

Aus dem Lehrstuhl für Neurologie  
Prof. Dr. Ulrich Bogdahn  
der Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

Wirkung von Hypoxie und repetitiven  
Isofluran- und Sevofluran-Expositionen  
auf die eNOS- und iNOS-Expression  
sowie auf die NO-Produktion  
humaner zerebraler Endothelzellen  
(in vitro)

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Sandra Balsler

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Felix Schlachetzki

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Fleck

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2012

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1 Anästhetika</b>	<b>7</b>
1.1 Historisches . . . . .	7
1.2 Eigenschaften von Isofluran und Sevofluran . . . . .	7
1.3 Wirkmechanismen von Isofluran und Sevofluran . . . . .	8
<b>2 Neurologischer Hintergrund</b>	<b>9</b>
2.1 Die Blut-Hirn Schranke: Aufbau und Eigenschaften . . . . .	9
2.2 Die Blut-Hirn Schranke: in vitro Modelle . . . . .	11
2.3 NO-Synthasen und ihre Wirkung im Gehirn . . . . .	12
2.4 NO-Synthasen in Endothelzellen unter Hypoxie . . . . .	13
2.5 Wirkung volatiler Anästhetika auf das Gehirn . . . . .	13
<b>3 Zielsetzung dieser Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
<b>4 Methoden</b>	<b>16</b>
4.1 Versuchsdesign . . . . .	16
4.1.1 Vorversuche . . . . .	16
4.1.2 Wiederholte Expositionen mit Isofluran und Sevofluran . . . . .	16
4.1.3 Hypoxie und Reoxygenierung . . . . .	17
4.2 Zellkultivierung . . . . .	18
4.2.1 Allgemeines . . . . .	18
4.2.2 Medium zur Kultivierung von hCMEC/D3 . . . . .	18
4.2.3 Beschichtung der Zellkulturflaschen . . . . .	19
4.3 Zellbiologische Methoden . . . . .	19
4.3.1 Zellen splitten und ernten . . . . .	19
4.3.2 Zellzahl-Bestimmung . . . . .	19
4.3.3 Exposition der Zellen mit volatilen Anästhetika . . . . .	20
4.3.4 Hypoxie und Reoxygenierung . . . . .	21

---

4.4	NO-Messung . . . . .	21
4.4.1	Griess-Assay . . . . .	21
4.4.2	GC-MS-Messung . . . . .	22
4.5	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	23
4.5.1	Gesamtproteinextraktion . . . . .	23
4.5.2	Proteinquantifizierung: BC-Assay . . . . .	23
4.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) . . . . .	23
4.5.4	Western Blot . . . . .	24
4.6	Datenanalyse . . . . .	25
<b>Ergebnisse</b>		<b>26</b>
<b>5</b>	<b>Vorversuche</b>	<b>26</b>
<b>6</b>	<b>Wiederholte Expositionen mit Isofluran und Sevofluran</b>	<b>28</b>
6.1	NO-Produktion . . . . .	28
6.2	Expression der NO-Synthasen . . . . .	30
6.2.1	iNOS-Expression . . . . .	30
6.2.2	eNOS-Expression . . . . .	31
<b>7</b>	<b>Hypoxie</b>	<b>32</b>
7.1	Expression der NO-Synthasen unter Hypoxie . . . . .	32
7.2	Expression der NO-Synthasen unter Hypoxie und Reoxygenierung . . . . .	33
7.2.1	iNOS-Expression . . . . .	33
7.2.2	eNOS-Expression . . . . .	34
<b>Diskussion</b>		<b>35</b>
<b>8</b>	<b>Problematik der in vitro BHS-Forschung</b>	<b>35</b>
8.1	Vor- und Nachteile der in vitro BHS-Forschung . . . . .	35
8.2	Immortalisierung mittels hTERT und SV40 . . . . .	36
<b>9</b>	<b>Diskussion der angewandten Methoden</b>	<b>37</b>
9.1	NO-Messung . . . . .	37
9.2	Western Blot . . . . .	38
<b>10</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>39</b>
10.1	Isofluran und Sevofluran haben keinen Effekt auf die NO-Produktion und die Expression der NO-Synthasen . . . . .	39

---

10.2	Unter Hypoxie nimmt die Expression der eNOS ab . . . . .	40
10.3	Kritische Hinterfragung der Ergebnisse . . . . .	41
10.4	Ausblicke . . . . .	42
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
	<b>Anhang</b>	<b>44</b>
11	<b>Material</b>	<b>44</b>
11.1	Verbrauchsmaterial und Chemikalien . . . . .	44
11.2	Geräte . . . . .	47
11.3	Zellkultur: hCMEC/D3 . . . . .	48
11.4	Antikörper . . . . .	48
11.5	Puffer und Stammlösungen . . . . .	49
11.6	Software . . . . .	50
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>51</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>52</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>59</b>

# Abstract

Unter Narkose mit Isofluran sowie Sevofluran herrscht eine „Luxurdurchblutung des Gehirns“, da diese volatilen Anästhetika einen zerebral vasodilatierenden Effekt ausüben. Es wird angenommen, dass dieser Effekt durch NO vermittelt wird, da bei Mäusen unter Narkose mit Isofluran die Zunahme des zerebralen Blutflusses durch Gabe eines unspezifischen NO-Synthase(NOS)-Inhibitors deutlich vermindert wird. Bei Ratten führen Narkosen mit Isofluran und Sevofluran zu einem Anstieg der NO-Konzentration im zerebralen Kortex, was ebenso durch die Gabe eines unspezifischen NOS-Inhibitors reduziert wird. Darüber hinaus wird beobachtet, dass bei Ratten, die als Kontrollgruppe dienen, das zerebrale Blutvolumen unter repetitiver Isofluran Monoanästhesie sukzessive zunimmt. Ziel dieser Arbeit war es, in Zellkultur humaner zerebraler Endothelzellen herauszufinden, ob die sukzessive Zunahme des zerebralen Blutvolumens unter wiederholter Anästhesie mit volatilen Anästhetika durch den NO-Pathway der zerebralen Endothelzellen vermittelt wird.

Hierfür wurden hCMEC/D3-Zellen, eine immortalisierte Zelllinie humaner zerebraler Endothelzellen mit spezifischen Eigenschaften der Blut-Hirn Schranke (BHS), ein-, zwei- oder dreimal für je eine Stunde im Abstand von 12 Stunden 1 oder 2 MAK Isofluran oder Sevofluran ausgesetzt. Anschließend wurde jeweils die NO-Produktion im Zellmedium mittels kolorimetrischem Griess-Assay und GC-MS-Messung sowie die eNOS- und die iNOS-Expression mittels Western-Blot analysiert.

Es konnte jedoch kein Effekt nachgewiesen werden. Hierbei bleibt unklar, worin dies begründet ist. Denkbar wäre zum einen, dass der in vivo beobachtete Anstieg der NO-Konzentration nicht auf Endothelzellen sondern auf Neurone oder Glia-Zellen zurückzuführen ist. Zum anderen könnte dies darin begründet sein, dass die komplexen BHS-spezifischen Eigenschaften der Zelllinie hCMEC/D3 in Kultur zumindest teilweise einer Dedifferenzierung unterliegen.

Anhand von Versuchen mit Hypoxie wurde darüber hinaus gezeigt, dass signifikante Unterschiede in der eNOS-Expression, falls vorhanden, mit unseren Versuchen messbar sind. Das Verhalten der hCMEC/D3, mit einem signifikanten Abfall der eNOS-Expression (von  $1,93 \pm 0,69$  auf  $1,02 \pm 0,38$  unter Hypoxie ( $p < 0,05$ )) und ausbleibendem Anstieg der iNOS-Expression unter 24-stündiger Hypoxie, konnte jedoch nicht eindeutig dem in der Literatur beschriebenen Verhalten anderer zerebraler Endothelzellen oder Endothelzellen anderer Körperregionen zugeordnet werden. Dies spricht möglicherweise dafür, dass die hCMEC/D3 einer Dedifferenzierung unterlagen.

Künftige Untersuchungen mit nicht immortalisierten zerebralen Endothelzellen können über den Zusammenhang zwischen Expositionen mit volatilen Anästhetika und der eNOS- sowie iNOS-Expression Aufschluss geben.

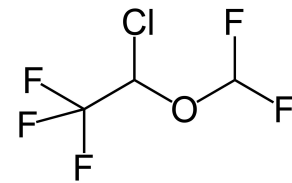
# Einleitung

## 1 Anästhetika

### 1.1 Historisches

Die moderne operative Medizin wie wir sie heute kennen, wäre ohne die Entdeckung und Entwicklung von Anästhetika unmöglich gewesen. Der Grundstein hierfür wurde 1842 von Crawford W. Long gelegt: er entdeckte die anästhetische Potenz des Diäthyläthers. (Nach [13], [9].) 4 Jahre später fand die erste erfolgreiche öffentliche Demonstration einer schmerzfreien Operation am spontan atmenden Patienten in Ätheranästhesie durch William T.G. Morton statt [7]. Für ca. 100 Jahre blieb die Ätheranästhesie das Mittel der Wahl bei der Durchführung operativer Eingriffe.

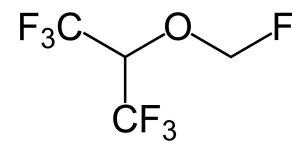
Ab den 1940ern ermöglichten neue Kenntnisse der organischen Chemie die Entwicklung unterschiedlicher Moleküle mit anästhetischer Potenz. Hinzu kam ein breiterer Wissensstand der Pharmakokinetik volatiler Anästhetika, was zum Ersatz chlorhaltiger Verbindungen mit fluorhaltigen Verbindungen führte, da diese die Blutlöslichkeit herabsetzen und somit eine Verkürzung der Ein- und Ausleitungsphase der Narkose sowie eine bessere intraoperative Steuerung der Narkosetiefe ermöglichten. (Nach [13].)



**Abb. 1: Strukturformel von Isofluran**

### 1.2 Eigenschaften von Isofluran und Sevofluran

Isofluran und Sevofluran sind heute die am meisten verwendeten volatilen Anästhetika in den Industrienationen. Ihre Strukturformeln sind in Abb. 1 und 2 dargestellt. Bei beiden Substanzen handelt es sich um halogenierte Methyl-Ether, die eine hohe molekulare Stabilität besitzen, weder brennbar noch explosiv sind und bei Raumtemperatur als Flüssigkeit vorliegen. Weitere physikalische und chemische Eigenschaften von Sevofluran und Isofluran sind in Tab. 1 zusammengefasst.



**Abb. 2: Strukturformel von Sevofluran**

Sowohl Isofluran als auch Sevofluran sind wegen der raschen Anflutung bei kleinen Blut/Gas-Verteilungskoeffizienten zur Narkose-Einleitung und -Aufrechterhaltung prinzipiell geeignet, wobei die Einleitung mit Isofluran (ca. 7 bis 10 min) im Vergleich zu Sevofluran (ca. 2 min) deutlich länger dauert. Eine weitere Einschränkung besteht beim

	Isofluran	Sevofluran
Molekulargewicht	184,5	200,05
Siedepunkt (bei 760 mm Hg)	48,5 °C	58,6 °C
Geruch	stechend	angenehm
Spezifisches Gewicht (bei 25 °C)	1,50	1,53
Dampfdruck (bei 25 °C)	295 mm Hg	197 mm Hg
Blut/Gas-Verteilungskoeffizient	1,4	0,63
Gehirn/Blut-Verteilungskoeffizient	1,6	1,7
MAK (Alter ca. 40 Jahre)	1,15 %	2,05%
Metabolisierung	< 0,2 %	< 5 %

**Tab. 1: Physikalische und chemische Eigenschaften von Isofluran und Sevofluran. Aus [13].**

Isofluran: Wegen des stechenden Geruchs wird es zur Narkose-Einleitung mit einem kurzwirkenden intravenösen Anästhetikum kombiniert. Die MAK-Werte (minimale alveoläre Konzentration, die bei 50 % der Patienten eine Abwehrreaktion auf einen definierten Schmerzreiz unterdrückt) sind altersabhängig und vermindern sich für beide Substanzen mit zunehmendem Lebensalter. Beide Substanzen werden hauptsächlich unverändert über die Lunge ausgeschieden. Während beim Isofluran nur ein sehr geringer Anteil (< 0,2 %) in der Leber zu Fluorid, Chlorid und Trifluoressigsäure metabolisiert wird, ist dieser Anteil beim Sevofluran mit < 5 % etwas größer. Sevofluran wird zu Fluorid, CO<sub>2</sub> und Hexafluoridisopropanol abgebaut. Damit liegt die Fluoridkonzentration im Blut unter Sevofluran-Narkose deutlich höher als bei Isofluran. Obwohl Fluorid potentiell nephrotoxisch ist, wurde auch bei Sevofluran kein klinisch signifikanter Effekt auf die Nierenfunktion beobachtet. Mit zunehmender Narkosetiefe nehmen Atemdepression und Blutdruckabfall bei beiden Anästhetika dosisabhängig zu. Wegen ihrer zerebral vasodilatierenden Wirkung sollten Isofluran und Sevofluran bei Patienten mit erhöhtem Risiko eines intrakraniellen Druckerhöhung mit Vorsicht verwendet werden. (Nach [13] sowie den Fachinformationen für Sevofluran (Sevofluran) und Isofluran (Isofluran).)

### 1.3 Wirkmechanismen von Isofluran und Sevofluran

Seit Ende des 19. Jahrhunderts hielt sich die Einheitstheorie der Anästhesie, die besagte, dass allen volatilen Anästhetika ein einheitlicher Wirkmechanismus zugrunde liegt. Es wurde angenommen, dass volatile Anästhetika eine unspezifische Wirkung an hydrophoben Lipidkomponenten der Zelle ausüben. Gestützt wurde diese Hypothese durch die Meyer-Overton Regel (um 1900), die eine enge Korrelation zwischen Fettlöslichkeit und



anästhetischer Potenz beschreibt.

Inzwischen wurden etliche Wirkorte auf molekularer Ebene identifiziert, so dass diese Theorie verlassen wurde. Vielmehr geht man gegenwärtig davon aus, dass Anästhetika die Wirkung inhibitorischer postsynaptischer Ionenkanäle verstärken und die Wirkung exzitatorischer postsynaptischer Ionenkanäle inhibieren, wodurch letztlich die neuronale Reizweiterleitung gehemmt wird. Die einzelnen Anästhetika unterscheiden sich dabei in dem Muster, welche Rezeptoren moduliert werden. So verstärken die halogenierten Ether, zu denen Isofluran und Sevofluran gehören, die inhibitorischen GABA<sub>A</sub>- und Glycin-Rezeptoren, während die exzitatorischen nikotinergeren Acetylcholin- und Glutamat-Rezeptoren inhibiert werden. (Nach [11].)

## 2 Neurologischer Hintergrund

### 2.1 Die Blut-Hirn Schranke: Aufbau und Eigenschaften

Im Gegensatz zu anderen Körperregionen wird der Stoffaustausch zwischen Blut und Umgebung im Zentralnervensystem (ZNS) durch die Blut-Hirn Schranke (BHS) eingeschränkt und kontrolliert. Dies sichert die Aufrechterhaltung des zerebralen ionalen und metabolischen Gleichgewichts, das für die neuronalen Funktionen benötigt wird.

Die Entdeckung der Blut-Hirn Schranke nahm ihre Anfänge in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts. Damals injizierte Paul Ehrlich wasserlösliche Farbstoffe intravenös und stellte fest, dass sich sämtliche Organe des Körpers dadurch anfärben ließen - mit einer Ausnahme: das ZNS blieb ungefärbt [20]. 1967 wurde die besondere Rolle der Tight Junctions zerebraler Endothelzellen bei der Ausbildung der Barrierefunktion der BHS bewiesen [53]. Dass die BHS jedoch als „funktionelle Einheit mehrerer Zelltypen“ gesehen werden muss, machten folgende Versuche klar: Läßt man Endothelzellen des ZNS in verpflanztes Gewebe einwachsen, das nicht aus dem ZNS stammt, so verlieren die Endothelzellen ihre Eigenschaften der BHS. Umgekehrt werden Endothelzellen, die nicht ursprünglich im ZNS angelegt wurden, von verpflanztem neuronalem Gewebe dazu angeregt, Eigenschaften der BHS auszubilden [62].

Zerebrale Kapillaren unterscheiden sich von Kapillaren anderer Körperstellen unter anderem durch das Fehlen von Fenestrationsen, sie besitzen eine besonders hohe Dichte an Perizyten und sind fast komplett mit Astrozytenfortsätzen bedeckt. Darüber hinaus nehmen auch die Neurone Einfluß auf die Hirnkapillaren [30]. Deshalb spricht man heutzutage auch von einer „Neurovaskulären Einheit“ aus Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten, Mikrogliazellen und Neuronen [18].

