mRNA wurde aus den Hirnregionen zerebraler Kortex (ZK), Hippocampus (H) oder Zerebellum (ZB) aus WT oder LGS-KO-Mäusen isoliert, um Genexpressionsspiegel mittels Affymetrix Clariom™ S Array zu analysieren. Die statistische Auswertung erfolgte mittel 2-seitigem Studentischen T-Test mit gleichen Varianzen; angepasster p-Wert (Benjamini-Hochberg Methode [154]).

Gehirnregion	Genname	p-Wert	angep. p-Wert	Fold change	log ₂ ratio
ZK	Lcn2	0.03	0.84	28.26	4.82
ZK	Plekha2	0.05	0.84	2.38	1.25
ZK	Prss23	0.02	0.84	2.20	1.14
ZK	Serpina3n	0.04	0.84	2.03	1.02
ZK	Cdh19	0.00	0.84	1.89	0.92
ZK	Mctpl	0.02	0.84	1.89	0.92
ZK	Deptor	0.02	0.84	1.83	0.87
ZK	Prkca	0.05	0.84	1.81	0.86
ZK	Tiparp	0.03	0.84	1.67	0.74
ZK	Htr1f	0.05	0.84	1.60	0.67
ZK	Fbxl12os	0.03	0.84	1.59	0.67
ZK	Htr2a	0.02	0.84	1.58	0.66
ZK	Ppp1cc	0.03	0.84	1.57	0.66
ZK	Ano3	0.02	0.84	1.57	0.65
ZK	Ppfa2	0.04	0.84	1.56	0.64
ZK	Gpx6	0.02	0.84	1.51	0.59
ZK	Tmem68	0.02	0.84	1.49	0.57
ZK	Postn	0.01	0.84	1.49	0.57
ZK	Fgf9	0.04	0.84	1.48	0.57
ZK	Dcald	0.01	0.84	1.48	0.57
ZK	Mtrf11	0.01	0.84	1.48	0.57
ZK	Dgat2l6	0.03	0.84	1.48	0.57
ZK	Top2b	0.01	0.84	1.48	0.56

ZK	Cd55	0.00	0.84	1.47	0.56
ZK	Zfp518b	0.03	0.84	1.46	0.55
ZK	Vma21	0.01	0.84	1.46	0.54
ZK	Cdca71	0.04	0.84	1.45	0.53
ZK	Ctsm	0.02	0.84	1.43	0.51
ZK	Adal	0.02	0.84	1.43	0.51
ZK	Tars	0.00	0.84	1.42	0.51
ZK	Cdo1	0.04	0.84	1.42	0.51
ZK	Serpini1	0.05	0.84	1.42	0.51
ZK	Fam81b	0.01	0.84	1.42	0.50
ZK	Nol10	0.01	0.84	1.41	0.50
ZK	Fam171b	0.03	0.84	1.41	0.50
ZK	Slc1a5	0.04	0.84	1.41	0.50
ZK	Dhx40	0.00	0.84	1.41	0.50
ZK	Ociad2	0.02	0.84	1.41	0.49
ZK	Zfp953	0.01	0.84	1.41	0.49
ZK	Tax1bp1	0.00	0.84	1.41	0.49
ZK	Zar1	0.02	0.84	1.39	0.48
ZK	Cyp2r1	0.05	0.84	1.39	0.48
ZK	Mplkip	0.02	0.84	1.38	0.47
ZK	Lyar	0.00	0.84	1.38	0.47
ZK	Chst11	0.04	0.84	1.37	0.45
ZK	Lilra6	0.04	0.84	1.36	0.45
ZK	Akap13	0.02	0.84	1.36	0.45
ZK	Nup43	0.01	0.84	1.36	0.44
ZK	Usp6nl	0.01	0.84	1.36	0.44
ZK	Ttc41	0.01	0.84	1.36	0.44
ZK	Elmo2	0.03	0.84	1.36	0.44
ZK	Klhl7	0.00	0.84	1.35	0.44
ZK	Zfp182	0.00	0.84	1.35	0.44
ZK	Rmdn2	0.00	0.84	1.35	0.44
ZK	Il20ra	0.04	0.84	1.35	0.44

ZK	Setdb2 Phf11c Phf11d	0.05	0.84	1.35	0.43
ZK	Strip2	0.05	0.84	1.35	0.43
ZK	Btbd1	0.05	0.84	1.34	0.42
ZK	Rab2b	0.00	0.84	1.34	0.42
ZK	Ufl1	0.02	0.84	1.34	0.42
ZK	Gm12657	0.05	0.84	1.34	0.42
ZK	Wdr55	0.01	0.84	1.34	0.42
ZK	Fam76b	0.04	0.84	1.34	0.42
ZK	Vcp	0.01	0.84	1.34	0.42
ZK	Gin1	0.04	0.84	1.33	0.42
ZK	Rap2c	0.00	0.84	1.33	0.42
ZK	Cmc1	0.01	0.84	1.33	0.42
ZK	Rnf149	0.00	0.84	1.33	0.42
ZK	Hccs	0.00	0.84	1.33	0.41
ZK	Zfp943	0.03	0.84	1.33	0.41
ZK	Atpaf1	0.00	0.84	1.33	0.41
ZK	1110017D15Rik	0.01	0.84	1.33	0.41
ZK	Cenpw	0.03	0.84	1.33	0.41
ZK	Slc26a7	0.00	0.84	1.33	0.41
ZK	Musk	0.01	0.84	1.33	0.41
ZK	Cdc40	0.04	0.84	1.33	0.41
ZK	Cfap36	0.02	0.84	1.33	0.41
ZK	Mgp	0.04	0.84	1.32	0.41
ZK	Piga	0.04	0.84	1.32	0.40
ZK	Zfp759	0.05	0.84	1.32	0.40
ZK	Twf1	0.03	0.84	1.32	0.40
ZK	Jak2	0.04	0.84	1.32	0.40
ZK	Mto1	0.04	0.84	1.32	0.40
ZK	Enox2	0.05	0.84	1.32	0.40
ZK	Bmi1	0.04	0.84	1.32	0.40
ZK	Msrb2	0.01	0.84	1.31	0.39
ZK	Htatsf1	0.00	0.84	1.31	0.39

