

4. Diskussion

Durch die Kombination proteinbiochemischer und histochemischer Methoden sowie insbesondere durch die Anwendung der computergestützten Bildanalyse konnten in dieser Arbeit einige neue Befunde über das NOS-1/NO-System im Skelettmuskel der Ratte erhoben werden. Sie betreffen vor allem die Eignung der NADPH-Diaphorasereaktion zum Nachweis der NOS-1, die Organisation dieses Enzyms in Costameren, seine fasertypabhängige Expression sowie die Wirkung von NO auf Enzymsysteme in Skelettmuskelfasern. Desweiteren konnte am Beispiel der histochemischen Nachweise für NOS-1, SDH, Cytochrom-Oxidasen und GAPDH gezeigt werden, daß die Bildanalyse ein leistungsfähiges Verfahren zur Messung von Enzymaktivitäten darstellt.

4.1. Die NADPH-Diaphorasereaktion als spezifischer Nachweis für NOS-1 im Skelettmuskel

In längs geschnittenen Skelettmuskelfasern der Ratte war eine NADPH-abhängige Diaphoraseaktivität in vier verschiedenen Formen zu beobachten, und zwar als:

1. Aneinanderreihung von punktförmigen Formazanpräzipitationen (die manchmal von feinen, quer zur Faserlängsachse verlaufenden Linien begleitet waren) entlang der Faseroberfläche,
2. Sarkolemm-assoziierte Bündel paralleler Längsstreifen besonders im Bereich von Muskel-Sehnen-Verbindungen,
3. starke intrafibräre Querstreifung, die Sarkomeren ähnelten sowie
4. intrafibräre Längsstreifen variabler Länge und Stärke senkrecht zur sarkomerähnlichen Querstreifung.

Die punktförmigen Formazanablagerungen im Bereich des Sarkolemm entsprechen der punktförmigen Darstellung der NOS-1 durch Immunhistochemie (Gossrau 1998b). Da die NOS-1 eine starke NADPH-abhängige Diaphoraseaktivität aufweist (Bredt *et al.* 1991; Hope *et al.* 1991, Grozdanovic *et al.* 1995), sind diese Formazanablagerungen mit hoher Wahrscheinlichkeit der Diaphoraseaktivität dieses Enzyms zuzuordnen. Diese Annahme wird auch gestützt durch Beobachtungen an NOS-1-defizienten knockout-Mäusen, die im Sarkolembereich keine

Diaphoraseaktivität aufweisen (Schuelke *et al.* 1998). Da die NOS-1 am Sarkolemm vor allem costamerisch organisiert ist (Gossrau 1998b), könnten diese punktförmigen Formazanpräzipitate quer angeschnittene Costameren repräsentieren.

Die zweite Sarkolemm-assoziierte Formazan-positive Struktur, die an längs angeschnittenen Skelettmuskelfasern als kräftige Längsstreifung bevorzugt in Muskel-Sehnen-Verbindungen zu finden war, konnte mit den durchgeführten Methoden nicht näher charakterisiert werden. Da diese Streifen auch in der Literatur nicht beschrieben sind, bleibt die Identität der verantwortlichen NADPH-Diaphorase unklar.

Die intrafibräre sarkomerähnliche Querstreifung, die an längs angeschnittenen Skelettmuskelfasern nach der NADPH-Diaphorasereaktion deutlich zu sehen war, ist in der Region des I-Streifens lokalisiert und im Bereich der Z-Linie unterbrochen. Da ein identisches Verteilungsmuster der Formazanablagerung auch beim histochemischen Nachweis der mitochondrial lokalisierten SDH zu finden war, sind wahrscheinlich diejenigen Diaphorasen, die in Mitochondrienarealen am Übergang zwischen A- und I-Streifen lokalisiert sind, für diese Querstreifung verantwortlich.

Die intrafibrären Längsstreifen gehen vermutlich auf die Aktivität derjenigen NADPH-Diaphorasen zurück, die im sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind.

Fahimi und Amarasingham (1964), die die Lokalisation der Lactat-Dehydrogenase und der NADH-Diaphorase in Skelettmuskelfasern untersuchten, beobachteten ein ähnliches Formazanmuster und folgerten, daß die sarkomerähnliche Querstreifung den Mitochondrien und die Längsstreifen dem sarkoplasmatischen Retikulum zuzuordnen sind.

In Querschnitten von Skelettmuskelfasern war Formazan in drei verschiedenen Formen zu beobachten, und zwar als:

1. ringförmige Linien im Sarkolembereich,
2. einzelne intrafibräre punktförmige Formazangranula,
3. feine fadenförmige Strukturen, die die Formazangranula untereinander verbanden.

Die ringförmigen Linien im Bereich der Faseroberfläche repräsentieren mit großer Wahrscheinlichkeit Costameren, die durch die Diaphoraseaktivität der NOS-1 dargestellt wurden, welche im Sarkolembereich costamerisch organisiert ist (Gossrau 1998b). Dabei ist aufgrund der Schnittdicke von 10 μm zu erwarten, daß bei Faserquerschnitten die Überlagerung mehrerer regulärer Costameren abgebildet ist, da diese in Abhängigkeit vom Kontraktionszustand der Muskelfaser einen durchschnittlichen Abstand von ca. 1-2 μm aufweisen (Pardo *et al.* 1983b).

Die intrafibrär lokalisierten punktförmigen Formazangranula finden sich auch bei Nachweis der mitochondrial gebundenen SDH und stellen deshalb offensichtlich Mitochondrienareale dar.

Das aus feinen, fadenförmigen Strukturen zusammengesetzte Netzwerk, welches die mitochondrialen Punkte untereinander verbindet, repräsentiert wahrscheinlich sarkoplasmatisches Retikulum. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, daß die Immunhistochemie mit Antikörpern gegen SERCA-1 (ein Marker des sarkoplasmatischen Retikulums) ein ähnlich netzförmiges Darstellungsmuster ergab.