Im Folgenden werden die Eigenschaften zerebraler Endothelzellen, die für die Ausbildung der BHS verantwortlich sind, genauer erläutert:

**Tight Junctions:** Tight Junctions (auch „Zonula occludens“ genannt) sind Verbindungen einer Zelle mit ihren Nachbarzellen zur Abdichtung von Grenzflächen in Epithelien. Darüber hinaus sorgen Tight Junctions für eine Polarisierung der Epithelzellen, in dem sie die Diffusion von Membrankomponenten vom luminalen in den basolateralen Bereich der Zellmembran und umgekehrt verhindern. Tight Junctions sind aufgebaut aus mehreren Strängen integraler Membranproteine (Claudine, Occludin), die an die entsprechenden Proteine der Nachbarzelle binden und so den parazellulären Transport einschränken, wobei die Durchlässigkeit mit steigender Strangzahl abnimmt. „Zonula occludens“-Proteine (ZO-1, ZO-2, ZO-3) verbinden die integralen Membranproteine mit dem Aktin-Zytoskelett [35]. Insbesondere erniedrigt die Expression von Occludin in den Tight Junctions der zerebralen Endothelzellen die parazelluläre Permeabilität und sorgt für einen hohen transepithelialen elektrischen Widerstand [66].

**Stoffaustausch über die BHS:** Die fehlende Fenestration zerebraler Endothelzellen sowie die Einschränkung der parazellulären Permeabilität durch Tight Junctions bedingen, dass der Stoffaustausch über die BHS weitestgehend transzellulär stattfinden muss.

**Transzytose und Endozytose:** Die Dichte an endozytotischen Vesikeln in zerebralen Endothelzellen ist deutlich niedriger als im Endothel anderer Organe [53], [61]. In Vesikeln werden Ionen und kleinere lösliche Moleküle mittels Pinozytose transportiert, der gerichtete Transport von größeren Molekülen wird über Rezeptoren vermittelt. Bei den Vesikeln kann man Caveolae und Clathrin-gecoatete Vesikel unterscheiden. Bei Caveolae handelt es sich um 50 bis 100 nm große Mikroinvaginationen der Zellmembran, die sich als Vesikel ins Innere der Zelle abkapseln und mit anderen Vesikeln oder der Zellmembran fusionieren können. Die luminalen Membran enthält Rezeptoren z.B. für Lipoproteine (LDL und HDL) und Insulin, die sich vermutlich über einen Caveolae-assoziierten Mechanismus von der Zellmembran in Vesikeln organisieren und mit der basolateralen Zellmembran wieder fusionieren. Caveolae scheinen so die Rezeptor-vermittelte Transzytose von LDL [17], HDL [4] und Insulin [50] über die BHS zu regeln. Im Gegensatz dazu findet die Rezeptor-vermittelte Endozytose von LDL, wenn während der Wachstumsphase Cholesterin für den Aufbau der Zellmembran benötigt wird, über Clathrin-gecoatete Vesikel statt [17].

**Transportproteine und Ionenkanäle:** Neben Lipoproteinen müssen weitere essentielle Nährstoffe wie Glucose und Aminosäuren die Blut-Hirn Schranke

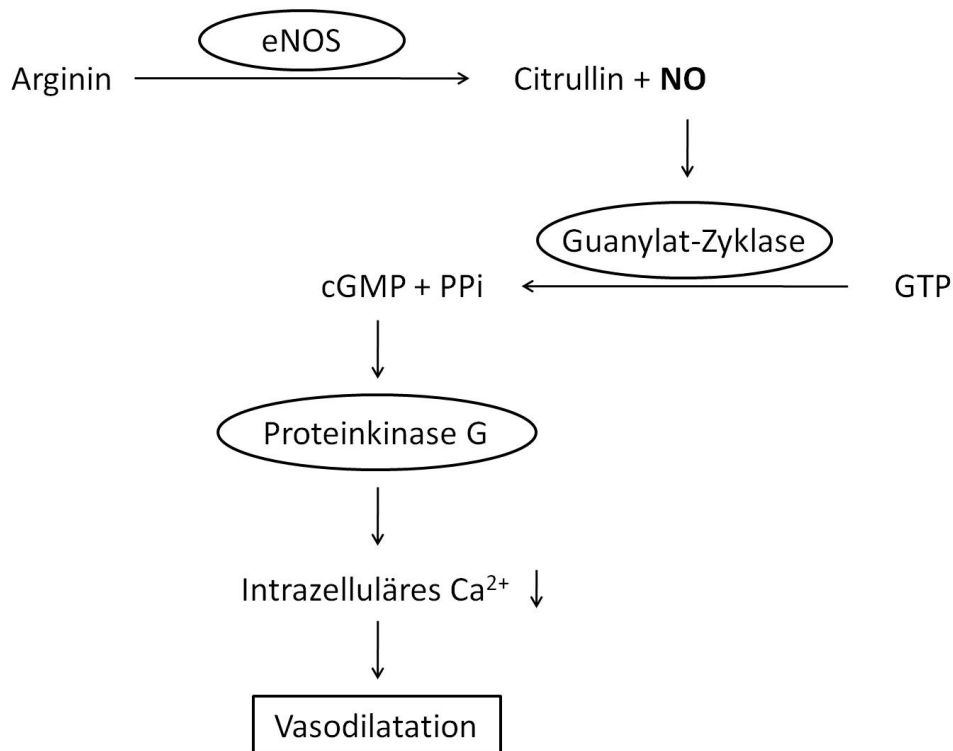
passieren. Man unterscheidet dabei den passiven Transport entlang des Konzentrationsgefälles (und bei Ionen des elektrischen Potentials) und den aktiven, energieverbrauchenden Transport. Glucose gelangt passiv über den Glut-1 Transporter über die BHS [8] und wird insulinabhängig über Glut-4 [37] und insulinunabhängig über Glut-3 [40] in Neurone aufgenommen. Auch für Aminosäuren existieren Transportsysteme über die BHS [49]. Die Aufrechterhaltung des ionalen Gleichgewichts in der interstitiellen Hirnflüssigkeit wird aktiv durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der basolateralen Membran der zerebralen Endothelzellen erreicht, in engem Zusammenspiel mit weiteren Transportern bzw. Ionenkanälen [23]. Möglicherweise gewährleistet hierbei die besonders hohe Dichte an Mitochondrien der Endothelzellen der BHS die Aufrechterhaltung der aktiven Pumpleistung entgegen Konzentrationsunterschieden über die BHS [47].

**Efflux-Transporter:** Darüber hinaus besitzt das Endothel des ZNS eine Reihe von aktiven Efflux-Transportern, die potenziell neurotoxische Substanzen, die im Gehirn entstanden sind oder die aufgrund ihrer Struktur (Lipophilie) ins Gehirn gelangt sind, aus dem Gehirn pumpen. So werden zahlreiche Medikamente wie Chemotherapeutika, Antimykotika, Antidepressiva, Antiepileptika, u.v.m. von den Efflux-Transportern wieder aus dem Gehirn ausgeschleust [5]. P-Glykoprotein (P-gp) ist der Efflux-Transporter, der als erstes entdeckt und am meisten beforscht wurde [39]. Er gehört zur Superfamilie der „ABC-Transporter“ (ATP Binding Cassette), die ihre Substrate unter ATP-Verbrauch translozieren. Beim Menschen gibt es zwei Isoformen von P-gp: „MDR1“ und „MDR2“, was für „Multidrug Resistance“ steht. F. Schlachetzki und W.M. Pardridge konnten zeigen, dass P-gp im Gehirn nicht nur in der Endothelzellmembran sondern auch in Astrozyten lokalisiert ist [57], was auf einen ubiquitären Entgiftungsmechanismus des Gehirns hindeutet.

## 2.2 Die Blut-Hirn Schranke: in vitro Modelle

Bei dem Versuch Zellkulturen zerebraler Endothelzellen herzustellen, musste man feststellen, dass die BHS-spezifischen Eigenschaften oftmals nicht ausgebildet wurden bzw. dass zerebrale Endothelzellen in Kultur rasch einer Dedifferenzierung unterlagen. Dem entgegenzuwirken gelang z.B durch Co-Kultivierung der Endothelzellen mit Astrozyten [31] oder durch Verwendung von Medium, das vorher durch Astrozyten geprägt wurde [54]. Die in dieser Arbeit verwendete immortalisierte Zelllinie hCMEC/D3 wurde so selektiert, dass sie die meisten spezifischen Eigenschaften der Blut-Hirn Schranke auch ohne Co-Kultivierung mit Astrozyten beibehält [65].

### 2.3 NO-Synthasen und ihre Wirkung im Gehirn



**Abb. 3: NO-Pathway:** Das durch die endotheliale NO-Synthase gebildete NO diffundiert in die benachbarten glatten Muskelzellen, aktiviert dort die Guanylat-Zyklase, die cGMP erzeugt. cGMP aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase G, die Zielproteine phosphoryliert und dadurch in ihrer Aktivität verändert. Als Folge davon sinkt die Konzentration des intrazellulären Calciums, was zu einer Relaxation der glatten Muskulatur der Blutgefäße und damit zu Vasodilatation führt. (Nach [1], [14], [22].)

Die NO-Synthasen (NOS) katalysieren die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) aus Arginin. Es gibt 3 verschiedene Isoformen der NO-Synthasen im menschlichen Körper. Zunächst wurde angenommen, dass zwei dieser Isoformen konstitutiv aktiv wären und unterschied sie von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS). Die beiden konstitutiv aktiven Formen wurden zunächst im Endothel (eNOS) [52] und den Neuronen (nNOS) [10] gefunden. Inzwischen weiß man, dass alle drei Isoformen durch unterschiedliche Stimuli induziert werden können und nicht ausschließlich in dem Gewebe produziert werden, wo sie zuerst entdeckt wurden. Die Namen eNOS, iNOS und nNOS haben sich dennoch gehalten. (Nach [42].)

Während der eNOS primär neuroprotektive Wirkungen des NO zugeschrieben werden, wie Regulation des zerebralen Blutflusses durch Vasodilatation (vgl. Abb. 3), bringt man die nNOS und die iNOS mit Neurotoxizität bei überschießender NO-Produktion in Zusammenhang [56]. NO stellt ein reaktives freies Radikal dar, das mit Superoxid-

anionen, die bei entzündlichen Reaktionen ebenfalls gebildet werden, zum hochtoxischen Peroxynitrit reagiert [19]. NO kann darüber hinaus mit der Thiol-Gruppe von Cysteinen reagieren und so die S-Nitrosylierung von Proteinen auslösen [60], was sowohl physiologische als auch pathophysiologische Effekte, insbesondere Neurotoxizität, zur Folge haben kann [43].

Beim ischämischen Schlaganfall z.B. vergrößert sich das Infarkt-Areal in eNOS-Knockout-Mäusen [32], während sich das Infarkt-Areal in nNOS- und iNOS-Knockout-Mäusen verkleinert. Die nNOS spielt hierbei in der akuten Phase eine Rolle [33], während die iNOS erst in der post-ischämischen Periode exprimiert wird [34].

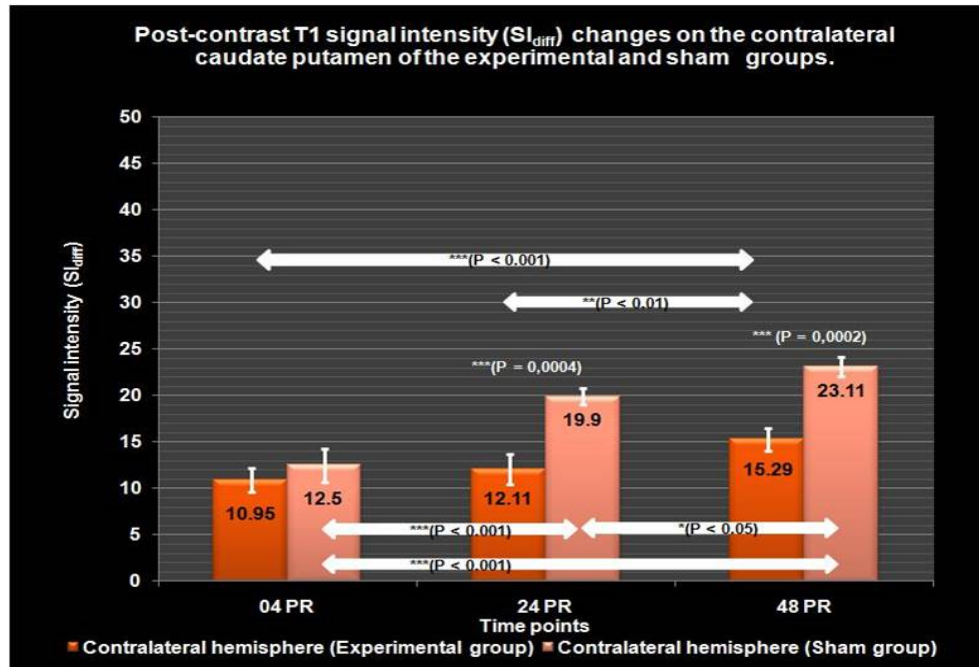
## 2.4 NO-Synthasen in Endothelzellen unter Hypoxie

Auch in Zellkultur zerebraler Endothelzellen wurde gefunden, dass die iNOS-Expression unter Hypoxie signifikant und die eNOS-Expression ebenfalls leicht ansteigt [41]. In Zellkultur humaner Endothelzellen, die nicht zerebralen Ursprungs sind, wurde ebenso gefunden, dass die iNOS-Expression unter Hypoxie ansteigt; die eNOS-Expression nimmt unter Hypoxie hingegen ab [44], [48]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass eine Aktivitätsabnahme der eNOS unter Hypoxie mit einer Veränderung des Phosphorylierungszustandes der eNOS einhergeht [48].

## 2.5 Wirkung volatiler Anästhetika auf das Gehirn

Isofluran und Sevofluran führen dosisabhängig zu einer zerebralen Vasodilatation. Hierbei nimmt der zerebrale Blutfluss unter Sevofluran- bzw. Isofluran-Narkose weniger ab als der zerebrale Sauerstoff-Verbrauch. Dieser Effekt gewährleistet eine „Luxusdurchblutung“ [13] des Gehirns unter Narkose und ist unter Isofluran beim Menschen etwas größer als unter Sevofluran [3]. Die zerebrale Vasodilatation scheint durch NO vermittelt zu werden: In Ratten führen Narkosen mit Isofluran und Sevofluran zu einem Anstieg der NO-Konzentration im zerebralen Kortex, der durch einen unspezifischen NOS-Inhibitor abgeschwächt wird [6]. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Zunahme des zerebralen Blutflusses unter Isofluran-Narkose durch die Gabe des unspezifischen NOS-Inhibitors  $N^{\omega}$ -nitro-L-arginin (L-NNA) deutlich vermindert wurde. Der zerebrale Blutfluss nahm auch in nNOS-Knockout-Mäusen unter Isofluran-Narkose deutlich zu und wurde in niedrigen bis mittleren Konzentrationen ebenfalls durch L-NNA vermindert. Bei hohen Isofluran-Konzentrationen konnte L-NNA die Isofluran-abhängige Vasodilatation jedoch nicht beeinflussen [46]. Darüber hinaus wurde gefunden, dass die vermehrte NO-Produktion im zerebralen Kortex von Ratten unter Isofluran- und Sevofluran-Narkose nicht durch einen spezifischen Inhibitor der nNOS, hingegen schon durch einen spezifischen Inhibitor der iNOS vermindert werden kann [58]. Diese bei-

den Ergebnisse legen nahe, dass die durch volatile Anästhetika vermittelte zerebrale Vasodilatation nicht durch die nNOS ausgelöst wird.



**Abb. 4: MRT-Kontrastmitteleinstrom in die kontralaterale Großhirnhemisphäre scheinoperierter, mehrfach narkotisierter Ratten:** Signalintensität (zerebrales Blutvolumen + extravasales Kontrastmittel) in der kontralateralen Großhirnhemisphäre scheinoperierter Tiere (rechte, hellrote Balken) unter repetitiver Isofluran-Monoanästhesie im Abstand von 20 bzw. 24 Stunden. Aus [51].

Bei MRT-Untersuchungen an Ratten nach zerebraler Ischämie fiel auf, dass das zerebrale Blutvolumen der scheinoperierten Vergleichstiere unter repetitiver Isofluran Monoanästhesie signifikant zunahm. Hierbei wurden die Tiere nach der Scheinoperation 3 mal im Abstand von 20 bzw. 24 Stunden narkotisiert um mittels MRT analysiert werden zu können. Die Signalintensität (entsprechend dem Kontrastmitteleinstrom in der kontralateralen Großhirnhemisphäre) nahm hierbei von 12,5 während der ersten Narkose auf 19,9 während der zweiten Narkose und auf 23,11 während der dritten Narkose signifikant zu (siehe Abb. 4 (aus [51])). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die zerebrale Vasodilatation eine Art „Gedächtnis“ besitzt, da sich der Effekt bei repetitiven Expositionen sukzessive vergrößert.

### 3 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, in Zellkultur zerebraler Endothelzellen herauszufinden, ob diese sukzessive Zunahme der Vasodilatation unter wiederholter Anästhesie mit volatilen Anästhetika durch den NO-Pathway vermittelt wird. Dabei sind unterschiedliche Möglichkeiten denkbar. Zum einen kann man annehmen, dass dieser Effekt auf einer Enzyminduktion der NOS beruht, die die vorliegende Proteinmenge der NOS mit jeder weiteren Exposition weiter ansteigen lässt. Zum anderen wurde beschrieben, dass die Aktivität der eNOS von ihrem Phosphorylierungszustand abhängt [21]. Somit wäre ebenfalls denkbar, dass diese sukzessive Zunahme der Vasodilatation auf einen höheren Aktivierungsgrad der eNOS zurückzuführen ist.