ZK	Mrc2	0.04	0.84	1.31	0.39
ZK	Cdkn2aip	0.05	0.84	1.31	0.39
ZK	Smad1	0.04	0.84	1.31	0.39
ZK	Sfrp1	0.04	0.84	1.31	0.39
ZK	Mgst3	0.04	0.84	1.31	0.39
ZK	Mtif3	0.02	0.84	1.31	0.39
ZK	Snx6	0.05	0.84	1.30	0.38
ZK	1700001J11Rik	0.02	0.84	1.30	0.38
ZK	Zfp605	0.02	0.84	1.30	0.38
ZK	Supt16	0.02	0.84	1.30	0.38
ZK	Parva	0.04	0.84	1.30	0.38
ZK	Znr1	0.00	0.84	1.30	0.38
ZK	Echdc1	0.03	0.84	1.30	0.38
ZK	Cecr2	0.03	0.84	1.30	0.38
ZK	Rwdd4a	0.04	0.84	1.30	0.37
ZK	Cxcl5	0.03	0.84	1.30	0.37
ZK	Myoc	0.03	0.84	-1.88	-0.91
ZK	Kcnc4	0.01	0.84	-1.61	-0.69
ZK	Fmn1	0.01	0.84	-1.61	-0.69
ZK	Gli3	0.05	0.84	-1.60	-0.68
ZK	Erich3	0.04	0.84	-1.54	-0.62
ZK	Erich6	0.04	0.84	-1.54	-0.62
ZK	Zdbf2	0.03	0.84	-1.51	-0.60
ZK	C1ql2	0.05	0.84	-1.51	-0.59
ZK	Tssk5	0.00	0.84	-1.51	-0.59
ZK	Hsd11b1	0.05	0.84	-1.50	-0.59
ZK	Hbq1b	0.01	0.84	-1.48	-0.57
ZK	Kndc1	0.03	0.84	-1.46	-0.55
ZK	Rpe65	0.02	0.84	-1.46	-0.54
ZK	Ccdc136	0.01	0.84	-1.46	-0.54
ZK	Aloxe3	0.04	0.84	-1.45	-0.54
ZK	Tmem145	0.00	0.84	-1.45	-0.54

ZK	Dgkq	0.03	0.84	-1.44	-0.53
ZK	Hs3st4	0.03	0.84	-1.44	-0.53
ZK	Gkn3	0.02	0.84	-1.43	-0.52
ZK	Tmem211	0.03	0.84	-1.43	-0.52
ZK	Olfr1030	0.03	0.84	-1.43	-0.51
ZK	Epb4114b	0.02	0.84	-1.42	-0.51
ZK	Nudt7	0.02	0.84	-1.42	-0.50
ZK	Vgll3	0.04	0.84	-1.41	-0.50
ZK	Olfr122	0.02	0.84	-1.41	-0.50
ZK	Hecw1	0.03	0.84	-1.41	-0.50
ZK	Plekhg4	0.03	0.84	-1.41	-0.49
ZK	Nrbp2	0.04	0.84	-1.41	-0.49
ZK	L3mbtl1	0.02	0.84	-1.40	-0.49
ZK	Tnfrsf22	0.00	0.84	-1.40	-0.49
ZK	Reg3b	0.05	0.84	-1.40	-0.49
ZK	Gm4988	0.05	0.84	-1.40	-0.48
ZK	Srcin1	0.04	0.84	-1.39	-0.48
ZK	Cdk3-ps	0.01	0.84	-1.39	-0.47
ZK	Flnb	0.00	0.84	-1.39	-0.47
ZK	Ltk	0.01	0.84	-1.38	-0.47
ZK	Adam11	0.01	0.84	-1.38	-0.46
ZK	Cacna1b	0.05	0.84	-1.38	-0.46
ZK	Gm17679	0.01	0.84	-1.37	-0.46
ZK	LOC100862269	0.01	0.84	-1.37	-0.46
ZK	Gm17297	0.01	0.84	-1.37	-0.46
ZK	Resp18	0.03	0.84	-1.37	-0.45
ZK	LOC101056159	0.01	0.84	-1.37	-0.45
ZK	Slc25a28	0.00	0.84	-1.37	-0.45
ZK	Gm6307	0.03	0.84	-1.36	-0.45
ZK	Sh3bp1	0.00	0.84	-1.36	-0.45
ZK	Aqp3	0.01	0.84	-1.36	-0.44
ZK	Prss2	0.03	0.84	-1.36	-0.44

ZK	Sgol1	0.01	0.84	-1.35	-0.44
ZK	Kcnk9	0.00	0.84	-1.35	-0.44
ZK	Wnk2	0.03	0.84	-1.35	-0.44
ZK	St6galnac5	0.03	0.84	-1.35	-0.43
ZK	Pask	0.00	0.84	-1.35	-0.43
ZK	Tex21	0.05	0.84	-1.34	-0.42
ZK	Flot1	0.03	0.84	-1.34	-0.42
ZK	Qtrt1	0.00	0.84	-1.34	-0.42
ZK	4930572O03Rik	0.02	0.84	-1.34	-0.42
ZK	Gm10065	0.02	0.84	-1.34	-0.42
ZK	E230025N22Rik	0.00	0.84	-1.34	-0.42
ZK	Olf899 250	0.00	0.84	-1.34	-0.42
ZK	Cadm1	0.01	0.84	-1.34	-0.42
ZK	Olf207 208 209	0.04	0.84	-1.34	-0.42
ZK	Chst8	0.05	0.84	-1.34	-0.42
ZK	Galr2	0.00	0.84	-1.33	-0.42
ZK	Aym1	0.03	0.84	-1.33	-0.42
ZK	Krt13	0.04	0.84	-1.33	-0.41
ZK	Frmpd3	0.02	0.84	-1.33	-0.41
ZK	Kcng4	0.02	0.84	-1.33	-0.41
ZK	Fam205c	0.01	0.84	-1.33	-0.41
ZK	1700001P01Rik	0.01	0.84	-1.33	-0.41
ZK	Tef	0.03	0.84	-1.33	-0.41
ZK	Adgra1	0.05	0.84	-1.33	-0.41
ZK	Vwa5b2	0.00	0.84	-1.33	-0.41
ZK	Bmper	0.01	0.84	-1.33	-0.41
ZK	Adamts17	0.02	0.84	-1.33	-0.41
ZK	Hspa12a	0.05	0.84	-1.32	-0.41
ZK	Tbc1d2	0.04	0.84	-1.32	-0.41
ZK	Wnt10b	0.01	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Itga4	0.03	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Smim9	0.02	0.84	-1.32	-0.40

ZK	Sult2a5	0.02	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Gm9961	0.03	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Mttp	0.04	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Flt3	0.03	0.84	-1.32	-0.40
ZK	1700084J12Rik	0.02	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Mapkapk2	0.01	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Mtch1	0.01	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Gm3238	0.00	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Fbxo2	0.01	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Smim22	0.03	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Olfr1474	0.05	0.84	-1.32	-0.40
ZK	Tmem132c	0.01	0.84	-1.31	-0.39
ZK	Tjp2	0.04	0.84	-1.31	-0.39
ZK	Fam13c	0.02	0.84	-1.31	-0.39
ZK	Nkx1-1	0.02	0.84	-1.31	-0.39
ZK	Nmnat2	0.02	0.84	-1.31	-0.39
ZK	Olfr1168	0.02	0.84	-1.31	-0.39
ZK	Mageb16-ps1	0.01	0.84	-1.31	-0.39
ZK	Col9a2	0.02	0.84	-1.31	-0.39
ZK	Zfhx2	0.02	0.84	-1.31	-0.39
ZK	Slc17a2	0.01	0.84	-1.31	-0.39
ZK	C77080	0.02	0.84	-1.31	-0.38
ZK	Plbd2	0.01	0.84	-1.30	-0.38
ZK	Trim43a	0.01	0.84	-1.30	-0.38
ZK	Uggt2	0.01	0.84	-1.30	-0.38
ZK	Dusp28	0.01	0.84	-1.30	-0.38
ZK	Car4	0.05	0.84	-1.30	-0.38
ZK	Cfap206	0.02	0.84	-1.30	-0.38
ZK	Itga8	0.01	0.84	-1.30	-0.38
ZK	Gpr119	0.02	0.84	-1.30	-0.37
ZK	Gdf7	0.01	0.84	-1.30	-0.37
H	Fam184b	0.01	0.84	-1.41	-0.50