Zusammengenommen werden in Quer- und Längsschnitten von Skelettmuskelfasern mit der NADPH-Diaphorasereaktion der Sarkolembereich, die Mitochondrien sowie das sarkoplasmatische Retikulum dargestellt. Für die Formazanablagerungen im Sarkolembereich dürfte praktisch nur die NOS-1 verantwortlich sein, da Grozdanovic *et al.* (1995) und Young *et al.* (1997) dieses Enzym immunhistochemisch ausschließlich im Sarkolembereich gefunden haben, wohingegen in Muskeln von Patienten mit DMD, mdx-Mäusen (einem Tiermodell für die DMD) und NOS-1-defizienten KO-Mäusen, in deren Sarkolembereich die NOS-1 fehlt, keine NADPH-Diaphoraseaktivität oder NOS-1-Immunreaktivität zu finden ist (Chang *et al.* 1996; Schuelke *et al.* 1998; Baum *et al.* 2001; Miethke 2001). Dabei könnte es allerdings speziesabhängige Unterschiede geben, da in humanen Skelettmuskelfasern die NOS-1 immunhistochemisch auch intrafibrär nachgewiesen worden ist (Frandsen *et al.* 1996).

Bislang sind 11 Enzyme beschrieben worden, die eine NADPH-Diaphoraseaktivität besitzen (Übersicht bei Blottner *et al.* 1995) und die somit für die Formazanproduktion speziell in Mitochondrien und im sarkoplasmatischen Retikulum in Frage kommen. Sieben davon sind bislang auch in Skelettmuskelfasern nachgewiesen worden (Tabelle 12).

EC 1.6.2.4 Cytochrom-P450-Reduktase (NADPH-Ferrihämoprotein)	Ubiquitäres Vorkommen im hydroxylierenden System von Microsomen, im endoplasmatischen Retikulum, in der äußeren Mitochondrienmembran. Katalysiert die Reduktion von Häm-Thiolat-abhängigen Monoxygenasen.	Kulkoski <i>et al.</i> (1979) Cooper <i>et al.</i> (1980)
EC 1.6.99.2 NAD(P)H-(Quinon)-Oxidoreduktase (DT-Diaphorase)	Mitochondrien und Cytosol in Skelettmuskelfasern von Mensch und Ratte. Verhindert die Bildung aktiver Sauerstoffverbindungen.	Lind <i>et al.</i> (1990) Jaiswal (1994)
EC 1.6.1.1 NAD(P)⁺-Transhydrogenase	Ubiquitäres Vorkommen in der inneren Mitochondrienmembran. Verbindet als atypische Protonenpumpe von 110 kDa den cytosolischen mit dem mitochondrialen Stoffwechsel.	Olausson <i>et al.</i> (1995)
EC 1.14.13.39 Endotheliale NOS (NOS-3)	Mitochondrien in Skelettmuskelfasern.	Kobzik <i>et al.</i> (1995)
EC 1.14.13.39 Induzierbare NOS (NOS-2)	Geringe RNA- und Proteinmengen in langsamen (Typ-I-) Skelettmuskelfasern.	Gath <i>et al.</i> (1999)
EC 1.14.13.39 Neuronale NOS (NOS-1)	Bestimmte Neuronen vor allem im Cerebellum, außerdem im Sarkolemm von Skelettmuskelfasern.	Brenman <i>et al.</i> (1996)
EC 1.6.99.1 NADPH-(Akzeptor)-Oxidoreduktase identisch mit EC 1.3.1.24 Biliverdin-IXβ-Reduktase	Sarkosol und Microsomen in Herz- und Skelettmuskelfasern, desweiteren in Leber, Lunge, Gehirn. Besitzt höhere Affinität zum Kosubstrat α -NADPH als zu β -NADPH.	Komuro <i>et al.</i> (1996) Shalloe <i>et al.</i> (1996) Massey und Schopfer (1986)

Tabelle 12: Zusammenstellung der aus der Literatur bekannten NADPH-Diaphorasen im Skelettmuskel, ihrer Lokalisation sowie wichtiger biochemischer Eigenschaften.

Die Cytochrom-P450-Reduktase, die NAD(P)H-(Quinon)-Oxidoreduktase, die NAD(P)⁺-Transhydrogenase und/oder die NOS-3 könnten für die Formazanproduktion in den Mitochondrien verantwortlich sein. Im sarkoplasmatischen Retikulum ist hingegen bislang nur die Cytochrom-P450-Reduktase als NADPH-Diaphorase nachgewiesen worden. Ob dieses Enzym ausschließlich für die Formazanproduktion in diesem Kompartiment verantwortlich ist oder ob womöglich noch weitere, bislang noch nicht charakterisierte NADPH-Diaphorasen dazu beitragen, bleibt ein Gegenstand künftiger Untersuchungen.

Bisher ist noch unbekannt, in welchem Ausmaß die einzelnen NADPH-Diaphorasen zur Gesamtformazanproduktion in den Skelettmuskelfasern beitragen, weil das quantitative Verhältnis der Aktivitäten dieser einzelnen Enzyme zueinander unbekannt ist. Außerdem wird die Situation

dadurch kompliziert, daß manche NADH-verbrauchende Diaphorasen zusätzlich NADPH umsetzen können, wie z.B. die Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (Haramaki *et al.* 1997), und die deshalb u.U. ebenfalls zur NADPH-abhängigen Formazanproduktion in Skelettmuskelfasern beitragen.

