

1. Einleitung

1.1. Stickstoffmonoxid und Stickstoffmonoxidsynthasen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein farbloses, in Wasser nur wenig lösliches Gasradikal. Bis in die siebziger Jahre hinein galt es vor allem als Zellgift. Dann konnten Arnold *et al.* (1977) zeigen, daß NO *in vivo* eine spezifische Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase bewirkt. Bei diesen Experimenten kam noch der Zellgift-Gedanke zum Tragen, da Zigarettenrauch als NO-Quelle benutzt wurde. Ende der achtziger Jahre wurde durch Palmer *et al.* (1987), Ignarro *et al.* (1988) und Furchgott und Vanhoutte (1989) nachgewiesen, daß der aufgrund seiner biologischen Wirkung schon länger postulierte endothelium derived relaxing factor (EDRF; Übersicht bei Furchgott *et al.* 1984), welcher bereits seit der Jahrhundertwende in Form von Nitroverbindungen zur Relaxation der Koronargefäße therapeutisch genutzt wurde, mit NO identisch ist. Damit wurde erstmals eine niedermolekulare und darüberhinaus gasförmige Substanz gefunden, die eine hormonähnliche Wirkung ausübt. Seitdem ist eine Beteiligung von NO an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen in zahlreichen Arbeiten ermittelt worden. Beispielsweise spielt NO eine Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus, der unspezifischen Immunabwehr oder der Funktion von Neuronen in peripheren und zentralen Abschnitten des Nervensystems (Moncada und Higgs 1993; Bredt und Snyder 1994).

NO wird im Körper von Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) durch eine NADPH-abhängige Oxidation der Guanidino-Stickstoffgruppe des L-Arginin mit Hilfe von molekularem Sauerstoff synthetisiert (Marletta *et al.* 1988; Palmer und Moncada 1989). Bei der Reaktion sind mehrere Kofaktoren (FAD, FMN, Tetrahydrobiopterin, Calmodulin) beteiligt, die u.a. für den Elektronentransfer vom NADPH auf das Substrat L-Arginin sorgen, das durch die Abspaltung von NO zu Citrullin umgewandelt wird (Bredt *et al.* 1991; Nishida und Ortiz de Montellano 1998).

Bisher konnten drei NOS-Formen identifiziert werden, die von drei unterschiedlichen Genen kodiert und in verschiedenen Zellarten exprimiert werden (Förstermann *et al.* 1995). In ihrer Struktur und Funktion sind sie sich jedoch recht ähnlich. So besitzen alle drei NOS-Formen eine N-terminale Oxygenase-Domäne sowie eine C-terminale Reduktase-Domäne, die strukturell dem Cytochrom P450 ähnelt (Bredt *et al.* 1991). Weiterhin wurden für alle NOS-Formen

die Bindungsstellen für die Kofaktoren und das Substrat L-Arginin sowie eine Homodimerisierungssequenz identifiziert (Nakane *et al.* 1993). Die zunächst aus Neuronen isolierte NOS-1 und die endotheliale NOS-3 werden in der Regel als konstitutive Formen angesehen, die nur geringe Mengen NO produzieren (Berkels *et al.* 2000). Neuere Untersuchungen haben jedoch ergeben, daß sich die Expression dieser beiden NOS-Formen unter bestimmten Umständen verändern kann. Beispielsweise erhöht vermehrte Kontraktionstätigkeit von Skelettmuskelfasern deren NOS-1-Konzentration (Reiser *et al.* 1997). Demgegenüber gilt die NOS-2 in der Regel als induzierbares Enzym, das erst nach Stimulation durch Cytokine (z.B. γ -Interferon) oder bakterielle Lipopolysaccharide in Makrophagen in nennenswerten Mengen auftritt und dann hohe, antimikrobiell wirksame Konzentrationen an NO synthetisiert (Marletta *et al.* 1988; Zhuang und Wogan 1997).