H	Adam3	0.01	0.84	-1.40	-0.49
H	Acox1	0.01	0.84	-1.38	-0.47
H	Mkl1	0.04	1.00	-1.37	-0.46
H	Dusp9	0.01	0.84	-1.36	-0.45
H	Zik1	0.02	1.00	-1.35	-0.44
H	Sppl2c	0.00	0.00	-1.35	-0.43
H	Cypt12	0.01	0.84	-1.34	-0.42
H	Gkn3	0.03	1.00	-1.33	-0.41
H	Grap2	0.03	1.00	-1.32	-0.40
H	Hist3h2ba	0.01	0.84	-1.32	-0.40
H	Snpc2	0.00	0.00	-1.32	-0.40
H	Prm2	0.00	0.00	-1.31	-0.39
H	Hist3h2bb-ps	0.02	1.00	-1.31	-0.39
H	Cdh7	0.05	1.00	-1.31	-0.39
H	Rhox4f	0.04	1.00	-1.31	-0.39
H	Gm14743	0.04	1.00	-1.30	-0.38
H	AY761184	0.03	1.00	-1.30	-0.38
H	Ftsj3	0.01	0.84	-1.30	-0.38
H	Shroom3	0.03	1.00	-1.30	-0.38
H	Acot2	0.04	1.00	-1.30	-0.37
H	Gm5820 Arhgap26	0.01	0.84	1.46	0.54
H	Olf167	0.00	0.00	1.43	0.52
H	Cd55b	0.01	0.84	1.42	0.50
H	Gm9881	0.00	0.00	1.40	0.48
H	Ccdc96	0.01	0.84	1.39	0.47
H	Masp2	0.03	1.00	1.37	0.46
H	Dnah6	0.01	0.84	1.37	0.45
H	Krt10	0.03	1.00	1.37	0.45
H	Scnn1a	0.01	0.84	1.35	0.43
H	1700123I01Rik	0.05	1.00	1.35	0.43
H	Ptpn21	0.01	0.84	1.35	0.43
H	Gc	0.01	0.84	1.34	0.42

H	Ripk2	0.00	0.00	1.34	0.42
H	Sp6	0.05	1.00	1.34	0.42
H	Apex2	0.01	0.84	1.33	0.42
H	Olf1414	0.00	0.00	1.33	0.41
H	Mustn1	0.00	0.00	1.32	0.40
H	Rpl	0.01	0.84	1.32	0.40
H	Tekt1	0.03	1.00	1.31	0.39
H	Six6	0.02	1.00	1.30	0.38
H	Gm20731	0.05	1.00	1.30	0.38
H	4930538K18Rik	0.01	0.84	1.30	0.38
H	Klh10	0.01	0.84	1.30	0.38
ZB	LCN2	0.04	0.81	29.22	4.87
ZB	Glra3	0.04	0.81	4.72	2.24
ZB	Tpbg	0.03	0.81	2.09	1.07
ZB	Cdh9	0.04	0.81	1.99	0.99
ZB	Glra4	0.04	0.81	1.85	0.89
ZB	Scg2	0.03	0.81	1.80	0.84
ZB	1700086L19Rik	0.02	0.81	1.75	0.80
ZB	Fam169a	0.04	0.81	1.71	0.77
ZB	Gm3532	0.03	0.81	1.66	0.73
ZB	Smim3	0.04	0.81	1.62	0.70
ZB	Lix1	0.01	0.81	1.60	0.67
ZB	D430019H16Rik	0.03	0.81	1.59	0.67
ZB	Prkar2b	0.04	0.81	1.59	0.67
ZB	AU041133	0.05	0.81	1.58	0.66
ZB	Sorcs1	0.01	0.81	1.54	0.62
ZB	Kcne11	0.02	0.81	1.53	0.62
ZB	D830030K20Rik	0.04	0.81	1.50	0.59
ZB	Dbn1	0.02	0.81	1.47	0.56
ZB	Lrrc9	0.01	0.81	1.47	0.56
ZB	Caly	0.03	0.81	1.47	0.55
ZB	Ehd4	0.01	0.81	1.46	0.54

ZB	Grin2b	0.05	0.81	1.44	0.53
ZB	Nkain4	0.03	0.81	1.43	0.52
ZB	Ly6c1	0.05	0.81	1.42	0.51
ZB	Serpib6b	0.02	0.81	1.42	0.51
ZB	Ramp2	0.03	0.81	1.42	0.50
ZB	Plekhg5	0.00	0.00	1.42	0.50
ZB	Lmo4	0.00	0.00	1.41	0.50
ZB	Cd34	0.04	0.81	1.41	0.50
ZB	Tmem14a	0.02	0.81	1.41	0.50
ZB	Syn3	0.05	0.81	1.41	0.49
ZB	Chrm3	0.02	0.81	1.40	0.49
ZB	Rpgrip11	0.01	0.81	1.40	0.48
ZB	BC030499	0.00	0.00	1.39	0.48
ZB	Pyurf	0.02	0.81	1.39	0.48
ZB	Higd1a	0.02	0.81	1.39	0.47
ZB	3110052M02Rik	0.00	0.00	1.38	0.46
ZB	Mgst1	0.05	0.81	1.38	0.46
ZB	Gm20026	0.01	0.81	1.37	0.46
ZB	Fgf2	0.04	0.81	1.37	0.45
ZB	Ccdc32	0.04	0.81	1.37	0.45
ZB	Ttpal	0.00	0.00	1.35	0.44
ZB	Gm3755	0.02	0.81	1.35	0.44
ZB	Ndn	0.04	0.81	1.35	0.44
ZB	Lrrc74b	0.01	0.81	1.35	0.44
ZB	Npas1	0.04	0.81	1.35	0.43
ZB	Egln3	0.03	0.81	1.35	0.43
ZB	Cadm1	0.03	0.81	1.34	0.42
ZB	Dmp1	0.04	0.81	1.34	0.42
ZB	Nap115	0.04	0.81	1.33	0.41
ZB	Slc25a33	0.04	0.81	1.33	0.41
ZB	Asap3	0.01	0.81	1.33	0.41
ZB	Zcche18	0.02	0.81	1.33	0.41