Obwohl es nicht möglich war, einzelne Diaphorasen mit aus der Literatur bekannten NADPH-Diaphorase-Inhibitoren selektiv zu hemmen, kann aus den Untersuchungen zur Spezifität der NADPH-Diaphorase auf zwei Subpopulationen von NADPH-Diaphorasen in Skelettmuskelfasern geschlossen werden: Die eine Subpopulation ist im Sarkolembereich anzutreffen und wird durch 1 M Harnstoff bzw. 0,4 M Guanidin-HCl im Inkubationsmedium nur unwesentlich gehemmt. Desweiteren vermag sie als Ko-Faktor das artifizielle Stereoisomer α -NADPH anstatt des natürlich vorkommenden β -NADPH zu nutzen (Grozdanovic und Gossrau 1995). Insbesondere die letztere Eigenschaft begründet die Annahme, daß diese Subpopulation im wesentlichen von der NOS-1 gebildet wird, da dieses Enzym sowohl α -NADPH als auch β -NADPH umzusetzen vermag (Blottner *et al.* 1995). Die andere Subpopulation von NADPH-Diaphorasen kommt hingegen intrafibrär vor, wird durch Zugabe von 1 M Harnstoff oder 0,4 M Guanidin-HCl nahezu vollständig inhibiert, kann α -NADPH lichtmikroskopisch nicht umsetzen und enthält deshalb keine NOS-1, sondern mindestens eines der anderen Enzyme aus Tabelle 12.

Über die Wirkungsweise der chaotropen Substanzen Harnstoff und Guanidin-HCl als Inhibitoren von NADPH-Diaphorasen gibt es bislang nur wenige experimentell belegte Vorstellungen. Es konnte aber gezeigt werden, daß Kalium-Thiocyanat (eine weitere chaotrope Substanz) an der DT-Diaphorase (siehe Tabelle 12) eine irreversible Abspaltung des Kofaktors FAD sowie eine Denaturierung des Homodimers verursacht (Byron *et al.* 1997). Von Harnstoff wurde berichtet, daß es Proteine denaturieren kann, indem es deren schützende und stabilisierende Hydrathülle entzieht (Narayanasami *et al.* 1997). Es ist also denkbar, daß diejenigen NADPH-Diaphorasen, die geschützt lokalisiert sind, zum Beispiel im subsarkolemmalen Bereich zwischen cytotokortikalen Proteinansammlungen, in Anwesenheit chaotroper Agenzien bevorzugt ihre Hydrathülle bewahren. So wäre die Resistenz der NOS-1-Diaphoraseaktivität gegen 1 M Harnstoff weniger strukturellen Eigenschaften des Proteins zuzuschreiben, sondern eher einer lokalisationsbedingten geringeren Wirkung der chaotropen Substanz, die somit nicht protein-

spezifisch, sondern eher kompartimentspezifisch wirken würde. Diese Vorstellung wird durch die Beobachtung erhärtet, daß auch die NOS-1-abhängige NADPH-Diaphoraseaktivität in bestimmten Neuronen des Cerebellums unter Zugabe von 1 M Harnstoff nahezu vollständig gehemmt ist (Gossrau, unveröffentlichte Beobachtungen). Die NOS-1 kommt in diesen Zellen ebenfalls in hohen Konzentrationen vor (Förstermann *et al.* 1990), ist aber auf andere Weise (über das postsynaptic density protein, PSD-95 und PSD-93) mit der Plasmamembran und möglicherweise anderen Zellstrukturen assoziiert (Brenman *et al.* 1996) und daher vielleicht weniger geschützt.

Aus den Auswertungen der Experimente mit Inhibitoren ergibt sich, daß vorangegangene Untersuchungen zur NOS-1, bei denen NADPH-Diaphorasemedien ohne Zugabe der hier benutzten chaotropen Substanzen oder anderer relativer Inhibitoren (Übersicht bei Blottner *et al.* 1995) verwendet wurden, möglicherweise zu einer falsch positiven Lokalisation der NOS-1 im Faserinneren führen (Frandsen *et al.* 1996; Young *et al.* 1997). Dagegen entspricht in Anwesenheit von chaotropen Substanzen die enzymhistochemische Darstellung der NADPH-Diaphorase zumindest in Skelettmuskelfasern der NOS-1-Immunhistochemie, mit der allerdings keine Aussagen über die Aktivität des Enzyms möglich sind. Demgegenüber stellt die enzymhistochemische Darstellung der NOS-1-Diaphorase wegen des Amplifizierungseffekts der enzymatischen Reaktion eine sehr sensitive Methode dar, kann aber beispielsweise schlechter mit Nachweisen anderer Proteine kombiniert werden. Auch kann aufgrund der Arbeiten von Narayanasami *et al.* (1997) nicht ausgeschlossen werden, daß die Zugabe von 1 M Harnstoff die Aktivität der NOS-1-Diaphorase nicht geringfügig beeinflusst. Beide histochemischen Nachweisverfahren besitzen somit ihre Berechtigung und ergänzen sich in Hinblick auf ihre Vor- und Nachteile.

4.2. NOS-1 als costamerisch organisiertes Enzym

Nach Anwendung zweier voneinander unabhängiger Verfahren (NOS-1-Diaphorasereaktion und Immunhistochemie mit Antikörpern gegen verschiedene sarkolemm-assoziierte Proteine) auf Kryostatschnitte mit einer Dicke von mehr als 30 µm sowie auf gezupfte Fasern konnte die Existenz bislang unbekannter irregulärer Costameren nachgewiesen werden. Diese sind als deutlich dargestellte Formazan- bzw. Immunfluoreszenzringe zu erkennen, die meist um den

gesamten Faserumfang herum verlaufen. Diese Strukturen bestanden in der Regel aus zwei parallel verlaufenden Einzelringen, die durch einen formazan- bzw. fluoreszenzfreien Zwischenraum von durchschnittlich 2 μm Breite getrennt sind, und die dadurch einen Doppelring bilden. Weil der Abstand zweier aufeinanderfolgender costamerischer Doppelringe höchst variabel war, wurde für diese Struktur die Bezeichnung "irreguläre Costameren" gewählt. Diese Bezeichnung soll diesen Costamerentyp damit von den "regulären Costameren" abgrenzen, welche sich als höchst regelmäßige Abfolge (Abstand von 1 μm) paralleler, quer zur Faserlängsachse verlaufender Linien darstellen (Pardo *et al.* 1983b). Diese Linien werden bevorzugt in Kryostat-schnitten mit einer Dicke von 10-20 μm gefunden und entsprechen räumlich gesehen Ringen. Weiterhin ist durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bekannt, daß reguläre Costameren die Z-Linie beidseits in ca. 100 nm Abstand flankieren (Watkins *et al.* 1997). Zur Funktion der regulären Costameren gibt es noch keine klaren Vorstellungen, obwohl bereits einige Strukturproteine und Signaltransduktionskomponenten des sub- bzw. intrasarkolemmalen Bereiches in regulären Costameren identifiziert worden sind, so z.B. die β_1 -Integrin-Untereinheit, der erweiterte Dystrophin-Komplex mit Dystrophin, Dystroglykanen, Syntrophinen und Sarkoglykanen (Porter *et al.* 1992) sowie NOS-1, Caveolin-3 (Gossrau 1998a, 1998b), Vinculin (Terracio *et al.* 1990) und Spektrine (Vybiral *et al.* 1992). Es gibt allerdings im Detail zwischen den einzelnen Molekülen durchaus Unterschiede in ihrem Verteilungsmuster, so etwa in Vorkommen und Ausprägung von Intercostameren (Williams und Bloch 1999a).