Um dies herauszufinden, wurden die zerebralen Endothelzellen mehrfach volatilen Anästhetika ausgesetzt und jeweils die NO-Produktion im Zellmedium sowie die eNOS- und die iNOS-Expression analysiert. Auf die Analyse der nNOS wurde verzichtet, da sie vermutlich bei diesem Mechanismus keine Rolle spielt. (Siehe hierzu Kapitel 2.5 „Die Wirkung volatiler Anästhetika auf das Gehirn“.)

# Material und Methoden

Die tabellarische Auflistung des Materials befindet sich im Anhang (ab Seite 44), Hyperlinks im Text verweisen auf die entsprechende Seite.

## 4 Methoden

### 4.1 Versuchsdesign

In dieser Arbeit sollten humane zerebrale Endothelzellen (hCMEC/D3<sup>(S.48)</sup>) repetitiven Expositionen mit Isofluran oder Sevofluran ausgesetzt werden und anschließend auf die NO-Bildung und auf die Expression der endothelialen und der induzierbaren NO-Synthase untersucht werden. In Vorversuchen sollten die optimalen Versuchsparameter ermittelt und für die Hauptversuchsreihe festgelegt werden.

#### 4.1.1 Vorversuche

Konfluente hCMEC/D3 wurden 2 x für eine Stunde mit 1 MAK (1,2 %) Isofluran im Abstand von 12 bzw. 24 Stunden begast (Probennamen: 12-x bzw. 24-x). Unmittelbar vor der letzten Begasung wurde das Zellmedium abgesaugt und 6 ml Medium ohne Ascorbin-Säure-Zusatz auf die Zellen gegeben. 0, 2 oder 4 Stunden nach der letzten Begasung wurden die Zellen geerntet (Probennamen: x-0, x-2 bzw. x-4). Eine Zellkulturflasche wurde 3 x im Abstand von je 12 Stunden begast und ebenfalls nach 2 Stunden geerntet (Probename: 12(3x)). Gleichzeitig zum Ernte-Zeitpunkt wurde auch das Medium für die Untersuchung der NO-Produktion entnommen, in Aliquots mit je 250  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Als Kontrolle diente eine Zellkulturflasche mit hCMEC/D3, die keinem Anästhetikum ausgesetzt wurde. Der Vorversuch umfasste also die Analyse von 7 unterschiedlich behandelten Zellkulturflaschen und einer Kontrolle. (Das genaue Vorgehen bei Begasung mit volatilen Anästhetika wird auf Seite 20 beschrieben.)

#### 4.1.2 Wiederholte Expositionen mit Isofluran und Sevofluran

In der Hauptversuchsreihe wurden 13 verschiedene Gruppen gebildet: die unbegaste Kontrollgruppe und die 12 Gruppen aus Tab. 2.

Jede dieser Gruppen umfasste die Untersuchung dreier Zellkulturflaschen. Die Kontrollgruppe umfasste 4 Zellkulturflaschen, da jeweils bei den Begasungen mit 1 MAK Isofluran, 2 MAK Isofluran, 1 MAK Sevofluran und 2 MAK Sevofluran eine Kontrolle



Anzahl der Begasungen	Isofluran <sup>(S.45)</sup>		Sevofluran <sup>(S.46)</sup>	
	1 MAK	2 MAK	1 MAK	2 MAK
1 x	1 Iso 1 x	2 Iso 1 x	1 Sevo 1 x	2 Sevo 1 x
2 x	1 Iso 2 x	2 Iso 2 x	1 Sevo 2 x	2 Sevo 2 x
3 x	1 Iso 3 x	2 Iso 3 x	1 Sevo 3 x	2 Sevo 3 x

**Tab. 2: Gruppeneinteilung und -namen**

mitgeführt wurde. Die verwendeten Konzentrationen von Iso- und Sevofluran orientieren sich an den MAK-Werten eines ca. 40-jährigen Menschen (siehe Tab. 3).

	Isofluran	Sevofluran
1 MAK	1,2 %	2,1 %
2 MAK	2,4 %	4,2 %

**Tab. 3: Narkosegas-Konzentrationen**

Nach Durchführung des Vorversuchs wurden die Versuchsparameter wie folgt festgelegt: Die Exposition mit volatilen Anästhetika erfolgte für je 1 h, bei mehrmaliger Exposition erfolgte die Begasung alle 12 h für je 1 h. Unmittelbar vor der letzten Begasung wurde das Zellmedium abgesaugt und 6 ml Medium ohne Ascorbin-Säure-Zusatz auf die Zellen gegeben. Für die Untersuchung der NO-Bildung wurde 1 ml des Zellmediums nach der letzten Begasung entnommen, in Aliquots mit je 250  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Die Zellkulturflaschen wurden erneut für zwei Stunden im Brutschrank gelagert bevor sie zur Untersuchung der Proteinexpression geerntet wurden. Eine graphische Darstellung der Vorgehensweise zeigt Abb. 5. (Das genaue Vorgehen bei Begasung mit volatilen Anästhetika wird auf Seite 20 beschrieben.)

#### 4.1.3 Hypoxie und Reoxygenierung

Konfluente hCMEC/D3 wurden einer 24-stündigen Hypoxie ausgesetzt und anschließend geerntet. Kontrollen wurden normoxischen Bedingungen ausgesetzt. Die Analyse der Hypoxie umfasst  $n = 6$  Zellkulturflaschen und  $n = 5$  Kontrollen.

Für die Untersuchung der Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung wurden die Zellkulturflaschen im Anschluß an die 24-stündige Hypoxie wieder in den normalen Brutschrank platziert und 4, 24 oder 48 Stunden später geerntet. Die Kontrollgruppe umfasste  $n = 2$  Zellkulturflaschen. In den Gruppen 24 h Hypoxie, 24 h Hypoxie + 4 h Reoxygenierung, 24 h Hypoxie + 24 h Reoxygenierung und 24 h Hypoxie + 48 h Reoxygenierung wurden jeweils 3 Zellkulturflaschen untersucht. (Das genaue Vorgehen bei

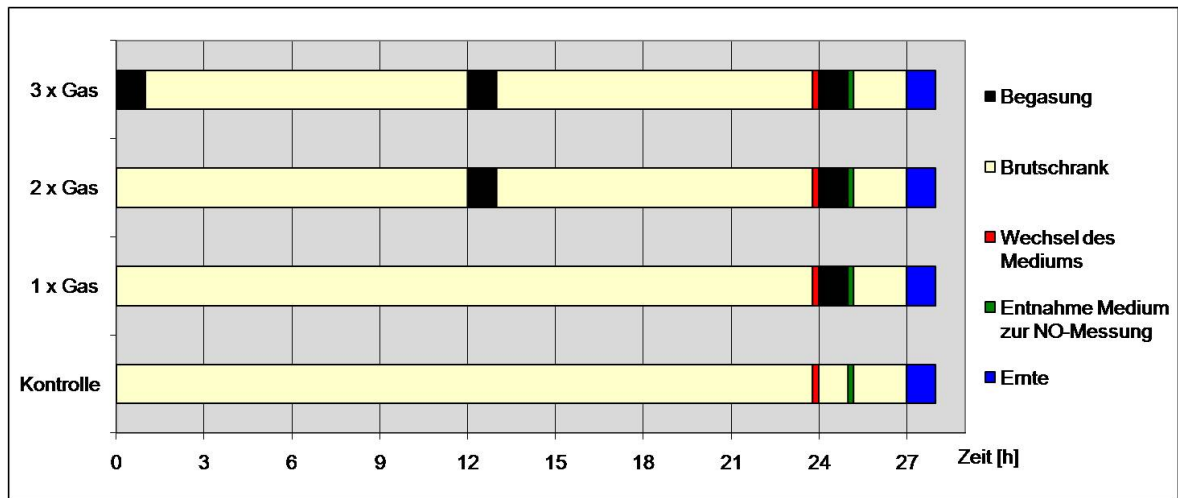


Abb. 5: Graphische Darstellung der Vorgehensweise zur Untersuchung wiederholter Expositionen mit Isofluran und Sevofluran

Hypoxie bzw. bei Hypoxie mit Reoxygenierung wird auf Seite 21 beschrieben.)

## 4.2 Zellkultivierung

### 4.2.1 Allgemeines

Mit Zellen wird unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Das Verbrauchsmaterial sowie alle Medien und Lösungen, die im Umgang mit den Zellen eingesetzt werden, werden autoklaviert, sofern nicht bereits steril gekauft, und nur unter der Sterilbank<sup>(S.47)</sup> geöffnet. Die Anzucht von hCMEC/D3-Zellen erfolgt in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen<sup>(S.44)</sup> im Brutschrank<sup>(S.47)</sup> bei 37 °C in Luft (aus Druckluft), die mit 5 % CO<sub>2</sub> versetzt wird.

### 4.2.2 Medium zur Kultivierung von hCMEC/D3

Zur Anzucht der hCMEC/D3-Zellen wird das EGM-2-Medium<sup>(S.45)</sup> verwendet. Es besteht aus dem Basalmedium EBM-2, wobei jede 500 ml Flasche vor Benutzung mit den folgenden Zusätzen (EGM-2 MV Single Quots) ergänzt wird:

- 6,25 ml FBS,
- 500 µl hFGF-B,
- 125 µl VEGF,
- 125 µl R<sup>3</sup>-IGF-1,
- 125 µl Ascorbinsäure,
- 125 µl hEGF,
- 125 µl GA-1000 (Gentamicin, Amphotericin B),
- 50 µl Hydrocortison

### 4.2.3 Beschichtung der Zellkulturflaschen

Die Böden der Zellkulturflaschen müssen vor der Anzucht von hCMEC/D3-Zellen einmalig mit Kollagen<sup>(S.44)</sup> beschichtet werden. Hierbei wird die Kollagen-Lösung 1:40 in PBS<sup>(S.46)</sup> verdünnt. Ca. 5 ml dieser Verdünnung werden in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche pipettiert, diese wird geschwenkt, so dass der Boden komplett benetzt ist. Die Lösung wird wieder abgenommen und die Flasche wird 30 min zur Fixierung des Kollagens im Brutschrank gelagert.

## 4.3 Zellbiologische Methoden

### 4.3.1 Zellen splitten und ernten

Zunächst wird das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellkulturflasche mit 10 ml PBS gewaschen. Das PBS wird wieder abgesaugt und 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung<sup>(S.46)</sup> auf die Zellen gegeben. Die Zellkulturflasche wird geschwenkt und 3 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden vom Boden der Zellkulturflasche durch Klopfen gelöst. Unter dem Mikroskop<sup>(S.47)</sup> wird überprüft, ob sich die Zellen gelöst haben. Wenn dies nicht der Fall ist, kann die Inkubationszeit bis auf maximal 10 min verlängert werden. Anschließend werden 5 ml Medium zugegeben, da das im Medium enthaltene Serum das Trypsin inhibiert. Die gelösten Zellen werden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 272 x g für 8 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand der zentrifugierten Zellen wird abgesaugt, die Zellen werden in 1 ml Medium resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Zellzahlbestimmung werden an dieser Stelle 10 µl für die 1:16 Verdünnung entnommen. Zum Splitten der Zellen wird die gewünschte Zellzahl anschließend in einer neuen Zellkultur-Flasche mit 10 ml frischem Medium ausgebracht. Zum Ernten werden die Zellen nach der Zellzahlbestimmung erneut pelletiert, der Überstand wird abgenommen und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 4.3.2 Zellzahl-Bestimmung

Die Zellzahl einer Zellkultur wird mit der Neubauer-Zählkammer<sup>(S.47)</sup> ermittelt. Dazu wird die geerntete Zellkultur (in 1 ml Medium - siehe Punkt „Zellen splitten und ernten“) 1:16 verdünnt und 10 µl unter das Deckglas der Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop sieht man das Zählgitter der Neubauer-Zählkammer, das aus 3 x 3 Großquadraten von je 1 mm Kantenlänge besteht. Üblicherweise werden 4 dieser Großquadrate ausgezählt, wobei die gemittelte Zellzahl eines Großquadrates mit 10<sup>4</sup> und dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden muß um die Zellzahl der Zellkultur pro ml zu errechnen.

### 4.3.3 Exposition der Zellen mit volatilen Anästhetika



**Abb. 6: Versuchsaufbau**

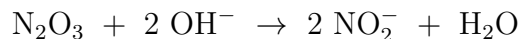
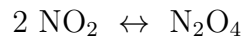
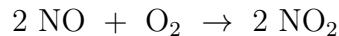
Der Versuchsaufbau zur Begasung der Zellen ist in Abb. 6 dargestellt. Als Schutz vor austretenden Narkosegasen wird unter einem Abzug gearbeitet. Über ein Narkosegerät<sup>(S.47)</sup> wird Druckluft mit 5 % CO<sub>2</sub> und der gewünschten Konzentration Isofluran oder Sevofluran versetzt. Der Gasfluß wird auf ca. 2 l/min eingestellt und über einen befeuchteten Beatmungsfilter<sup>(S.44)</sup> geleitet. Damit mehrere Zellkulturflaschen gleichzeitig begast werden können, wird das austretende Gasgemisch über zwei Hahnbanken auf insgesamt 9 Leitungen verteilt. 8 dieser Leitungen können so zur Begasung der Zellen verwendet werden. Die verbleibende Leitung wird zur ständigen Kontrolle der Gas-Konzentrationen an einen Capnomac-Monitor<sup>(S.47)</sup> angeschlossen. Die Zellkulturflaschen werden für die Dauer des Versuchs auf einer Heizplatte auf eine Temperatur von ca. 37 °C gewärmt. Mit Hilfe einer Kanüle wird jeweils ein Loch in die Deckel der Zellkulturflaschen gestochen, so dass ein Entweichen von Gas möglich ist. Die zuführende Leitung mit dem Gasgemisch wird anschließend über eine an anderer Stelle im Deckel verbleibende Kanüle angeschlossen. Die Begasung erfolgt über 60 min, anschließend wird noch 10 min mit Druckluft mit 5 % CO<sub>2</sub> ohne Iso- oder Sevofluran begast um das volatile Anästhetikum auszuwaschen.

### 4.3.4 Hypoxie und Reoxygenierung

Die Zellen, die der Hypoxie ausgesetzt werden, werden in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit verschließbarem Deckel<sup>(S.46)</sup> und nicht in Flaschen mit Filterpapier im Deckel angezogen. Die Zellkulturflaschen werden zunächst mit leicht geöffnetem Deckel für 4 h zur Equilibrierung in einen Hypoxie-Brutschrank<sup>(S.47)</sup> (37 °C, Stickstoff mit 5 % CO<sub>2</sub> und 3 % Sauerstoff) gelegt. Anschließend werden die Deckel zugedreht und die Flaschen für die gewünschte Hypoxie-Dauer inkubiert. Zur Reoxygenierung werden die Zellkulturflaschen nach Beendigung der Hypoxie wieder mit leicht geöffnetem Deckel in den normalen Brutschrank gelegt.

## 4.4 NO-Messung

Da das durch die NO-Synthasen gebildete NO kurzlebig ist, wird dieses über die stabilen Endprodukte Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) und Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) im Zell-Überstand bestimmt. Im Folgenden sind eine Reihe an möglichen Reaktionen dargestellt, wie das NO zu Nitrit und Nitrat umgewandelt wird. Darüber hinaus kann das Nitrit in biologischen Systemen zu Nitrat oxidiert werden.



Da beide der unten dargestellten Methoden Nitrit quantifizieren, wird dem Griess-Assay eine enzymatische Reduktion des Nitrats zu Nitrit vorgestellt [67], bei der GC-MS-Messung wird Nitrat mit elementarem Cadmium zu Nitrit reduziert [15]. Um ausschließlich Nitrat zu bestimmen, wird sowohl eine Messung nach Reduktion des Nitrats als auch eine reine Nitrit-Messung durchgeführt, so dass sich die Nitrat-Konzentration aus der Differenz ergibt.

### 4.4.1 Griess-Assay

Beim Griess-Assay handelt es sich um einen kolorimetrischen Test zur Quantifizierung von Nitrit.