ZB	Irx1	0.05	0.81	1.33	0.41
ZB	Kpna2	0.00	0.00	1.32	0.41
ZB	Bmp2	0.00	0.00	1.32	0.41
ZB	E130311K13Rik	0.03	0.81	1.32	0.40
ZB	Ccdc65	0.02	0.81	1.32	0.40
ZB	Dcaf12l1	0.05	0.81	1.32	0.40
ZB	Pde8b	0.05	0.81	1.32	0.40
ZB	Gm8050	0.05	0.81	1.32	0.40
ZB	L3mbtl3	0.03	0.81	1.32	0.40
ZB	Mlec	0.04	0.81	1.31	0.39
ZB	Sparc	0.03	0.81	1.31	0.39
ZB	C1galt1	0.05	0.81	1.31	0.39
ZB	Icam2	0.01	0.81	1.31	0.39
ZB	Cep63	0.00	0.00	1.31	0.39
ZB	Olf1499	0.02	0.81	1.31	0.39
ZB	Slc25a48	0.00	0.00	1.31	0.39
ZB	Rgl1	0.04	0.81	1.31	0.39
ZB	Gm3642 LOC100504218	0.04	0.81	1.31	0.39
ZB	Mum111	0.02	0.81	1.31	0.39
ZB	Gsto1	0.05	0.81	1.31	0.38
ZB	Prkar1b	0.03	0.81	1.30	0.38
ZB	Samd15	0.02	0.81	1.30	0.38
ZB	Twf1	0.02	0.81	1.30	0.38
ZB	Pdgfd	0.00	0.00	1.30	0.38
ZB	Abat	0.04	0.81	1.30	0.38
ZB	Xrcc6bp1	0.04	0.81	1.30	0.37
ZB	Adgrf2	0.03	0.81	-1.54	-0.62
ZB	Gm4461	0.04	0.81	-1.53	-0.62
ZB	Olf1006	0.00	0.00	-1.53	-0.61
ZB	Pkd111	0.00	0.00	-1.49	-0.57
ZB	Rufy4	0.00	0.00	-1.49	-0.57
ZB	Tmem266	0.04	0.81	-1.48	-0.57

ZB	Icos	0.05	0.81	-1.44	-0.53
ZB	Tas2r143	0.01	0.81	-1.43	-0.52
ZB	Sept12	0.02	0.81	-1.43	-0.52
ZB	Gm10944	0.02	0.81	-1.42	-0.50
ZB	Atoh1	0.01	0.81	-1.41	-0.50
ZB	Slc22a14	0.02	0.81	-1.40	-0.49
ZB	Gm13304	0.03	0.81	-1.40	-0.49
ZB	Ccl21b Gm13304	0.03	0.81	-1.40	-0.49
ZB	Erich6b	0.00	0.00	-1.39	-0.48
ZB	Gm14477	0.01	0.81	-1.39	-0.47
ZB	Gm14475 Gm14477	0.01	0.81	-1.39	-0.47
ZB	Olf1026	0.04	0.81	-1.39	-0.47
ZB	Zfp703	0.02	0.81	-1.38	-0.46
ZB	Gm14483	0.03	0.81	-1.37	-0.46
ZB	Gm14477 14475 14476 14482	0.03	0.81	-1.37	-0.46
ZB	Gm14479 14482	0.03	0.81	-1.37	-0.46
ZB	Gm14476 14478 14482	0.03	0.81	-1.37	-0.46
ZB	Gm14482 14501	0.03	0.81	-1.37	-0.46
ZB	Defa20	0.01	0.81	-1.37	-0.46
ZB	Gm15308	0.01	0.81	-1.37	-0.46
ZB	Hmx1	0.03	0.81	-1.37	-0.45
ZB	Krtap5-1	0.02	0.81	-1.37	-0.45
ZB	Gm26657	0.01	0.81	-1.36	-0.45
ZB	Pate2	0.01	0.81	-1.35	-0.44
ZB	Olf1431	0.03	0.81	-1.35	-0.44
ZB	Abhd16a	0.02	0.81	-1.35	-0.44
ZB	Fam132a	0.01	0.81	-1.35	-0.44
ZB	Olf869	0.02	0.81	-1.35	-0.43
ZB	Gm5464	0.02	0.81	-1.35	-0.43
ZB	Kcnj14	0.02	0.81	-1.35	-0.43
ZB	Hnf4g	0.04	0.81	-1.35	-0.43
ZB	H2-Eb2	0.03	0.81	-1.35	-0.43

ZB	Amelx	0.03	0.81	-1.35	-0.43
ZB	Cldn20	0.03	0.81	-1.34	-0.42
ZB	Maml2	0.03	0.81	-1.34	-0.42
ZB	Car9	0.04	0.81	-1.34	-0.42
ZB	Atxn7l2	0.01	0.81	-1.33	-0.42
ZB	Gm13304	0.03	0.81	-1.33	-0.41
ZB	Ccl21c Gm21541	0.03	0.81	-1.33	-0.41
ZB	D630045J12Rik	0.00	0.00	-1.33	-0.41
ZB	Lrrc16b	0.01	0.81	-1.33	-0.41
ZB	Atp10d	0.02	0.81	-1.33	-0.41
ZB	Ccl2	0.01	0.81	-1.33	-0.41
ZB	BC049762	0.00	0.00	-1.33	-0.41
ZB	Abca4	0.01	0.81	-1.33	-0.41
ZB	Micalcl	0.05	0.81	-1.33	-0.41
ZB	Il12a	0.04	0.81	-1.32	-0.41
ZB	Acsn2	0.02	0.81	-1.32	-0.40
ZB	Defb22	0.05	0.81	-1.32	-0.40
ZB	Rfpl4	0.04	0.81	-1.32	-0.40
ZB	Gm7849 7861	0.00	0.00	-1.32	-0.40
ZB	Gm7861 7849	0.00	0.00	-1.32	-0.40
ZB	A430105I19Rik	0.04	0.81	-1.32	-0.40
ZB	Olfir53	0.02	0.81	-1.32	-0.40
ZB	Neurog1	0.01	0.81	-1.32	-0.40
ZB	Olfir466	0.00	0.00	-1.32	-0.40
ZB	Olfir273	0.00	0.00	-1.31	-0.39
ZB	Cldn15	0.01	0.81	-1.31	-0.39
ZB	Rhox2h	0.04	0.81	-1.31	-0.39
ZB	Slc6a19	0.04	0.81	-1.31	-0.39
ZB	Gm11541	0.02	0.81	-1.31	-0.39
ZB	Ddah2	0.01	0.81	-1.31	-0.39
ZB	Apcs	0.01	0.81	-1.31	-0.39
ZB	Dlgap3	0.02	0.81	-1.31	-0.39

