

3. Ergebnisse

3.1. Verteilungsmuster der NADPH-Diaphoraseaktivität in Skelettmuskelfasern

3.1.1. Vergleich mit den Verteilungsmustern von NADH-Diaphorase, SDH, MHC und SERCA-1

3.1.1.1. Längsschnitte von Skelettmuskelfasern

Nach Anwendung des Standardprotokolls zum Nachweis der NADPH-Diaphorase auf Zunge, M. cremaster und M. extensor digitorum longus (EDL) der Ratte war eine ausgeprägte Formazanpräzipitation sowohl im Sarkolembereich (umfaßt das Sarkolemm selbst mit seiner unmittelbaren Umgebung) als auch im Faserinneren zu beobachten. Da sich dieses Verteilungsmuster zwischen den einzelnen Muskeln nicht wesentlich unterschied, gelten die folgenden Ausführungen für alle untersuchten Muskeln.

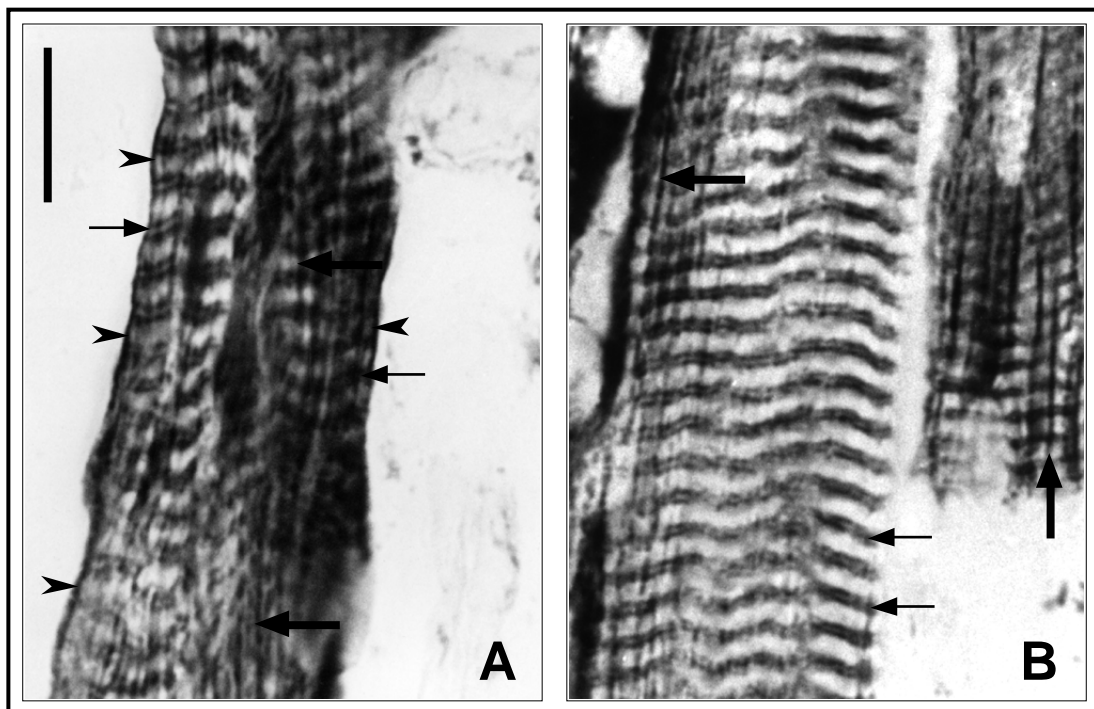


Abb. 2: Histochemischer Nachweis der NADPH-Diaphorase (A) und NADH-Diaphorase (B) in längs geschnittenen Muskelfasern der Zunge der Ratte. Mit beiden Reaktionen ist eine Formazanbildung außerhalb des sarkolemmalen Bereiches zu sehen als regelmäßige Querstreifung (dünne Pfeile) und Bündel längsorientierter Streifen variabler Stärke (dicke Pfeile). In (A) ist zusätzlich das Sarkolemm dargestellt (Pfeilspitzen). Balken = 10 µm.

An längs geschnittenen Skelettmuskelfasern (Abb. 2A) war die Sarkolemm-assoziierte Formazanproduktion in zwei verschiedenen Mustern zu beobachten: 1) Entlang der Oberfläche der Skelettmuskelfaser reihten sich perlschnurartig punktförmige Formazanablagerungen aneinander. An manchen Stellen war zu sehen, wie sich diese Punkte in Linien mit senkrechtem Verlauf zum Sarkolemm fortsetzten (siehe auch Abb. 6B). 2) Zumeist in tangential angeschnittenen Sarkolembereichen um Muskel-Sehnen-Verbindungen waren Bündel parallel verlaufender, längsorientierter Streifen sichtbar. Die Formazanproduktion im intrafibrären Bereich trat ebenfalls in zwei Formen auf: 1) Fast überall kamen deutlich hervortretende, quer zur Faserachse verlaufende, sarkomerähnliche Streifen mit sehr regelmäßigen Abständen zueinander vor. Die Periode a dieser Streifen betrug durchschnittlich $2\ \mu\text{m}$ ($a_{\text{NADPH}}=2,0\pm 0,23\ \mu\text{m}$; $n_{\text{NADPH}}=500$) bei bildanalytischer Bestimmung. 2) Seltener zeigten sich Längsbündel variabler Länge und Stärke.

Beim Nachweis der NADH-Diaphorase (Abb. 2B) und der SDH (Ergebnisse hier nicht gezeigt) war das Sarkolemm nicht dargestellt. Hingegen kamen intrafibrär ähnliche Strukturen wie bei der NADPH-Diaphorase vor, nämlich Längsbündel sowie eine sarkomerähnliche Querstreifung. Bei beiden Reaktionen betrug der Abstand zweier benachbarter Querstreifen ebenfalls ca. $2\ \mu\text{m}$ ($a_{\text{SDH}}=1,9\pm 0,24\ \mu\text{m}$; $n_{\text{SDH}}=500$; $a_{\text{NADH}}=2,0\pm 0,22\ \mu\text{m}$; $n_{\text{NADH}}=500$).

Um die exakte Lokalisation der sarkomerähnlichen Querstreifung in den Muskelfasern zu ermitteln, wurden Doppelinkubationen für die NADPH-Diaphorase und myosin heavy chain-slow (MHCs) durchgeführt (Abb. 3A, B). Da MHCs ein etablierter Marker für den A-Streifen ist, war es so möglich, die Lokalisation der Formazanproduktion auf das Sarkomersystem zu beziehen. Die mittels Bildanalyse gewonnenen Daten sind in Abb. 3C und D zu sehen; hierbei zeigten die gemessenen Maxima der Formazanbildung keine räumliche Übereinstimmung mit denen der MHCs-Immunfluoreszenz, d.h. die Formazanproduktion ist im I-Streifen lokalisiert.

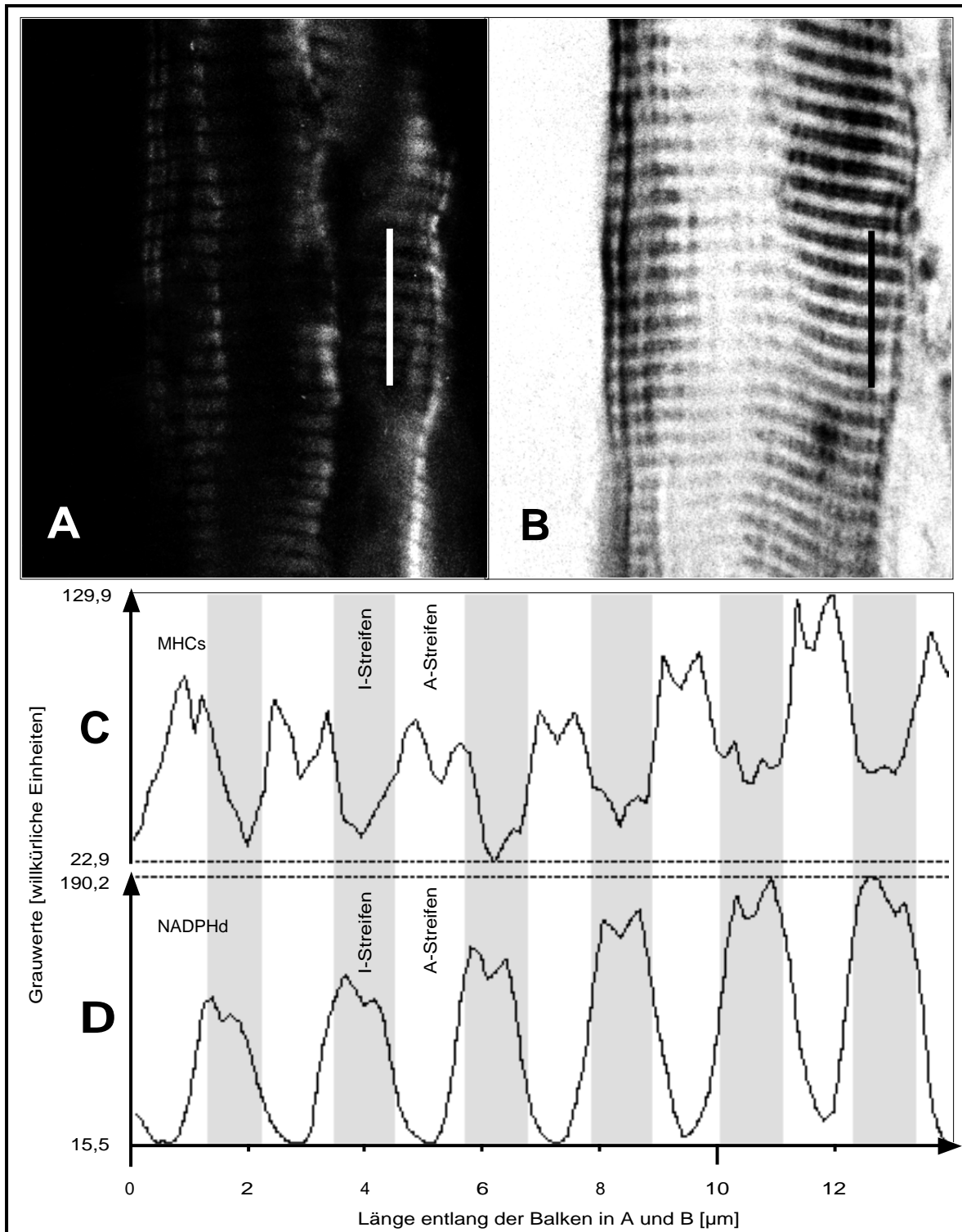


Abb. 3: Doppelinkubation mit MHCs-Immunhistochemie (A) und NADPH-Diaphorase-Reaktion (B) an längs geschnittenen Fasern des *M. extensor digitorum longus* der Ratte. Die Quantifizierung mittels Bildanalyse ergab die Darstellung in (C) und (D), wobei (C) die invertierten Grauwerte entlang des weißen Balkens in (A) zeigt, (D) hingegen die Grauwerte entlang des schwarzen Balkens in (B). Dabei stimmen die Spitzenwerte in (C) nicht mit denen in (D) überein.

Die hochauflösende Bildanalyse belegte zusätzlich, daß die Formazanablagerung im I-Streifen im Bereich der Z-Linie regelmäßig unterbrochen ist, was an den Doppelspitzen mit ungefähr 0.8 µm Abstand erkennbar ist (Abb. 3D). Die Auswertung von anderen Doppelinkubationen (NADPH-Diaphorase/MHCf, NADH-Diaphorase/MHCs und SDH-Diaphorase/MHCs) erbrachte gleichermaßen keine Überdeckung von Formazan und Immunfluoreszenz (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.1.1.2. Querschnitte von Skelettmuskelfasern

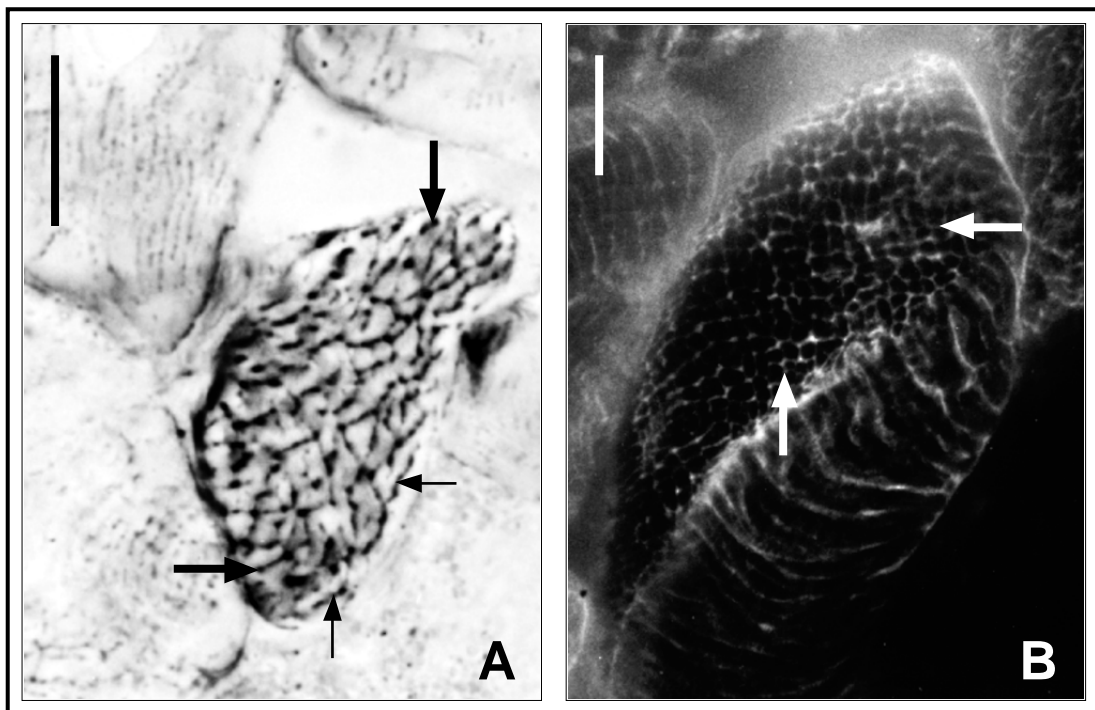


Abb. 4: Histochemischer Nachweis der NADPH-Diaphorase (A) und immunhistochemische Darstellung von SERCA-1 (B) in quer geschnittenen Fasern des M. cremaster der Ratte. In A ist ein stark Formazan-positives Netzwerk zu sehen, bestehend aus Punkten (dünne Pfeile), die untereinander durch Filamente (dicke Pfeile) verbunden sind. Diese filamentären Strukturen bilden auch in (B) ein Netzwerk, jedoch ohne punktförmige Darstellungen. Balken = 10 µm.