Je 2 x 50 µl der zu messenden Proben sowie des Nitrit- bzw. Nitrat-Standards (100 µM; 50 µM; 25 µM; 12,5 µM; 6,25 µM; 3,125 µM; 1,56 µM und 0 µM in Zellmedium ohne Ascorbinsäure) werden in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. (Ascorbinsäure und andere Reduktionsmittel inhibieren den Griess-Assay.) Pro Well werden

40  $\mu\text{l}$  Conversion Buffer<sup>(S.49)</sup> (für die alleinige Nitrit-Bestimmung wird Conversion Buffer ohne Nitratreduktase verwendet) und 10  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  NADPH zugegeben und 45 min bei RT inkubiert um das Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Danach werden pro Well 20  $\mu\text{l}$  Griess-Reagenz<sup>(S.45)</sup> (Reagenz A 1:1 mit Reagenz B gemischt) und 80  $\mu\text{l}$  Wasser zugegeben und weitere 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es bildet sich eine rosafarbene Azoverbindung, die im Microplate Reader<sup>(S.47)</sup> bei 540 nm vermessen wird. Über die Nitrit- bzw. Nitrat-Standard-Werte wird eine Standardgerade ermittelt, aus deren Steigung dann die Konzentrationen der Proben errechnet werden. (Nach [24], [64], [67])

#### 4.4.2 GC-MS-Messung

Um Nitrat und Nitrit mittels Gaschromatograph und Massenspektrometer (GC-MS) zu quantifizieren, müssen diese zunächst so derivatisiert werden, dass sie in die Gasphase übertreten können. Dafür bedient man sich ihrer Pentafluorbenzyl-Derivate:

Zur Reduktion des Nitrats zu Nitrit werden je 2 x 80  $\mu\text{l}$  der zu messenden Proben mit 10  $\mu\text{l}$  einer 4,2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}^{15}\text{NO}_3$ <sup>(S.44)</sup>-Lösung, 20  $\mu\text{l}$  einer 20 % Essigsäure und ca. 5 mg ( $\approx$  eine Spatelspitze) Cd-Pulver versetzt. Die Ansätze werden für 15 min bei 30 °C im Wasserbad mit Ultraschall behandelt und anschließend bei 15700 x g für 2 min bei RT zentrifugiert. Zur Nitrit-Derivatisierung werden 100  $\mu\text{l}$  des Überstands eingesetzt.

Für die Nitrit-Derivatisierung werden je 2 x 80  $\mu\text{l}$  der zu messenden Proben sowie des Nitrit-Standards (32,3  $\mu\text{M}$ ; 16,2  $\mu\text{M}$ ; 8,1  $\mu\text{M}$ ; 3,2  $\mu\text{M}$ ; 1,6  $\mu\text{M}$  und 0  $\mu\text{M}$ ) bzw. 100  $\mu\text{l}$  der Proben aus der Nitrat-Reduktion mit 10  $\mu\text{l}$  einer 71,2  $\mu\text{M}$   $\text{Na}^{15}\text{NO}_2$ <sup>(S.44)</sup>-Lösung und 400  $\mu\text{l}$  -20 °C kaltem Aceton versetzt, vermischt und für 10 min bei -20 °C gelagert. Die Proben werden erneut vermischt, dann bei 15700 x g für 2 min bei RT zentrifugiert. 400  $\mu\text{l}$  des Überstands werden mit 100  $\mu\text{l}$  Toluol und 5  $\mu\text{l}$  Pentafluorbenzylbromid versehen und vermischt. Die Ansätze werden für 1 h bei 50 °C im Wasserbad mit Ultraschall behandelt, auf Eis abgekühlt und bei 15700 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. 80  $\mu\text{l}$  der oberen Phase werden in Vials für die GC-MS-Messung überführt. Die Vials werden mittels GC-MS<sup>(S.47)</sup> unter folgenden Bedingungen vermessen:

Injektionsvolumen:	1 $\mu\text{l}$
Injektortemperatur:	250 °C
Betriebsmodus:	Splitless für 2 min
Helium-Flow:	1 ml/min konstant
Säulen-Model:	Restek 13623-127 Rxi-5Sil MS w/ Integra-Guard <sup>(S.44)</sup>
Säulen-Länge:	30,0 m
Säulen-Durchmesser:	250,00 $\mu\text{m}$
Film-Dicke (der Säule):	0,25 $\mu\text{m}$

Ofen-Programm:	100 °C für 2 min, danach Steigerung der Temperatur um 20 °C/min bis 230 °C
Laufzeit:	8,5 min

Das Nitrit wird im MS im NCI-Modus mit Methan als Ionisierungsgas bei  $m/z = 46$  und das  $^{15}\text{N}$ -Nitrit bei  $m/z = 47$  detektiert. Über die Nitrit-Standard-Werte wird eine Standardgerade ermittelt, aus deren Steigung die Konzentrationen der Proben errechnet werden. Das  $^{15}\text{N}$ -Nitrit (bzw. Nitrat) dient hierbei als interner Standard. (Nach [27], [63])

## 4.5 Proteinbiochemische Methoden

### 4.5.1 Gesamtproteinextraktion

Alle Schritte werden auf Eis, mit gekühlten Lösungen und in gekühlten Zentrifugen durchgeführt. Zellpellets der 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen werden auf Eis aufgetaut. Pro Probe werden 100  $\mu\text{l}$  RIPA-Puffer<sup>(S.49)</sup> mit 4  $\mu\text{l}$  Protease-Inhibitor<sup>(S.46)</sup> versetzt, auf das Zellpellet gegeben und durch pipettieren resuspendiert. Die Proben werden anschließend 30 min bei 4 °C (im Kühlschrank) geschwenkt und 15 min bei 4 °C und 9168 x g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgesäß gegeben und bei -80 °C gelagert.

### 4.5.2 Proteinquantifizierung: BC-Assay

Beim BC-Assay (Bicinchoninic Acid) handelt es sich um einen kolorimetrischen Test zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen. Von den zu messenden Proben werden 1:10 Verdünnungen in RIPA-Puffer hergestellt. Je 2 x 25  $\mu\text{l}$  der 1:10 verdünnten Proben sowie des BSA-Standards<sup>(S.44)</sup> (2 mg/ml; 1 mg/ml; 0,75 mg/ml; 0,5 mg/ml; 0,25 mg/ml; 0,1 mg/ml; 0,02 mg/ml und 0 mg/ml in RIPA-Puffer) werden in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte pipettiert. Pro Well werden 200  $\mu\text{l}$  BC-Assay-Reagenz<sup>(S.44)</sup> (Reagenz B 1:50 in Reagenz A) zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Platte im Microplate Reader bei 540 nm gemessen. Über die BSA-Standard-Werte wird eine Standardgerade ermittelt, aus deren Steigung dann die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet werden. (Nach [59])

### 4.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, wird eine SDS-PAGE durchgeführt. In dieser Arbeit wurden NuPAGE Novex 3-8 % Tris-Acetate Gele<sup>(S.46)</sup> verwendet. Die gewünschte Proteinmenge, üblicherweise 30  $\mu\text{g}$ , wird mit 4 x NuPAGE LDS Sample Buffer<sup>(S.46)</sup>, 10 x NuPAGE Reducing Agent<sup>(S.46)</sup> und H<sub>2</sub>O versetzt, so dass

sich die gewünschte Proteinmenge in der jeweils 1-fachen Konzentration Sample Buffer und Reducing Agent befindet. Vor dem Auftragen werden die Proben für 10 min bei 70 °C inkubiert. Der NuPAGE Tris-Acetat SDS Running Buffer<sup>(S.46)</sup> (20 x-Stammlösung) wird 1:20 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und in die äußere Kammer der XCell SureLock Mini-Cell Apparatur<sup>(S.47)</sup> gefüllt. Für die innere Kammer werden 200 ml Laufpuffer mit 500 µl NuPAGE Antioxidant<sup>(S.46)</sup> versetzt und ebenfalls eingefüllt. Nachdem die Proben und der Proteinstandard<sup>(S.46)</sup> in die Gel-Taschen pipettiert wurden, wird eine Spannung von 150 V angelegt, bis die blaue Farbe das untere Ende erreicht hat bzw. gerade ausgelaufen ist (ca. 75 min). (Nach [36])

#### 4.5.4 Western Blot

Aufbau der Blot-Apparatur:	Antikörper <sup>(S.48)</sup>	Verdünnung
Kathode		
2 x Filterwatte		
2 x Whatman-Papier	Anti-eNOS (Mouse)	1:1000
3-8 % Tris-Acetate Gel	Anti-β-Aktin (Rabbit)	1:5000
PVDF Membran		
2 x Whatman-Papier	Anti-iNOS (Rabbit)	1:1000
1 x Filterwatte	Anti-β-Aktin (Mouse)	1:5000
2 x Whatman-Papier		
3-8 % Tris-Acetate Gel	IRDye 680 Anti-Rabbit (Donkey)	1:15000
PVDF Membran	IRDye 800cw Anti-Mouse (Donkey)	1:15000
2 x Whatman-Papier		
2 x Filterwatte	HRP-conjug. Anti-Mouse (Donkey)	1:5000
Anode		

**Tab. 5: Links: Aufbau der Blot-Aparatur; Rechts: Verdünnungen der Antikörper**

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden in der Tank-Blot-Apparatur XCell II Blot Module CE Mark<sup>(S.47)</sup> in 1 x Transferpuffer<sup>(S.49)</sup> bei 30 V für 1 h (bei einem Gel) oder für 1,5 h (bei zwei Gelen) auf je eine PVDF-Membran<sup>(S.45)</sup> geblottet. Der Aufbau der Blot-Aparatur ist in Tab. 5 dargestellt. Die Membran wird 3 x 10 min mit TPBS<sup>(S.49)</sup> gewaschen und dann für 1 h mit Milk-TPBS<sup>(S.49)</sup> auf dem Schüttler inkubiert, um die Membran mit Proteinen abzusättigen.



**Bei Detektion mit dem Entwickler:**

Die Membran wird mit dem 1. Antikörpern versetzt (in der gewünschten Verdünnung in Milk-TPBS, siehe Tab. 5) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wird die Membran 3 x 10 min mit Milk-TPBS gewaschen und für 1 h mit dem 2. Antikörper (ebenfalls verdünnt in Milk-TPBS) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TPBS für 3 x 10 min wird je 1 x mit TPBS und Wasser gespült und dann je 1 ml Luminol/Enhancer und Peroxide Solution des Pierce ECL Western Blotting Substrate<sup>(S.46)</sup> vermischt und auf die Membran gegeben. Nach Inkubation für 5 min wird die Chemielumineszenz in der Dunkelkammer auf einem Film<sup>(S.44)</sup> detektiert und mit Hilfe eines Entwicklers<sup>(S.47)</sup> dargestellt.

**Bei Detektion mit dem Odyssey Infrared Imaging System:**

Die Membran wird mit den beiden 1. Antikörpern versetzt (in der gewünschten Verdünnung in Milk-TPBS, siehe Tab. 5) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wird die Membran 3 x 10 min mit Milk-TPBS gewaschen und für 1 h mit den beiden 2. Antikörpern (ebenfalls verdünnt in Milk-TPBS) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TPBS für 3 x 10 min wird die Membran auf dem Odyssey Infrared Imaging System<sup>(S.47)</sup> analysiert, wobei  $\beta$ -Aktin auf der jeweils anderen Wellenlänge als Beladungskontrolle dient und zur Normalisierung eingesetzt wird. Bei der Auswertung wird die Hintergrund-Methode „Lane Background“ verwendet.

## 4.6 Datenanalyse

Die statistische Analyse der Daten wird mittels Einfaktorieller ANOVA und Tamhane-T2 bei Post-Hoc-Mehrfachvergleichen bzw. mittels Mann-Whitney-U-Test mit SPSS<sup>(S.50)</sup> durchgeführt.

# Ergebnisse

## 5 Vorversuche

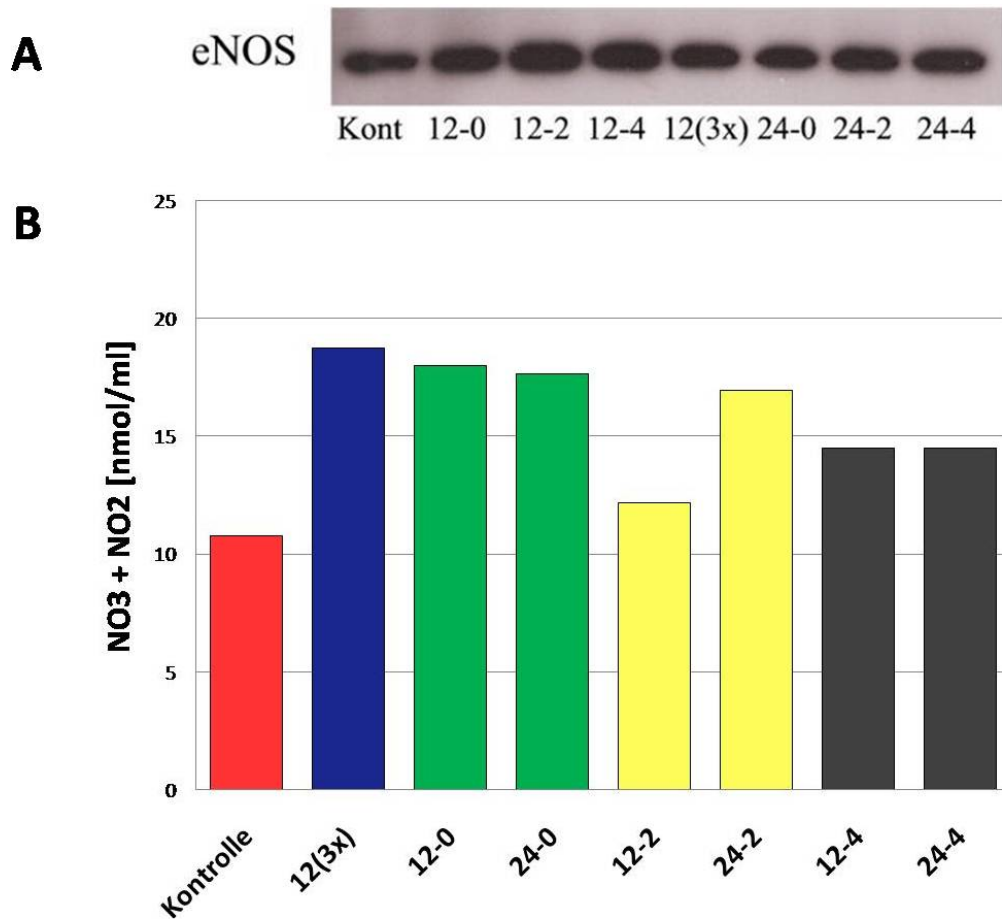
Für die Durchführung der Experimente wurden zunächst in Vorversuchen die optimalen Versuchsbedingungen ermittelt. Dabei ging es vor allem um das Intervall zwischen den Begasungen sowie die Wartezeit zwischen Ende der Begasungen und Zellernte.

Im Western Blot (Abb. 7 A) zeigt sich, dass die Kontrollzellen im Vergleich zu den Isofluran-exponierten Zellen weniger eNOS produzieren. Sowohl bei Betrachtung des 12-Stunden-Intervalls als auch bei Betrachtung des 24-Stunden-Intervalls sieht man, dass die eNOS-Expression nach 2 Stunden höher ist als bei sofortiger Ernte der Zellen. Eine 4-stündige Wartezeit nach der letzten Begasung scheint keine weitere Erhöhung der eNOS-Expression zu bedingen. Desweiteren wurde gefunden, dass die eNOS-Expression im 12-Stunden-Intervall stärker angeregt wird als im 24-Stunden-Intervall.

Auf dem Western Blot, der mit Anti-iNOS behandelt wurde, zeigten sich nur unspezifische Banden. (Abbildung nicht gezeigt.)

Abb. 7 B stellt das Ergebnis der NO-Messung mittels Griess-Assay dar. In allen Proben liegt der Nitrat- und Nitrit-Gehalt höher als in der Kontrolle. Die höchste Konzentration wurde in der Probe 12(3x) erzielt, also nach dreimaliger Begasung. Es zeichnete sich ab, dass der optimale Zeitpunkt der Probenentnahme für die NO-Messung direkt nach der letzten Begasung ist, da danach das nachweisbare NO tendenziell wieder abnimmt.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Versuchsbedingungen für die Hauptversuchsreihe wie folgt festgelegt: Die Begasungen erfolgen im 12-Stunden-Intervall. Ein Aliquot des Zellmediums wird zur NO-Messung sofort nach der letzten Begasung entnommen und die Zellen verbleiben für zwei Stunden nach der letzten Begasung im Brutschrank, bevor sie zur Proteinextraktion geerntet werden.



**Abb. 7: Ergebnisse der Vorversuchsreihe: A: Western Blot:** Je 30  $\mu\text{g}$  Protein wurde pro Spur auf ein 3-8 % Tris-Acetat-Gel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran geblottet. Detektiert wurde mit Anti-eNOS (aus Maus) und HRP-gekoppeltem 2. Antikörper. **B: NO-Produktion:** Das Zellmedium wurde unmittelbar vor der letzten Begasung erneuert und zur NO-Messung mittels Griess-Assay zum Ernte-Zeitpunkt entnommen.

## 6 Wiederholte Expositionen mit Isofluran und Sevofluran

### 6.1 NO-Produktion

Bei der NO-Messung wurden 2 Methoden angewandt: der kolorimetrische Griess-Assay sowie die Messung mittels Gaschromatograph und Massenspektrometer (GC-MS). Die Ergebnisse beider Methoden sind zueinander stimmig, jedoch wurden wegen Schwierigkeiten, die geringen Konzentrationsunterschiede im Vergleich zum reinen Zellmedium mit dem Griess-Assay zu unterscheiden, für diese Auswertung nur die Messungen mit dem GC-MS berücksichtigt.