Ogleich reguläre Costameren nur selten in gezupften Skelettmuskelfasern oder in dicken Kryostat-schnitten zu finden waren, traten sie doch manchmal gemeinsam mit irregulären Costameren auf, wodurch ein direkter Vergleich der beiden Strukturen möglich ist: Beide Formen von Costameren verlaufen senkrecht zur Faserlängsachse entlang der Faseroberfläche. Irreguläre Costameren können dabei an ihrer größeren Dicke erkannt werden. Darüberhinaus waren bei irregulären Costameren in dem 2 μm breiten Raum zwischen den beiden Einzelringen keine anderen Moleküle nachweisbar, während der Bereich zwischen regulären Costameren häufig mit Formazan- oder Immunfluoreszenz-positiven, längsverlaufenden Intercostameren ausgefüllt war.

In dieser Arbeit konnte mittels Enzym- und Immunhistochemie gezeigt werden, daß neben der

NOS-1, die am subsarkolemmal gelegenen Dystrophinkomplex über α 1-Syntrophin verankert ist (Brenman *et al.* 1996), auch einige andere integrale und periphere Proteine des erweiterten Dystrophinkomplexes in irregulären Costameren vorkommen. Irreguläre Costameren beinhalten offenbar den sarkolemmalen und subsarkolemmalen Proteinkomplex. Im Gegensatz zu den oben aufgezählten Molekülen waren solche wie α -Actinin (eine Komponente der Z-Scheibe), Desmin (umgibt als Intermediärmolekül die Z-Scheibe), MHCf (Sarkomer-Molekül) und SERCA-1 (ein Marker des sarkoplasmatischen Retikulums) nicht in Form irregulärer Costameren organisiert. Daraus kann geschlossen werden, daß intrafibräre (nicht mit dem Sarkolemm assoziierte) Kompartimente oder Strukturen keine irregulären Costameren bilden. Besonders bedeutsam erscheint dies für Desmin, das unmittelbar unter dem Sarkolemm vorkommt (Tokuyasu *et al.* 1983). Ausgehend von dieser Lokalisation verläuft also die Grenze zwischen (sub)sarkolemmalen Proteinkomplexen, die auch in irregulären Costameren vorkommen, und Intrafibrärraum offenbar zwischen Sarkolemm und Desmin.

Die Schlußfolgerung, daß irreguläre Costameren einen Teil des (sub)sarkolemmalen Apparates darstellen, wird auch durch die Beobachtung unterstützt, daß sie als Invaginationen auftreten, die von der Faseroberfläche ausgehen. Prinzipiell könnten sie daher z.B. T-Tubuli darstellen, die im Bereich des A-I-Überganges senkrecht ins Faserinnere ziehen. Diese Möglichkeit kann jedoch aus zwei Gründen ausgeschlossen werden: Erstens sind die T-Tubuli lichtmikroskopisch nur als Linie (und nicht wie die irregulären Costameren als Ringe) darstellbar, und ihr Lumen liegt jenseits der lichtmikroskopischen Auflösungsgrenze (Franzini-Armstrong 1994). Zweitens ist im Bereich der T-Tubuli der intrafibräre myofibrilläre Apparat nicht abweichend gebaut, und es sind an diesen Stellen keine lichtmikroskopisch nachweisbare Aussparungen von Intrafibrärmolekülen beobachtet worden. Dagegen konnten im Zwischenraum der Doppelringe keine intrafibrären Proteine nachgewiesen werden. Weiterhin ist zwar bekannt, daß Abschnitte des sarkoplasmatischen Retikulums manchmal in direkten Kontakt zur Faseroberfläche treten (Ogata und Yamasaki 1997), jedoch kam dessen Markerprotein SERCA-1 nicht in diesen Strukturen vor.

Die Anzahl der nachweisbaren irregulären Costameren war in gestreckten Skelettmuskelfasern signifikant verringert, in maximal kontrahierten Fasern jedoch deutlich erhöht. Zusätzlich wurden Skelettmuskelfasern im Bereich irregulärer Costameren scheinbar in der Art von Faßdauben

zusammengehalten, während der angrenzende Abschnitt des Sarkolemm ballonartig aufgetrieben war. Insbesondere die letztere Beobachtung läßt die Annahme zu, daß es sich bei irregulären Costameren um Strukturen handelt, bei denen ein veränderter Kontakt zwischen Sarkolemm und dem darunter liegenden myofibrillären Apparat besteht und die im Kontraktions-Relaxationszyklus bei der Organisation des sarkolemmalen Reservezone eine Rolle spielen. Bislang ist nur sehr wenig darüber bekannt, wie das Sarkolemm und die mit ihm assoziierten Proteine auf Verkürzung oder Verlängerung der Muskelfaser reagieren. Durch Arbeiten zum Dystrophin (das sarkolemm-assoziiert vorkommt und der strukturellen Organisation des subsarkolemmalen Cytoskeletts dient) ist aber deutlich geworden, daß der sarkolemmale Bereich eine hochkomplexe und wohlorganisierte Anordnung von Proteinen darstellt (Blake und Kroger 2000). Insbesondere scheint das Fehlen dieses Proteins bei der DMD und deren Tiermodell, der mdx-Maus, dazu zu führen, daß das Sarkolemm aufgrund des gestörten Aufbaus des subsarkolemmalen Proteinkomplexes anfälliger gegen Rupturen während der mechanischen Belastung beim Kontraktions-Relaxationsprozeß ist (Petrof *et al.* 1993).

