

Aus dem
Institut für Anatomie
der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-G. Baumgarten
Abteilung Anatomie II
Leiter: Prof. Dr. R. Gossrau

**Untersuchungen zur Stickstoffmonoxid-Synthase-1 (NOS-1)
im Skelettmuskel der Ratte unter besonderer Benutzung der
computergestützten Bildanalyse**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Gerit Planitzer
aus Hoyerswerda

Referent: Prof. Dr. R. Gossrau

Koreferent: Prof. Dr. M. Bräutigam

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 16. April 2002



Foto: Edy Brunner

Es ist spät geworden,
sagte die ältere Zypresse zu den anderen, ich glaube, wir sollten wieder gehen.
Doch als sie sich umdrehten, erschrecken sie.
Es hatte sich viel verändert.
Ach, sagte sie, vielleicht ist es besser, wir bleiben noch ein bisschen zusammen.

Franz Hohler, 1987

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1.	Stickstoffmonoxid und Stickstoffmonoxid-Synthasen	1
1.2.	Stickstoffmonoxid-Synthasen im Skelettmuskel	2
1.3.	Nachweisverfahren für die NOS-1 im Skelettmuskel	
1.3.1.	Biochemische Nachweise	4
1.3.2.	Immunhistochemische Nachweise	4
1.3.3.	Enzymhistochemische Nachweise	5
1.4.	Costameren	6
1.5.	Bildanalyse enzymhistochemischer Reaktionen	8
1.6.	Zielsetzung der Arbeit	9
2.	Material und Methoden	
2.1.	Gewinnung und Aufarbeitung der Gewebeproben	
2.1.1.	Gewebeproben für histochemische und biochemische Untersuchungen	11
2.1.2.	Kontrahierte und dilatierte Muskelproben	12
2.1.3.	Gezupfte Skelettmuskelfasern	12
2.2.	Katalytische Histochemie	
2.2.1.	Allgemeine Vorbehandlung der Kryostatschnitte	13
2.2.2.	NADPH-Diaphorase / NOS-1-Diaphorase	
2.2.2.1.	Standardmedium für die NADPH-Diaphorase	13
2.2.2.2.	Leerwertuntersuchungen	14
2.2.2.3.	Modifikation des Standardmediums für die NOS-1-Diaphorase	14
2.2.2.4.	Formazanquantifizierung in Kryostatschnitten	14
2.2.3.	NADH-Diaphorase	15
2.2.4.	Succinat-Dehydrogenase	15
2.2.5.	Cytochrom-Oxidasen	15
2.2.6.	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	16
2.2.7.	Experimente mit NO-Donatoren	16
2.3.	Immunhistochemie	
2.3.1.	Vorbehandlung der Kryostatschnitte	17
2.3.2.	Primärantikörper	17
2.3.3.	Sekundärantikörper, Visualisierung	18
2.4.	Proteinbiochemische Methoden	
2.4.1.	Probenaufarbeitung	19
2.4.2.	Proteinbestimmung	19
2.4.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
2.4.4.	Western-Blot	21
2.4.5.	Färbeverfahren	21
2.4.6.	Visualisierung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine	22

2.5.	Bildanalyse	
2.5.1.	Geräte, Software	23
2.5.2.	Messungen räumlicher Größen	
2.5.2.1.	Messung des Sarkolemmgehaltes	24
2.5.3.	Extinktionsmessungen, Datenaufarbeitung	
2.5.3.1.	Statische Extinktionsmessungen (Endpunktmessungen)	25
2.5.3.2.	Fortlaufende Extinktionsmessungen (Kinetische Messungen)	25
2.5.3.3.	Grundlagen der Messung von Grauwerten in Kryostatschnitten	26
2.5.3.4.	Datenaufarbeitung	30
2.6.	Statistik	
2.6.1.	Allgemeine statistische Angaben	32
2.6.2.	Mittelwertvergleiche	32
2.6.3.	Tests auf Korrelation zweier Merkmale	33
2.6.4.	Meßwiederholungsstudie	33
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	34
3.1.1.2.	Querschnitte von Skelettmuskelfasern	37
3.1.2.	Charakterisierung der NADPH-Diaphorasen mit Inhibitoren	39
3.1.3.	Vergleich mit dem Verteilungsmuster der NOS-1-Immunfluoreszenz	41
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	43
3.2.1.2.	Charakterisierung durch NOS-1-Immunhistochemie	46
3.2.2.	Reguläre und irreguläre Costameren in gezupften Fasern	49
3.2.3.	Funktionelle Analyse irregulärer Costameren	50
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	52
3.3.1.2.	Meßwiederholungsstudie	53
3.3.2.	Expression der NOS-1 in verschiedenen Skelettmuskeln	
3.3.2.1.	Quantitative Analyse mittels Western-Blot	53
3.3.2.2.	Qualitativ-histochemische NOS-1-Faserverteilung	55
3.3.2.3.	Quantifizierung von NOS-1-Protein und NOS-1-Diaphoraseaktivität	56
3.3.2.4.	Enzymkinetische Parameter und NOS-1-Verteilung in verschiedenen Fasertypen	58
3.3.3.	Bildanalytische Aktivitätsmessung der NOS-1 in verschiedenen Fasertypen ...	60
3.3.4.	Wirkung von NO-Donatoren auf Cytochrom-Oxidasen und GAPDH	61

4.	<u>Diskussion</u>	
4.1.	NADPH-Diaphorasereaktion als spezifischer Nachweis für NOS-1 im Skelettmuskel	64
4.2.	NOS-1 als costamerisch organisiertes Enzym	69
4.3.	Fasertypabhängige Expression der NOS-1	73
4.4.	Biologische Wirkung des NOS-1/NO-Systems im Skelettmuskel	75
4.5.	Wert bildanalytischer Verfahren zur Aktivitätsmessung von Enzymen	78
5.	<u>Zusammenfassung</u>	81
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	83

Anhang

Verwendete Abkürzungen	I
Lebenslauf	II
Danksagung	III

Teile dieser Arbeit sind an folgenden Stellen publiziert worden:

Zeitschriftenbeiträge:

Planitzer G, Baum O, Gossrau R (2000)

Skeletal muscle fibres show NADPH diaphorase activity associated with mitochondria, the sarcoplasmic reticulum and the NOS-1-containing sarcolemma.