ZB	Disc1	0.02	0.81	-1.31	-0.39
ZB	Avil	0.02	0.81	-1.31	-0.39
ZB	Hsd17b3	0.03	0.81	-1.31	-0.39
ZB	NuP210l	0.04	0.81	-1.31	-0.39
ZB	Bpifa3	0.02	0.81	-1.31	-0.39
ZB	Gpha2	0.01	0.81	-1.31	-0.38
ZB	Eif4ebp1	0.03	0.81	-1.30	-0.38
ZB	Lrrc30	0.01	0.81	-1.30	-0.38
ZB	Gm13769	0.00	0.00	-1.30	-0.38
ZB	Olfr1506 Gm13769	0.00	0.00	-1.30	-0.38
ZB	Efna4	0.04	0.81	-1.30	-0.38
ZB	Ccl11	0.05	0.81	-1.30	-0.37
ZB	Reg4	0.03	0.81	-1.30	-0.37
ZB	Erc6l	0.03	0.81	-1.30	-0.37

Anhang Tabelle 2: Durch Proteomanalyse identifizierte Proteine deren Expressionsspiegel verändert vorliegen im zerebralen Kortex (ZK), Hippocampus (H) oder Zerebellum (ZB) der LGS-KO-Maus. Es wurde ein 2-seitiger gepaarter Studentischer T-Test angewendet; der q-Wert entspricht dem angepassten p-Wert (Benjamini-Hochberg Methode [154]).

Gehirnregion	Genname	p-Wert	q-Wert	log ₂ ratio
ZK	Trove2	0.00	0.10	1.94
ZK	Prmt5	0.02	0.30	1.30
ZK	Myh11	0.01	0.22	-1.49
ZK	Carm1	0.01	0.05	-2.40
H	Mcu	0.00	0.00	2.85
H	Rab8a; Rab13	0.01	0.44	1.78
H	Crym	0.02	0.46	1.68
H	Cpne6	0.00	0.21	1.65
H	Hmgcl	0.00	0.15	1.64

H	Tenm2	0.00	0.13	1.64
H	Shisa6	0.05	0.52	1.58
H	Icam5	0.03	0.48	1.58
H	Sec14l2	0.01	0.48	1.53
H	Gria1	0.01	0.46	1.50
H	Cpne7	0.01	0.41	1.49
H	Ptk2b	0.02	0.45	1.39
H	Gria2	0.02	0.42	1.37
H	Psd3	0.01	0.45	1.36
H	Strn4	0.05	0.49	1.20
H	Gprin1	0.01	0.41	1.10
H	Dip2b	0.00	0.32	-1.02
H	Nefl	0.02	0.40	-1.19
H	Kcna2	0.04	0.50	-1.22
H	Marcks	0.04	0.51	-1.25
H	Tf;Gm20425	0.04	0.51	-1.32
H	Gap43	0.04	0.50	-1.34
H	Nefm	0.00	0.31	-1.37
H	Lgi3	0.03	0.46	-1.38
H	Mag	0.01	0.41	-1.43
H	Slc6a11	0.02	0.42	-1.45
H	Itgb1	0.00	0.18	-1.46
H	Nefh	0.01	0.40	-1.49
H	Vwa8	0.03	0.49	-1.50
H	Myo1d	0.01	0.39	-1.55
H	Vat1l	0.00	0.05	-1.60
H	Kcnj10	0.05	0.50	-1.66
H	Ahi1	0.01	0.47	-1.78
H	A2m	0.03	0.43	-1.85
H	Serpina1a-1d	0.00	0.00	-1.89
H	Pcsk1n	0.00	0.00	-2.79
ZB	Mtx2	0.00	0.00	3.50

ZB	Mylk	0.00	0.00	2.16
ZB	2310061I04Rik	0.01	0.06	1.84
ZB	Agap3	0.01	0.05	1.57
ZB	Ccdc92	0.01	0.08	1.47
ZB	Clybl	0.02	0.20	1.33
ZB	UPF0568	0.03	0.29	-1.12
ZB	Ppm1g	0.01	0.05	-1.22
ZB	Trappc3	0.04	0.34	-1.30
ZB	Sart3	0.02	0.20	-1.36
ZB	Ighm	0.03	0.19	-1.67
ZB	Apex1	0.00	0.00	-1.97
ZB	Pdelc	0.01	0.05	-2.19
ZB	S100a1	0.01	0.05	-2.19
ZB	Arl6ip5	0.01	0.04	-2.27

Anhang Tabelle 3: Funktionelle Gruppierung von differentiell exprimierten Genen im zerebralen Kortex, Zerebellum und Hippocampus der LGS-KO-Maus durch Anwendung der CAMERA Methode mit dem R package limma und dem HALLMARK Genarchiv aus der *Molecular Signatures Database*. NGene: Anzahl der Gene im Genset. Richtung: Trend der Expression für die Mehrheit der Gene in der getesteten Gruppe relativ zur Referenzgruppe. p-Wert: Studentischer T-Test, unangepasster p-Wert; FDR: angepasster p-Wert (Benjamini-Hochberg Methode [154]).

Region	Genset	NGene	Richtung	p-Wert	FDR
Zerebraler Kortex	MYC TARGETS V1	245	Hoch	4.37E-09	2.18E-07
	OX. PHOSPHORYLATION	236	Hoch	8.76E-06	2.19E-04
	MTORC1 SIGNALING	283	Hoch	6.08E-04	1.01E-02
	G2M CHECKPOINT	292	Hoch	5.56E-03	6.95E-02
	PROTEIN SECRETION	140	Hoch	7.62E-03	7.12E-02
	DNA REPAIR	186	Hoch	8.92E-03	7.12E-02
	PI3K AKT MTOR SIGNALING	181	Hoch	9.97E-03	7.12E-02

	UNF. PROTEIN RESSPONSE	166	Hoch	1.15E-02	7.16E-02
	FATTY ACID METABOLISM	226	Hoch	4.20E-02	2.30E-01
	KRAS SIGNALING DN	383	Runter	4.82E-02	2.30E-01
Zerebellum	OX. PHOSPHORYLATION	236	Hoch	8.11E-21	4.06E-19
	MTORC1 SIGNALING	283	Hoch	1.33E-10	3.33E-09
	MYC TARGETS V1	245	Hoch	2.44E-10	4.06E-09
	PROTEIN SECRETION	140	Hoch	2.50E-06	3.12E-05
	ADIPOGENESIS	291	Hoch	3.22E-05	3.22E-04
	CHOLESTEROL HOMEOSTASIS	102	Hoch	1.64E-04	1.37E-03
	GLYCOLYSIS	290	Hoch	2.43E-04	1.74E-03
	FATTY ACID METABOLISM	226	Hoch	3.69E-04	2.31E-03
	UNF. PROTEIN RESPONSE	166	Hoch	8.03E-04	4.46E-03
	ROS PATHWAY	67	Hoch	1.08E-03	5.41E-03
	DNA REPAIR	186	Hoch	4.57E-03	2.08E-02
	MYC TARGETS V2	63	Hoch	8.77E-03	3.63E-02
	ANDROGEN RESPONSE	172	Hoch	9.43E-03	3.63E-02
	KRAS SIGNALING UP	315	Hoch	2.87E-02	1.02E-01
	HEME METABOLISM	281	Hoch	3.51E-02	1.15E-01
	PI3K AKT MTOR SIGNALING	181	Hoch	3.68E-02	1.15E-01
		HYPOXIA	313	Hoch	4.77E-02
Hippocampus	MITOTIC SPINDLE	342	Runter	1.00E-02	5.01E-01
	PANCREAS BETA CELLS	53	Hoch	2.78E-02	5.36E-01
	APICAL JUNCTION	354	Runter	3.83E-02	5.36E-01
	PI3K AKT MTOR SIGNALING	181	Runter	4.29E-02	5.36E-01