Nach Inkubation für NADPH-Diaphorase umgab eine durchgehende Formazanlinie die gesamte sarkolemmale Faser Oberfläche; im Faserinneren fanden sich hingegen punktförmige Formazanpräzipitationen, die untereinander durch ein Netzwerk filamentärer Strukturen verknüpft wa-

ren (Abb. 4A, Abb. 5A). In Folgeschnitten, in denen die SDH (Abb. 5B) dargestellt war, zeigten sich dagegen meist punktförmige Formazanablagerungen, die den nach NADPH-Diaphorase-Reaktion gefundenen ähnelten; allerdings waren beim SDH-Nachweis weder Filamentstrukturen noch eine Sarkolemmdarstellung zu beobachten. Netzwerkartige Filamentstrukturen im Faserinneren, die denen beim NADPH-Diaphorase-Nachweis ähnelten, fanden sich dagegen beim immunhistochemischen Nachweis von SERCA-1, einem Marker für das sarkoplasmatische Retikulum (Abb. 4B). Allerdings kam SERCA-1 nicht als punktförmige Struktur oder im Sarkolemm vor.

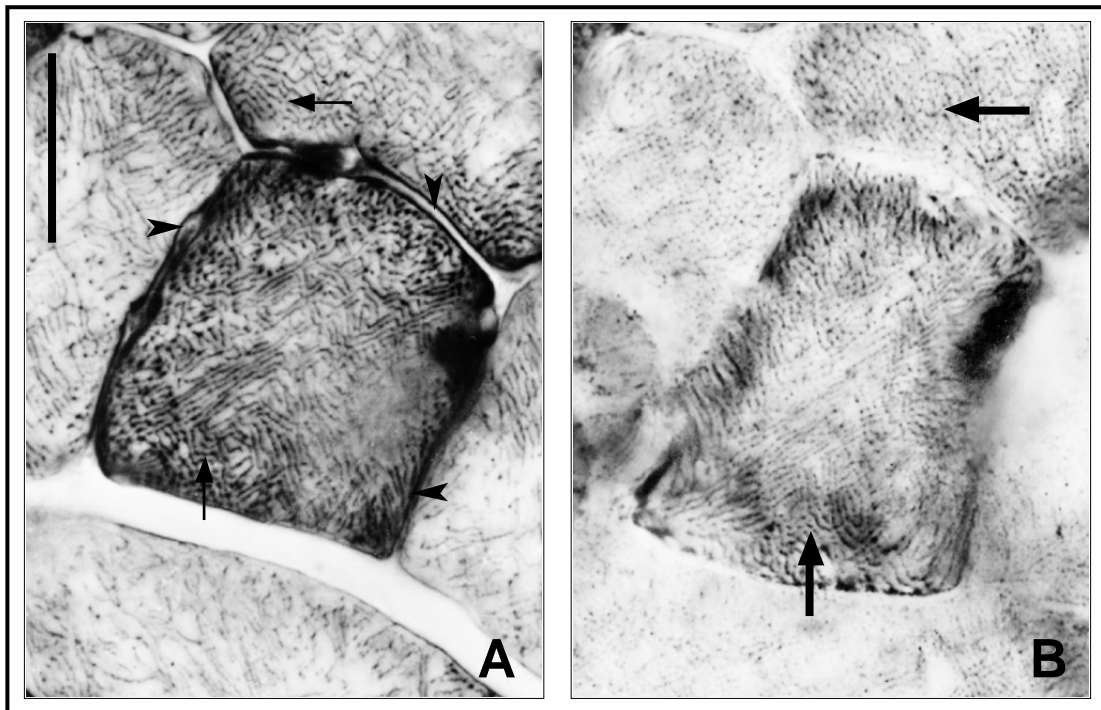


Abb. 5: Histochemischer Nachweis der NADPH-Diaphorase (A) und der SDH (B) im *M. cremaster* der Ratte. Zusätzlich zu den in (B) dominierenden punktförmigen Formazanpräzipitationen (dicke Pfeile) sind in (A) filamentäre Strukturen (dünne Pfeile) sowie das Sarkolemm (Pfeilspitzen) dargestellt. Balken = 10 μ m.

Um nachzuweisen, daß vor allem die intrafibrären Formazanablagerungen allein durch enzymatische Aktivität entstanden waren und nicht etwa durch unspezifische Reduktion von NBT durch Bestandteile des Inkubationsmediums (NADPH, Triton-X 100), wurde eine Reihe von Kontrollexperimenten durchgeführt: Schnitte, die mit Diaphorasemedium ohne NADPH oder NADH inkubiert wurden, zeigten abgesehen von einer schwachen Darstellung der Papillae

filiformes des Zungenepithels unabhängig von der Zugabe von Triton-X 100 keine signifikante Formazanproduktion (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Die Inkubation mit einer Formazansuspension (hergestellt aus nichtenzymatisch reduziertem NBT) führte lediglich zu einer Ablagerung unwesentlicher Mengen an Formazan im Gewebe. Ebenso konnte durch Präinkubation mit einer NBT-Lösung ohne Kosubstrat und die nachfolgende Inkubation mit einem nichtenzymatischen Reduktionsmittel die Existenz von Strukturen mit einer hohen Affinität zu NBT ausgeschlossen werden.

3.1.2. Charakterisierung der NADPH-Diaphorasen mit Inhibitoren

Um die Frage zu beantworten, welche Diaphorasen vor allem für die intrafibräre Formazanproduktion, d.h. außerhalb des Sarkolembereiches, verantwortlich sind, wurden dem NADPH-Diaphorasemedium Inhibitoren zugesetzt, die laut Literatur Enzyme mit NADPH-Diaphoraseaktivität spezifisch hemmen und die in Tabelle 10 zusammengefaßt sind.

Manche Inhibitoren (EDTA, Dicoumarol, Miconazol) zeigten selbst in hohen Konzentrationen keinen wesentlichen Einfluß auf die Stärke der NADPH-abhängigen Diaphoraseaktivität. Andere Inhibitoren (NAD^+ , N-Ethyl-maleinimid, Cytochrom C) unterdrückten in hohen Konzentrationen die Diaphoraseaktivität in allen subzellulären Kompartimenten mehr oder minder vollständig; in geringeren Konzentrationen zeigten sie dagegen keinen Effekt. Weiterhin konnten keine Übergangsbereiche festgestellt werden, in denen bei mittleren Konzentrationen die Diaphoraseaktivität in einem Kompartiment schon deutlicher unterdrückt gewesen wäre als in einem anderen. Im Gegensatz dazu bewirkten chaotrope Substanzen wie Harnstoff (Abb. 6) oder Guanidin-HCl in Konzentrationen von 1 M bzw. 0,4 M eine selektive Formazanproduktion im Sarkolembereich. Wurde statt des natürlich vorkommenden Ko-Substrates β -NADPH sein synthetisches Stereoisomer α -NADPH eingesetzt, konnte ebenfalls eine selektive Sarkolemmdarstellung beobachtet werden, wenn auch mit wesentlich verminderter Intensität als bei Verwendung chaotroper Substanzen.

Inhibitor		Intensität des Formazans			Supprimiertes Enzym
		Sarko- lemm	Mito- chondrien	Sarkoplas- matisches Retikulum	
Konzentration					
NAD⁺	1,4 mM	+++	++	++	NAD(P)H-Transhydrogenase
	7 mM	+	0	+	NAD(P)H-(Quinon)-Oxidoreduktase
	14 mM	0	0	0	(EC 1.6.1.1; EC 1.6.99.2)
EDTA	1 mM	+++	+++	+++	NAD(P)H-(Quinon)-Oxidoreduktase
	10 mM	++	+++	+++	(EC 1.6.99.2)
Dicumarol	0,1 mM	+++	++	++	NAD(P)H-(Quinon)-Oxidoreduktase
	1 mM	++	++	++	(EC 1.6.99.2)
N-Ethyl- maleinimid	1 mM	++	+++	+++	NADPH-(Akzeptor)-Oxidoreduktase
	5 mM	++	++	++	(EC 1.6.99.1)
	20 mM	+	+	+	
Cytochrom C	0,1 mM	+++	+++	++	Cytochrom-P450-Reduktase
	5 mM	0	0	0	(EC 1.6.2.4)
Miconazol	0,1 mM	+++	+++	+++	Cytochrom-P450-Reduktase
	1 mM	+++	+++	++	(EC 1.6.2.4)
Harnstoff	1 M	+++	0	0	
	2 M	++	0	0	
Guanidin-HCl	0,4 M	++	0	0	
α -NADPH	1,1 mM	+	0	0	Alle NADPH-Diaphorase außer NOS-1

Tabelle 10: Liste der geprüften potentiellen Inhibitoren bekannter NADPH-Diaphorase. Die Intensität der Formazandarstellung wurde unabhängig von zwei Personen beurteilt unter Verwendung folgender vierstufiger Ordinalskala: „+++“ bedeutet eine gleich starke Reaktion im Vergleich zu Inkubationen ohne Inhibitor, „++“ bedeutet eine leicht, „+“ eine stark verminderte Reaktion, und „0“ steht für keine Formazanbildung.

Zusammengefaßt belegen die Experimente mit Hemmsubstanzen die Existenz zweier verschiedener Typen von NADPH-abhängigen Diaphorase: Eine sarkolemm-assoziierte und eine nicht-sarkolemm-assoziierte Gruppe, die sich besonders in ihrer Empfindlichkeit gegenüber denaturierenden Substanzen wie beispielsweise Harnstoff unterscheiden.

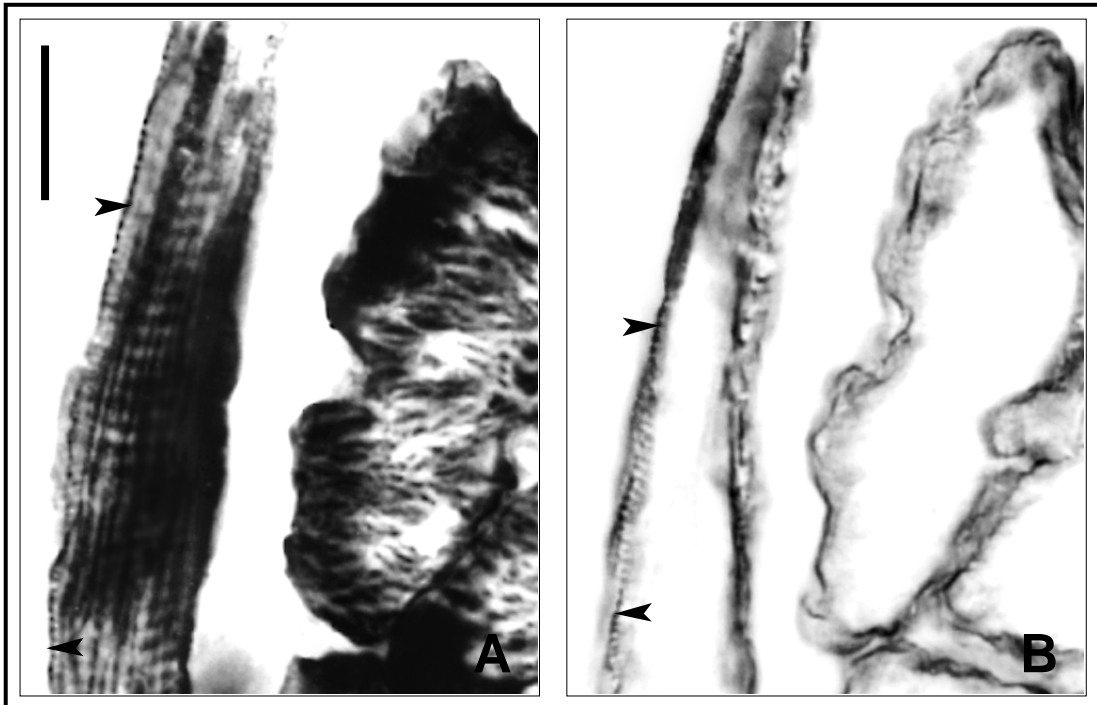


Abb. 6: Folgeschnitte von Skelettmuskelfasern der Zunge der Ratte nach NADPH-Diaphorase-Reaktion ohne (A) und mit 1 M Harnstoff (B). In (A) ist eine Formazanpräzipitation im sarkolemmalen Bereich (Pfeilspitzen) sowie im Zellinneren zu sehen. In (B), unter der Einwirkung von Harnstoff, ist die gepunktete Darstellung des Sarkolemm (verursacht von NOS-1) erhalten, währenddessen intrafibrär die Diaphoraseaktivität fast völlig unterdrückt ist. Balken = 10 μm .