1.2. Stickstoffmonoxid-Synthasen im Skelettmuskel

Die ursprünglich aus Neuronen isolierte NOS-1 kommt in hohen Konzentrationen auch im Skelettmuskel vor (Nakane *et al.* 1993; Kobzik *et al.* 1994; Grozdanovic *et al.* 1995). Später zeigten Kobzik *et al.* (1995), daß offenbar auch die NOS-3 in Skelettmuskelfasern von Nagern auftritt. Hingegen gelang der Nachweis der NOS-2 im Skelettmuskel lediglich in langsamen (Typ I-) Fasern von Meerschweinchen (Gath *et al.* 1996, 1999). Von der NOS-1 existieren mit der NOS-1 α , NOS-1 β , NOS-1 γ und der NOS-1 μ mindestens vier alternative Spleißformen (Brenman *et al.* 1996). Dabei unterscheidet sich die im Skelettmuskel überwiegend vorkommende NOS-1 μ von der neuronalen α -Isoform dadurch, daß sie ein zusätzliches Exon mit 34 Aminosäuren besitzt. Die katalytischen Aktivitäten beider Isoformen sind jedoch praktisch gleich (Silvagno *et al.* 1996). Nach bisherigem Kenntnisstand wird die NOS-1 μ im Skelettmuskel über eine PDZ-Domäne an α 1-Syntrophin gekoppelt, welches wiederum mit dem Dystrophinkomplex verbunden ist, so daß es letztlich zu einer Assoziation der NOS-1 mit sub-, intra- und extrasarkolemmalen Proteinkomplexen kommt (Brenman *et al.* 1996), die Costameren bilden (Übersicht bei Anastasi *et al.* 1998). Bedingt durch diese Anbindung an den Dystrophin-Proteinkomplex zeigt auch die NOS-1 im Skelettmuskel eine costamerische Verteilung (Gossrau 1998b).

Es gibt eine Vielzahl von Untersuchungen, die sich mit der Lokalisation der NOS-1 und der Wirkung des NOS-1/NO-Systems in Skelettmuskelfasern befassen (Übersicht bei Stamler und Meissner 2001). Während im endothelialen NOS-3/NO-System die lösliche Guanylatcyclase (sGC) als Rezeptor für das NO akzeptiert ist (Furchgott und Vanhoutte 1989), gibt es bislang nur vereinzelte Berichte über Vorkommen und Lokalisation der sGC in Skelettmuskelfasern (Feussner *et al.* 2001; Schoser und Behrends 2001). Es wurde aber eine NO-abhängige Erhöhung des Spiegels von cGMP, des Produktes der von der sGC katalysierten Reaktion, beobachtet (Lau *et al.* 1998). Auch fand man in Endplatten eine Kollokalisierung der NOS-1 mit der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (Typ I; Chao *et al.* 1997). Weiterhin ist die NOS-1 im Bereich motorischer Endplatten auch mit dem N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-) Rezeptor (Grozdanovic und Gossrau 1998), einem Glutamat-gesteuerten Ca^{2+} -Kanal, kollokalisiert, der möglicherweise an der Regulierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Aktivität der NOS-1 beteiligt ist. Außerdem zeigte sich nach Applikation von NO eine Hemmung der ryanodinsensitiven Ca^{2+} -Kanäle (Meszaros *et al.* 1996) sowie der Myosin-ATPase (Perkins *et al.* 1997). NO könnte auf diese Weise die Kontraktilität der Muskelfasern beeinflussen. Darüberhinaus wurde ein Effekt von NO auf den Stoffwechsel in Muskelfasern gefunden. So kann NO die Glukoseaufnahme (Balon und Nadler 1997; Kapur *et al.* 1997) und den Citratzyklus (Anderson *et al.* 1998) beeinflussen, auch wenn die molekularen Details oft noch unklar sind. Daneben hemmt NO die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) über eine S-Nitrosylierung (Mohr *et al.* 1996). Weiterhin wurden Interaktionen von NO mit Myoglobin (Brunori 2001) und der Cytochrom C-Oxidase (Borutaite und Brown 1996) gefunden. Außerdem wurde kürzlich beschrieben, daß das von der NOS-1 der Muskelfasern produzierte NO an der Regulation der Muskeldurchblutung beteiligt ist. So wird durch NO die Sensitivität der Blutgefäße gegenüber den bei Belastung ausgeschütteten adrenergen Hormonen vermindert (Thomas *et al.* 1994). Zusätzlich scheint NO im Skelettmuskel an der Myoblastenfusion (Lee *et al.* 1994), der Endplattenbildung (Tews *et al.* 1997) und der Signaltransduktion an ausdifferenzierten Endplatten beteiligt zu sein (Wang *et al.* 1995).