In Abb. 8 sind die gemessenen Gesamt- $\text{NO}_3^-$ - und  $\text{NO}_2^-$ -Konzentrationen dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, die volatilen Anästhetika ausgesetzt waren, und der Kontrollgruppe. Die höchsten Werte wurden in den Gruppen erreicht, die mit 1 MAK Isofluran begast wurden:  $21,3 \pm 5,6$  nmol/ml in der Gruppe 1 Iso 1 x,  $20,8 \pm 6,7$  nmol/ml in der Gruppe 1 Iso 2 x und  $22,1 \pm 7,6$  nmol/ml in der Gruppe 1 Iso 3 x. Der höchste Einzelwert mit  $27,8$  nmol/ml wurde in der Kontrolle gemessen, die mit der Versuchsreihe mit 1 MAK Isofluran zeitgleich angezogen und geerntet wurde. Der niedrigste Wert wurde in der Gruppe 1 Sevo 1 x gemessen. Hier lag die gemessene Gesamt- $\text{NO}_3^-$ - und  $\text{NO}_2^-$ -Konzentration mit  $12,6 \pm 5,1$  nmol/ml im Bereich des Wertes des reinen Zellmediums mit  $12,8 \pm 1,6$  nmol/ml.

Stellt man  $\text{NO}_3^-$  ohne  $\text{NO}_2^-$  dar, so sieht die Verteilung des  $\text{NO}_3^-$  sehr ähnlich zu Abb. 8 aus, allerdings um ca. 2 bis 4 nmol/ml zu niedrigeren Werten verschoben. Dieser Unterschied entspricht dem Anteil, der auf  $\text{NO}_2^-$  zurückzuführen ist. (Abbildungen nicht gezeigt.)

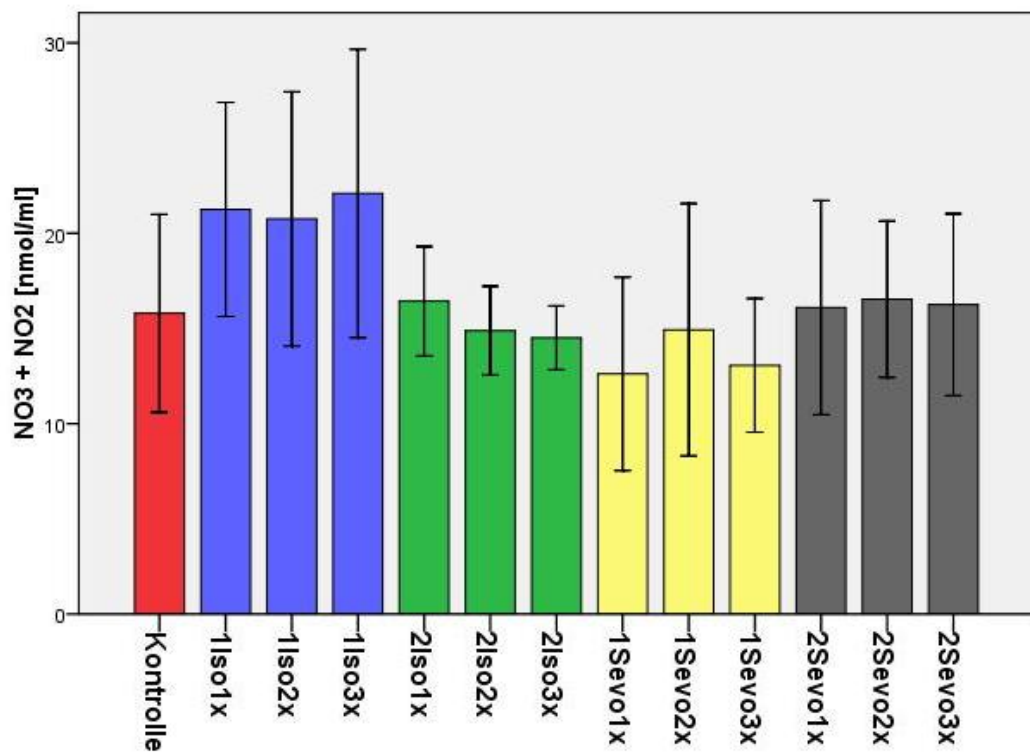
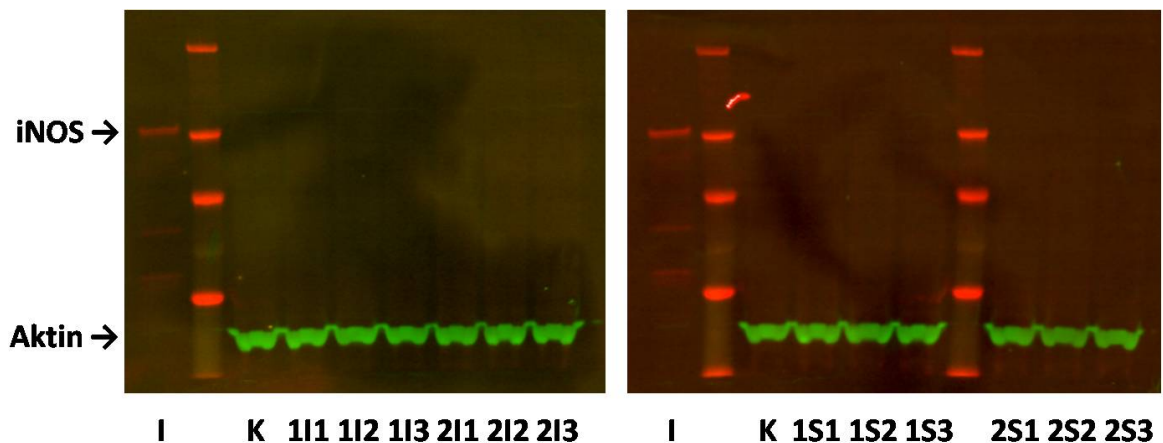


Abb. 8:  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NO}_2^-$  im Zellmedium von hCMEC/D3 nach wiederholten Expositionen mit volatilen Anästhetika: Messung mit dem GC-MS. Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung an.

## 6.2 Expression der NO-Synthasen

### 6.2.1 iNOS-Expression

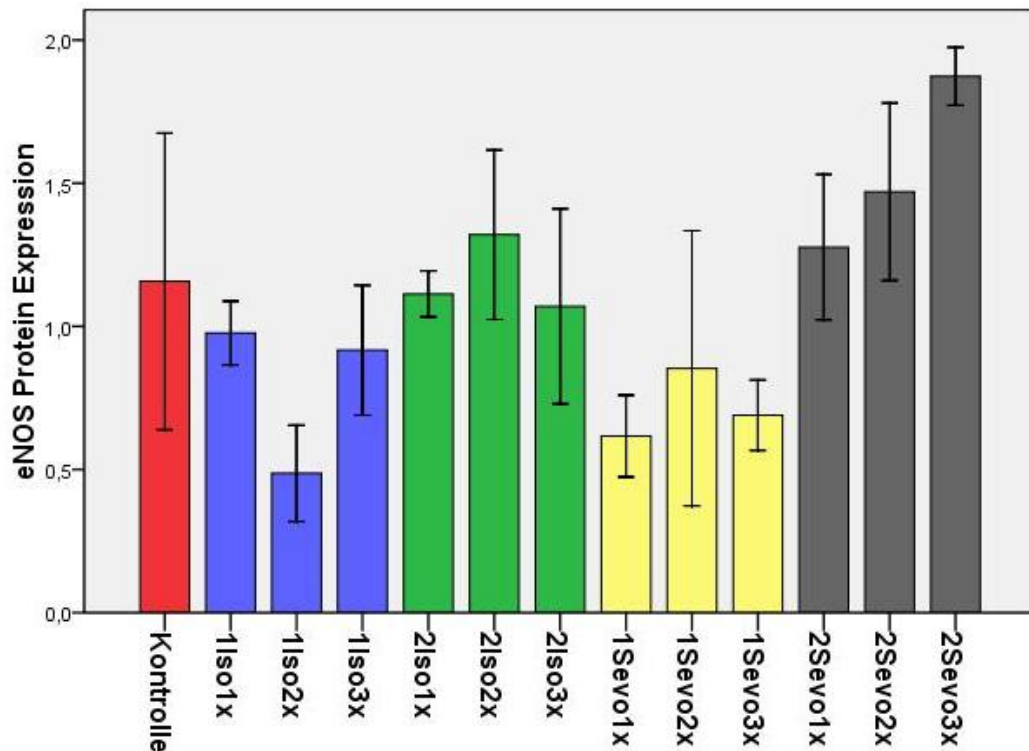
hCMEC/D3 exprimierten unter wiederholten Begasungen mit Isofluran oder Sevofluran keine messbare Menge an iNOS. Als Kontrolle, dass die Western-Blot-Analyse und die Protein-Extraktion funktioniert hat, diente eine Spur mit iNOS-Positivkontrolle<sup>(S.45)</sup> und die Beladungskontrolle  $\beta$ -Aktin. Beides war auf den Blots nachweisbar, jedoch war keine iNOS in den hCMEC/D3-Proteinextrakten nachweisbar. Um dieses Ergebnis zu festigen, wurden statt den üblichen 30  $\mu$ g Protein pro Spur noch Western Blots mit jeweils 72  $\mu$ g Protein pro Spur angesetzt. Doch auch hier wurde keine iNOS detektiert (siehe Abb. 9).



**Abb. 9: iNOS Expression unter repetitiven Expositionen mit volatilen Anästhetika:** Je 72  $\mu$ g Protein wurde pro Spur auf ein 3-8 % Tris-Acetat-Gel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran geblottet. Detektiert wurde gleichzeitig mit Anti-iNOS (aus Kaninchen) und Anti- $\beta$ -Aktin (aus Maus) mit unterschiedlichen IR-Farbstoffen. Proteingrößenstandard von oben nach unten: 250 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 55 kDa, 35 kDa; iNOS (ca. 130 kDa) in rot,  $\beta$ -Aktin (42 kDa) in grün. I: iNOS-Positivkontrolle; K: unbegaste Kontrollgruppe; 1I1: 1 Iso 1 x; 1I2: 1 Iso 2 x; 1I3: 1 Iso 3 x; 2I1: 2 Iso 1 x; 2I2: 2 Iso 2 x; 2I3: 2 Iso 3 x; 1S1: 1 Sevo 1 x; 1S2: 1 Sevo 2 x; 1S3: 1 Sevo 3 x; 2S1: 2 Sevo 1 x; 2S2: 2 Sevo 2 x; 2S3: 2 Sevo 3 x.

### 6.2.2 eNOS-Expression

Die eNOS-Expression änderte sich unter wiederholten Begasungen mit Isofluran oder Sevofluran nur unwesentlich. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und der Kontrolle. Hierbei lagen die Werte der Gruppen am höchsten, die mit 2 MAK Sevofluran begast wurden:  $1,28 \pm 0,25$  in der Gruppe 2 Sevo 1 x;  $1,47 \pm 0,31$  in der Gruppe 2 Sevo 2 x und  $1,87 \pm 0,10$  in der Gruppe 2 Sevo 3 x. Der Wert der Kontrolle, die mit der Versuchsreihe mit 2 MAK Sevofluran zeitgleich angezogen, geerntet und auf den gleichen Western Blot aufgetragen wurde, lag bei 1,74.



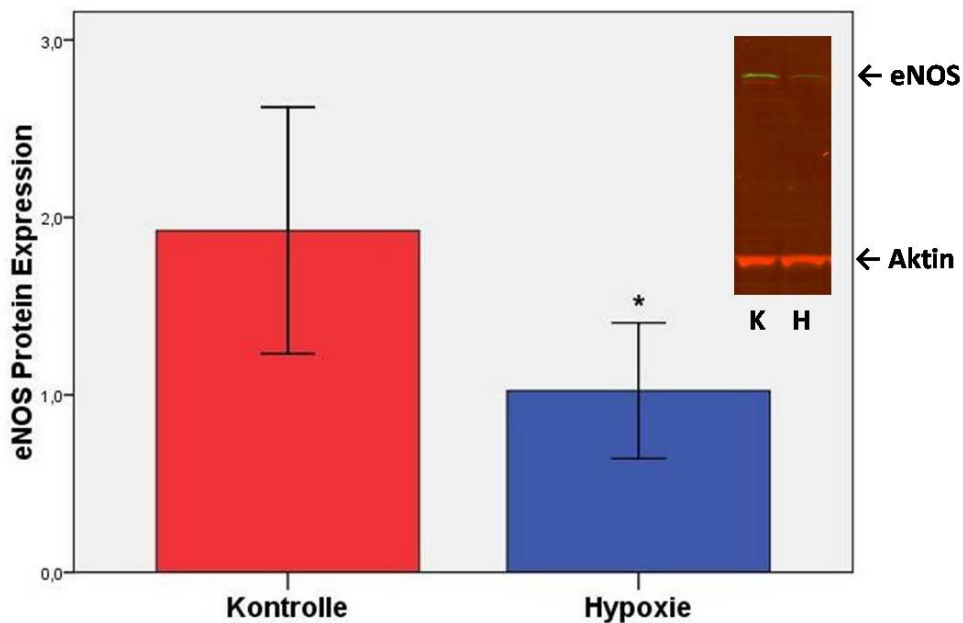
**Abb. 10: eNOS Expression unter repetitiven Expositionen mit volatilen Anästhetika:** Je  $30 \mu\text{g}$  Protein wurde pro Spur auf ein 3-8 % Tris-Acetat-Gel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran geblottet. Detektiert wurde gleichzeitig mit Anti-eNOS (aus Maus) und Anti- $\beta$ -Aktin (aus Kaninchen) mit unterschiedlichen IR-Farbstoffen. Die gemessenen Intensitäten der eNOS wurden auf  $\beta$ -Aktin normalisiert. Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung an.

## 7 Hypoxie

### 7.1 Expression der NO-Synthasen unter Hypoxie

Mittels Western Blot wurde die Expression der eNOS und der iNOS in hCMEC/D3 nach 24-stündiger Hypoxie (ohne anschließende Reoxygenierung) mit der Kontrollgruppe unter Normoxie verglichen.

Während die iNOS weder in Hypoxie noch in Normoxie messbar war, nahm die Expression der eNOS unter Hypoxie signifikant ( $p < 0,05$ ) ab. Die auf  $\beta$ -Aktin normalisierte Intensität der eNOS in der Kontrollgruppe lag bei  $1,93 \pm 0,69$  und sank unter 24-stündiger Hypoxie auf  $1,02 \pm 0,38$  ab (siehe Abb. 11).



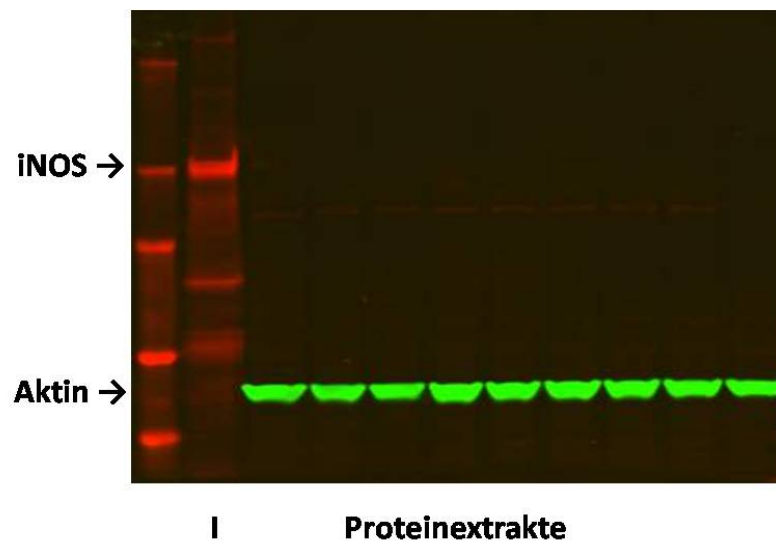
**Abb. 11: eNOS Expression unter Hypoxie:** Je  $30 \mu\text{g}$  Protein wurde pro Spur auf ein 3-8 % Tris-Acetat-Gel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran geblottet. Detektiert wurde gleichzeitig mit Anti-eNOS (aus Maus) und Anti- $\beta$ -Aktin (aus Kaninchen) mit unterschiedlichen IR-Farbstoffen. Die gemessenen Intensitäten der eNOS wurden auf  $\beta$ -Aktin normalisiert. Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung an. \*  $p < 0,05$ . **Inlay:** Ausschnitt Western Blot; linke Spur: Kontrolle (K); rechte Spur: Hypoxie (H). eNOS (135 kDa) in grün,  $\beta$ -Aktin (42 kDa) in rot.