3.1.3. Vergleich mit dem Verteilungsmuster der NOS-1-Immunfluoreszenz

Mit beiden benutzten Antikörpern gegen NOS-1 war in Querschnitten von Skelettmuskelfasern ausschließlich der Sarkolembereich dargestellt (Abb. 7C), wobei sich aber ein faserabhängiger Unterschied in der Immunreaktivität zeigte. Entsprechende Ergebnisse fanden sich auch bei Faserlängsschnitten (Ergebnisse nicht gezeigt). Im Sarkolembereich stimmte die immunhistochemische Lokalisation der NOS-1 mit der NADPH-abhängigen Formazanproduktion überein, während intrafibrär keine NOS-1-Immunreaktivität, wohl aber Formazan zu beobachten war (Abb. 7A, C). Diese Unterschiede im intrafibrären Bereich traten nach Zugabe von 1 M Harnstoff nicht mehr auf, d.h. Immunfluoreszenz und Formazan waren dann nur noch im Sarkolembereich zu sehen (Abb. 7B, C).

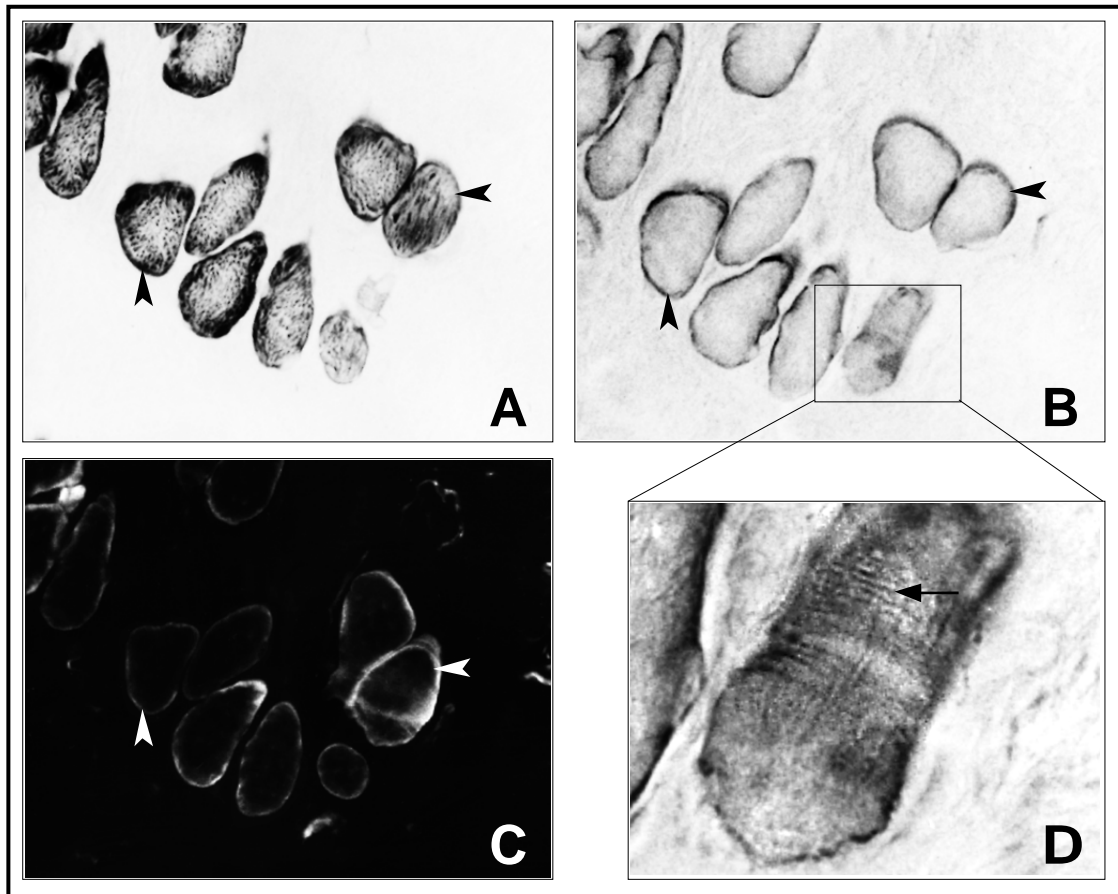


Abb. 7: Folgeschnitte von quer geschnittenen Muskelfasern der Zunge der Ratte. Die Inkubation mit NADPH-Diaphorasemedium ergab eine intensive Darstellung sowohl des sarkolemmalen (Pfeilspitzen) als auch des nicht-sarkolemmalen Bereiches. Die Anwesenheit von Harnstoff (B) unterdrückt alle intrafibrär lokalisierten NADPH-abhängigen Diaphorasen und ergibt eine Darstellung, die dem immunhistochemischen Nachweis der NOS-1 (C) entspricht. Die Vergrößerung in (D) zeigt eine costamerische Verteilung (dünner Pfeil) der Formazanpräzipitation bei tangentialem Faseranschnitt (siehe auch [Abschnitt 3.2](#)).

Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse wird im folgenden nur noch von “NOS-1-Diaphorase” und “NOS-1-Diaphoraseaktivität” statt von “NADPH-Diaphorase” und “NADPH-Diaphoraseaktivität” gesprochen. Damit soll verdeutlicht werden, daß unter Benutzung von 1 M Harnstoff im NADPH-Diaphorasemedium zumindest in Skelettmuskelfasern der Ratte enzymhistochemisch ausschließlich die Aktivität der NOS-1 visualisiert wird.

3.2. NOS-1 als costamerisch organisiertes Enzym im Sarkolemm von Skelettmuskelfasern

3.2.1. Reguläre und irreguläre Costameren in 60 µm dicken Kryostatschnitten

3.2.1.1. Charakterisierung durch NOS-1-Diaphorase

In 10 µm dicken Längsschnitten des EDL der Ratte fanden sich nach der NOS-1-Diaphorase-reaktion bei tangential getroffenen Abschnitten des Sarkolemmms charakteristische Formazanablagerungen in Form von senkrecht zur Faserlängsachse orientierten Linien (Abb. 8A), die

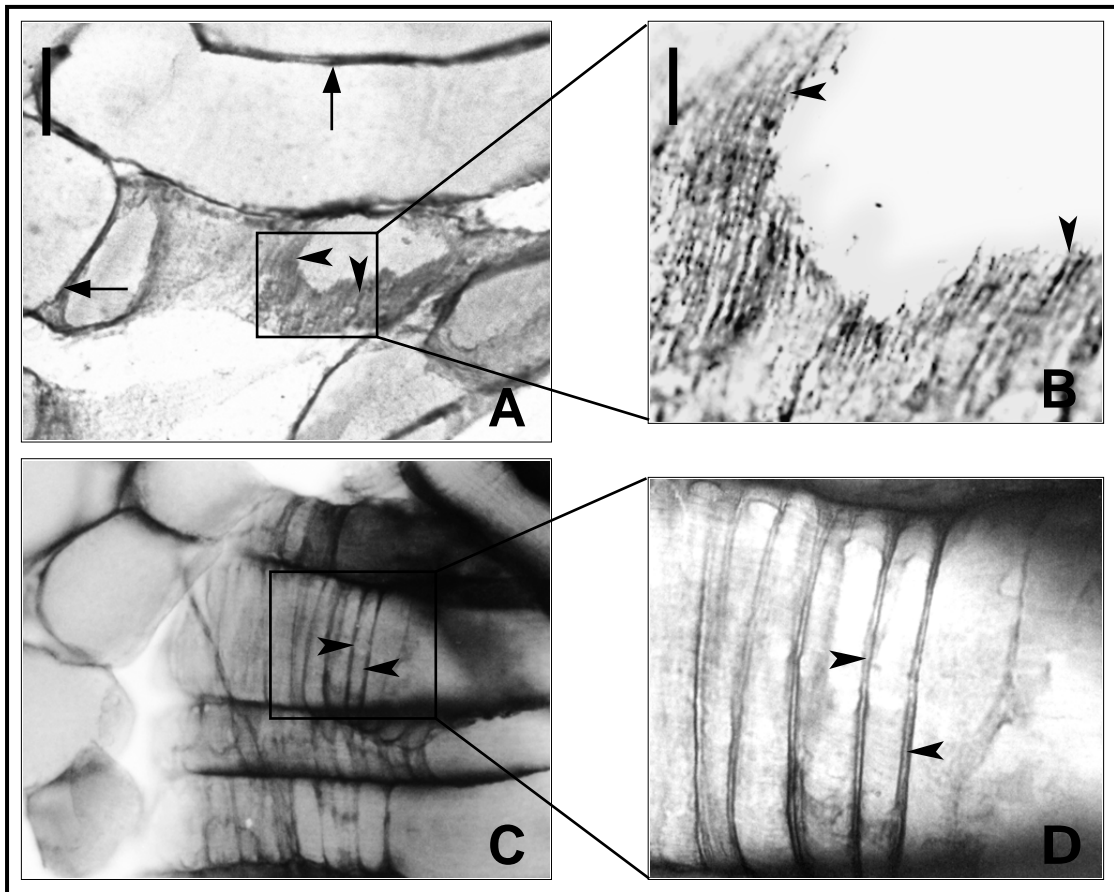


Abb. 8: Enzymhistochemischer Nachweis der NOS-1-Diaphorase führt zur Darstellung regulärer und irregulärer Costameren. Zur Demonstration der Expression der NOS-1 wurden Längsschnitte von entweder 10 µm (A, B) oder 60 µm (C, D) Dicke mit NADPH-Diaphorasemedium unter Zugabe von 1 M Harnstoff inkubiert. In 10 µm dicken Schnitten ist Formazan vorwiegend im Sarkolembereich (Pfeile) zu finden sowie in dicht aufeinanderfolgenden regulären Costameren (Pfeilspitzen), die manchmal durch Intercostameren verbunden sind. In 60 µm dicken Schnitten ist die Formazanproduktion auf die Faseroberfläche (Pfeile) beschränkt, insbesondere in Form ringförmiger irregulärer Costameren (Pfeilspitzen), welche die gesamte Faseroberfläche umgeben. (B) und (D) zeigen vergrößerte Ausschnitte von (A) bzw. (C). Balken = 25 µm (A, C) bzw. 10 µm (B, D).

parallel (manchmal auch wellenförmig) zueinander entlang der Faseroberfläche verliefen. Die Abstände zwischen diesen Linien waren regelmäßig und betragen bei bildanalytischer Messung durchschnittlich $1\ \mu\text{m}$, ein Abstand, der für Costameren typisch ist. Manche der Costameren waren untereinander durch kurze, längsverlaufende Linien, sogenannte Intercostameren verbunden, wodurch in solchen Regionen eine gitterartige Struktur der Formazanablagerungen zu beobachten war (Abb. 8B).

Bei Verwendung von $60\ \mu\text{m}$ dicken Kryostatschnitten verhielt sich die NOS-1-Diaphorase dagegen anders: Das Formazan war vorwiegend in ringförmigen Strukturen zu sehen, die meist den gesamten Faserumfang umgaben (Abb. 8C). Im Detail stellt eine solche Costamere einen Doppelring dar, der aus zwei parallel verlaufenden, eng benachbarten Einzelringen besteht, die durch einen Formazan-freien Bereich voneinander getrennt sind (Abb. 8D).

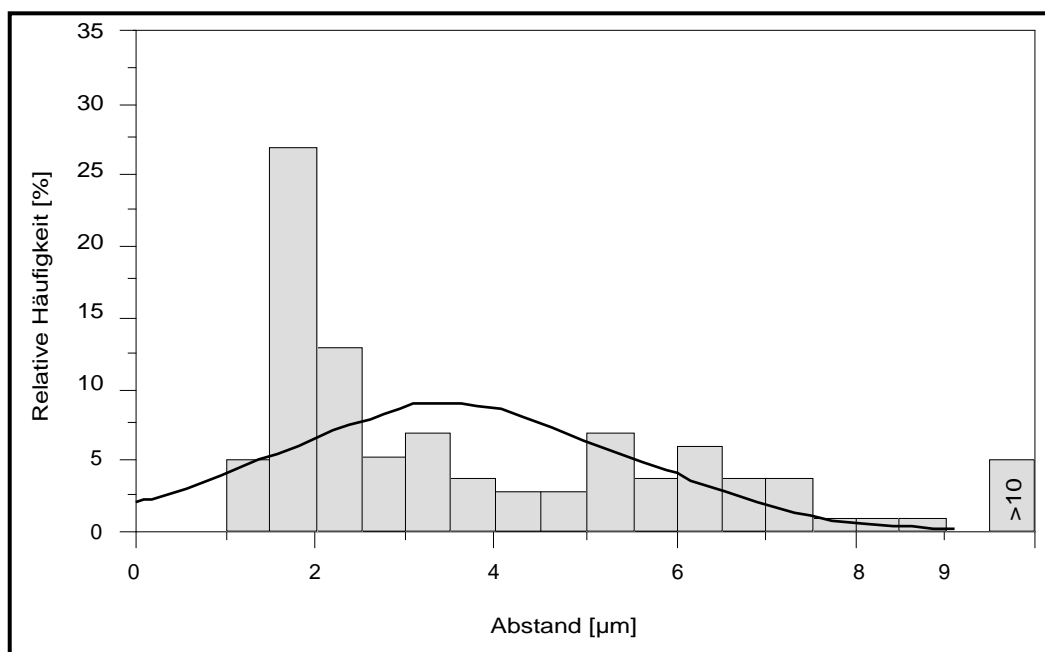


Abb. 9: Häufigkeitsverteilung der Abstände zwischen benachbarten costamerischen Ringen in $60\ \mu\text{m}$ dicken Schnitten. Nach Durchführung der NOS-1-Diaphorase-Reaktion wurden die Abstände benachbarter Formazanringe zueinander bildanalytisch gemessen. Das Maximum bei ungefähr $2\ \mu\text{m}$ entspricht dem regelmäßigen Abstand zwischen den Einzelringen der irregulären Costameren. Abstände größer als $2\ \mu\text{m}$ treten dagegen nahezu gleich häufig auf. Es gibt also keinen statistisch bevorzugten Wert für die Distanz zwischen zwei benachbarten irregulären Costameren. Abstände größer als $10\ \mu\text{m}$ wurden zusammengefasst. Die eingezeichnete Glockenkurve zeigt die berechnete Normalverteilung.