Insgesamt wurden Effekte von NO auf zahlreiche physiologische Vorgänge in Skelettmuskelfasern beschrieben. Oft wird aber nicht deutlich, welche der erhobenen Befunde wirklich biologische Relevanz besitzen.

1.3. Nachweisverfahren für die NOS-1 im Skelettmuskel

1.3.1. Biochemische Nachweise

Der Nachweis denaturierten NOS-1-Proteins in Western-Blot-Verfahren wurde in einer Reihe von Arbeiten verwendet, in denen die Konzentration von NOS-1-Protein in verschiedenen Skelettmuskeln untersucht wurde. Dabei konnte gezeigt werden, daß in Muskeln mit einem hohen Anteil an schnellen (Typ II-) Fasern auch die Konzentration der NOS-1 deutlich höher ist (Kobzik *et al.* 1994; Chao *et al.* 1997; Hussain *et al.* 1997). Allerdings könnte es dabei speziesabhängige Unterschiede geben (Grozdanovic *et al.* 1995; Frandsen *et al.* 1996, 2000). Auch gibt es bislang keine Untersuchungen darüber, ob es innerhalb der heterogenen Gruppe der schnellen Fasern (Pette und Staron 1990) Unterschiede in der NOS-1-Konzentration gibt.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der NOS-1 kommt meist ein Assay unter Verwendung von radioaktiv markiertem L-Arginin zum Einsatz (Depre *et al.* 1997), jedoch ist diese Methode ebenso wie die nicht-radioaktive Messung der Aktivität der NOS-1 über den HPLC (high pressure liquid chromatography)-Nachweis des Citrullins (Carlberg 1994) auf die Analyse von Gewebshomogenaten beschränkt.

1.3.2. Immunhistochemische Nachweise

Bei immunhistochemischen Nachweismethoden wird ebenfalls Protein nachgewiesen, das auch in denaturierter Form vorliegen kann. Für die NOS-1 stehen einige kommerziell vertriebene Antikörper gegen verschiedene Abschnitte des NOS-1-Proteins zur Verfügung. Mit den immunhistochemischen Verfahren konnte beispielsweise die Assoziation der NOS-1 mit dem Sarkomer der Skelettmuskelfasern gezeigt werden (Kobzik *et al.* 1994; Grozdanovic *et al.* 1995).

1.3.3. Enzymhistochemische Nachweise

Histochemische Nachweise von Enzymaktivitäten sind im allgemeinen Zweischrittreaktionen (Übersicht bei Lojda *et al.* 1979). Im ersten Schritt setzen die nachzuweisenden Enzyme ihr natürliches Substrat oder eine dem natürlichen Substrat verwandte artifizielle Substanz um. Das entstehende primäre Reaktionsprodukt wird im zweiten Schritt durch Hilfsreagenzien (z.B. Metallionen) ausgefällt (Reaktionen vom Gomori-Typ) oder an wasserlösliche Kuppler (z.B. Diazoniumsalze) gebunden (simultane und sukzedane Azokupplung), wobei sekundäre farbige Reaktionsprodukte entstehen, die praktisch wasserunlöslich sind und dadurch ausfallen. Der zweite Schritt kann auch in einer Reduktion von oder durch Hilfsreagenzien (Tetrazoliumsalze, Indoxyl oder Indolylyamin) bestehen, wodurch ebenfalls weitgehend wasserunlösliche sekundäre Reaktionsprodukte entstehen. Bei den Tetrazoliumsalzmethode zum Oxidoreduktasenachweis kann allerdings dieser zweite Schritt von anderen Enzymen als dem nachzuweisenden katalysiert werden und so zu Unspezifitäten führen. Diese durch sogenannte Diaphorase vermittelte Elektronenübertragung, die die Gesamtreaktion limitiert, bewirkt eine falsch-positive Reduktion des wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes zu wasserunlöslichem Formazan. Sie kann jedoch nichtkatalytisch mit dem Elektronenüberträger PMS (Phenazinmethosulfat) umgangen werden, um so zu möglichst spezifischen Ergebnissen zu kommen.