Obwohl nicht völlig auszuschließen ist, daß es sich bei irregulären Costameren um experimentelle Artefakte handeln könnte (z.B durch Überlagerung von sarkolemmalen Bereichen, die infolge der Kontraktion zusammengeschoben werden), ist es doch wahrscheinlicher, daß sie biologische Relevanz besitzen. Überlagerungen zusammengeschobener Sarkolemmbereiche würden beispielsweise nicht die Beobachtung erklären, daß intrafibräre Proteine im Bereich der irregulären Costameren nicht nachweisbar sind. Weiterhin wären solche Überlagerungen keine Erklärung dafür, daß die Muskelfasern scheinbar im Bereich irregulärer Costameren mechanisch zusammengehalten werden, und schließlich spricht die große Reproduzierbarkeit des Abstandes von 2 µm innerhalb der costamerischen Doppelringe gegen bloße Artefakte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Kryostatschnitte mit einer Dicke von mehr als 30 µm oder gezupfte Fasern eher ungeeignet zur Analyse der bislang aus der Literatur bekannten regulären Costameren sind. Solche Kryostatschnitte lassen sich eher zur Untersuchung von Prozessen am Sarkolemm einsetzen, die mit dem Kontraktionsvorgang der Skelettmuskelfasern einhergehen. Dabei kommt es offenbar zu unregelmäßig verteilten Invaginationen des Sarkolemm, die zu einer Reservezone im Sarkolemm gehören und eventuell mit irregulären Costa-

meren identisch sind. Dieser Costamerentyp weist dabei ein einheitliches Erscheinungsbild mit einer Breite von 2 μm auf und beinhaltet neben der NOS-1 auch andere, im subsarkolemmalen Proteinkomplex vorkommende Moleküle, so z.B. die Mitglieder des erweiterten Dystrophin-komplexes. Intrafibrär gelegene Proteine wie Desmin oder α -Actinin sind hingegen nicht am Aufbau der irregulären Costameren beteiligt. Es bleibt allerdings noch unklar, warum in dicken Kryostatschnitten und gezupften Fasern kaum reguläre Costameren zu beobachten sind.

4.3. Fasertypabhängige Expression der NOS-1

Um die Expression der NOS-1 in verschiedenen Skelettmuskeln der Ratte zu untersuchen, wurden Immunblot-Analysen mit enzym- und immunhistochemischen Methoden kombiniert. Die quantitativen Daten der Immunblots zeigten dabei eine signifikant höhere Expression der NOS-1 in Skelettmuskeln mit einem hohen Anteil an schnellen (Typ II-) Fasern (TA, EDL, Zunge, GM) verglichen mit den Muskeln mit einem mittleren (M. cremaster, mGC) oder niedrigen Anteil an schnellen Fasern (M. soleus). Diese Befunde entsprechen denen früherer Untersuchungen mit ähnlichen methodischen Ansätzen (Chao *et al.* 1997; Hussain *et al.* 1997; Wehling *et al.* 1998) und dürften eher die tatsächliche Verteilung der NOS-1 in Skelettmuskelfasern widerspiegeln als die Ergebnisse von Kobzik *et al.* (1994), die nach Korrelation der Konzentration der NOS-1 in verschiedenen Muskeln mit Literaturdaten über die Fasertypzusammensetzung dieser Muskeln zu dem Schluß gelangten, daß die NOS-1 ausschließlich in schnellen Fasern vorkommt. Allerdings ist es unklar, warum die ermittelten absoluten Konzentrationen der NOS-1 ungefähr zehnmal höher waren als die von Wehling *et al.* (1998) gefundenen.

Aus einer positiven Korrelation zwischen dem NOS-1-Gehalt im Homogenat und dem Anteil von schnellen Fasern an der Gesamtfaserzahl läßt sich nicht zwangsläufig ableiten, daß die NOS-1-Aktivität in allen schnellen Skelettmuskelfasern einheitlich ausgeprägt ist. Schnelle Fasern stellen eine bezüglich ihrer oxidativen Kapazität uneinheitliche Gruppe der Skelettmuskelfasern dar (Schmalbruch 1985; Delp und Duan 1996). Mit quantitativen bildanalytischen Methoden konnte gezeigt werden, daß FOG-Fasern eine signifikant höhere NOS-1-(Diaphorase)-Aktivität besitzen als FG- und insbesondere SO-Fasern. Dieses Ergebnis wird von Untersuchungen gestützt, bei denen ein Einfluß von NO auf den oxidativen Stoffwechsel von Skelett-

muskelfasern gezeigt wurde (Balon und Nadler 1997; Kapur *et al.* 1997; Andersson *et al.* 1998). Zusätzlich besitzen FOG-Fasern den höchsten Gehalt an Myoglobin, welches ein Zielmolekül für von der NOS-1 produziertes NO darstellt (Pette und Staron 1990). Weiterhin gibt es Studien, die eine Erhöhung der Konzentration der NOS-1 in Skelettmuskelfasern des EDL nach chronischer elektrischer Stimulation (Reiser *et al.* 1997) sowie nach Ausdauertraining desselben Muskels (Balon und Nadler 1997) belegen. Interessanterweise gehen beide experimentellen Ansätze mit einer Fasertypumwandlung (von FG über FOG zu SO) einher, was die Plastizität der Skelettmuskeln bzw. die Anpassungsfähigkeit ihres Stoffwechsels an sich ändernde Anforderungen unterstreicht (Pette 2001). Unklar ist dabei allerdings, ob und wie die NOS-1 an den Fasertypumwandlungen beteiligt ist.