Der Abstand der beiden Einzelringe zueinander war in hohem Maße regelmäßig und betrug bei bildanalytischer Messung ungefähr $2\ \mu\text{m}$ (Abb. 9). Die Abstände zwischen zwei jeweils benachbarten Doppelringen wiesen dagegen keinen statistisch bevorzugten Wert auf. Es existierten in den Kryostatschnitten sowohl Bereiche mit lediglich vereinzelt auftretenden Doppelringen, die große Abständen zueinander besaßen, als auch Abschnitte mit zahlreichen, auf engstem Raum zusammengedrängten Doppelringen. Diese starke Ungleichverteilung variierte zudem noch zwischen direkt benachbarten Skelettmuskelfasern. Deshalb ergab die Auswertung der bildanalytisch bestimmten Abstände zwischen den Doppelringen keinen statistisch bevorzugten Wert, sondern eine annähernde Gleichverteilung (Abb. 9). Wegen ihrer unregelmäßigen Abstände zueinander wurde für diese Doppelringe die Bezeichnung "irreguläre Costameren" gewählt.

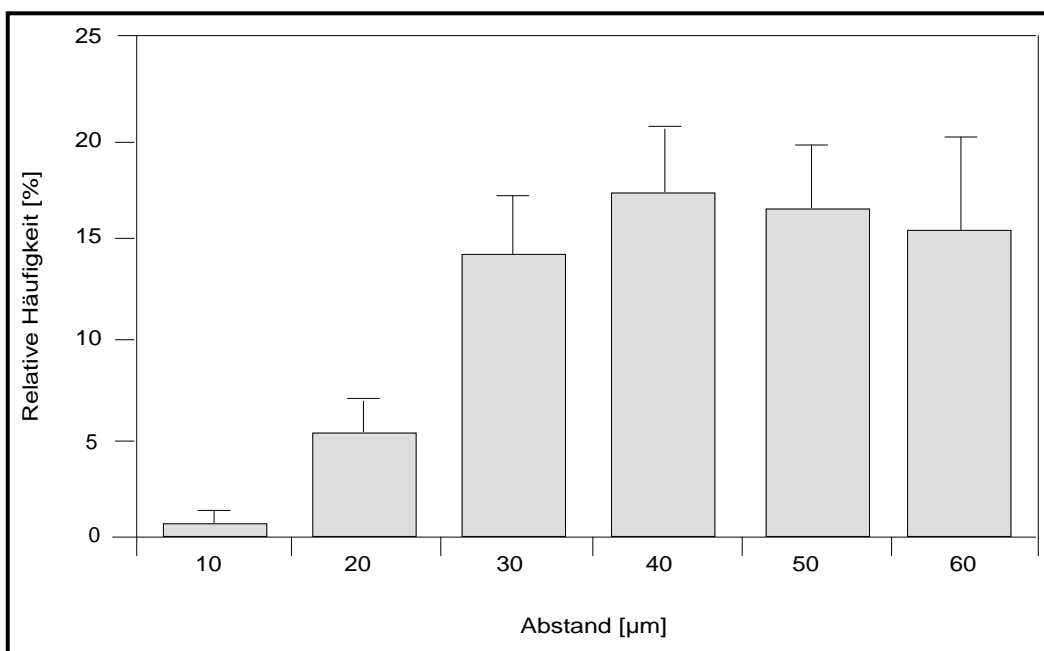


Abb. 10: Relative Häufigkeit des Auftretens irregulärer Costameren in Abhängigkeit von der Dicke der Kryostatschnitte. 10, 20, 30, 40, 50 und 60 μm dicke Schnitte wurden nach Durchführung der NOS-1-Diaphorasereaktion lichtmikroskopisch auf die Häufigkeit des Auftretens von irregulären Costameren hin untersucht. An 9 Schnitten von 3 Tieren wurden 100 Skelettmuskelfasern zufällig ausgewählt und das Verhältnis zwischen Fasern mit Costameren und Gesamtfaserzahl gegen die Schnittdicke aufgetragen. Irreguläre Costameren sind im EDL der Ratte bevorzugt in dicken Kryostatschnitten zu finden.

Um nun die strukturelle Beziehung zwischen regulären Costameren in 10 µm dicken Kryostatschnitten und irregulären Costameren in 60 µm dicken Schnitten zu untersuchen, wurden zusätzlich 20-50 µm dicke Kryostatschnitte vom selben Gewebsblock ausgewertet. Irreguläre Costameren kamen häufig bei Schnittdicken über 30 µm vor (Abb. 10). In 10 oder 20 µm dicken Schnitten fanden sich hingegen nur wenige irreguläre Costameren (oft mit unklarer Darstellung und erst nach intensiver Suche auffindbar), während reguläre Costameren mit ca. 1 µm Abstand zueinander fast überall sichtbar waren. In Kryostatschnitten mittlerer Dicke war eine ähnliche Anzahl von irregulären und regulären Costameren nachweisbar. Motorische Endplatten und Regionen von Muskel-Sehnen-Verbindungen waren frei von beiden Typen von Costameren (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.2.1.2. Charakterisierung durch NOS-1-Immunhistochemie

Die immunhistochemische Darstellung der NOS-1 an 60 µm dicken Kryostatschnitten zeigte eine mit der NOS-1-Diaphorase identische Darstellung: Ringe umgaben die Faseroberfläche, die dadurch eingeschnürt wirkte.

Die immunhistochemische Analyse anderer Moleküle ergab, daß Proteine, die mit dem Sarkolemm assoziiert sind, ebenfalls in irregulären Costameren vorkommen (Abb. 11). So war die Immunfluoreszenz, die mit Antikörpern gegen Proteine des Dystrophin-Protein-Komplexes erzielt wurde, mit der Immunfluoreszenz der NOS-1 kolokalisiert. Dabei verhielten sich integrale (α -Sarcoglycan; Abb. 11B), partiell integrale (Caveolin-3, Abb. 11D) oder peripher subsarkolemmale (Dystrophin; Abb. 11F) Proteine prinzipiell gleich.

Im Gegensatz dazu konnte bei Inkubationen mit Antikörpern gegen intrafibrär lokalisierte Proteine wie α -Actinin und Desmin oder gegen den Marker für das sarkoplasmatische Retikulum, SERCA-1, keine Organisation in Costameren und somit auch keine Kolokalisation mit der NOS-1 beobachtet werden. Darüberhinaus ließen Immuninkubationen für diese Proteine fluoreszenzfreie Bereiche mit einer Breite von ungefähr 2 µm erkennen, die von NOS-1-positiven irregulären Costameren begrenzt wurden (Abb. 12).

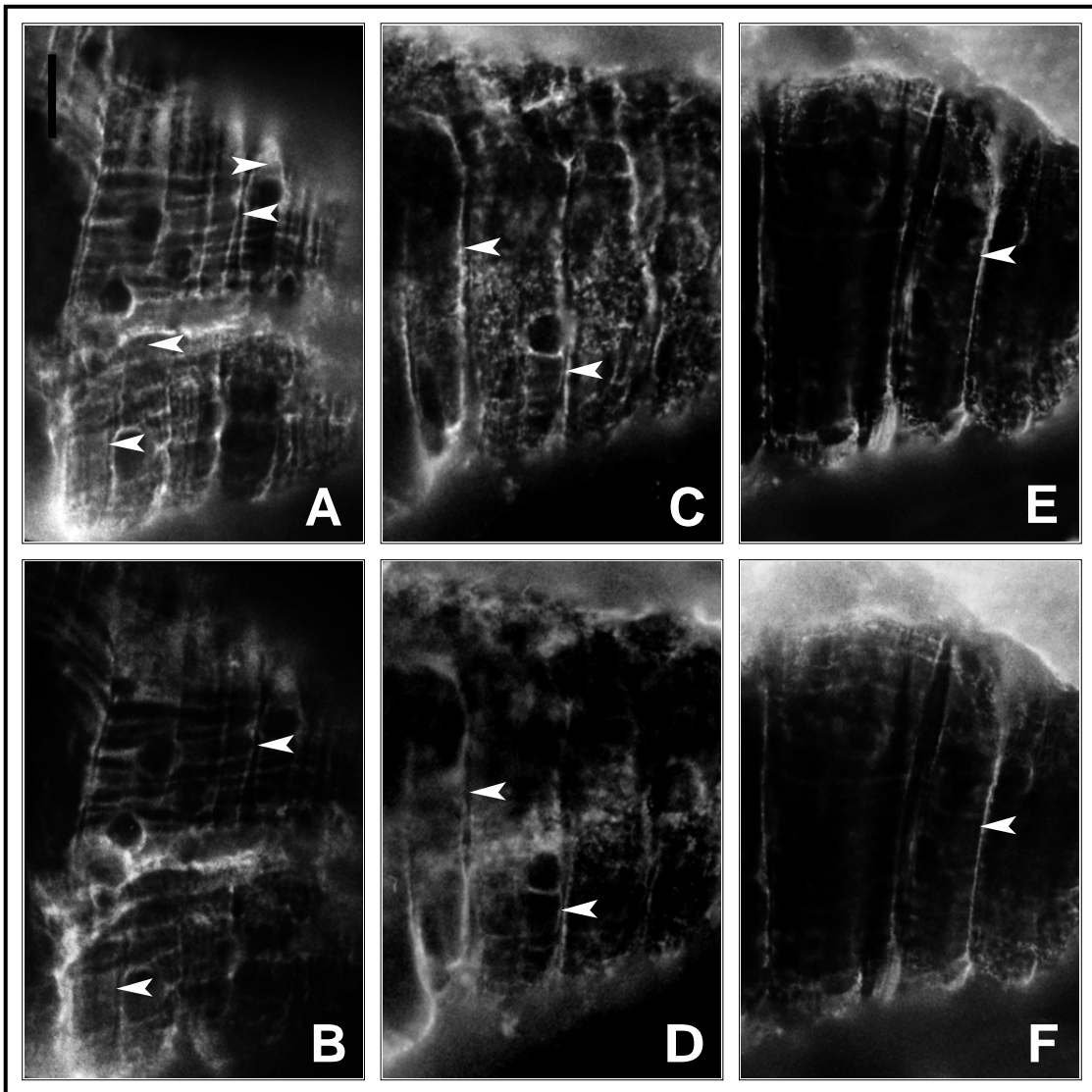


Abb. 11: Mitglieder des erweiterten Dystrophinkomplexes kommen in irregulären Costameren (Pfeilspitzen) mit NOS-1 gemeinsam vor. An 60 μm dicken Kryostat-schnitten des EDL erwachsener Ratten wurden Doppelinkubationen zum einen mit polyklonalen Antikörpern gegen NOS-1 (A, C, E) sowie zum anderen mit monoklonalen Antikörpern gegen α -Sarkoglycan (B), Dystrophin (DYS-2; D) und Caveolin-3 (F) durchgeführt. Gebundene Antikörper gegen NOS-1 wurden mit Cy-3-gekoppelten Sekundärantikörpern (anti-rabbit), die Antikörper gegen die anderen Moleküle mit Cy-2 gekoppelten Sekundärantikörpern (anti-mouse) visualisiert. Balken = 10 μm .

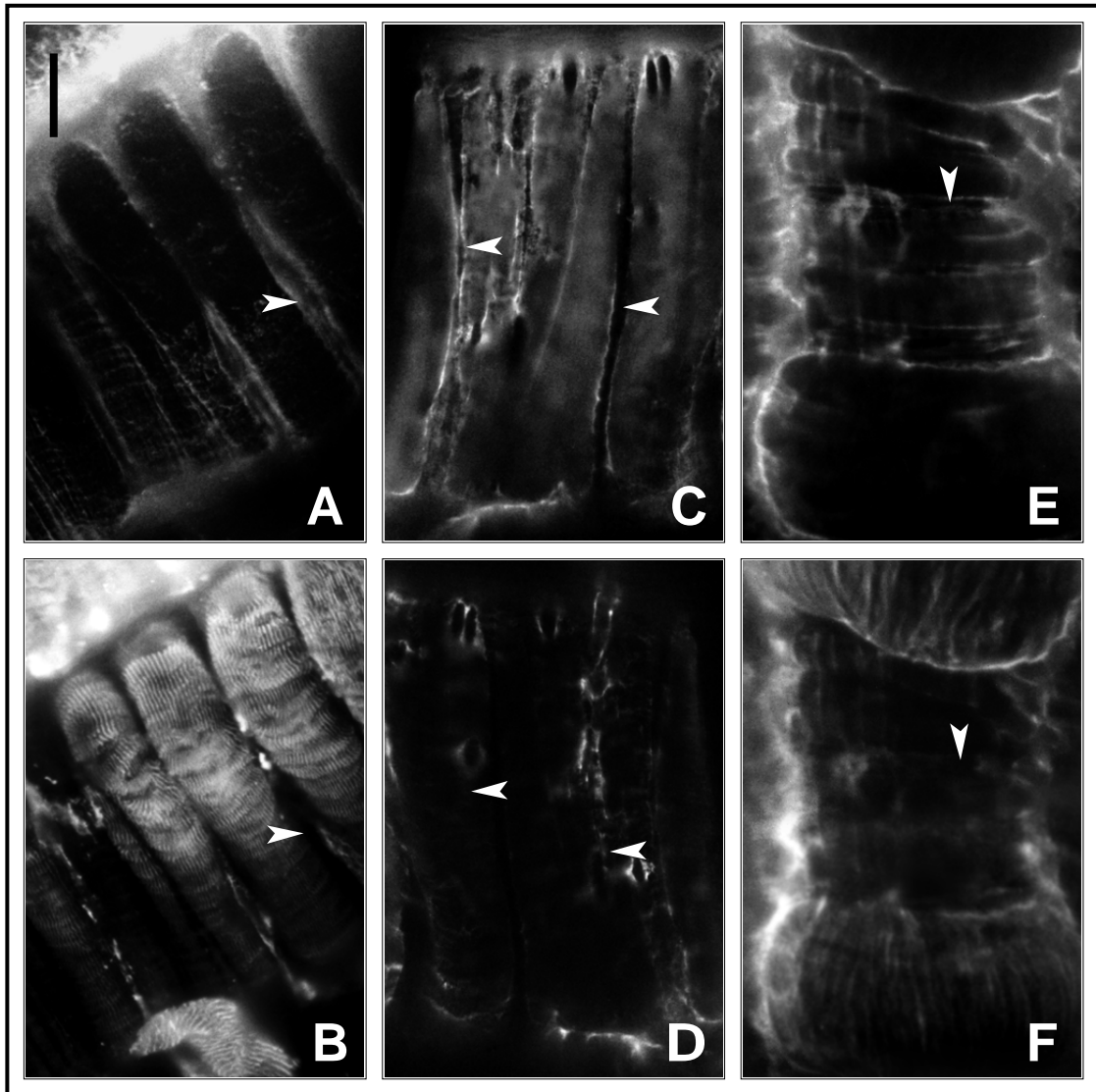


Abb. 12: Moleküle, die nicht mit dem Sarkolemm assoziiert vorkommen, treten nicht in irregulären Costameren (Pfeilspitzen) auf. An 60 μm dicken Kryostat-schnitten des EDL adulter Ratten wurden Doppelinkubationen zum einen mit polyklonalen Antikörpern gegen NOS-1 (A, C, E) sowie zum anderen mit monoklonalen Antikörpern gegen α -Actinin (B), Desmin (D) und SERCA-1 (F) durchgeführt. Die Visualisierung gebundener Primärantikörper erfolgte wie in Abb. 11 beschrieben. Balken = 10 μm .