## 7.2 Expression der NO-Synthasen unter Hypoxie und Reoxygenierung

### 7.2.1 iNOS-Expression

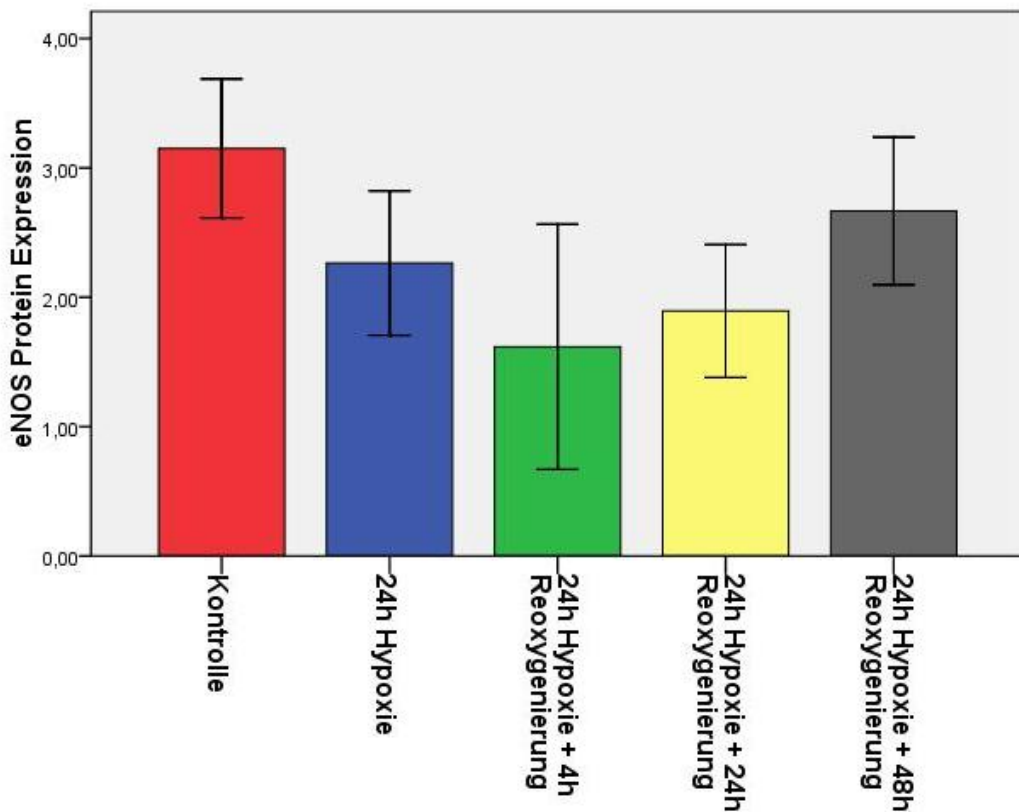
hCMEC/D3 exprimierten auch unter Hypoxie mit anschließender Reoxygenierung keine detektierbare Menge an iNOS. Als Kontrolle, dass die Western-Blot-Analyse und die Protein-Extraktion funktioniert hatten, diente wiederum eine Spur mit iNOS-Positivkontrolle und die Beladungskontrolle  $\beta$ -Aktin. Beides war auf dem Blot nachweisbar, jedoch war keine iNOS in den hCMEC/D3-Proteinextrakten nachweisbar (siehe Abb. 12).



**Abb. 12: iNOS Expression unter Hypoxie und Reoxygenierung:** Je 30  $\mu\text{g}$  Protein wurde pro Spur auf ein 3-8 % Tris-Acetat-Gel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran geblottet. Detektiert wurde gleichzeitig mit Anti-iNOS (aus Kaninchen) und Anti- $\beta$ -Aktin (aus Maus) mit unterschiedlichen IR-Farbstoffen. iNOS (ca. 130 kDa) in rot,  $\beta$ -Aktin (42 kDa) in grün. 1.Spur: Proteingrößenstandard (von oben nach unten: 250 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 55 kDa, 35 kDa); 2.Spur: iNOS-Positivkontrolle (I); restliche Spuren: Proteinextrakte.

### 7.2.2 eNOS-Expression

Die Expression der eNOS nimmt unter 24-stündiger Hypoxie vom Wert der Kontrollgruppe mit  $3,15 \pm 0,54$  auf  $2,26 \pm 0,56$  ab, verringert sich weiter nach 4 h Reoxygenierung auf  $1,62 \pm 0,95$  und steigt nach 24 h Reoxygenierung wieder auf  $1,89 \pm 0,51$  an, bis sie sich nach 48 h Reoxygenierung mit  $2,67 \pm 0,57$  wieder dem Ausgangslevel annähert (siehe Abb. 13).



**Abb. 13: eNOS Expression unter Hypoxie und Reoxygenierung:** Je  $30 \mu\text{g}$  Protein wurde pro Spur auf ein 3-8 % Tris-Acetat-Gel aufgetragen und auf eine PVDF-Membran geblottet. Detektiert wurde gleichzeitig mit Anti-eNOS (aus Maus) und Anti- $\beta$ -Aktin (aus Kaninchen) mit unterschiedlichen IR-Farbstoffen. Die gemessenen Intensitäten der eNOS wurden auf  $\beta$ -Aktin normalisiert. Fehlerbalken zeigen die einfache Standardabweichung an.

# Diskussion

## 8 Problematik der in vitro BHS-Forschung

### 8.1 Vor- und Nachteile der in vitro BHS-Forschung

Die Blut-Hirn Schranke (BHS) ist wegen ihrer Lage im ZNS in vivo am Menschen schwer zu untersuchen. Um dennoch mehr über die Eigenschaften der BHS zu erfahren, finden viele Untersuchungen an Versuchstieren (insbesondere an Ratten und Mäusen) statt. Jedoch bestehen wahrscheinlich Unterschiede zwischen Mensch und Versuchstieren. Auch der Aspekt des Tierschutzes sollte bedacht werden. 1959 bereits stellten W.M.S. Russell und R.L. Burch Prinzipien für Tierversuche anhand der „3 Rs“ auf [55]:

**Refinement:** Die Tiere, die in Tierversuchen zum Einsatz kommen, sollen so wenig wie möglich an Schmerzen und Leiden ertragen müssen.

**Reduction:** Die Zahl der Tiere soll reduziert werden: Einsatz von so wenig Tieren wie unbedingt nötig.

**Replacement:** Tierversuche sollen durch andere Methoden ersetzt werden, wo es möglich ist, das gleiche wissenschaftliche Ziel ohne den Einsatz von Tieren zu erreichen.

Humane in vitro Modelle nehmen folglich einen hohen Stellenwert in der Forschung ein. Doch auch die Herstellung von in vitro Modellen der BHS hat sich als schwierig erweisen. (Siehe Kapitel 2.2.) In diesem Zusammenhang sei nochmal an das komplexe Zusammenspiel aus Endothelzellen, Astrozyten, Perizyten, Mikrogliazellen und Neuronen erinnert, die gewissermaßen eine „Neurovaskulären Einheit“ bilden.

Bei der Zelllinie dieser Arbeit handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie, die darauf selektioniert wurde, dass sie wichtige Eigenschaften der BHS auch ohne Cokultivierung mit Gliazellen beibehält. Untersucht wurden unter anderem die Bildung und Zusammensetzung von Tight Junctions, die Expression von Efflux-Transportern, die selektive Permeabilität etc. Obwohl die Korrelation mit den Eigenschaften der BHS im Großen und Ganzen gut war, so fanden sich doch bereits Unterschiede: z.B. wurde Occludin nicht durchwegs in Tight Junctions exprimiert und der transendotheliale Widerstand war relativ niedrig [65].

Deshalb ist fraglich, inwieweit die hCMEC/D3 die tatsächlichen Gegebenheiten der BHS auch in Bezug auf unsere Experimente widerspiegeln können.

## 8.2 Immortalisierung mittels hTERT und SV40

Telomere sind Strukturen an den Enden eukaryotischer Chromosomen, die aus repetitiven DNA-Motiven und daran bindenden Proteinen bestehen. Durch die Telomerstruktur wird verhindert, dass die Chromosomen-Enden als beschädigte DNA erkannt werden. Das Enzym Telomerase sorgt dafür, dass die endständige DNA nicht bei jeder Replikation verkürzt wird, indem es als reverse Transkriptase die repetitiven DNA-Motive mit Hilfe eines RNA-Templates verlängert [25], [26].

Dass Unterschiede zwischen den Endothelzellen von Menschen und Mäusen bestehen, lässt sich einfach belegen: Mäuse exprimieren in allen Körperzellen das Enzym Telomerase, während die meisten somatischen Zellen der Menschen dieses Enzym nicht besitzen. Das bedeutet, dass in den meisten menschlichen Zellen die Enden der Chromosomen mit jeder Replikation kürzer werden [29]. Hat diese Verkürzung ein bestimmtes Niveau überschritten, so wird die betroffene Zelle daran gehindert, weiter zu proliferieren. Dieser Zustand wird Seneszenz genannt. Nachdem auch die menschlichen Endothelzellen keine Telomerase bilden, muss dieses Enzym den Endothelzellen zugefügt werden, um sie in Zellkultur über einen längeren Zeitraum stabil anzüchten zu können. Deshalb wurde die Zelllinie, die in dieser Arbeit verwendet wurde, mit einem lentiviralen Vektor transduziert, der die DNA-Sequenz der katalytischen Untereinheit der menschlichen Telomerase (hTERT) enthält und in das Wirts-Genom integriert [68]. Diesen Vorgang nennt man „stabile Transduktion“.

Doch eine funktionierende Telomerase alleine reicht nicht aus, um Endothelzellen zu immortalisieren [45]. Der Zellzyklus hat verschiedene Kontrollpunkte, die nur durchlaufen werden können, wenn mit der Zelle alles in Ordnung ist. Zwei wichtige Proteine, die hierbei eine Rolle spielen, sind p53 und pRb, zwei sogenannte Tumorsuppressoren. pRb bindet den Transkriptionsfaktor E2F und inhibiert diesen. E2F aktiviert die Transkription von Genen, die Proteine codieren, die für den Eintritt der Zellen in die S-Phase benötigt werden. Wird pRb phosphoryliert, so löst sich die Bindung von pRb und E2F und die S-Phase wird initiiert. Die Phosphorylierung von pRb erfolgt z.B. durch extrazelluläre Signale wie Mitogene. p53 hingegen wird in unbeschädigten Zellen schnell abgebaut und liegt somit nur in geringer Konzentration vor. Treten jedoch DNA-Schäden auf, so akkumuliert p53 und aktiviert die Transkription einer Reihe von Genen, die den Zellzyklus arretieren. Kann die beschädigte DNA nicht repariert werden, so induziert p53 die Apoptose. (Nach [1].)

Durch das sogenannte large-T-Antigen, ein Protein des SV40 (Simian Virus 40), werden sowohl p53 [12], [38] als auch pRb [16] gebunden und inaktiviert. Dies hat zur Folge, dass die infizierten Zellen unabhängig von äußeren Stimuli und DNA-Schäden rasch proliferieren. Das large-T-Antigen des SV40 ist deshalb das zweite Protein, dessen Gensequenz

über einen lentiviralen Vektor in die hCMEC/D3 Zellen eingebracht wurde um diese zu immortalisieren.

Wie man sich vorstellen kann, birgt diese Form der Herstellung immortalisierter Zellen gewisse Risiken. Durch die Inhibition von p53 und pRb unterliegt die Zellproliferation einer geringeren Kontrolle. DNA-Schäden werden von den Zellen ignoriert und können akkumulieren. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass Mutationen beider Proteine mit Krebs assoziiert sind. Die immortalisierte Zelllinie hCMEC/D3 ist jedoch keine Krebs-Zelllinie: hCMEC/D3-Zellen bilden Monolayer in Zellkulturflaschen und unterliegen einer Kontakt-Inhibition, wenn sie konfluent werden. Dies sind Eigenschaften, die bei der Transformation zu Krebs-Zellen verloren gingen. Heutzutage entspricht die Vorstellung der Krebsentstehung einer Mehrschritt-Theorie, die besagt, dass eine Zelle mehrerer verschiedener krebsbegünstigender Mutationen bedarf, bis sich ein bösartiger Tumor bildet. Allerdings ist die Immortalisierung ein kritischer Schritt bei der Tumorigenese [28].

## 9 Diskussion der angewandten Methoden

### 9.1 NO-Messung

In dieser Arbeit kamen zwei unterschiedliche Methoden zur Messung von Nitrat und Nitrit als stabile Endprodukte von NO zum Einsatz. Zum einen wurde der Griess-Assay angewandt, ein kolorimetrischer Test zur Quantifizierung von Nitrit, dem eine enzymatische Reduktion von Nitrat zu Nitrit vorangestellt wurde. Zum anderen wurde eine Reduktion des Nitrats zu Nitrit durch elementares Cadmium und die anschließende Messung des Nitrits mittels GC-MS durchgeführt. Die zweite Methode wurde gewählt, da sich im Griess-Assay bei der Messung der Hauptversuchsreihe die Unterschiede zwischen dem Zellmedium, in dem die Standard-Nitrat/Nitrit-Gerade angesetzt wurde, und den Proben nicht darstellen ließen. Deshalb wurde versucht ein niedrigeres Detektionslimit mit dem GC-MS zu erreichen um die Unterschiede darstellen zu können. Jedoch wurde gleichzeitig dazu übergegangen, die Standard-Eichgerade nicht in Zellmedium sondern in Wasser anzusetzen und den Wert des reinen Zellmediums extra zu messen. Somit wurden mit dem GC-MS sinnvolle Ergebnisse erzielt und die Messungen konnten ausgewertet werden. Ob diese Methode allerdings tatsächlich dem Griess-Assay überlegen ist, bleibt ungeklärt. Vermutlich hätte man die gleichen Ergebnisse erzielt, wenn man beim Griess-Assay die Standard-Eichgerade in Wasser und nicht in Zellmedium angesetzt hätte. Dort, wo sich die Ergebnisse von Griess-Assay und GC-MS-Messung vergleichen lassen, sind sie zueinander stimmig: Der höchste Wert von Nitrat und Nitrit wurde mit beiden Messungen in der Kontrolle der Versuchsreihe mit 1 MAK Isofluran erzielt und mit beiden Methoden waren die Werte der Versuchsreihe mit 1 MAK Isofluran deutlich

über den Werten der anderen Proben, die sich zum Teil nur sehr wenig von dem Wert in reinem Zellmedium unterscheiden.

## 9.2 Western Blot

Auch beim Western Blot kamen zwei unterschiedliche Detektions-Methoden zum Einsatz. Bei der einen Methode handelt es sich um die herkömmliche Methode mit einem 2. Antikörper, der an HRP (Peroxidase aus Meerrettich) gekoppelt ist. Zur Detektion der Banden wird eine Luminol-Peroxid-Lösung auf die Membran gegeben, die als Substrat für die HRP dient. Luminol wird dabei oxidiert und in einen angeregten Zustand versetzt. Beim Übergang in den Grundzustand wird Licht emittiert. Dieses wird mit einem Film in der Dunkelkammer detektiert und durch die Entwicklung des Films sichtbar gemacht. Somit ist bei dieser Art der Detektion ein Verstärkungsschritt eingebaut: die HRP bleibt solange aktiv, wie Substrat vorhanden ist und solange wird auch Licht emittiert. Das bedeutet, dass Unterschiede in den Größen der Banden mit dieser Methode verstärkt werden.

Die zweite Detektionsmethode verwendet einen 2. Antikörper, der an einen Infrarot-Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt ist. Der Infrarot-Fluoreszenz-Farbstoff wird im „Odyssey Infrared Imaging System“ durch einen Laser auf einer Wellenlänge angeregt und gibt dabei energieärmeres Licht einer längeren Wellenlänge ab. Dieses wird detektiert, aber nur genau an der Stelle, an der der Farbstoff über die Antikörper an die Membran gebunden vorliegt. Dadurch fallen die absoluten Unterschiede der detektierten Intensitäten geringer aus als bei der Chemielumineszenz-Methode, was es bei so schwachen Banden wie der eNOS möglicherweise erschwert, signifikante Ergebnisse zu erzielen. Jedoch hat diese Methode einen anderen Vorteil: man kann gleichzeitig zwei verschiedene Proteine mit zwei unterschiedlichen IR-Farbstoffen detektieren und quantifizieren. In dieser Arbeit wurde dies dazu genutzt, eine Normalisierung auf  $\beta$ -Aktin durchzuführen, ein „Housekeeping-Protein“, von dem man annimmt, dass die Expression unter den meisten Bedingungen konstant bleibt. Jedoch ist auch die Normalisierung auf  $\beta$ -Aktin nicht ganz unumstritten, da sehr wohl Bedingungen bekannt sind, die die Expression von  $\beta$ -Aktin beeinflussen. (Für eine kritische Hinterfragung der Methode siehe [2].) In diesem Zusammenhang sollte nicht unerwähnt bleiben, dass in HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) gezeigt wurde, dass die Expression von  $\beta$ -Aktin unter Hypoxie abnimmt [48]. Wäre dies in hCMEC/D3 der Fall, so sollte die Normalisierung auf  $\beta$ -Aktin der Detektion einer signifikanten eNOS-Expressions-Minderung unter Hypoxie entgegenwirken, was bei uns jedoch nicht der Fall war. Bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Arbeit machte es keinen Unterschied, ob auf  $\beta$ -Aktin normalisiert wurde oder nicht. Allerdings erlaubte die gleichzeitige Detektion der iNOS(-Positivkontrolle) mit

$\beta$ -Aktin die Aussage, dass hCMEC/D3 unter keiner der getesteten Bedingungen eine detektierbare Menge an iNOS exprimieren.

## 10 Diskussion der Ergebnisse

### 10.1 Isofluran und Sevofluran haben keinen Effekt auf die NO-Produktion und die Expression der NO-Synthasen

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob wiederholte Expositionen der humanen zerebralen Endothelzellen hCMEC/D3 mit Isofluran oder Sevofluran einen sukzessiven Anstieg der NO-Produktion durch vermehrte Expression oder gesteigerte Aktivität einer oder mehrerer der NO-Synthasen zur Folge haben.