Die Zunge und der EDL wiesen sowohl ähnliche MHC-Fasertypzusammensetzungen als auch sehr ähnliche NOS-1-Konzentrationen in Immunblots von Homogenaten auf. Dies widerspricht jedoch der lichtmikroskopischen Beobachtung, daß das Sarkolemm der Skelettmuskelfasern der Zunge eine höhere NOS-1-Diaphoraseaktivität besitzt als der EDL. Die daraufhin erfolgte bildanalytische Charakterisierung der katalytischen Eigenschaften der NOS-1 auf der Basis ihrer NADPH-Diaphoraseaktivität ergab unterschiedliche v_{max} -Werte für das Enzym in Zunge und EDL, während die K_m -Werte für NADPH praktisch gleich waren. Die Unterschiede der v_{max} -Werte können entweder durch Differenzen in der Konzentration des Enzyms im sarkolemmalen Bereich erklärt werden oder aber durch eine abweichende allosterische Regulation des Enzyms in beiden Muskeln. Obwohl die NOS-1 über einen Phosphorylierungsmechanismus reguliert werden kann (Zoche *et al.* 1997), ist es wenig plausibel, daß solche regulativen Vorgänge in einem Skelettmuskel in höherem Maße auftreten sollen als in einem anderen. Vielmehr ist es wahrscheinlicher, daß die NOS-1 im Sarkolembereich der beiden Muskeln in verschiedenen Konzentrationen vorkommt und hierdurch die verschiedenen v_{max} -Werte verursacht werden. Um nun zu klären, weshalb dann im Homogenat von Zunge und EDL gleiche Werte der NOS-1-Konzentration zu finden sind, wurde eine Bestimmung der pro Gewebsabschnitt vorhandenen Menge an Sarkolemm (ausgedrückt als Länge des Sarkolemm pro Flächeneinheit des Kryostatschnittes) durchgeführt mit der Überlegung, daß geringere Sarkolemm-Gesamtmengen im Zungenmuskel eine höhere Konzentration der NOS-1 in diesem Sarkolemm kompensieren könnten. Weil die Verteilung der NOS-1 an den Sarkolembereich und damit an die Faserober-

fläche gekoppelt ist, stellt auch der Gehalt an Sarkolemm eine bessere Bezugsgröße für die NOS-1-Konzentration dar als etwa der Anteil der Muskelfasern am Gesamtvolumen, welchen man z.B. durch den Myosingehalt im Homogenat ausdrücken kann (Miethke 2001). Der gesamte Zungenmuskel besaß gegenüber dem Gesamt-EDL einen geringeren Gehalt an Sarkolemm. Dieses zeigte aber in der Zunge eine höhere Konzentration an NOS-1-Molekülen als im EDL. Beide auf Einzelfaserebene untersuchten Charakteristika, also Sarkolemmgehalt und NOS-1-Konzentration, kompensieren sich in Zunge bzw. EDL, so daß auf der Ebene des Homogenats der entsprechenden Gesamtmuskeln gleiche Werte der NOS-1-Konzentration zu finden sind. Diese Befunde stellen einen weiteren Beleg dafür dar, daß schnelle Fasern, die metabolisch verschieden sind, auch eine unterschiedliche Expression der NOS-1 aufweisen. Dabei besitzen Skelettmuskelfasern der Zunge, die ausschließlich FOG-Fasern besitzt (Schmalbruch 1985), einen höheren NOS-1-Gehalt als die Fasern des EDL, der zu etwa 60% aus FG-Fasern besteht (Punkt *et al.* 1998). Diese Befunde unterstreichen die Notwendigkeit, biochemische Methoden, deren Ergebnisse auf Durchschnittswerten beruhen, durch Bildanalyse enzymhistochemischer Nachweise zu ergänzen, da nur diese den inhomogenen histologischen Aufbau des Gewebes, hier des Skelettmuskels, berücksichtigen können.

4.4. Biologische Wirkung des NOS-1/NO-Systems im Skelettmuskel

Um die biologische Wirkung des von der NOS-1 produzierten NO zu analysieren, stehen etablierte Verfahren zur Verfügung, die entweder mit NOS-1-Inhibitoren (z.B. N^o-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester; King *et al.* 1994) oder der Zugabe von NO (meist simuliert durch die Gabe von NO-Donatoren) arbeiten. Eine beispielhafte Auflistung von Untersuchungen über den Einfluß des von NO-Donatoren erzeugten NO auf verschiedene Teilfunktionen von Skelettmuskelfasern findet sich in Tabelle 13. Die meisten dieser Studien berücksichtigen jedoch nur ungenügend, daß die NOS-1 vorwiegend in Muskeln mit überwiegend schnellen Fasern vorkommt. So fanden Kapur *et al.* (1997) zwar, daß die Insulin-abhängige Glukoseaufnahme unter NO-Donatoren-Einfluß im Skelettmuskel vermindert ist; sie verwendeten jedoch in ihren Experimenten den M. soleus, der nur geringe Mengen an NOS-1 enthält und deshalb für die Untersuchung des Einflusses von NO auf die Fasertätigkeit eher ungeeignet ist. Dieser Widerspruch mag auch

ein Grund dafür sein, weshalb Balon und Nadler (1997) mit ähnlichen Versuchsbedingungen im *M. soleus* einen entgegengesetzten Effekt von NO auf die Glukoseaufnahme fanden. Auch Koh und Tidball (1999) verwendeten diesen Muskel, um den Einfluß von NO auf den Umbau kontraktiler Elemente zu untersuchen, so daß sich damit die Frage nach der biologischen Relevanz dieser Studien stellt. Demgegenüber berücksichtigen bislang nur wenige Arbeiten ausdrücklich, daß das NOS-1/NO-System in schnellen Fasern aktiver ist als in langsamen. So zeigten Lau *et al.* (2000), daß NO-Donatoren den Gehalt an cGMP im NOS-1-reichen EDL erhöhten, während im NOS-1-armen *M. soleus* kein solcher Anstieg zu verzeichnen war. Hirschfield *et al.* (2000)