3.2.2. Reguläre und irreguläre Costameren in gezupften Fasern

Nach Durchführung der NOS-1-Diaphorasereaktion an gezupften Skelettmuskelfasern des EDL der Ratte traten ebenfalls Formazan-positive Ringe auf (Abb. 13A), die denen in dicken Kryostatschnitten ähnelten, und die als Serien parallel verlaufender Doppellinien mit unregelmäßigen Abständen zueinander zu beobachten waren.

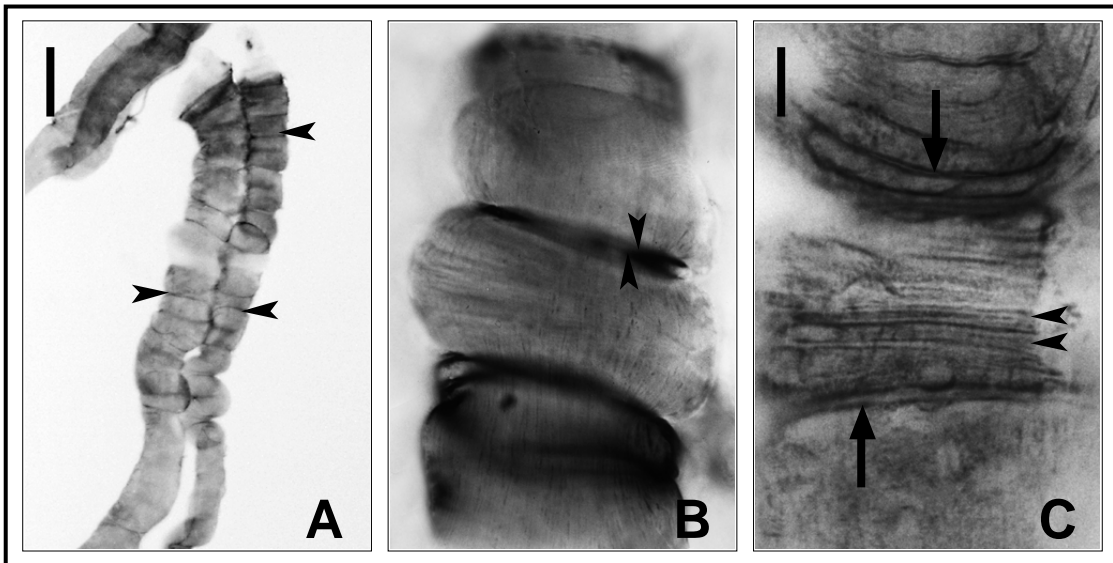


Abb. 13: Gezupfte Skelettmuskelfasern zeigen ebenfalls irreguläre Costameren. Der EDL der Ratte wurde von Hand in einzelne Fasern (bzw. kleine Faserbündel) zerzupft und danach mit NOS-1-Diaphorasemedium inkubiert. A: Ein Bündel isolierter Skelettmuskelfasern weist irreguläre formazanpositive Costameren auf (Pfeilspitzen), ähnlich zu den in dicken Kryostatschnitten gefundenen. B: Irreguläre Costameren (Pfeilspitzen) scheinen die Fasern einzuschnüren, währenddessen Costameren-freie Abschnitte der Fasern ballonartig aufgebläht sind. C: Reguläre (Pfeilspitzen) und irreguläre Costameren (Pfeile) treten gemeinsam in gezupften Fasern auf.

Balken = 50 μm (A) bzw. 10 μm (B, C).

Im Detail zeigte sich, daß die Sarkolemm-Abschnitte zwischen zwei irregulären Costameren ballonartig aufgebläht erschienen, während im Bereich der Costameren die Skelettmuskelfasern eingeschnürt waren (Abb. 13B). Das gemeinsame Auftreten regulärer und irregulärer Costameren in manchen Fasern erlaubte den direkten Vergleich beider Typen von Costameren (Abb. 13C): Irreguläre Costameren waren dicker als reguläre und wiesen aufgrund des Fehlens von Intercostameren auch nicht jenes gitterartige Bild auf, welches typisch für Regionen mit regulären Costameren ist.

3.2.3. Funktionelle Analyse irregulärer Costameren

Die Auswertung von 60 µm dicken Kryostatschnitten des EDL der Ratte nach NOS-1-Diaphorase-reaktion deutete an, daß die irregulären Costameren mit Invaginationen des Sarkolemmes in Zusammenhang stehen (Abb. 14), die die Faser mehr oder minder einschnüren. Auch nach Immuninkubation mit Antikörpern gegen NOS-1 fanden sich ähnliche Invaginationen (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Beobachtung führte zu der Annahme, daß die Häufigkeit irregulärer

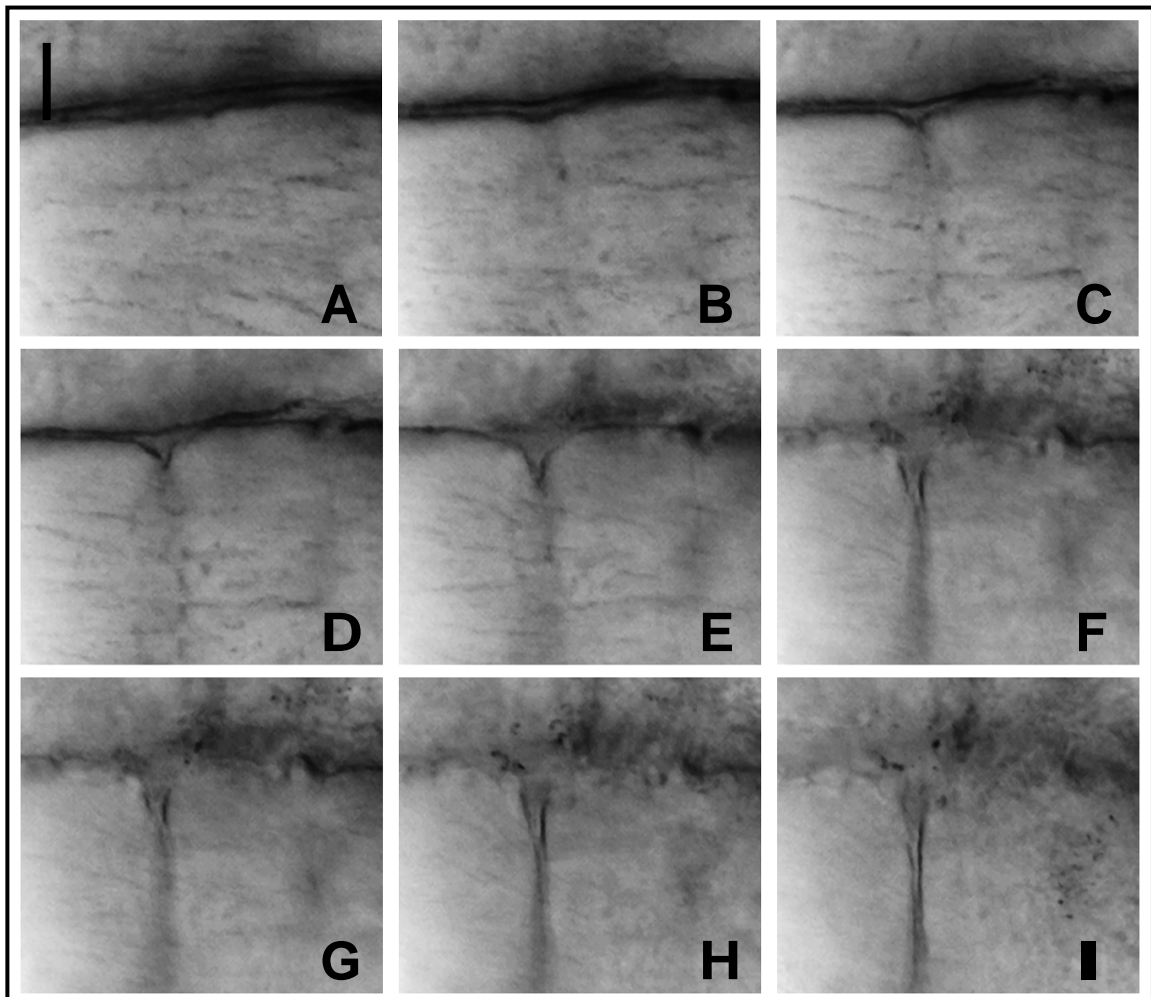


Abb. 14: Irreguläre Costameren repräsentieren Invaginationen des Sarkolemmes. An 60 µm dicken Kryostatschnitten des EDL der Ratte wurde die NOS-1 mittels Diaphorase-reaktion dargestellt. Die Einzelbilder (A)-(I) entstanden durch Veränderung der Fokusebene des Lichtmikroskopes in Schritten von 3 µm.

Ein kurzer Film der Folgebilder kann im Quicktime-Format unter folgender Internet-adresse heruntergeladen werden:

<http://www.medizin.fu-berlin.de/anatomie/gossrau/GeritPromo/promotion.html>.

Balken = 10 µm.

Costameren vom Kontraktionszustand des untersuchten Muskels beeinflusst wird. Um dies zu überprüfen, wurden drei Proben von EDL der Ratte untersucht, die sich durch ihren experimentell herbeigeführten Kontraktionszustand unterschieden. Durch elektrische Stimulation des EDL wurden maximal kontrahierte Muskelfasern erzeugt, die einen bildanalytisch gemessenen Sarkomerabstand (als Maß für die Kontraktionstärke) von $1,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$ besaßen. Mechanisch gestreckte Muskelproben wiesen einen Sarkomerabstand von $3,7 \pm 0,4 \mu\text{m}$ auf, während die zur Kontrolle nicht manipulierten Proben des EDL einen Sarkomerabstand von $2,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$ zeigten. Die Anzahl irregulärer Costameren war in maximal kontrahierten Skelettmuskelfasern gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht, währenddessen in gestreckten Fasern die Zahl der irregulären Costameren signifikant verringert war (U-Test nach Mann-Whitney; Abb. 15).

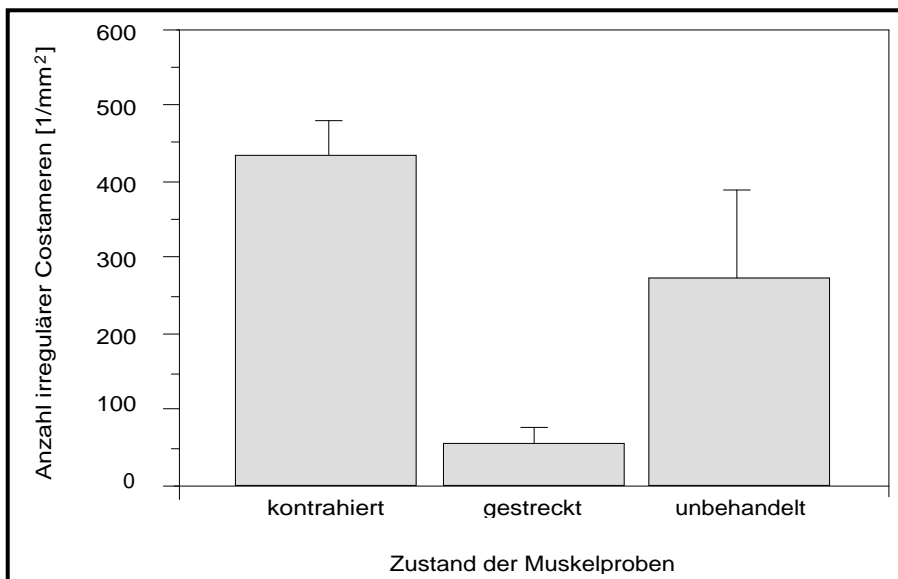


Abb. 15: Anzahl irregulärer Costameren in Abhängigkeit vom Kontraktionszustand des Muskels. Der EDL erwachsener Ratten wurde entweder unter tetanischer Kontraktion infolge elektrischer Stimulation, unter mechanischer Streckung oder ohne jede Manipulation in mit flüssigem Stickstoff gekühlten Methylbutan eingefroren. Danach wurden $60 \mu\text{m}$ dicke Kryostatschnitte mit NOS-1-Diaphorasemedium inkubiert. Die Häufigkeit des Auftretens irregulärer Costameren (ausgedrückt als Anzahl pro Fläche) wurde mittels zweifacher Auszählung von 5 Schnitten pro Muskel von 3 Tieren bestimmt (Anzahl pro Manipulationsgruppe: $n=30$).

