

Literaturverzeichnis

1	Einleitung	11
1.1	Klinische Definition der hepatischen Enzephalopathie	11
1.2	Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie	12
1.3	Kovalente Proteinmodifikationen bei hepatischer Enzephalopathie	15
1.4	Oxidation von Nukleinsäuren	17
2	Zielsetzung	19
3	Material und Methoden	21
3.1	Materialien	21
3.1.1	Geräte	22
3.1.2	Feinchemikalien	23
3.1.3	Primärantikörper	24
3.1.4	Sekundärantikörper	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	Präparation und Kultivierung von Astrozyten aus dem zerebralen Rattenkortex .	25
3.2.2	Anlage einer partiellen portalvenösen Ligatur	26
3.2.3	Einstellung einer akuten Hyperammonämie in der Ratte	26
3.2.4	Humane post mortem Hirnbiopsien	27
3.2.5	Western- und Dot-Blot-Analyse	29
3.2.6	RNA-Präparation und Messung der RNA-Konzentration	31
3.2.7	Kapillarelektrophoretische Messung der RNA-Integrität	31
3.2.8	Northwestern- und Slot-Blot-Analyse	31
3.2.9	Densitometrische Quantifizierung von Western- und Dot-Blots	32
3.2.10	Bestimmung des Blutammoniakgehalts	32
3.2.11	Präparation vitaler Maushirnschnitte	33
3.2.12	Immunfluoreszenzanalyse	33
3.2.13	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	34
3.2.14	Immunpräzipitation/Immundepletion spezifischer Proteine und oxidierter RNA .	34
3.2.15	Semiquantitative Polymerasekettenreaktion	35
3.2.16	Denitrase-Assay	36
3.2.17	Messung des proteasomalen Abbaus durch das 20S Proteasom	36
3.3	Glutaminsynthetase-Assay	36
3.3.1	Statistische Auswertung	37
4	Ergebnisse	39
4.1	Untersuchung zur Wirkung Peroxynitrit-vermittelter kovalenter Proteinmodifikationen auf die Aktivität der Glutaminsynthetase	39
4.1.1	Validierung eines in vitro Testsystems zur Untersuchung der Peroxynitrit- vermittelten Wirkung auf die Glutaminsynthetase	39

4.1.2	Identifizierung der Peroxynitrit-vermittelten Proteinmodifikationen an isolierter Glutaminsynthetase und deren Einfluss auf die enzymatische Aktivität .	40
4.1.3	Einfluss von Epicatechin auf die PN-induzierte Tyrosinnitrierung und den GS-Aktivitätsverlust	43
4.1.4	Denitrierung der GS durch LPS-behandelte Milzproteinlysate	44
4.1.5	Einfluss der GS-Proteintyrosinnitrierung auf den proteasomalen Abbau des Enzyms durch das 20S Proteasom	47
4.1.6	Nachweis tyrosinnitrierter Proteine und Identifizierung der tyrosinnitrierten Glutaminsynthetase in humanen post mortem Hirnproben	48
4.2	RNA-Oxidation	50
4.2.1	Einfluss von Ammoniak auf die Oxidation von RNA in kultivierten Ratten-astrozyten	50
4.2.2	Pharmakologische Charakterisierung der Ammoniak-induzierten RNA-Oxidation in kultivierten Rattenastrozyten	54
4.2.3	Identifizierung oxidiertes RNA-Spezies in Ammoniak behandelten kultivierten Rattenastrozyten	55
4.2.4	Einfluss HE-relevanter Faktoren auf die RNA-Oxidation in kultivierten Astrozyten	56
4.2.5	Nachweis und Charakterisierung zerebraler RNA-Oxidation in Ammonium-azetat-behandelten Ratten	57
4.2.6	Nachweis oxidiertes RNA und Identifizierung oxidiertes RNA-Spezies in NH ₄ Cl-behandelten vitalen Maushirnschnitten	60
4.2.7	Wirkung von TNF- α auf die RNA-Oxidation im vitalen Maushirnschnitt	62
4.2.8	Nachweis oxidiertes RNA im Rattenhirn nach Portalvenenligatur	64
4.2.9	Nachweis oxidiertes RNA in humanen post mortem Hirnproben	65
4.2.10	Nachweis von zerebralem oxidativem Stress in der leberspezifischen GS-Knockout-Mauslinie	67
5	Diskussion	69
5.1	Proteintyrosinnitrierung der Glutaminsynthetase	70
5.2	Zerebraler oxidativer/nitrosativer Stress und Nitrierung der Glutaminsynthetase bei Zirrhosepatienten mit hepatischer Enzephalopathie	73
5.3	Bedeutung der Glutaminsynthetasenitrierung für die Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie	73
5.4	Oxidation von RNA bei hepatischer Enzephalopathie	75
6	Schlussfolgerung	79
7	Literaturverzeichnis	81
8	Abbildungsnachweise	91
9	Tabellenverzeichnis	97