Autor	NODo	Konzentration	Effekt
Kobzik <i>et al.</i> (1994)	SNAC SNP	10^{-4} M	Inhibition der myofibrillären Kontraktilität
Galler <i>et al.</i> (1997)	SNAP SNP	10^{-4} M 10^{-3} M	Senkung der Aktivität der Myosin-ATPase
Perkins <i>et al.</i> (1997)	SNP	10^{-4} - 10^{-2} M	Senkung der Aktivität der Myosin-ATPase Inhibition der myofibrillären Kontraktilität
Andrade <i>et al.</i> (1998)	SNAC SNP	$2,5 \cdot 10^{-4}$ - 10^{-3} M	Reduktion der myofibrillären Sensitivität gegenüber Ca^{2+}
Meszaros <i>et al.</i> (1996)	SNAP	10^{-5} M	Inhibition des Ryanodin-Calciumkanals im sarkoplasmatischen Retikulum
Berkels <i>et al.</i> (2000)	NOC-9 SNAP	10^{-5} M	cGMP-unabhängige Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in Endothelien
Lau <i>et al.</i> (2000)	SNP	10^{-5} M	Erhöhung des cGMP-Spiegels im EDL mit und ohne Stimulation
Tidball <i>et al.</i> (1999)	SNAP	10^{-4} M	Protein-Kinase-G-abhängige Steigerung der Expression von Talin und Vinculin
Balon und Nadler (1997)	SNP	10^{-3} - 10^{-2} M	Steigerung der Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme im <i>M. soleus</i>
Kapur <i>et al.</i> (1997)	GEA ₅₀₂₄ SNP	10^{-5} - 10^{-4} M 10^{-4} - 10^{-3} M	Senkung der Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme in EDL und <i>M. soleus</i>
Andersson <i>et al.</i> (1998)	SNP	10^{-3} M	Inaktivierung der Aconitase-Oxoglutarat-Dehydrogenase im <i>M. soleus</i>

Tabelle 13: Auflistung von Untersuchungen zum Effekt von NO-Donatoren auf Teilfunktionen von Skelettmuskeln

demonstrierten im Vergleich zwischen M. soleus und dem Zwerchfell den Einfluß der NOS-1 (und damit von NO) auf die kontraktilen Eigenschaften speziell der schnellen Skelettmuskelfasern.

Erschwert wird die Analyse der biologischen Wirkung von NO auch noch durch die physikochemischen Eigenschaften dieses Moleküls, das nur eine sehr kurze Halbwertszeit aufweist und somit nur in unmittelbarer Umgebung des Entstehungsortes wirken sollte. NO zerfällt spontan rasch in Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-). Das entstandene Nitrit vermag zum einen die Aktivitäten bestimmter Enzyme direkt regulieren (z.B. Arginase von Makrophagen; Hrabak *et al.* 1996), zum anderen kann es durch Reduktion wieder in NO zurückverwandelt werden (Reutov und Sorokina 1998). Diese Reduktion wird von einer Reihe strukturell ähnlicher Proteine, die eine Häm-Gruppe als prosthetische Gruppe aufweisen, bewirkt, z.B. von desoxygeniertem Hämoglobin und Myoglobin sowie von reduziertem Cytochrom C. In diesem Zusammenhang wird auch von einer Nitrit-Reduktase-Aktivität gesprochen, die die Gesamtaktivität der NO-Synthasen um den Faktor 10^3 übersteigt und damit eine Art NO-Nitrit-Zyklus speziell in sauerstoffarmer Umgebung in Gang hält (Reutov und Sorokina 1998). Aus diesem Grund wird die bislang postulierte Beschränkung der NO-Wirkung auf die unmittelbare Umgebung der NO-Synthasen relativiert. Im Gefäßsystem könnte NO bzw. Nitrit stromabwärts transportiert werden und distal des eigentlichen Entstehungsortes parakrin wirken. Der Nitrit-Reduktase-Mechanismus könnte auch eine Erklärung dafür sein, daß zwei Tage abgestandene Inkubationsmedien (aus denen sich das NO verflüchtigt hatte) eine nicht so ausgeprägte, aber dennoch mit ca. 30% deutliche Hemmung der Cytochrom-Oxidasen bewirken. Cytochrom-Oxidasen sind eine heterogene Gruppe von Hämenzymen (Brown 2000), um deren aktive Zentren sowohl NO als auch Nitrit mit molekularem Sauerstoff kompetitiv konkurrieren (Cleeter *et al.* 1994), wobei NO durch diese Enzymgruppe rasch reduziert wird (Borutaite und Brown 1996). Diese Befunde mögen auch erklären, weshalb bei erhöhtem NO-Spiegel die Sauerstoffaufnahme der Muskulatur der Extremitäten verringert ist (King *et al.* 1994).

Für die GAPDH wird in der Literatur eine nicht-kompetitive Hemmung beschrieben, indem NO eine kovalente S-Nitrosylierung in der Nähe des aktiven Zentrums bewirkt (Mohr *et al.* 1996). Dieser Mechanismus könnte die Ursache dafür sein, daß selbst bei hohen Konzentra-