3.3. NOS-1 in verschiedenen Skelettmuskelfasertypen

3.3.1. Überprüfung des bildanalytischen Verfahrens zur Messung von Enzymaktivitäten

3.3.1.1. Vergleich der Messungen mit und ohne Berechnung der Fuzzy-Maske

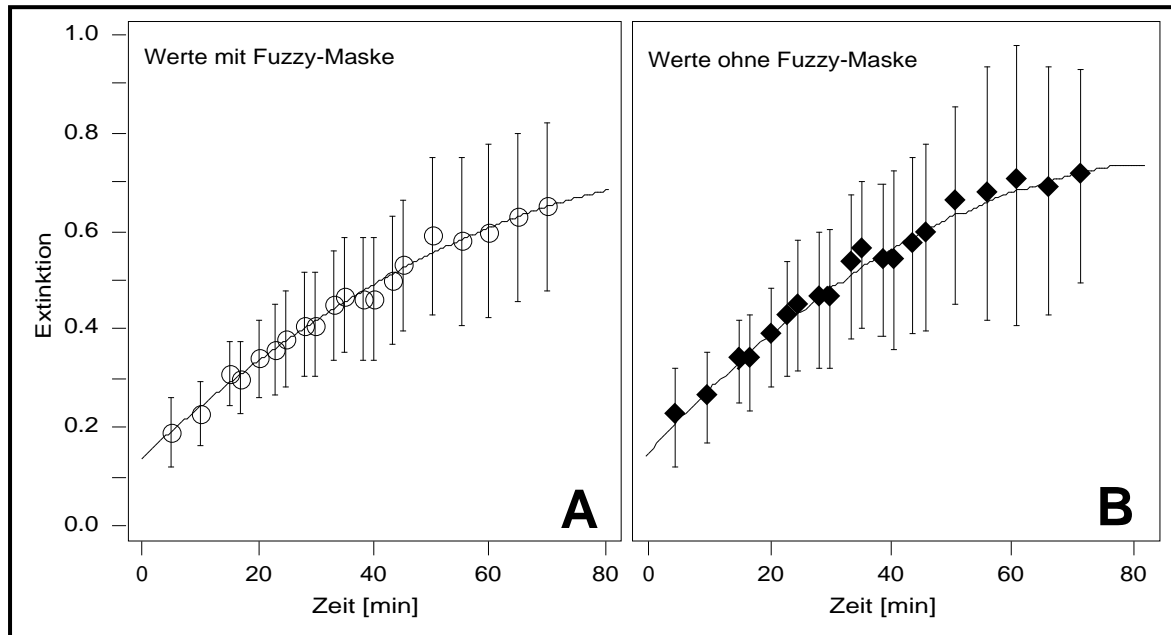


Abb. 16: Meßwerte für die Extinktion während der NOS-1-Diaphorasereaktion einer Skelettmuskelfaser der Zunge. Im Berechnungsverfahren für (A) wurden die Grauwerte nach Erstellung der Fuzzy-Maske S_f bestimmt, in (B) erfolgte die Grauwertbestimmung dagegen lediglich mit der Maske S für die Formazanmaxima (siehe auch Abb. 1). Dabei sind die Standardabweichungen in (A) gegenüber (B) um ca. ein Drittel vermindert. Die anderen Parameter der Anpassungskurve, insbesondere v_{init} , weichen nur geringfügig voneinander ab.

Für die Bildanalyse wurde aufgrund theoretischer Überlegungen ein auf dem mathematischen Modell der Fuzzy-Mengen basierendes Verfahren entwickelt, das die unscharfe mikroskopische Darstellung subzellulärer Strukturen berücksichtigt und sich damit von herkömmlichen bildanalytischen Vorgehensweisen unterscheidet, bei denen alle Pixel des interessierenden Bereiches (hier des Sarkolemmes) gleichwertig zur Bestimmung der Grauwerte herangezogen werden. Der Vergleich zwischen dem in dieser Arbeit entwickelten Verfahren (Abb. 16A) und bisherigen bildanalytischen Meßmethoden (Abb. 16B) belegt, daß durch Erstellung der Fuzzy-Maske (siehe auch Abb. 1) die Streuung der Meßwerte vermin-

dert werden konnte. Diese Vorgehensweise erhöht die Validität der aus den Koeffizienten der Anpassungskurve ermittelten katalytischen Parameter, insbesondere von v_{init} .

3.3.1.2. Meßwiederholungsstudie

Um die Validität des Meßverfahrens und des Experimentaufbaues der Bildanalyse allgemein zu testen, wurde eine Meßwiederholungsstudie in Form einer Varianzanalyse für bildanalytische Messungen der Aktivität der NOS-1-Diaphorase durchgeführt, deren Resultate in Tabelle 11 zusammengestellt sind. Insbesondere ergaben sich für die betrachteten Gruppen (Schnitte, Tiere sowie Tiere · Schnitte) p-Werte, die deutlich über dem vorher festgelegten Signifikanzniveau von $\alpha=0,1$ lagen. Offensichtlich gibt es keine wesentlichen Unterschiede zwischen einzelnen Tieren und den Inkubationen verschiedener Schnitte des gleichen Tieres.

	Fg	Quadratsumme	Mittleres Quadrat	p-Wert
Schnitte	2	3,248E-6	1,624E-6	0,1891
Tiere	1	5,824E-7	5,824E-7	0,1601
Tiere · Schnitte	2	9,807E-7	4,904E-7	0,1969

Tabelle 11: Auflistung der Parameter der Varianzanalyse für die Meßwiederholungsstudie
Fg ... Freiheitsgrad.

3.3.2. Expression der NOS-1 in verschiedenen Skelettmuskeln

3.3.2.1. Quantitative Analyse mittels Western-Blot

Die Konzentration der NOS-1 in verschiedenen Skelettmuskeln der Ratte wurde durch densitometrische Auswertung von Immunblots ermittelt. Hierzu wurden gleiche Proteinmengen von Homogenaten von sieben Muskeln (Caput medialis des M. gastrocnemius, mGC; M. tibialis anterior, TA; M. soleus, M. extensor digitorum longus, EDL; Zunge, M. cremaster, M. gluteus maximus, GM) sowie des Cerebellums als Positivkontrolle durch SDS-PAGE/Immunblot mit polyklonalen Antikörpern gegen NOS-1 analysiert. Wie in Abb. 17A dargestellt, kommt die

NOS-1 in allen untersuchten Muskeln und im Cerebellum als Doppelbande bei ungefähr 160 und 140 kDa vor. In manchen Muskeln (TA, Zunge, M. cremaster und GM) war die obere Bande reproduzierbar stärker als die untere; in anderen Muskeln (mGC, M. soleus, EDL) zeigten sich keine Unterschiede.

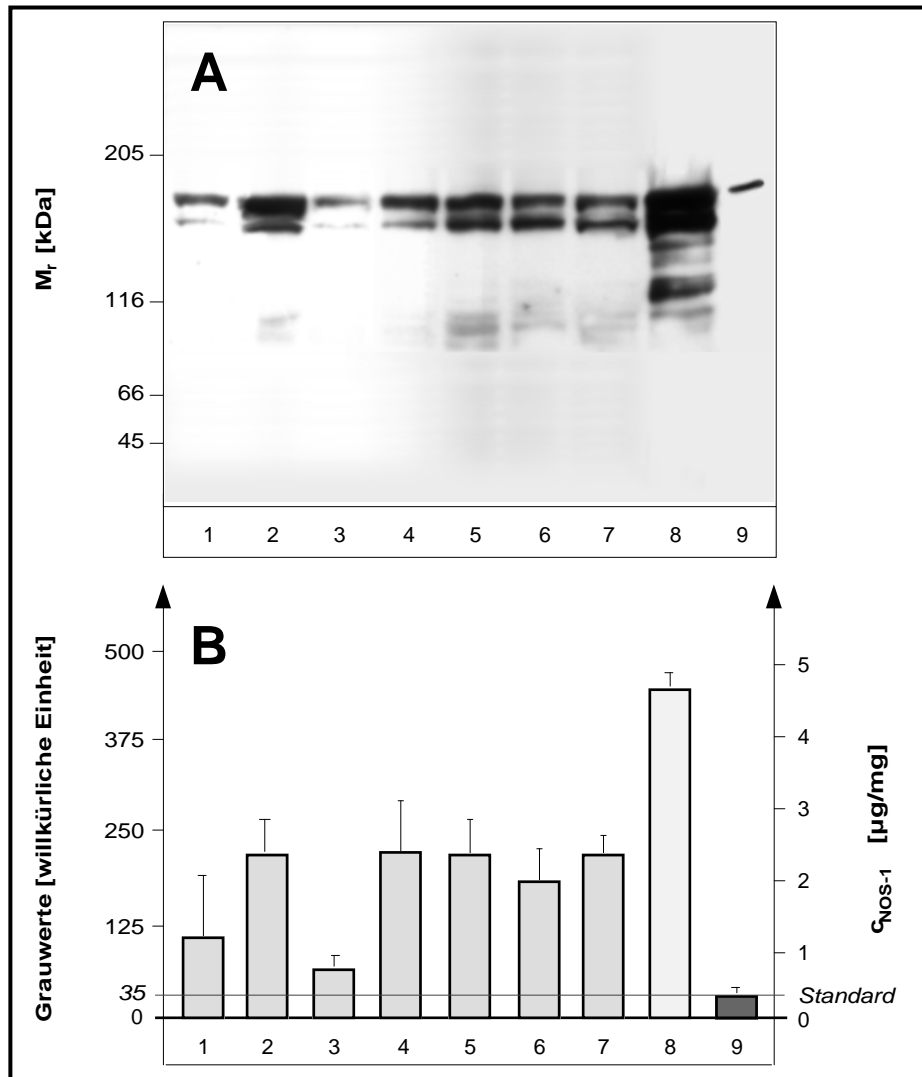


Abb. 17: Bestimmung der Konzentration der NOS-1 in verschiedenen Skelettmuskeln der Ratte. A: Gleiche Proteinmengen (50 µg) von Homogenaten der Skelettmuskeln wurden elektrophoretisch auf einem 7,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Danach wurde ein Immunblot mit polyklonalen Antikörpern gegen NOS-1 durchgeführt. 1: Caput medialis des M. gastrocnemius, 2: M. tibialis anterior, 3: M. soleus, 4: M. extensor digitorum longus, 5: Zunge, 6: M. cremaster, 7: M. glutaeus maximus, 8: Cerebellum, 9: Standard aus rekombinanter NOS-1 der Ratte (16 ng). B: Die immunreaktiven Banden der NOS-1 wurden densitometrisch quantifiziert und in Relation zum NOS-1-Standard gesetzt, um die Konzentration der NOS-1 in jedem Muskel zu erhalten. n=3.

In den Immunblots wurde jeweils ein Aliquot des rekombinanten NOS-1-Standards (welcher nur eine Bande bei 160 kDa ergab) mit bekannter Konzentration eingesetzt. Anschließend wurde eine densitometrische Auswertung zur Bestimmung der Konzentration der NOS-1 in jedem der untersuchten Skelettmuskeln durchgeführt (Abb. 17B). Diese lag zwischen 0,8 und 2,5 µg/mg mit den höchsten Werten für TA, EDL, Zunge und GM, niedrigeren Werten für M. cremaster und den niedrigsten für mGC und M. soleus. Das Cerebellum enthielt durchschnittlich 4,8 µg/mg an NOS-1.

Die Coomassie-Färbung von parallel laufenden Gelen derselben Proben zeigte ähnliche qualitative und quantitative Proteinverteilungsmuster für alle Muskelproben mit Ausnahme der Zunge, in der die sonst prominenten Myosin- und Actin-Banden (180 bzw. 45 kDa) vermindert waren. Zusätzlich trat eine Vielzahl kleinerer Banden auf, die fast gleichmäßig über den Auftrennungsbereich verteilt waren (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.3.2.2. Qualitativ-histochemische NOS-1-Faserverteilung

Teile aller Muskeln (bzw. ihre kontralaterale Gegenstücke), die zur Immunblot-Analyse verwendet wurden, kamen außerdem für enzym- (NOS-1-Diaphorase) und immunhistochemische Untersuchungen zum Einsatz (NOS-1, MHCs und MHCf). In allen Muskeln fand sich eine NOS-1-Diaphoraseaktivität und NOS-1-Immunreaktivität ausschließlich im sarkolemmalen Bereich (Abb. 18A, B). Alle Skelettmuskelfasern waren entweder für MHCs oder für MHCf positiv (Abb. 18C, D). Dies zeigt, daß alle Skelettmuskelfasern der erwachsenen Ratte mit dieser Auswahl an anti-MHC-Antikörpern erfaßt werden. Da für die Untersuchungen Folgeschnitte verwendet wurden, konnten auf Einzelfaserebene die Ergebnisse des histochemischen Nachweises der NOS-1-Diaphorase mit der MHC-basierten Fasertypisierung kombiniert werden, was zu dem Ergebnis führte, daß NOS-1-Protein und NOS-1-Aktivität deutlich stärker in schnellen (MHCf-positiven) Skelettmuskelfasern ausgeprägt sind (Abb. 18).