NGene: Anzahl der Gene; FDR: *false discovery rate*.

Anhang Tabelle 4: Funktionelle Gruppierung von differentiell exprimierten Genen im zerebralen Kortex, Zerebellum und Hippocampus unter Anwendung der CAMERA Methode aus dem *R package limma* und der C5 Genset Kollektion aus der *Molecular Signatures Database*. NGene: Anzahl der Gene im Genset. Richtung: Trend der Expression für

die Mehrheit der Gene in der getesteten Gruppe relativ zur Referenzgruppe. p-Wert: Moderate T-Statistik (Beyes Fit); FDR: angepasster q-Wert (Benjamini-Hochberg Methode [154]).

Genset	NGene	Richtung	p-Wert	FDR
GO_RNA_SPLICING_VIA_TRANSESTERIFICATION_REACTIONS	292	Hoch	2.93E-07	1.81E-03
GO_MRNA_PROCESSING	442	Hoch	1.54E-06	4.74E-03
GO_RNA_SPLICING	387	Hoch	2.91E-06	5.62E-03
GO_SPLICEOSOMAL_COMPLEX	189	Hoch	3.64E-06	5.62E-03
GO_CORNIFIED_ENVELOPE	57	Runter	6.16E-06	7.59E-03
GO_KERATIN_FILAMENT	78	Runter	1.46E-05	1.50E-02
GO_RNA_PROCESSING	843	Hoch	2.68E-05	2.19E-02
GO_MRNA_METABOLIC_PROCESS	610	Hoch	2.83E-05	2.19E-02
GO_RNA_POLYMERASE_COMPLEX	125	Hoch	3.54E-05	2.42E-02
GO_EXORIBONUCLEASE_ACTIVITY	32	Hoch	4.67E-05	2.88E-02
GO_RNA_PHOSPHODIESTER_BOND_HYDROLYSIS_EXONUCLEOLYTIC	34	Hoch	7.72E-05	4.33E-02
GO_MITOCHONDRIAL_TRANSLATION	110	Hoch	9.64E-05	4.96E-02
GO_DNA_DIRECTED_RNA_POLYMERASE_II_HOLOENZYME	102	Hoch	1.08E-04	4.96E-02
GO_INTERMEDIATE_FILAMENT	180	Runter	1.13E-04	4.96E-02
GO_POLY_A_RNA_BINDING	1340	Hoch	1.23E-04	4.96E-02
GO_NUCLEAR_TRANSCRIBED_MRNA_CATABOLIC_PROCESS_DEADENYLATION_DEPENDENT_DECAY	61	Hoch	1.29E-04	4.96E-02

Anhang Tabelle 5: Durch Proteomanalyse identifizierte Proteine deren Expressionsspiegel durch Ammoniumchlorid in beiden Testgruppen, AllStars (Kontrolle) wie auch TROVE2 siRNA transfizierten kultivierten Rattenastrozyten verändert vorliegen. Statistik: 2-seitiger gepaarter Studentischer T-Test; q-Wert: angepasster p-Wert (Benjamini-Hochberg Methode [154]).

Genname	AllStars			TROVE2 siRNA		
	p-Wert	q-Wert	log ₂ ratio	p-Wert	q-Wert	log ₂ ratio

Aars	0.003	0.015	1.02	0.001	0.01	0.94
Acox1	0.035	0.063	-0.79	0.009	0.03	-0.75
Acsbg1	0.010	0.038	-0.63	0.012	0.04	-0.59
Adgrg1	0.023	0.069	-0.56	0.042	0.09	-0.54
Ahnak	0.008	0.028	0.85	0.002	0.02	0.58
Ahnak2	0.006	0.008	2.10	0.000	0.00	1.35
Akap12	0.013	0.044	0.76	0.001	0.01	0.60
Aldh18a1	0.001	0.014	1.27	0.023	0.03	1.17
Aox1	0.014	0.042	0.64	0.048	0.07	1.05
Asns	0.001	0.000	1.70	0.005	0.00	1.65
Atp6v1b2	0.007	0.040	0.58	0.004	0.03	0.50
Atp6v1h	0.004	0.027	0.72	0.005	0.03	0.52
Bcat2	0.018	0.053	0.59	0.019	0.06	0.62
Bgn	0.013	0.041	-0.60	0.006	0.02	-0.70
Btf3l4	0.023	0.035	1.54	0.005	0.01	1.20
Cars	0.041	0.043	1.75	0.017	0.02	1.40
Cp	0.033	0.056	-0.83	0.019	0.05	-0.71
Creld2	0.001	0.000	3.22	0.002	0.00	3.03
Ctsa	0.001	0.011	-1.04	0.002	0.01	-0.87
Ctsb	0.001	0.016	-1.27	0.001	0.01	-0.94
Ctsd	0.006	0.017	-1.09	0.003	0.01	-0.93
Dnajc3	0.026	0.036	1.57	0.016	0.02	1.18
Dnase2	0.037	0.053	-1.02	0.004	0.02	-0.63
Eif3g	0.016	0.053	0.58	0.000	0.01	0.84
Eprs	0.009	0.031	0.73	0.007	0.03	0.62
Fth1	0.006	0.018	1.67	0.036	0.03	1.94
Ftl1	0.002	0.000	3.41	0.001	0.00	3.44
Gba	0.017	0.040	0.76	0.000	0.00	0.85
Ghitm	0.005	0.014	1.57	0.003	0.01	2.15
Glg1	0.003	0.029	-0.59	0.005	0.03	-0.54
Gpnmb	0.036	0.053	0.96	0.047	0.07	1.10
H2afy	0.005	0.030	-0.69	0.006	0.03	-0.61