Die Quantifizierung enzymhistochemischer Reaktionen gestaltet sich wegen der Unregelmäßigkeit biologischer Strukturen als kompliziert. Ursprünglich wurde dazu das Verfahren der Mikrodensitometrie (auch als Cytophotometrie bezeichnet) entwickelt (Übersicht bei Van Noorden und Jonges 1995). Desweiteren wurden im letzten Jahrzehnt mit der zunehmenden Leistungsfähigkeit graphisch basierter Computersysteme bildanalytische Methoden etabliert, mit denen histochemische Reaktionen ebenfalls und besser als mit der Cytophotometrie quantifiziert werden können (Übersicht bei Chieco 2001).

Der enzymhistochemische Nachweis der NOS-1 beruht auf seiner NADPH-abhängigen Diaphoraseaktivität (Hope *et al.* 1991: Neurone; Grozdanovic *et al.* 1995: Skelettmuskelfasern). Bei dieser Reaktion werden an der NADPH-Reduktase-Domäne der NOS-1 Elektronen von NADPH über die Kofaktoren FMN und FAD auf wasserlösliches Tetrazoliumsalz übertragen (Bredt *et al.* 1991), welches dadurch in mehreren Teilschritten zu wasserunlöslichem Formazan

reduziert wird (Übersicht bei Seidler 1991). Der Nachweis der NOS-1 durch ihre Diaphoraseaktivität ist allerdings nicht unproblematisch, da noch weitere Enzyme eine NADPH-Diaphoraseaktivität aufweisen (Übersicht bei Blottner *et al.* 1995). Diese NADPH-Diaphorasen besitzen bezüglich ihrer Primärstruktur kaum Gemeinsamkeiten, stellen jedoch alle Flavoproteine dar (Förstermann *et al.* 1995). Diese Struktureigenschaft ist offenbar als Voraussetzung für die Ausbildung der Diaphorase-Eigenschaft anzusehen. Die Spezifität des enzymhistochemischen Nachweises der NOS-1 über ihre Diaphoraseaktivität ist deshalb wegen der möglichen Ko-Expression mit anderen NADPH-Diaphorasen primär gering.

Weiterhin wurde unlängst mit 4,5-Diaminofluoreszein (DAF) und seinen Derivaten eine Substanzgruppe entwickelt, mit deren Hilfe NO und andere Stickstoffradikale in intakten Zellen semiquantitativ nachgewiesen werden können. Diese Methode ist allerdings bislang nur für Untersuchungen von neuronalem Gewebe und Endothelien etabliert (Kojima *et al.* 1998; Nakatsubo *et al.* 1998).

1.4. Costameren

Costameren stellen eine multimolekulare Aggregation von Proteinen im sarkolemmalen Bereich von Skelettmuskelfasern dar, wodurch beim histochemischen Nachweis dieser Proteine eine regelmäßige, dichte Abfolge von Linien bzw. Ringen sichtbar wird, die senkrecht zur Längsachse der Skelettmuskelfasern verlaufen. Sogenannte Intercostameren verbinden diese Linien bzw. Ringe zu einer gitterartigen Struktur (Cullen *et al.* 1991). Darüberhinaus gibt es auch Studien über Costameren in Kardiomyozyten (Wu *et al.* 1999) sowie vasalen und nicht-vasalen glatten Muskelzellen (Price 1991).