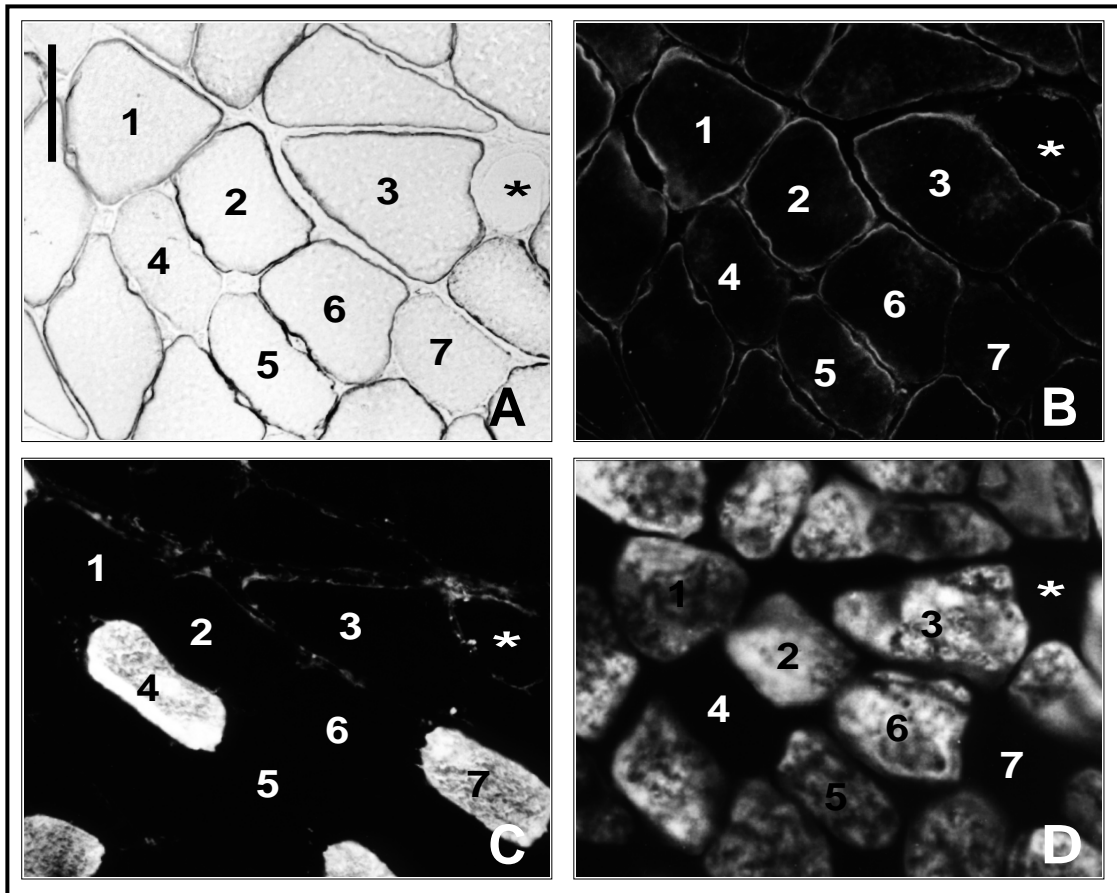


Abb. 18: An Folgeschnitten des *M. cremaster* der Ratte wurden enzymhistochemisch die NOS-1-Diaphorase (A) sowie immunhistochemisch NOS-1 (B), MHCs (C) und MHCf (D) nachgewiesen. Der Stern in allen Einzelbildern markiert ein Blutgefäß. Die Zahlen 1-7 kennzeichnen in den Einzelbildern dieselben Skelettmuskelfasern. MHCs-positive Fasern (4, 7) enthalten deutlich weniger von der NOS-1 produziertes Formazan (A) und NOS-1-spezifische Immunreaktivität (B) als MHCf-positive Fasern (1, 2, 3-6). Balken = 40 μm .

3.3.2.3. Quantifizierung von NOS-1-Protein und NOS-1-Diaphoraseaktivität

Der Anteil von schnellen (MHCf-positiven) Skelettmuskelfasern an der Gesamtfaserzahl sowie die Höhe der NOS-1-Diaphoraseaktivität in jedem der untersuchten Muskeln wurden quantitativ ausgewertet. Der Anteil MHCf-positiver Fasern variierte deutlich zwischen den einzelnen Muskeln (Abb. 19A), der in Zunge, GM, TA und EDL mit 85-100% sehr hoch, im mGC sowie *M. cremaster* mittelhoch und *M. soleus* nur gering war. Die Menge produzierten Formazans

aus den Kryostatschnitten als Maß für die NOS-1-Aktivität (Abb. 19B) der Muskeln spiegelt im wesentlichen die Ergebnisse der Immunblots wider (siehe Abb. 17). Lediglich in M. soleus und GM war etwas mehr bzw. etwas weniger Formazan zu finden als nach den Ergebnissen der Immunblots zu erwarten gewesen wäre.

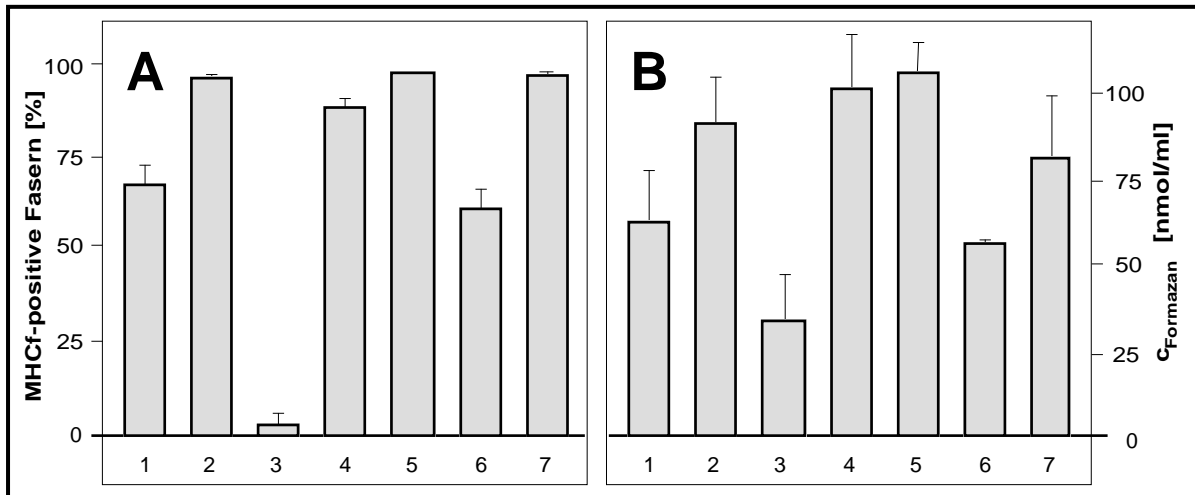


Abb. 19: Bestimmung des prozentualen Anteils von schnellen (MHCf-positiven) Skelettmuskelfasern an der Gesamtfaserzahl sowie der Menge des von der NOS-1-Diaphorase produzierten Formazans in verschiedenen Skelettmuskelfasern der Ratte. A: Die schnellen Skelettmuskelfasern wurden durch MHCf-Immunhistochemie dargestellt und ihre Anzahl zur Gesamtfaserzahl ins Verhältnis gesetzt. B: Nach Durchführung der NOS-1-Diaphorasereaktion wurden die Schnitte mit Proteasen behandelt, um eine Dispersion des entstandenen Formazan zu erzielen. Die photometrische Bestimmung der Formazanmenge und der Proteinkonzentration ermöglichte die Berechnung der Aktivität der NOS-1-Diaphorase für jeden Muskel: 1: Caput medialis des M. gastrocnemius, 2: M. tibialis anterior, 3: M. soleus, 4: M. extensor digitorum longus, 5: Zunge, 6: M. cremaster, 7: M. glutaeus maximus.

Im nächsten Schritt wurde eine Korrelationsanalyse zwischen dem Gehalt an NOS-1 in Homogenaten (bestimmt durch Immunblot) sowie der Fasertypkomposition (bestimmt durch Immunhistochemie) der entsprechenden Muskeln mit dem Verfahren nach Kendall durchgeführt (Abb. 20): Mit steigendem prozentualen Anteil von schnellen (MHCf-positiven) Fasern an der Gesamtfaserzahl im Skelettmuskel stieg auch die durchschnittliche Konzentration der NOS-1 in diesen Muskeln an. Allerdings ist die Stärke des Zusammenhangs zwischen diesen zwei Merkmalen mit $\tau = 0,46$ nicht sehr hoch ungeachtet der statistischen Signifikanz ($p < 0,05$).

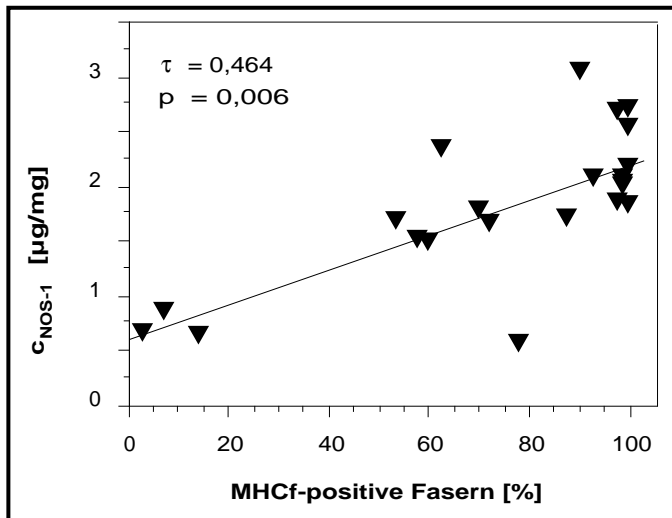


Abb. 20: Korrelation zwischen dem Gehalt an NOS-1 und dem Anteil von schnellen (MHCf-positiven) Skelettmuskelfasern an der Gesamtfaserzahl in Skelettmuskeln der Ratte. Die mittels Immunblot (siehe Abb. 17) bestimmte Konzentration der NOS-1 im Homogenat verschiedener Skelettmuskeln der Ratte wurde gegen den Anteil von schnellen Muskelfasern (siehe Abb. 19A) in denselben Muskeln aufgetragen. Die Darstellung setzt sich aus Werten zusammen, die von den sieben untersuchten Muskeln aus drei Tieren stammen. n=21.

τ ... Korrelationskoeffizient, berechnet mittels Rangkorrelationstest nach Kendall.

3.3.2.4. Enzymkinetische Parameter und NOS-1-Verteilung in verschiedenen Fasertypen

Grund für diese Untersuchung war, daß einerseits vor allem Zunge und EDL im Immunblot fast gleiche NOS-1-Konzentrationen und ähnliche Fasertypzusammensetzungen aufweisen, was auf ähnliche katalytische Eigenschaften der NOS-1-Diaphorase hindeutet. Andererseits wird bei semiquantitativer lichtmikroskopischer Beurteilung im Sarkolemm von Muskelfasern der Zunge deutlich mehr Formazan produziert als unter vergleichbaren Bedingungen im EDL (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen zur Aktivität der NOS-1-Diaphorase auf die Ebene von Einzelfasern ausgedehnt:

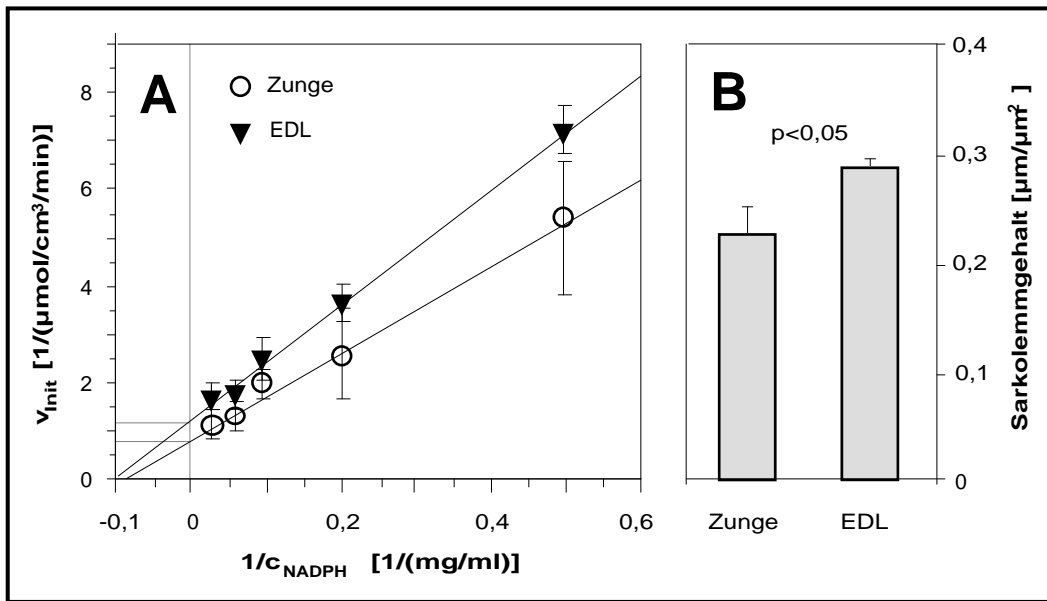


Abb. 21: Bestimmung von v_{max} und K_m für NADPH der NOS-1-Diaphorase in Einzel-fasern (A) sowie des Sarkolemmgehaltes, ausgedrückt in Längeneinheiten pro Schnittfläche, (B) von Zunge und M. extensor digitorum longus (EDL) der Ratte. A: Folgeschnitte von Zunge und EDL wurden für NOS-1-Diaphorase mit verschiedenen Konzentrationen an NADPH inkubiert. In jeder von 100 Skelettmuskelfasern wurde mittels Bildanalyse die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bestimmt, gegen die NADPH-Konzentration als Reziprokwerte aufgetragen und daraus v_{max} und K_m der NOS-1-Diaphorase ermittelt. B: Der Umfang von 100 nach dem Zufallsprinzip ausgewählten Fasern in Kryostatschnitten von Zunge und EDL wurde bildanalytisch gemessen und die Meßdaten auf die Gesamtzahl der Fasern pro Fläche des Muskelgesamtquerschnittes bezogen.