H2afy2	0.020	0.027	-2.19	0.004	0.01	-0.87
Hmox1	0.009	0.030	1.19	0.002	0.00	1.19
Hsp90b1	0.016	0.034	1.03	0.004	0.01	1.03
Hspa5	0.010	0.019	1.60	0.002	0.01	1.46
Hspa9	0.014	0.037	1.00	0.005	0.01	0.95
Hyou1	0.009	0.026	1.09	0.007	0.01	1.07
Iars	0.014	0.042	0.79	0.035	0.08	0.55
Lama5	0.001	0.000	3.77	0.009	0.00	3.68
Lamp1	0.003	0.018	0.81	0.000	0.01	0.73
Lamp2	0.042	0.063	0.93	0.001	0.01	0.84
Lars	0.007	0.040	0.53	0.012	0.03	0.66
Lgals3bp	0.001	0.000	2.47	0.001	0.00	2.43
Lgmn	0.003	0.018	-2.80	0.003	0.00	-3.24
Limch1	0.042	0.090	-0.64	0.047	0.07	-0.87
Lmod1	0.011	0.042	-0.65	0.002	0.01	-0.72
Lonp1	0.016	0.042	0.70	0.020	0.06	0.63
Manf	0.016	0.035	1.04	0.002	0.00	1.04
Map4	0.017	0.019	3.69	0.017	0.02	2.04
Mgll	0.046	0.077	0.83	0.013	0.05	0.56
Mroh1	0.007	0.029	0.96	0.047	0.09	0.59
Mtfr1l	0.047	0.059	1.13	0.023	0.06	0.70
Npr3	0.031	0.070	0.66	0.024	0.05	0.82
Nsfl1c	0.001	0.010	0.91	0.002	0.02	0.60
Osbp15	0.015	0.039	-0.89	0.038	0.07	-0.85
P4ha1	0.036	0.090	-0.59	0.009	0.03	-0.65
Parp14	0.025	0.063	-0.62	0.000	0.00	-1.63
Pcdhgc3	0.043	0.053	-1.19	0.029	0.04	-1.15
Pck2	0.026	0.069	0.59	0.008	0.03	0.61
Pdia4	0.016	0.040	0.82	0.003	0.01	0.84
Pdia6	0.034	0.092	0.54	0.008	0.04	0.56
Pitrm1	0.008	0.036	0.71	0.004	0.03	0.60
Pla2g7	0.008	0.016	2.15	0.016	0.02	1.87

Plod3	0.026	0.033	-1.73	0.028	0.04	-1.08
Prdx4	0.004	0.040	-0.52	0.006	0.03	-0.53
Retsat	0.010	0.041	-0.67	0.016	0.05	-0.61
RGD1304704	0.022	0.042	0.86	0.013	0.04	0.62
Sars	0.003	0.017	1.06	0.002	0.01	0.76
Scn7a	0.009	0.032	-0.73	0.012	0.05	-0.59
Sdf2l1	0.017	0.021	3.15	0.006	0.01	2.67
Shmt2	0.003	0.016	0.97	0.004	0.01	1.08
Sorl1	0.004	0.010	-2.38	0.002	0.00	-2.54
Sort1	0.000	0.000	-3.87	0.000	0.00	-4.14
Synpo	0.020	0.036	1.16	0.015	0.02	1.27
Timp3	0.002	0.027	0.61	0.006	0.03	0.56
Tmpo	0.020	0.048	0.69	0.003	0.01	0.91
Tnks1bp1	0.036	0.040	1.52	0.002	0.00	1.86
Tpm1	0.020	0.047	-0.72	0.001	0.01	-0.81
Tpp1	0.010	0.034	-0.81	0.000	0.00	-0.63
Vamp2	0.003	0.018	0.95	0.050	0.07	1.03
Vapb	0.004	0.030	0.68	0.039	0.08	0.63
Wars	0.025	0.041	1.09	0.001	0.01	0.79
Zfp11	0.046	0.069	0.91	0.003	0.02	0.68

Anhang Tabelle 6: Durch Proteomanalyse identifizierte Proteine deren Expressionsspiegel durch Ammoniumchlorid entweder in AllStars (Kontrolle) oder in TROVE2 siRNA transfizierten kultivierten Rattenastrozyten verändert vorliegen. Statistik: 2-seitiger gepaarter Studentischer T-Test; q-Wert: angepasster p-Wert (Benjamini-Hochberg Methode [154]).

Experimentelle Bedingung	Genname	p-Wert	q-Wert	Fold change
AllStars siRNA	Abca1	0.031	0.042629	-1.074
AllStars siRNA	Adgr13	0.030	0.056485	-0.758
AllStars siRNA	Atp1b2	0.011	0.050133	-0.513
AllStars siRNA	Atp2c1	0.037	0.056916	-0.923
AllStars siRNA	B2m	0.014	0.039958	-0.691

AllStars siRNA	Clec2d11	0.018	0.0275	-1.366
AllStars siRNA	Clptm1	0.016	0.064493	-0.500
AllStars siRNA	Cnm3	0.024	0.058588	-0.638
AllStars siRNA	Ctgf	0.031	0.044171	-1.766
AllStars siRNA	Ctsl	0.040	0.103235	-0.508
AllStars siRNA	Dipk2a	0.047	0.110483	-0.525
AllStars siRNA	Entpd2	0.045	0.095589	-0.610
AllStars siRNA	Erlec1	0.035	0.041825	-1.283
AllStars siRNA	Fzd2	0.045	0.042235	-2.017
AllStars siRNA	Gpc4	0.041	0.039542	-1.999
AllStars siRNA	H3f3c	0.005	0.033172	-0.595
AllStars siRNA	Hist1h1c	0.010	0.039139	-0.645
AllStars siRNA	Hist1h4b	0.032	0.068821	-0.680
AllStars siRNA	Hist2h3c2	0.001	0.027892	-0.520
AllStars siRNA	Hspa1a	0.003	0.034357	-0.532
AllStars siRNA	Jup	0.012	0.04308	-0.613
AllStars siRNA	LOC100909666	0.002	0.012	-1.698
AllStars siRNA	Lpgat1	0.048	0.078583	-0.846
AllStars siRNA	Lypd1	0.016	0.028121	-1.866
AllStars siRNA	Mlc1	0.021	0.042356	-1.075
AllStars siRNA	Mprp	0.047	0.099915	-0.611
AllStars siRNA	Mrc2	0.046	0.067034	-0.989
AllStars siRNA	Pigt	0.003	0.025872	-0.597
AllStars siRNA	Pkp4	0.046	0.103	-0.558
AllStars siRNA	Ptk7	0.020	0.067184	-0.550
AllStars siRNA	Rpl6	0.011	0.041832	-0.567
AllStars siRNA	RT1	0.030	0.073238	-0.607
AllStars siRNA	Scpep1	0.028	0.055642	-0.727
AllStars siRNA	Sell1	0.049	0.058161	-1.211
AllStars siRNA	Smarca4	0.025	0.040554	-1.447
AllStars siRNA	Snx17	0.039	0.087745	-0.646
AllStars siRNA	Akap2	0.008	0.019	1.693