Erstmals wurden Costameren von Pardo *et al.* (1983a) an Skelettmuskelfasern für Vinculin beschrieben, später auch für Integrine (Anastasi *et al.* 1998), Talin (Belkin *et al.* 1986), Spektrine (Vybiral *et al.* 1992), Dystrophin (Straub *et al.* 1992), einige Mitglieder des erweiterten Dystrophinkomplexes, beispielsweise Dystroglykane, Syntrophine und Sarkoglykane (Porter *et al.* 1992), Kollagene (Kostin *et al.* 1998) und Caveolin-3 (Gossrau 1998a). Diese Moleküle können in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation einem sub-, intra- oder extrasarkolemmalen

Kompartiment zugeordnet werden. Neben diesen Nichtenzymproteinen sind mit der Na^+/K^+ -ATPase (Williams und Bloch 1999b) und der NOS-1 (Gossrau 1998b; vgl. Chang *et al.* 1996) auch Enzyme costamerisch organisiert.

Weiterhin ist bekannt, daß die Costameren eine feste räumliche Beziehung zum Sarkomer-Apparat besitzen, indem sie die Z-Linie mit einem Abstand von ca. 100 nm flankieren (Watkins *et al.* 1997). Darüberhinaus sind sie auch mit der M-Linie verbunden, wodurch auf lichtmikroskopischer Ebene ein durchschnittlicher Abstand zweier benachbarter Costameren von 1 μm resultiert (Pardo *et al.* 1983b).

Die Funktion der Costameren besteht möglicherweise darin, eine mechanische Verbindung zwischen Sarkomer-Apparat, Sarkolemm und extrazellulärer Matrix herzustellen (Berthier und Blaineau 1997). Sie sollen an der Organisation des Sarkolemm-assoziierten kortikalen Cytoskeletts und damit an der Ausrichtung und Stabilisierung des kontraktilen Sarkomer-Apparates beteiligt sein (Williams und Bloch 1999a). Die Bedeutung eines regelrechten Aufbaus des kortikalen Cytoskeletts wird insbesondere bei Muskeldystrophien deutlich. So fehlt bei der letztlich letal verlaufenden Muskeldystrophie Typ Duchenne (DMD) mit dem Dystrophin ein zentrales Protein des Cytoskeletts, wodurch es zu Umverteilungen von daran verankerten Proteinen (so auch der NOS-1) aus dem Sarkolembereich in den Intrafibrärraum kommt (Crosbie *et al.* 1998; Miethke 2001). Die Muskeldystrophie Typ Becker wirkt sich direkt auf die costamerische Verteilung des Dystrophin aus (Minetti *et al.* 1998). Neben den mechanischen Funktionen wurde außerdem eine Beteiligung der Costameren an Signaltransduktionsvorgängen diskutiert, wie sie für andere Plasmamembranabschnitte, die reich an Integrinen sind, beschrieben wurde (Yamada und Geiger 1997).

Insgesamt ist die Bedeutung der Costameren als subzelluläre Struktur jedoch noch nicht vollständig klar. So stellt sich z.B. die Frage, weshalb es im Detail Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen den verschiedenen costamerisch organisierten Proteinen gibt, wie etwa in der Ausprägung von Intercostameren (Gossrau 1998b). Auch ist nicht geklärt, wie sich Costameren während der Kontraktion der Muskelfasern verhalten, bei der es infolge der Sarkomerverkürzung oder -verlängerung intrafibrär zu räumlichen Veränderungen kommt, die mit erheblichen mechanischen Auswirkungen auf den Sarkolembereich einhergehen sollten.

1.5. Bildanalyse enzymhistochemischer Reaktionen

Die beim enzymhistochemischen Nachweis entstehenden Reaktionsprodukte besitzen eine charakteristische Farbe und fallen in der unmittelbaren Umgebung des Enzyms aus. Das meist schmalbandige Absorptionsmaximum dieser Farbstoffe ermöglicht Extinktionsmessungen und damit Konzentrationsbestimmungen des durch die Reaktion entstandenen Farbstoffes. Unter Verwendung von Interferenzfiltern im Strahlengang des Mikroskopes kann diese Messung der Extinktion auch *in situ*, d.h. in Gewebsschnitten vorgenommen werden (Chieco *et al.* 1994). Dabei werden von der Mikroskopkamera Graustufen aufgezeichnet, die proportional zur Transmission des Lichtes sind:

$$GW = k \cdot T$$

$$T = \frac{\Phi}{\Phi_0}$$

mit:	GW	... Grauwert innerhalb eines Bildpunktes (Pixel)
	T	... Transmission
	Φ	... der im Bereich eines Pixels ausfallende Lichtstrom
	Φ_0	... der im Bereich eines Pixels einfallende Lichtstrom
	k	... Proportionalitätsfaktor