tionen an NO-Donatoren die GAPDH nicht vollständig inhibiert wird. In den einzelnen Fasertypen zeigten sowohl die GAPDH als auch die Cytochrom-Oxidasen nach Applikation von NO-Donatoren vergleichbare $c_{50\%}$ -Werte, obgleich die basale Gesamtaktivität beider Enzyme sehr unterschiedlich war. Somit wird die Wirkung von NO auf den Stoffwechsel wesentlich von der Konzentration der Zielmoleküle bestimmt. Diese Ergebnisse könnten bedeuten, daß NO in Fasern mit vorwiegend oxidativem Stoffwechsel (d.h. in FOG- oder SO-Fasern) eine höhere Modulationskapazität als in Fasern mit glykolytischem Stoffwechsel (FG-Fasern) aufweist. Obwohl die in den Experimenten ermittelten $c_{50\%}$ -Werte im Bereich der in Tabelle 13 aufgeführten Studien oder sogar darunter liegen, sind sie dennoch kritisch zu hinterfragen. Denn die verwendeten Mengen an NO-Donatoren sollten auf den Kryostatschnitten zu NO-Konzentrationen im hohen nanomolaren bis mikromolaren Bereich führen, die auf physiologischem Wege allenfalls in Makrophagen durch die dort lokalisierte NOS-2 erreicht werden, nicht jedoch in Skelettmuskelfasern und Endothelien, die NOS-1 bzw. NOS-3 enthalten, in denen bislang NO-Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich (<10 nM) gemessen wurden (Berkels *et al.* 2000). Vor diesem Hintergrund findet sich die physiologische Situation eher in Arbeiten wie denen von Salom *et al.* (1999a, 1999b) wieder, in welchen für die Dilatation von Gefäßringen $c_{50\%}$ -Werte von SNP (Nitroprussid-Natrium) und anderen NO-Donatoren im Bereich von etwa $5 \cdot 10^{-7}$ bis 10^{-5} M gemessen wurden.

4.5. Wert bildanalytischer Verfahren zur Aktivitätsmessung von Enzymen

Für Untersuchungen zur Aktivität von Enzymen im Skelettmuskel stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Mit biochemischen Methoden werden qualitative und quantitative Ergebnisse erzielt, die dann durch definierte Digestions-, Zentrifugations- und / oder Solubilisierungsschritte subzellulären Strukturen zugeordnet werden können. Diese Verfahren sind inzwischen so optimiert worden, daß Homogenate von wenigen Skelettmuskelfasern für die Analyse genügen (Pette und Staron 1990). Sie weisen allerdings den prinzipiellen Nachteil auf, daß im allgemeinen mit der Mikroumgebung der zu untersuchenden Moleküle auch deren regulatorische Zusammenhänge zerstört werden (Rozhin *et al.* 1990; Sloane *et al.* 1992). Zum anderen führen quantitative Analysen in verdünnten Lösungen zu katalytischen Parametern der unter-

suchten Enzyme, die erheblich von denen *in vivo* abweichen können (Van Noorden und Jonges 1995). Darüberhinaus ist mit Homogenaten von histologisch an sich heterogenen Geweben keine eindeutige Zuordnung enzymatischer Aktivitäten zu verschiedenen Zelltypen erreichbar. Beispielsweise vermag man allein mit biochemischen Methoden nicht zu klären, ob im Skelettmuskel nachweisbares NO von der endothelialen NOS-3 der Blutgefäße oder der NOS-1 der Skelettmuskelfasern synthetisiert worden ist.

Alternativ zu den biochemischen Verfahren stehen zur *in-situ*-Messung von Enzymaktivitäten zwei Methoden zur Verfügung, die letztlich als erweiterte histochemische Verfahren anzusehen sind: Mit der zuerst entwickelten Cytophotometrie (auch als Mikrodensitometrie bezeichnet) können mittels eines definiert lokalisierten Lichtstrahls Extinktionsmessungen in Gewebsschnitten vorgenommen werden, die Grundlage zur Bestimmung von Enzymaktivitäten sind (Übersicht bei Ruhnke 1989). Das Hauptaugenmerk der Cytophotometrie besteht neben der räumlichen Zuordnung von Enzymen zu bestimmten Zellarten vor allem in der Analyse von Enzymaktivitäten in ihrem natürlichen Mikromilieu (Van Noorden und Jonges 1995).

Mit der zunehmenden Leistungsfähigkeit graphisch basierter Computersysteme wurden mit einem meist als Bildanalyse bezeichneten Verfahren zunächst morphometrische Messungen auf lichtmikroskopischer Ebene vorgenommen. Daraus wurde eine zweite *in-situ*-Methode zur Aktivitätsmessung von Enzymen entwickelt, die mittlerweile mit den bei Chieco (2001) dargestellten Vorarbeiten eine solide technische und theoretische Basis besitzt. In der vorliegenden Arbeit wurden mit bildanalytischen Methoden zum einen Endpunktmessungen in Kryostat-schnitten nach abgeschlossener (oder nach definierter Reaktionszeit abgebrochener) enzymhistochemischer Reaktion (für Cytochrom-Oxidasen und GAPDH) und zum anderen kinetische Messung, d.h. während des Reaktionsverlaufes (NOS-1-Diaphorase und SDH) durchgeführt. Dabei kam erstmals eine bildanalytische Meßmethode zur Anwendung, mit der die Aktivität der NOS-1-Diaphorase bestimmt werden konnte und die darüberhinaus mit dem Sarkolemm erstmals eine Struktur auf subzellulärer Ebene der bildanalytischen Messung von Enzymaktivitäten zugänglich machte. Durch die Bestimmung der Diaphoraseaktivität der NOS-1 konnten bisherige auf Homogenatsebene erhobene Daten präzisiert werden, die andeuteten, daß die NOS-1 in schnellen Fasern stärker exprimiert wird als in langsamen Fasern (Hussain *et al.* 1997; Reiser *et*

al. 1997). Mit der Bildanalyse konnte darüberhinaus unter Ausnutzung der NOS-1-Diaphoraseaktivität erstmalig gezeigt werden, daß die NOS-1 in FOG-Fasern eine höhere Aktivität besitzt als in FG-Fasern.

Bildanalytische und cytophotometrische Methoden zur Aktivitätsmessung von Enzymen sind zur Zeit häufig noch mit dem Nachteil behaftet, auf histochemischen Nachweisen zu beruhen, die nicht immer spezifisch für einzelne Enzyme sind, weil sie oft nicht mit natürlichen, sondern mit artifiziellen Substraten arbeiten. Auch die immunhistochemischen Methoden zur Untersuchungen von Proteinkonzentrationen besitzen meist nur semiquantitativen Charakter. Sollte es möglich sein, diese Einschränkungen für die quantitative Enzym- und Immunhistochemie zu überwinden, wird die Bildanalyse eine zu anderen Verfahren nicht mehr wegzudenkende Ergänzung darstellen.