Dazu wurden mit bildanalytischer Messung im Sarkolembereich von 100 Skelettmuskelfasern der Zunge bzw. des EDL die initiale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{init}) der NOS-1-Diaphorase bei fünf verschiedenen Konzentrationen von NADPH ermittelt. Die Berechnung von v_{max} und K_m für NADPH (Abb. 21A) ergab, daß v_{max} der NOS-1-Diaphorase in der Zunge höher als beim EDL war (1,3 bzw. 0,8 $\mu\text{mol}/\text{cm}^3/\text{min}$), die K_m war hingegen in beiden Muskeln gleich (ca. 10 $\text{mg}/\text{ml} = 13 \text{ mM}$). Dies läßt vermuten, daß die Skelettmuskelfasern der Zunge in ihrem Sarkolembereich einen höheren Gehalt an NOS-1 besitzen als die des EDL. Weiterhin ist der durchschnittliche Sarkolemmgehalt aller Fasern im Querschnitt der Zunge geringer als beim EDL (Abb. 21B). Bezogen auf den Gesamtmuskel wird die gegenüber dem EDL höhere Konzentration von NOS-1-Molekülen im Sarkolemm der Zunge durch deren geringeren Gesamtgehalt an Sarkolemm kompensiert und führt *in toto* zu gleichen Werten der NOS-1-Konzentration im Immunblot bzw. zu gleichen Werten der NOS-1-Diaphoraseaktivität (gemessen durch die Men-

ge des in Kryostatschnitten gebildeten Formazans). Dies bedeutet, daß allein die bildanalytische Messung Informationen über das tatsächliche kinetische Verhalten der NOS-1 liefert.

3.3.3. Bildanalytische Aktivitätsmessung der NOS-1 in verschiedenen Fasertypen

An Folgeschnitten des M. cremaster der Ratte wurde in jeder von 72 Skelettmuskelfasern der metabolische Typ anhand ihrer SDH-Aktivität, der MHC-Fasertyp mit MHCs-Immunhistochemie sowie die NOS-1-Diaphoraseaktivität ermittelt. Dieser Muskel wurde ausgewählt, weil er eine heterogenere Fasertypzusammensetzung als die anderen Muskeln aufweist (Abb. 22A, siehe auch Abb. 18 und Abb. 19).

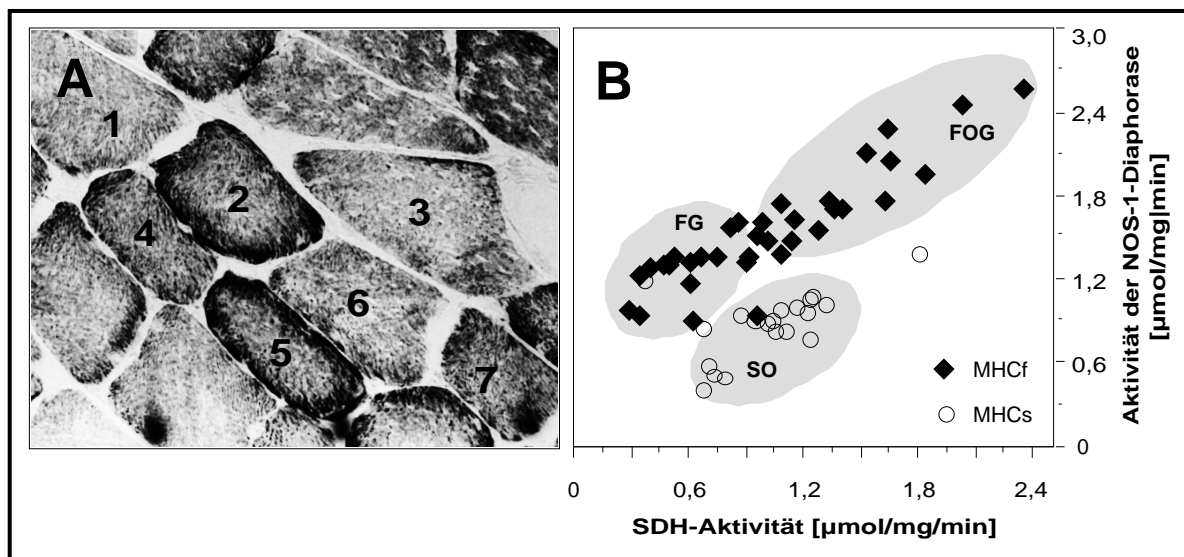


Abb. 22: Schnelle oxidative Skelettmuskelfasern (FOG; Typ IIA) besitzen höhere NOS-1-Diaphoraseaktivität als langsame oxidative (SO; Typ I) oder schnelle glykolytische (FG; Typ IIB) Fasern. A: An Kryostatschnitten vom M. cremaster der Ratte wurde die SDH-Reaktion durchgeführt. Der Stern sowie die Zahlen 1-7 kennzeichnen die den Folgeschnitten von Abb. 18 entsprechenden (und dort erklärten) Strukturen. Durch Kombination der Ergebnisse von MHC-Immunhistochemie und SDH-Enzymhistochemie können die Fasern 2 und 5 zur Gruppe der schnellen oxidativen, 4 und 7 zur Gruppe der langsamen oxidativen und 1, 3 sowie 6 zur Gruppe der schnellen glykolytischen Fasern zugeordnet werden. B: Die Aktivität der NOS-1 (gemessen als NOS-1-Diaphoraseaktivität) von Einzelfasern wurde gegen deren SDH-Aktivität aufgetragen. Die Zuordnung der untersuchten Einzelfasern zu den langsamen oxidativen (SO), schnellen oxidativen (FOG) oder schnellen glykolytischen (FG) Fasern erfolgte durch immun- und enzymhistochemische Inkubation von Folgeschnitten für MHCs bzw. SDH.

Die Werte der NOS-1-Diaphoraseaktivität jeder Faser wurde, wie in Abb. 22B dargestellt, unter Berücksichtigung des MHC-Fasertypes gegen die SDH-Aktivität derselben Faser aufgetragen. Daraus ergab sich die Zuordnung jeder Einzelfaser zu einer der drei Gruppen: Langsame oxidative Fasern (SO; MHCs-positiv, mittlere SDH-Aktivität; Typ I), schnelle oxidative Fasern (FOG; MHCf-positiv, hohe SDH-Aktivität; Typ IIA), schnelle glykolytische Fasern (FG; MHCf-positiv, geringe SDH-Aktivität; Typ IIB). Dabei hatten FOG-Fasern mit $2,13 \pm 0,22$ $\mu\text{mol/mg Protein/min}$ eine signifikant höhere NOS-1-Diaphoraseaktivität (U-Test nach Mann-Whitney) als FG-Fasern ($1,02 \pm 0,21$ $\mu\text{mol/mg Protein/min}$). SO-Fasern zeigten die geringste NOS-1-Diaphoraseaktivität ($0,88 \pm 0,23$ $\mu\text{mol/mg Protein/min}$). Die Korrelation der beiden Merkmale SDH-Aktivität und NOS-1-Diaphoraseaktivität wurde nun innerhalb der vom MHC-Subtyp definierten Gruppen mit Hilfe des Rangkorrelationstests nach Kendall untersucht. Dabei zeigte sich innerhalb der Gruppe der schnellen (MHCf-positiven Fasern) ein vergleichsweise starker Zusammenhang zwischen SDH- und NOS-1-Diaphoraseaktivität mit $\tau=0,77$ ($p<0,05$). In der metabolisch homogenen Gruppe der langsamen (MHCs-positiven) Skelettmuskelfasern gab es hingegen praktisch keine Korrelation zwischen beiden Merkmalen ($\tau=0,35$; $p<0,05$).

3.3.4. Wirkung von NO-Donatoren auf Cytochrom-Oxidasen und GAPDH

Um zu untersuchen, ob NO den Stoffwechsel der Skelettmuskelfasern beeinflusst, wurden zwei vom Wirkprinzip unterschiedliche NO-Donatoren (NOC-9 und SNAP) sowie zwei in Skelettmuskelfasern vorkommende Enzyme ausgewählt, für die etablierte histochemische Nachweismethoden existieren (Cytochrom-Oxidasen sowie Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase; GAPDH). In Abhängigkeit von der Konzentration der NO-Donatoren wurde die Extinktion der von den beiden Enzymen gebildeten Farbstoffe bildanalytisch in Kryostatschnitten bestimmt und für NOC-9 in semilogarithmischen Dosis-Wirkungs-Kurven aufgetragen (Abb. 23). Um die so erhaltenen Daten definierten Fasertypen zuordnen zu können, wurde auf Folgeschnitten für jede untersuchte Faser auch deren oxidative Stoffwechseleigenschaften durch SDH-Enzymhistochemie und ihr MHC-Fasertyp durch MHCs-Immunhistochemie ermittelt.

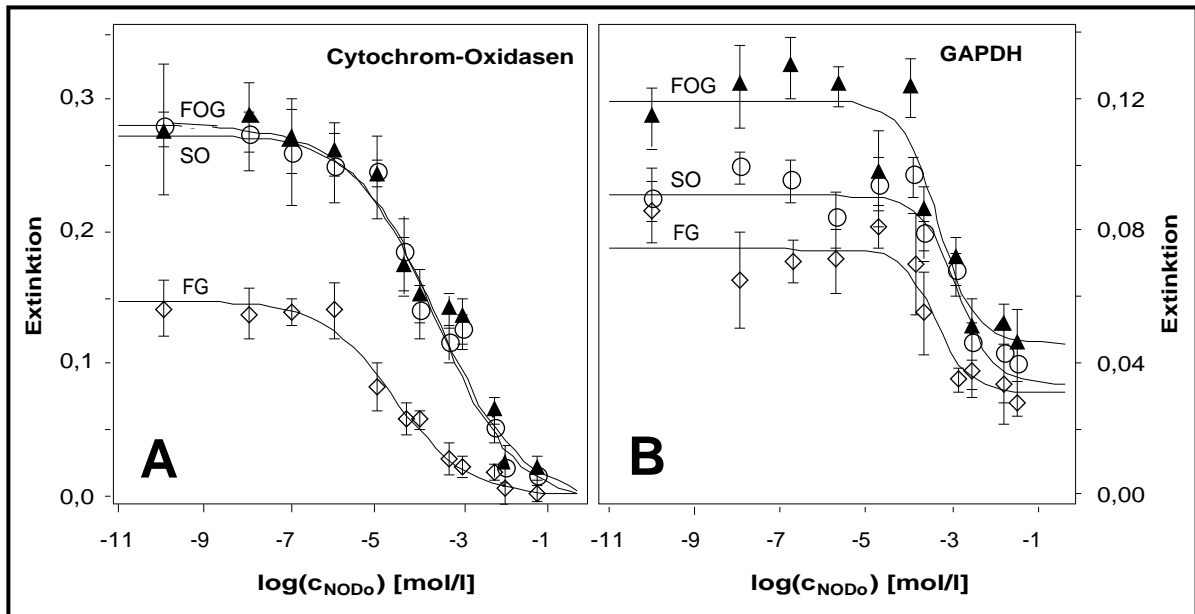


Abb. 23: NO Donatoren inhibieren die Aktivität von Cytochrom-Oxidase und der GAPDH in Skelettmuskelfasern des *M. cremaster* der Ratte. Dafür wurden an Kryostatschnitten die histochemische Reaktion für Cytochrom-Oxidase (A) und GAPDH (B) unter Zugabe verschiedener Mengen des NO-Donators NOC-9 durchgeführt, die Extinktion des Reaktionsproduktes Diaminobenzidin-Braun (A) bzw. Formazan (B) bildanalytisch bestimmt und als Dosis-Wirkungs-Diagramme aufgetragen. Die Zuordnung der untersuchten Einzelfasern zu den langsamen oxidativen (SO), schnellen oxidativen (FOG) und schnellen glykolytischen (FG) Fasern erfolgte durch immun- bzw. enzymhistochemische Inkubation von Folgeschnitten für MHCs bzw. SDH.

Die Untersuchungen mit NOC-9 und SNAP ergaben prinzipiell ähnliche Ergebnisse: Beide NO-Donatoren verringerten die Aktivität sowohl der Cytochrom-Oxidase als auch der GAPDH in allen untersuchten Skelettmuskelfasern. Der wesentliche Unterschied zwischen beiden NO-Donatoren bestand darin, daß SNAP aufgrund der geringeren Freisetzungsgeschwindigkeit von NO um ungefähr eine Größenordnung höher als NOC-9 konzentriert sein mußte, um gleiche Hemmeffekte zu erreichen.

Die Konzentration von NOC-9, die zur 50-prozentigen Hemmung der Aktivität der Cytochrom-Oxidase führte ($c_{50\%}$), war mit etwa $5 \cdot 10^{-5}$ M in allen drei Fasertypen gleich, obwohl die Ausgangsaktivität der Enzyme in FOG- und SO-Fasern etwa doppelt so hoch war wie in FG-Fasern. Das Ausmaß der Hemmung erreichte mit steigenden Konzentrationen an NO-Donatoren praktisch 100%. Als Negativkontrolle wurden 48 Stunden alte NOC-9- bzw.

SNAP-Lösungen benutzt, aus denen ein Großteil des entstandenen NO freigesetzt worden war. Zwar kam es auch mit diesen Ansätzen zu einer Hemmung der Cytochrom-Oxidasen, das Ausmaß der Hemmung war jedoch mit ca. 30% erheblich geringer als bei Verwendung frischer Inkubationsmedien (Ergebnisse nicht gezeigt).

Auch die Aktivität der GAPDH wurde durch NO-Donatoren gehemmt, wofür jedoch höhere Konzentrationen von NO-Donatoren erforderlich waren. So war die $c_{50\%}$ von NOC-9 um etwa eine Größenordnung höher ($5 \cdot 10^{-4}$ M) als bei den Cytochrom-Oxidasen. Außerdem wurde die GAPDH nur unvollständig gehemmt, d.h. die Aktivität dieses Enzyms wurde maximal um zwei Drittel verringert. Die ebenfalls vorhandenen Fasertypunterschiede in der Ausgangsaktivität der GAPDH waren weniger ausgeprägt also bei den Cytochrom-Oxidasen. Die Negativkontrollen mit abgestandenen Medien zeigten ähnliche Ergebnisse wie bei Cytochrom-Oxidasen.