Daraus kann die Extinktion E in jedem einzelnen Pixel berechnet werden:

$$E = -^{10}\log GW$$

Durch diesen Zusammenhang läßt sich auch die Initialgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen bestimmen (Jonker *et al.* 1995), die sich mitunter erheblich von der *extra situm*, d.h. mit biochemischen Verfahren ermittelten, unterscheidet (Van Noorden und Jonges 1995). Weiterhin konnten mit der Bildanalyse Unterschiede in der Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase in periportalen und perizentralen Abschnitten der Leberlobuli gemessen werden, die mit biochemischen Methoden nicht feststellbar waren (Geerts *et al.* 1996). Zur NOS-1 in Skelettmuskelfasern gibt es bislang noch keine quantitativen bildanalytischen Daten, was mit der relativ geringen Spezifität der NADPH-Diaphorasereaktion und der inhomogenen Verteilung des Enzyms zusammenhängt.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, das Vorkommen der NOS-1 im Skelettmuskel vertiefend zu charakterisieren. Dazu wurde eine Kombination aus proteinbiochemischen, immunhistochemischen und enzymhistochemischen Methoden eingesetzt und für die NOS-1-Messung an Kryostat-schnitten ein computergestütztes bildanalytisches Meßverfahren etabliert und angewandt. Im einzelnen wurden folgende Aspekte bearbeitet:

1. Da für den enzymhistochemischen Nachweis der NOS-1 deren NADPH-abhängige Diaphoraseaktivität verwendet werden sollte, waren zunächst Versuche zur Erhöhung der NOS-1-Spezifität bzw. zur Abgrenzung der NOS-1-Diaphorase gegenüber anderen im Skelettmuskel vorkommenden NADPH-Diaphorasen durchzuführen.
2. Unter Verwendung histochemischer und morphometrischer Methoden sollten die bisherigen Befunde zur costamerischen Verteilung der NOS-1 in Skelettmuskelfasern präzisiert werden. Dazu wurden auch andere Proteine, deren Lokalisation in verschiedenen Kompartimenten von Skelettmuskelfasern bekannt ist, vergleichend mit der NOS-1 untersucht.
3. Bisher war es nicht möglich, die NOS-1 *in situ*, d.h. in Kryostatschnitten zu quantifizieren. Solche Messungen sind aber wichtig, da biochemische Methoden für die heterogen aufgebaute Skelettmuskulatur nur Durchschnittsdaten liefern und nichts über das Verhalten der NOS-1 in den verschiedenen Fasertypen aussagen können. Es sollte daher eine bildanalytische Methode entwickelt werden, mit der die katalytischen Eigenschaften der NOS-1 durch ihre Diaphoraseaktivität bestimmt werden können. Hier war insbesondere die Lokalisation der NOS-1 im Sarkolembereich zu berücksichtigen, da die bisher bildanalytisch untersuchten Enzyme im Unterschied zur NOS-1 eine annähernd homogene Verteilung im Cytoplasma aufweisen.
4. Im Vergleich zu anderen Molekülen, über deren Expression bzw. Aktivität die Definition der verschiedenen Typen von Skelettmuskelfasern erfolgt, sollte herausgefunden werden, ob mit der Bildanalyse zusätzliche Aussagen zur Aktivität der NOS-1 in diesen Fasertypen möglich sind und ob gegebenenfalls die Aktivität des Enzyms mit den metabolischen Eigenschaften der verschiedenen Fasertypen korreliert werden kann.

5. Durch Verwendung von NO-Donatoren sollte die biologische Wirkung von NO simuliert und die dadurch veränderten katalytischen Aktivitäten der NO-sensitiven GAPDH und Cytochrom-Oxidasen in Kryostatschnitten bildanalytisch bestimmt werden, um mögliche funktionelle Zusammenhänge zwischen diesen beiden Enzymen und dem NOS-1/NO-System der betreffenden Muskelfasern herauszufinden.