Betrachtet man die NO-Produktion, so fällt auf, dass die Werte der Gruppen, die mit 1 MAK Isofluran begast wurden, höher liegen als die Werte der anderen Gruppen, nämlich etwa bei 21 nmol/ml. Jedoch wurde der höchste Einzelwert mit 27,8 nmol/ml in der Kontrolle gemessen, die mit der Versuchsreihe mit 1 MAK Isofluran zeitgleich angezogen und geerntet wurde. (Dies wurde sowohl mit dem GC-MS als auch mit dem Griess-Assay nachgewiesen.) Deshalb deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass in der Versuchsreihe mit 1 MAK Isofluran ein systematischer Fehler in Form einer Nitrat-Verunreinigung vorlag. Betrachtet man hingegen die eNOS-Expression, so liegen hier die Werte der Gruppen, die mit 2 MAK Sevofluran begast wurden, höher als die Werte der anderen Gruppen. Auch hier liegt allerdings die Kontrolle, die mit der Versuchsreihe mit 2 MAK Sevofluran zeitgleich angezogen und geerntet wurde, im selben Größenbereich wie die Werte der mit 2 MAK Sevofluran begasteten Zellen. Darüber hinaus ist kein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Expression der eNOS und einer vermehrten NO-Produktion gegeben, da sich bei der NO-Produktion mit der Versuchsreihe mit 1 MAK Isofluran eine andere Versuchsreihe von den restlichen Gruppen abhebt als bei der eNOS-Expression mit der Versuchsreihe mit 2 MAK Sevofluran. Die iNOS wurde weder in der Kontrollgruppe noch in den begasteten hCMEC/D3 detektiert. Deshalb ziehe ich die Schlußfolgerung, dass in hCMEC/D3 durch die Begasungen keine Unterschiede zur unbegasteten Kontrollgruppe im Hinblick auf die NO-Produktion und die eNOS- und iNOS-Expression ausgelöst werden. Mögliche Ursachen für dieses Ergebnis wären:

- Der in Tierversuchen beobachtete Effekt ist nicht auf Endothelzellen zurückzuführen. Denkbar wäre z.B., dass die NO-Produktion nicht vom Endothel sondern von Neuronen oder Gliazellen ausgeht. Somit wäre der Effekt in Tierversuchen vorhanden, nicht jedoch in Zellkultur zerebraler Endothelzellen. Da die Endothelzellen aber direkt am Ort der Wirkung, nämlich den Blutgefäßen, lokalisiert sind,

ist die Annahme durchaus logisch, dass Endothelzellen diesen Effekt hervorrufen. Darüber hinaus ist die endotheliale NO-Synthase ein möglicher Kandidat für die Isofluran- und Sevofluran- vermittelte zerebrale Vasodilatation, wohingegen die neuronale NO-Synthase bereits ausgeschlossen wurde. (Siehe Kapitel 2.5.)

- Obwohl die verwendete Zellkultur der hCMEC/D3-Zellen bis zu einer Passage von 34 keiner offensichtlichen Dedifferenzierung unterlag [65], so ist dennoch nicht ausgeschlossen, dass manche Eigenschaften der zerebralen Endothelzellen in Zellkultur nicht erhalten bleiben. Dass dies in unserem Fall aber entscheidend für den Ausgang der Experimente ist, zeigt die Tatsache, dass die vermehrte NO-Produktion und die damit verbundene Vasodilatation durch Isofluran und Sevofluran nur im Gehirn und nicht in anderen Organen auftritt [6].
- Darüber hinaus ist ein wichtiger Detektions-Mechanismus für DNA-Schäden mit der Inhibition von p53 durch das large-T-Antigen des SV40 in den hCMEC/D3-Zellen ausgeschaltet, was zur Folge haben könnte, dass Mutationen unbeboben bleiben. Das bedeutet, dass die für dieses Experiment gezüchteten hCMEC/D3 in Passage 34 evtl. bereits einen anderen Phenotyp aufweisen könnten als die hCMEC/D3, die von Weksler et al bei ihrer Veröffentlichung [65] untersucht wurden. Leider war es in unserem Labor nicht möglich, die Experimente mit Zellen in niedrigeren Passagen als Passage > 34 durchzuführen.
- Auch wäre denkbar, dass die Unterschiede zwischen Erwartung und Ergebnis dieser Versuchsreihe durch Unterschiede in der Reaktion auf Isofluran und Sevofluran zwischen den Versuchstieren (Mäuse und Ratten) und Menschen bedingt sind. Dies halte ich allerdings für unwahrscheinlich, da die in der Einleitung erwähnte Beobachtung, dass der zerebrale Blutfluss unter Sevofluran- bzw. Isofluran-Narkose weniger abnimmt als der zerebrale Sauerstoff-Verbrauch [3], was einer relativen Vasodilatation entspricht, an Menschen gemacht wurde.

## 10.2 Unter Hypoxie nimmt die Expression der eNOS ab

Nachdem mit der Versuchsreihe mit Isofluran und Sevofluran keine Unterschiede in der Expression der NO-Synthasen bewiesen werden konnten, wurde gezielt nach Bedingungen gesucht, durch die sich Unterschiede provozieren lassen. Dies sollte vor allem dazu dienen, zu beweisen, dass wir Unterschiede detektiert hätten, wären welche vorhanden. Nachdem bereits durch mehrere Veröffentlichungen gezeigt wurde, dass sich die eNOS und die iNOS in ihrer Expression durch Hypoxie beeinflussen lassen, haben wir ebenfalls die Hypoxie gewählt.



Bereits nach der Western Blot Analyse von jeweils  $n = 3$  Zellkulturflaschen hatten wir auf einem Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  eine deutliche Abnahme der eNOS-Expression unter 24-stündiger Hypoxie detektiert. Nachdem die iNOS nach 24-stündiger Hypoxie ebenfalls nicht von den hCMEC/D3-Zellen exprimiert wurde, haben wir die Versuchsdurchführung variiert und eine Reoxygenierungsphase von bis zu 48h mit eingeschlossen. Hintergedanke war hierbei, dass beim ischämischen Schlaganfall gezeigt wurde, dass die eNOS und die nNOS in der akuten Phase [32], die iNOS hingegen zeitverzögert in der post-ischämischen Phase eine Rolle spielt [34]. Jedoch konnte die iNOS auch in der Reoxygenierungsphase nicht detektiert werden.

Die Abnahme der eNOS unter 24-stündiger Hypoxie wurde durch die zusätzlich untersuchten Zellkulturflaschen signifikant ( $p < 0,05$ ), womit bewiesen wurde, dass durch meine Arbeit signifikante Unterschiede detektiert werden, falls vorhanden. Auch ließ sich eine zeitabhängige Kurve der eNOS-Expression nach Hypoxie ableiten, die besagt, dass die Expression der eNOS unter Reoxygenierung zunächst weiter abnimmt, bevor sie nach 24-stündiger Reoxygenierung wieder ansteigt.

### 10.3 Kritische Hinterfragung der Ergebnisse

Vergleicht man die unter Hypoxie erzielten Ergebnisse dieser Arbeit mit bereits veröffentlichten Ergebnisse aus der Literatur, so deckt sich das Ergebnis, dass die eNOS-Expression unter Hypoxie abnimmt, mit den Ergebnissen, die in HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) [48] und in HMEC-1 (human dermal microvessel endothelial cells) [44] erzielt wurden. Sieht man sich jedoch die eNOS-Expression in primären Kulturen zerebraler Endothelzellen aus Rindern (BBMEC) an, so steigt diese unter Hypoxie leicht, wenn auch nicht signifikant, an. [41]. Dieses unterschiedliche Verhalten von zerebralen und nicht-zerebralen Endothelzellen wäre durchaus denkbar, zum einen, weil sich die Endothelzellen des ZNS durch die Bildung der BHS in ihren Eigenschaften von den Endothelzellen des restlichen Körpers unterscheiden und zum anderen da auch die gesteigerte NO-Produktion bei Isofluran- und Sevofluran-Narkose nur im zerebralen Cortex und nicht in anderen Organen (Leber, Herz, Nieren, ...) auftritt [6].

Betrachtet man hingegen die iNOS, so sieht man, dass die iNOS unter Hypoxie signifikant ansteigt, egal ob in zerebralen oder dermalen Endothelzellen [41], [44].

Diese Vergleiche mit der Literatur deuten darauf hin, dass die von uns verwendeten hCMEC/D3-Zellen weder in Bezug auf die iNOS, noch in Bezug auf die eNOS so reagiert haben, wie man das von zerebralen Endothelzellen erwarten würde. Deshalb stellt sich die Frage, ob die von uns verwendeten hCMEC/D3-Zellen die tatsächlichen Gegebenheiten der humanen zerebralen BHS-bildenden Endothelzellen widerspiegeln.

## 10.4 Ausblicke

In Bezug auf die Hypoxie-Experimente wäre es interessant zu untersuchen, ob die Expression der iNOS nach Hypoxie eventuell erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt: in Mäusen wurde gezeigt, dass die höchste iNOS-Expression erst 96 Stunden nach dem ischämischen Ereignis erfolgte [34]. Dies ist jedoch eher unwahrscheinlich, denn mittels RT-PCR war die iNOS mRNA auch nach 48 Stunden bereits nachweisbar.

Darüber hinaus wäre es interessant zu untersuchen, ob man in primären Kulturen von zerebralen Endothelzellen (z.B. von Rindern oder Schweinen) eine Reaktion auf die Exposition mit volatilen Anästhetika erzielen kann. Es wäre ebenso interessant zu sehen, welches Ergebnis man in Bezug auf die Hypoxie mit primären Kulturen zerebraler Endothelzellen erhalten würde.

Außerdem könnte man indirekt die Wirkung volatiler Anästhetika auf die eNOS-Expression in hCMEC/D3-Zellen testen, in dem man untersucht, ob volatile Anästhetika die Reduktion der eNOS-Expression unter Hypoxie verringern können.

# Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die in vivo beobachtete zerebrale Vasodilatation durch NO-Produktion als Folge von volatilen Anästhetika auf ein in vitro Modell aus humanen zerebralen Endothelzellen übertragen und genauer charakterisiert werden. Insbesondere sollte einem gesteigerten Effekt bei mehrmaligen Expositionen nachgegangen werden.

Dafür wurden humane zerebrale Endothelzellen mehrfach volatilen Anästhetika ausgesetzt und jeweils die NO-Produktion im Zellmedium sowie die eNOS- und die iNOS-Expression analysiert. Es konnte jedoch kein Effekt nachgewiesen werden.

Es bleibt unklar, worin dies begründet ist. Denkbar wäre zum einen, dass der in vivo beobachtete Effekt nicht auf Endothelzellen sondern auf Neuronen oder Glia-Zellen zurückzuführen ist, zum anderen könnte es daran liegen, dass die komplexen BHS-spezifischen Eigenschaften der Zelllinie hCMEC/D3 in Kultur einer Dedifferenzierung unterliegen. Anhand von Versuchen mit Hypoxie wurde darüber hinaus gezeigt, dass signifikante Unterschiede in der eNOS-Expression in unseren Versuchen messbar sind, wenn vorhanden. Das Verhalten der hCMEC/D3, der hier verwendeten zerebralen Endothelzelllinie, konnte jedoch nicht eindeutig dem in der Literatur beschriebenen Verhalten anderer zerebraler Endothelzellen oder Endothelzellen anderer Körperregionen zugeordnet werden, was eher dafür spricht, dass die hCMEC/D3 einer Dedifferenzierung unterlagen.

Künftige Untersuchungen mit nicht immortalisierten zerebralen Endothelzellen können über den Zusammenhang zwischen Expositionen mit volatilen Anästhetika und der eNOS- sowie iNOS-Expression Aufschluss geben.

# Anhang

## 11 Material

### 11.1 Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Artikel	Firma
<sup>15</sup> N-Natriumnitrat	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA)
<sup>15</sup> N-Natriumnitrit	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA)
1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
2 ml Reaktionsgefäße „Safe-lock“	Sarstedt (Nümbrecht)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Europe GmbH (München)
BC Assay for Protein Quantification	Uptima, Interchim (Montlucon, France)
Beatmungsfilter mit Befeuchtungsfunktion	Covidien Deutschland (Neustadt a.d.Donau)
$\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bicine	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bis-Tris	Sigma-Aldrich (Steinheim)
BSA Standard for Protein Assay	Uptima, Interchim (Montlucon, France)
Capillary Column Restek 13623-127 Rxi-5Sil MS w/10 m Integra-Guard Column (Länge 30 m, Durchmesser 250 $\mu$ m, Film-Dicke 0,25 $\mu$ m)	Restek (Bad Homburg)
Collagen R Typ I Solution	PAN-Biotech (Aidenbach)
Combitips plus	Eppendorf (Hamburg)
Corning 15 ml Centrifuge Tube	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Corning 75 cm <sup>2</sup> Cell Culture Flask	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Corning 96 Well Plate Flat Bottom with Lid	Sigma-Aldrich (Steinheim)

<i>Fortsetzung</i>	
Artikel	Firma
Deoxycholic Acid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
D-Glucose 6-phosphate disodium salt hydrate	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
EGM-2 Endothelial Cell Growth Medium-2	Lonza (Verviers, Belgien)
Epiduralfachfilter mit Luer Lok 0,75 ml 0,2 my zur Plexusblockade	Smiths Medical Deutschland (Grasbrunn)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Forene (Isofluran)	Abbott (Wiesbaden)
Glucose-6-phosphate Dehydrogenase	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Griess Reagent Kit for Nitrite Determination	Invitrogen (Karsruhe)
Hahnbank PVC-frei 3-fach	Braun B. Melsungen (Melsungen)
Hahnbank PVC-frei 5-fach	Braun B. Melsungen (Melsungen)
Handschuhe „Safe-Skin Purple Nitrile“	Kimberly-Clark (Koblenz)
Handschuhe ‘Safe-Skin Satin Plus’	Kimberly-Clark (Koblenz)
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore (Molsheim, Frankreich)
Immun-Blot PVDF-Membrane	Bio-Rad Laboratories (München)
iNOS Positive Control	Cayman Chemicals (Tallinn, Estland)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumnitrat	Fluka (Buchs)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Multipette plus	Eppendorf (Hamburg)
Natriumchlorid	VWR International (Darmstadt)
Natriumnitrit	Fluka (Buchs)
Nitrate Reductase	Sigma-Aldrich (Steinheim)

<i>Fortsetzung</i>	
Artikel	Firma
Normkanülen Gr. 1 gelb 20G	Seidel Medipool (Gauting-Buchendorf)
Nunc EasyFlasks 75 cm <sup>2</sup> Nunclon Verschlusstyp Vent/close	Fisher Scientific GmbH (Schwerte)
NuPAGE Antioxidant	Invitrogen (Karsruhe)
NuPAGE LDS Sample Buffer	Invitrogen (Karsruhe)
NuPAGE Novex 3-8 % Tris-Acetate Gel	Invitrogen (Karsruhe)
NuPAGE Reducing Agent	Invitrogen (Karsruhe)
NuPAGE Tris-Acetate SDS Running Buffer	Invitrogen (Karsruhe)
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
PBS	PAA Laboratories (Cölbe)
Pentafluorbenzylbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Perfusorleitung PVC-frei 150 cm PE-Schlauch 1,0 x 2,0 mm	Seidel Medipool (Gauting-Buchendorf)
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Perbio Science Deutschland GmbH (Bonn)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Precision Plus Protein Prestained Standard	Bio-Rad Laboratories (München)
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (Mannheim)
SDS	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Sevorane (Sevofluran)	Abbott (Wiesbaden)
Sucofin Magermilchpulver	TSI (Zeven)
Toluol	Merck (Darmstadt)
Tris	USB (Bad Homburg)
Trypsin/EDTA	PAA Laboratories (Cölbe)
Tween 20	Sigma-Aldrich (Steinheim)

## 11.2 Geräte

Gerät	Hersteller
3K30 Tischkühlzentrifuge	Sigma
5973 Mass-Selective Detector	Agilent
6890 GC Method Plus	Agilent
Biofuge pico	Heraeus Instruments
Brutschränke (normal und für Hypoxie)	Heraeus Instruments
Capnomac Ultima	Datex Engstrom
Electrophoresis Power Supply EPS 500/400	Pharmacia FineChemicals
EMax Precision Microplate Reader	Molecular Devices
GFL-3025 Reagenzglas Rotator	GFL
Heizplatte (mit Rührer) MR 3001	Heidolph
Megafuge 1,0R	Heraeus Instruments
Mikroskop Fluovert	Leica
Narkosegerät Trajan 808	Dräger
Neubauer-Zählkammer	W.Schreck, Hofheim
Odyssey Infrared Imaging System	LI-COR Biosciences
PH-Meter ph530	WTW
Pipetten (1000/200/20/10 $\mu$ l)	Gilson
Präzitherm Heizplatte PZ35	Harry Gestigkeit
Schüttelgerät	Heidolph
Schüttelgerät	Edmund Bühler
Sterilbank BSB4	Gelair Flow Laboratories
Thermomixer 5436	Eppendorf
Varioklav Dampfsterilisator	H & P Labortechnik
Vortex IKA MS1 Minishaker	IKA
Wärmeschrank	Heraeus Instruments
Waagen	Sartorius
XCell II Blot Module CE Mark	Invitrogen
XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen
X-Omat M35 Film Processor	Kodak
Zentrifuge 5417C	Eppendorf