AllStars siRNA	Apeh	0.035	0.069926	0.698
AllStars siRNA	Arhgef2	0.037	0.048421	1.180
AllStars siRNA	Atp6v1a	0.000	0.009	0.616
AllStars siRNA	Atp6v1d	0.016	0.026435	1.320
AllStars siRNA	Atp6v1e1	0.049	0.108195	0.550
AllStars siRNA	Bclaf1	0.042	0.040909	2.293
AllStars siRNA	Cald1	0.027	0.061295	0.655
AllStars siRNA	Dync1li2	0.008	0.038173	0.581
AllStars siRNA	Echdc1	0.021	0.04	0.889
AllStars siRNA	Eif4b	0.047	0.092839	0.683
AllStars siRNA	Flrt3	0.028	0.03865	1.306
AllStars siRNA	Gosr2	0.027	0.088214	0.518
AllStars siRNA	Homer3	0.033	0.042919	1.109
AllStars siRNA	Hook3	0.013	0.053024	0.536
AllStars siRNA	Ipo4	0.042	0.079285	0.724
AllStars siRNA	Lama3	0.018	0.035308	1.179
AllStars siRNA	Lamtor1	0.013	0.05271	0.539
AllStars siRNA	Lipa	0.019	0.048	0.687
AllStars siRNA	LOC100362339	0.004	0.043188	0.512
AllStars siRNA	LOC100911774	0.047	0.090184	0.718
AllStars siRNA	Metap2	0.037	0.048403	1.119
AllStars siRNA	Nars	0.013	0.042353	0.688
AllStars siRNA	Osbp	0.046	0.104093	0.541
AllStars siRNA	Pdk3	0.003	0.027022	0.617
AllStars siRNA	Rcc2	0.003	0.013091	2.141
AllStars siRNA	Rpl19	0.043	0.107318	0.512
AllStars siRNA	Scd4	0.038	0.078136	0.682
AllStars siRNA	Sec23b	0.024	0.075023	0.531
AllStars siRNA	Sorbs3	0.006	0.043824	0.569
AllStars siRNA	Sqstm1	0.019	0.042346	0.746
AllStars siRNA	Srrm2	0.002	0	2.650
AllStars siRNA	Ube2m	0.034	0.090753	0.560

AllStars siRNA	Wipi1	0.042	0.092588	0.622
AllStars siRNA	Yars	0.006	0.040684	0.560
TROVE2 siRNA	Actc1	0.004	0.027282	-0.518
TROVE2 siRNA	Atxn10	0.009	0.035818	-0.574
TROVE2 siRNA	Car9	0.039	0.082835	-0.630
TROVE2 siRNA	Cav2	0.016	0.06608	-0.527
TROVE2 siRNA	Cnn2	0.046	0.086079	-0.635
TROVE2 siRNA	Ddx46	0.030	0.032764	-1.628
TROVE2 siRNA	Der11	0.023	0.057534	-0.654
TROVE2 siRNA	Ece2	0.002	0.01175	-0.759
TROVE2 siRNA	Fam91a1	0.048	0.079675	-0.803
TROVE2 siRNA	Fryl	0.007	0.034227	-0.554
TROVE2 siRNA	Hspg2	0.034	0.045366	-1.190
TROVE2 siRNA	M6pr	0.008	0.033049	-0.584
TROVE2 siRNA	Npr2	0.022	0.071978	-0.530
TROVE2 siRNA	P3h3	0.0286253	0.043115	-0.986967
TROVE2 siRNA	P4htm	0.009018	0.009895	-1.45901
TROVE2 siRNA	Palld	0.0040352	0.028	-0.536609
TROVE2 siRNA	Pdgfrb	0.0359956	0.045714	-1.24406
TROVE2 siRNA	Slc27a3	0.0071481	0.028354	-0.623804
TROVE2 siRNA	Tagln	0.0076396	0.014894	-1.07435
TROVE2 siRNA	Tgfb1i1	0.0050393	0.004364	-1.91087
TROVE2 siRNA	Tgm2	0.0087854	0.036147	-0.574899
TROVE2 siRNA	Thbs1	0.0146673	0.023082	-1.19125
TROVE2 siRNA	Tmx2	0.0050899	0.032781	-0.547495
TROVE2 siRNA	Acot2	0.0461041	0.085722	0.632925
TROVE2 siRNA	Adck4	0.0074013	0.032386	0.612784
TROVE2 siRNA	Alad	0.0090047	0.045	0.517258
TROVE2 siRNA	Arl8a	0.0104998	0.045677	0.552529
TROVE2 siRNA	Blmh	0.0288118	0.051382	0.871589
TROVE2 siRNA	Calr	0.0008437	0.01	0.552935
TROVE2 siRNA	Cnpy3	0.0018663	0.025587	0.510243

TROVE2 siRNA	Dars2	0.0123052	0.023158	1.08818
TROVE2 siRNA	Dnajib11	0.0215521	0.070851	0.530547
TROVE2 siRNA	Dynlt3	0.0494914	0.067723	1.11873
TROVE2 siRNA	Eif4g3	0.0066153	0.023362	0.693206
TROVE2 siRNA	Enpp5	0.0214482	0.037964	0.883526
TROVE2 siRNA	Ewsr1	0.0202941	0.019245	2.71806
TROVE2 siRNA	Gcat	0.0059298	0.033703	0.526786
TROVE2 siRNA	Gmppb	0.0315508	0.033878	1.49042
TROVE2 siRNA	Gns	0.0034969	0.024444	0.650307
TROVE2 siRNA	Got1	0.0339125	0.078503	0.618721
TROVE2 siRNA	Isyna1	0.0471249	0.074267	0.842102
TROVE2 siRNA	Lamc1	0.0430725	0.048339	1.50825
TROVE2 siRNA	Lima1	0.0482592	0.090298	0.606647
TROVE2 siRNA	LOC100911677	0.0051638	0.033318	0.544754
TROVE2 siRNA	Mia3	0.0242047	0.07329	0.540488
TROVE2 siRNA	Oat	0.0002836	0.0115	0.504705
TROVE2 siRNA	Pkn3; Set	0.0304797	0.083128	0.526203
TROVE2 siRNA	Rab3gap1	0.013621	0.0248	1.0433
TROVE2 siRNA	Slc1a2	0.0448528	0.082829	0.702597
TROVE2 siRNA	Snrnp40	0.0002794	0.01122	0.502009
TROVE2 siRNA	Tars	4.068E-05	0	0.718027
TROVE2 siRNA	Thrap3	0.044825	0.042678	2.00952
TROVE2 siRNA	Triobp	0.0499482	0.071579	1.01118
TROVE2 siRNA	Ubtf	0.0175428	0.049061	0.645736
TROVE2 siRNA	Ufsp2	0.0312234	0.053188	0.923438
TROVE2 siRNA	Vps52	0.0070432	0.032	0.599428