### 11.3 Zellkultur: hCMEC/D3

Name	Eigenschaften	Referenz
hCMEC/D3	Immortalisierte, humane, adulte, zerebrale Endothelzellen mit spezifischen Eigenschaften der Blut-Hirn Schranke	[65]

### 11.4 Antikörper

Antikörper	Firma
Anti-Actin antibody produced in rabbit	Sigma-Aldrich (Steinheim)
iNOS Polyclonal Antibody	Cayman Chemicals (Tallinn, Estland)
IRDye 680 Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
IRDye 800CW Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	LI-COR Biosciences (Bad Homburg)
Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Monoclonal Anti-Nitric Oxide Synthase Endothelial antibody produced in mouse	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Peroxidase-conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> Fragment Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, England)



## 11.5 Puffer und Stammlösungen

Conversion Buffer:	3,8 mg Glucose-6-Phosphat 2 Units Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase 1 Unit Nitratreduktase in 5 ml Na-Phosphat-Puffer, 14 mM, pH 7,4 lösen
Na-Phosphat-Puffer, 14 mM:	1,01 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 184 mg NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O lösen, pH auf 7,4 einstellen, mit H <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen
RIPA-Puffer:	1 x PBS mit 0,1 % SDS 1 % nonident p40 Detergent 5 g/l Deoxycholic Acid
10x PBS:	80 g NaCl 2 g KCl 21,6 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O lösen, pH auf 7,4 einstellen, mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
TPBS/Milk-TPBS:	1 x PBS mit 0,1 % Tween 20 3 % Magermilchpulver
20x Transferpuffer:	10,2 g Bicine 13,1 g Bis-Tris (free base) 0,75 g EDTA mit H <sub>2</sub> O auf 125 ml auffüllen
1x Transferpuffer:	50 ml 20 x Transferpuffer 1 ml NuPAGE Antioxidant 100 ml Methanol bei Transfer von 1 Gel 200 ml Methanol bei Transfer von 2 Gelen mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen

## 11.6 Software

Auswertung der Western Blots:	Odyssey Infrared Imaging System; Application Software Version 3.0
Auswertung der GC-MS-Daten:	Agilent Technologies, Inc.; Enhanced Chem Station E.02.00.493
Auswertung Microplate Reader:	Molecular Devices; Softmax Version 2.34
Diagramme, Tabellen:	Excel 2007
Literaturrecherche:	<a href="#">PubMed</a>
Statistik:	SPSS 16.0
Textverarbeitung:	L <sup>A</sup> T <sub>E</sub> X- T <sub>E</sub> XnicCenter, MikT <sub>E</sub> X2.8

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
ABC	ATP Binding Cassette
AK	Antikörper
BHS	Blut-Hirn Schranke
BC	Bicinchoninic acid
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Titrplex III)
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FBS	Fetal Bovine Serum
GC	Gaschromatograph
hEGF	Human Epidermal Growth Factor
hFGF-B	Human Fibroblast Growth Factor-basic
hTERT	katalytische Untereinheit der humanen Telomerase
IGF-1	Insuline-like Growth Factor-1
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IR	Infrarot
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L-NNA	N <sup>omega</sup> -nitro-L-arginin
MAK	Minimale alveoläre Konzentration
MDR	Multidrug Resistance
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometer
NCI	Negative chemische Ionisation
nNOS	Neuronale NO-Synthase
NOS	NO-Synthase(n)
NO	Stickstoffmonoxid
P-gp	P-Glykoprotein
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SV 40	Simian Virus 40
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentralnervensystem

## Literaturverzeichnis

- [1] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, Taylor & Francis Group, 4th edition, 2002.
- [2] G.M. Aldridge, D.M. Podrebarac, W.T. Greenough, and I.J. Weiler. The use of total protein stains as loading controls: an alternative to high-abundance single-protein controls in semi-quantitative immunoblotting. *Journal of neuroscience methods*, 172:250–254, 2008.
- [3] A.A. Artru, A.M. Lam, J.O. Johnson, and R.J. Sperry. Intracranial pressure, middle cerebral artery flow velocity, and plasma inorganic fluoride concentrations in neurosurgical patients receiving sevoflurane or isoflurane. *Anesthesia and analgesia*, 85:587–592, 1997.
- [4] Z. Balazs, U. Panzenboeck, A. Hammer, A. Sovic, O. Quehenberger, E. Malle, and W. Sattler. Uptake and transport of high-density lipoprotein (hdl) and hdl-associated alpha-tocopherol by an in vitro blood-brain barrier model. *Journal of neurochemistry*, 89:939–950, 2004.
- [5] J. Bart, H.J. Groen, N.H. Hendrikse, W.T. van der Graaf, W. Vaalburg, and E.G. de Vries. The blood-brain barrier and oncology: new insights into function and modulation. *Cancer treatment reviews*, 26:449–462, 2000.
- [6] L. Baumane, M. Dzintare, L. Zvejniece, D. Meirena, L. Lauberte, V. Sile, I. Kalvinsh, and N. Sjakste. Increased synthesis of nitric oxide in rat brain cortex due to halogenated volatile anesthetics confirmed by EPR spectroscopy. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 46:378–383, 2002.
- [7] H.J. Bigelow. Insensibility during surgical operations produced by inhalation. *The Boston Medical and Surgical Journal*, 35:309–316, 1846.
- [8] M. Bélanger, P. Desjardins, N. Chatauret, and R.F. Butterworth. Selectively increased expression of the astrocytic/endothelial glucose transporter protein GLUT1 in acute liver failure. *Glia*, 53:557–562, 2006.
- [9] L. Brandt and G. Fehr. *Eine Entdeckung in der Chirurgie - Die ersten Monate der modernen Anästhesie im Spiegel der deutschsprachigen Tagespresse*. Wissenschaftliche Verlagsabteilung Abbott GmbH, 1st edition, 1996.
- [10] D.S. Bredt, P.M. Hwang, and S.H. Snyder. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347:768–770, 1990.

- 
- [11] J.A. Campagna, K.W. Miller, and S.A. Forman. Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *The New England journal of medicine*, 348:2110–2124, 2003.
- [12] W.W. Colby and T. Shenk. Fragments of the simian virus 40 transforming gene facilitate transformation of rat embryo cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79:5189–5193, 1982.
- [13] P. Conzen and J. Hobbhahn. *Sevofturan-Kompendium: Inhalationsanästhetikum*. Wissenschaftliche Verlagsabteilung Abbott GmbH & Co. KG, 2nd edition, 2003.
- [14] T.L. Cornwell and T.M. Lincoln. Regulation of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  levels in cultured vascular smooth muscle cells. reduction of  $\text{Ca}^{2+}$  by atriopeptin and 8-bromo-cyclic GMP is mediated by cyclic GMP-dependent protein kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 264:1146–1155, 1989.
- [15] W. Davison and C Woof. Comparison of different forms of cadmium as reducing agents for the batch determination of nitrate. *The Analyst*, 103:403 – 406, 1978.
- [16] J.A. DeCaprio, J.W. Ludlow, J. Figge, J.Y. Shew, C.M. Huang, W.H. Lee, E. Marsilio, E. Paucha, and D.M. Livingston. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*, 54:275–283, 1988.
- [17] B. Dehouck, L. Fenart, M.P. Dehouck, A. Pierce, G. Torpier, and R. Cecchelli. A new function for the ldl receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology*, 138:877–889, 1997.
- [18] G.J. del Zoppo. Stroke and neurovascular protection. *The New England journal of medicine*, 354:553–555, 2006.
- [19] I.T. Demchenko, D.N. Atochin, A.E. Boso, J. Astern, P.L. Huang, and C.A. Piantadosi. Oxygen seizure latency and peroxynitrite formation in mice lacking neuronal or endothelial nitric oxide synthases. *Neuroscience letters*, 344:53–56, 2003.
- [20] P. Ehrlich. Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. Habilitationsschrift, Universität Berlin, 1885.
- [21] I. Fleming and R. Busse. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 284:R1–12, 2003.

- [22] H.A. Ghofrani, J. Pepke-Zaba, J.A. Barbera, R. Channick, A.M. Keogh, M.A. Gomez-Sanchez, M. Kneussl, and F. Grimminger. Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(12 Suppl S):68S–72S, 2004.
- [23] G.W. Goldstein and A.L. Betz. Recent advances in understanding brain capillary function. *Annals of neurology*, 14:389–395, 1983.
- [24] L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnock, and S.R. Tannenbaum. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126:131–138, 1982.
- [25] C.W. Greider and E.H. Blackburn. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell*, 43:405–413, 1985.
- [26] C.W. Greider and E.H. Blackburn. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*, 51:887–898, 1987.
- [27] F.M. Gutzki, D. Tsikas, U. Alheid, and J.C. Frölich. Determination of endothelium-derived nitrite/nitrate by gas chromatography/tandem mass spectrometry using (15N)NaNO<sub>2</sub> as internal standard. *Biological mass spectrometry*, 21:97–102, 1992.
- [28] D. Hanahan and R.A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57–70, 2000.
- [29] C.B. Harley, A.B. Futcher, and C.W. Greider. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345:458–460, 1990.
- [30] R.F. Haseloff, I.E. Blasig, H.C. Bauer, and H. Bauer. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25:25–39, 2005.
- [31] Y. Hayashi, M. Nomura, S. Yamagishi, S. Harada, J. Yamashita, and H. Yamamoto. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia*, 19:13–26, 1997.
- [32] Z. Huang, P.L. Huang, J. Ma, W. Meng, C. Ayata, M.C. Fishman, and M.A. Moskowitz. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-l-arginine. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16:981–987, 1996.

- [33] Z. Huang, P.L. Huang, N. Panahian, T. Dalkara, M.C. Fishman, and M.A. Moskowitz. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science*, 265:1883–1885, 1994.
- [34] C. Iadecola, F. Zhang, R. Casey, M. Nagayama, and M.E. Ross. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17:9157–9164, 1997.
- [35] U. Kniesel and H. Wolburg. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cellular and molecular neurobiology*, 20:57–76, 2000.
- [36] U.K. Laemmle. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- [37] C. Leloup, M. Arluison, N. Kassis, N. Lepetit, N. Cartier, P. Ferré, and L. Pénicaud. Discrete brain areas express the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *Brain research. Molecular brain research*, 38:45–53, 1996.
- [38] D.I. Linzer and A.J. Levine. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17:43–52, 1979.
- [39] W. Löscher and H. Potschka. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2:86–98, 2005.
- [40] G.J. Mantych, D.E. James, H.D. Chung, and S.U. Devaskar. Cellular localization and characterization of glut 3 glucose transporter isoform in human brain. *Endocrinology*, 131:1270–1278, 1992.
- [41] K.S. Mark, A.R. Burroughs, R.C. Brown, J.D. Huber, and T.P. Davis. Nitric oxide mediates hypoxia-induced changes in paracellular permeability of cerebral microvasculature. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 286:H174–180, 2004.
- [42] T. Michel and O. Feron. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *The Journal of clinical investigation*, 100:2146–2152, 1997.
- [43] T. Nakamura and S.A. Lipton. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. *Apoptosis*, 14:455–468, 2009.

- [44] R. Natarajan, D.G. Jones, B.J. Fisher, T.J. Wallace, S. Ghosh, and A.A. Fowler 3rd. Hypoxia inducible factor-1: regulation by nitric oxide in posthypoxic microvascular endothelium. *Biochemistry and cell biology*, 83:597–607, 2005.
- [45] M.J. O’Hare, J. Bond, C. Clarke, Y. Takeuchi, A.J. Atherton, C. Berry, J. Moody, A.R. Silver, D.C. Davies, A.E. Alsop, A.M. Neville, and P.S. Jat. Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98:646–651, 2001.
- [46] H. Okamoto, W. Meng, J. Ma, C. Ayata, R.J. Roman, Z.J. Bosnjak, J.P. Kampine, P.L. Huang, M.A. Moskowitz, and A.G. Hudetz. Isoflurane-induced cerebral hyperemia in neuronal nitric oxide synthase gene deficient mice. *Anesthesiology*, 86:875–884, 1997.
- [47] W.H. Oldendorf, M.E. Cornford, and W.J. Brown. The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Annals of neurology*, 1:409–417, 1977.
- [48] L. Ostergaard, E. Stankevicius, M.R. Andersen, Y. Eskildsen-Helmond, T. Ledet, M.J. Mulvany, and U. Simonsen. Diminished NO release in chronic hypoxic human endothelial cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293:H2894–2903, 2007.
- [49] W.M. Pardridge. Blood-brain barrier carrier-mediated transport and brain metabolism of amino acids. *Neurochemical research*, 23:635–644, 1998.
- [50] W.M. Pardridge, Y.S. Kang, J.L. Buciak, and J. Yang. Human insulin receptor monoclonal antibody undergoes high affinity binding to human brain capillaries in vitro and rapid transcytosis through the blood-brain barrier in vivo in the primate. *Pharmaceutical research*, 12:807–816, 1995.
- [51] D.R. Pillai, M.S. Dittmar, D. Baldaranov, R.M. Heidemann, E.C. Henning, G. Schuierer, U. Bogdahn, and F. Schlachetzki. Cerebral ischemia-reperfusion injury in rats - a 3 T MRI study on biphasic blood-brain barrier opening and the dynamics of edema formation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*, 29:1846–1855, 2009.
- [52] J.S. Pollock, U. Förstermann, J.A. Mitchell, T.D. Warner, H.H. Schmidt, M. Nakane, and F. Murad. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial



- cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88:10480–10484, 1991.
- [53] T.S. Reese and M.J. Karnovsky. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *The Journal of cell biology*, 34:207–217, 1967.
- [54] L.L. Rubin, D.E. Hall, S. Porter, K. Barbu, C. Cannon, H.C. Horner, M. Janatpour, C.W. Liaw, K. Manning, J. Morales, et al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology*, 115:1725–1735, 1991.
- [55] W.M.S. Russell and R.L. Burch. *The principles of humane experimental technique*. Methuen London, 1959.
- [56] A.F. Samdani, T.M. Dawson, and V.L. Dawson. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke*, 28:1283–1288, 1997.
- [57] F. Schlachetzki and W.M. Pardridge. P-glycoprotein and caveolin-1alpha in endothelium and astrocytes of primate brain. *Neuroreport*, 14:2041–2046, 2003.
- [58] N. Sjakste, J. Sjakste, J.L. Boucher, L. Baumane, T. Sjakste, M. Dzintare, D. Meirena, J. Sharipova, and I. Kalvinsh. Putative role of nitric oxide synthase isoforms in the changes of nitric oxide concentration in rat brain cortex and cerebellum following sevoflurane and isoflurane anaesthesia. *European journal of pharmacology*, 513:193–205, 2005.
- [59] P.K. Smith, R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150:76–85, 1985.
- [60] J.S. Stamler, D.I. Simon, J.A. Osborne, M.E. Mullins, O. Jaraki, T. Michel, D.J. Singel, and J. Loscalzo. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89:444–448, 1992.
- [61] P.A. Stewart. Endothelial vesicles in the blood-brain barrier: are they related to permeability? *Cellular and molecular neurobiology*, 20:149–163, 2000.
- [62] P.A. Stewart and M.J. Wiley. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail–chick transplantation chimeras. *Developmental biology*, 84:183–192, 1981.

- [63] D. Tsikas, R.H. Böger, S.M. Bode-Böger, F.M. Gutzki, and J.C. Frölich. Quantification of nitrite and nitrate in human urine and plasma as pentafluorobenzyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry using their  $^{15}\text{N}$ -labelled analogs. *Journal of chromatography. B, Biomedical applications*, 661:185–191, 1994.
- [64] C.P. Verdon, B.A. Burton, and R.L. Prior. Sample pretreatment with nitrate reductase and glucose-6-phosphate dehydrogenase quantitatively reduces nitrate while avoiding interference by  $\text{NADP}^+$  when the Griess reaction is used to assay for nitrite. *Analytical Biochemistry*, 224:502–508, 1995.
- [65] B.B. Weksler, E.A. Subileau, N. Perrière, P. Charneau, K. Holloway, M. Leveque, H. Tricoire-Leignel, A. Nicotra, S. Bourdoulous, P. Turowski, D.K. Male, F. Roux, J. Greenwood, I.A. Romero, and Couraud P.O. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *The FASEB Journal*, 19:1872–1874, 2005.
- [66] V. Wong and B.M. Gumbiner. A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *The Journal of cell biology*, 136:399–409, 1997.
- [67] G.Y. Wu and J.T. Brosnan. Macrophages can convert citrulline into arginine. *The Biochemical journal*, 281:45–48, 1992.
- [68] V. Zennou, C. Serguera, C. Sarkis, P. Colin, E. Perret, J. Mallet, and P. Charneau. The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nature Biotechnology*, 19:446–450, 2001.

## Danksagung

Vielen Dank an Herrn PD Dr. med. Felix Schlachetzki, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit durchzuführen.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Michael Dittmar für die Mitbetreuung des Projekts bedanken.

Desweiteren danke ich allen Mitgliedern der Laborarbeitsgruppen für Anästhesie des Gebäudes H4 sowie Neurologie des Gebäudes H3 für ihre Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich hier Herrn Dr. rer. nat. Michael Gruber und Frau Regina Lindner hervorheben, die mir im Labor immer mit Rat und Tat zur Seite standen.