Histochem J 32: 303-312

Baum O, Planitzer G, Richter H, Gossrau R (2000)

Irregular costameres represent nitric oxide synthase-1-positive sarcolemma invaginations enriched in contracted skeletal muscle fibres.

Histochem J 32: 743-751

Planitzer G, Miethke A, Baum O (2001)

Nitric oxide synthase-1 is enriched in fast-twitch oxidative myofibers.

Cell Tissue Res 306: 325-333

Posterbeiträge:

Planitzer G, Gossrau R

Measurement of nitric oxide synthase-1 in skeletal muscle fibers by image analysis - Methodological and applied aspects.

Biology of Nitric Oxide, 6th International Meeting, Stockholm
September 5-8, 1999

Baum O, Planitzer G, Richter H, Gossrau R

Irregular costameres represent nitric oxide synthase-1-positive sarcolemma invaginations enriched in contracted skeletal muscle fibres.

Ann Anat Suppl 2000 (im Druck)

Beiträge für die Wissenschaftlichen Jahrbücher des Fachbereichs Humanmedizin der FU Berlin

Baum O, Planitzer G, Richter, Gossrau R (1999)

Nitric oxide synthase I is located in regular and irregular costameres in rat skeletal muscle.

Planitzer G, Baum O, Gossrau R (2000)

Entwicklung einer Software für die Quantifizierung histochemischer Reaktionen *in situ*: angewandt zur Analyse der Stickstoffmonoxidsynthase im Skelettmuskel.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine Kombination aus proteinbiochemischen, histochemischen und vor allem bildanalytischen Methoden das NOS-1/NO-System in den Skelettmuskelfasern von Ratten charakterisiert. Wesentliche Fragestellungen betrafen die Eignung der enzymhistochemischen NADPH-Diaphorase-Methode zum Nachweis der NOS-1, die Organisation des Enzyms in Costameren und seine Aktivität in den verschiedenen Typen von Skelettmuskelfasern. Desweiteren wurde die potentielle Regulation NO-sensitiver Enzyme untersucht.

Durch Zugabe von chaotropen Substanzen wie Harnstoff zum Inkubationsmedium konnte eine Erhöhung der Spezifität der NADPH-Diaphorasereaktion *in situ* für die NOS-1 gegenüber anderen in Skelettmuskelfasern der Ratte vorkommenden NADPH-Diaphorasen erzielt werden. Mit weiteren aus der Literatur bekannten Inhibitoren gegen NADPH-Diaphorasen war es dagegen nicht möglich, die NOS-1 von den anderen NADPH-Diaphorasen abzugrenzen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß neben regulären auch irreguläre Costameren in Skelettmuskelfasern existieren. Diese bestehen aus jeweils zwei Einzelringen, die einen regelmäßigen Abstand von 2 µm zueinander aufweisen (und somit Doppelringe bilden). Dagegen war der Abstand zwischen benachbarten irregulären Costameren äußerst unregelmäßig. Im Gegensatz zu regulären Costameren, die in 10 µm dicken Kryostatschnitten häufig zu finden sind, kommen irreguläre Costameren vorwiegend in Kryostatschnitten mit einer Dicke über 30 µm oder in gezupften Skelettmuskelfasern vor. Die irregulären Costameren ließen sich als Sarkolemminvaginationen identifizieren, die wesentlich häufiger in kontrahierten als in dilatierten Fasern auftreten. Deshalb kommen neben der NOS-1 auch andere Proteine des peripheren Cytoskeletts (z.B. Dystrophin) in irregulären Costameren vor, während intrafibrär lokalisierte Moleküle wie α -Actinin fehlen.

Zur Quantifizierung der NOS-1 wurde ein bildanalytisches Verfahren entwickelt, mit dem die katalytischen Eigenschaften der NOS-1-Diaphorase im Skelettmuskel auf Einzelfaserebene ermittelt werden konnten. Hierbei zeigte sich, daß die NOS-1 in schnellen (Typ II-) Skelettmuskelfasern höher konzentriert ist als in langsamen (Typ I-) Fasern. Desweiteren konnte nachgewiesen werden, daß innerhalb der Gruppe der schnellen Fasern eine positive Korrelation zwischen

der oxidativen Stoffwechselkapazität (bildanalytisch bestimmt durch die SDH-Reaktion) und der bildanalytisch gemessenen NOS-1-Aktivität besteht.

Außerdem konnte durch Bildanalyse gezeigt werden, daß von NO-Donatoren freigesetztes NO die Aktivität von Cytochrom-Oxidasen und GAPDH *in situ* hemmt. Je nach Aktivität dieser Enzyme in den verschiedenen Fasertypen vermag NO diese Fasern in unterschiedlichem Maße zu beeinflussen. Die $c_{50\%}$ -Werte für die Cytochrom-Oxidasen waren in allen Fasertypen praktisch gleich. Sie lagen jedoch etwa um eine Größenordnung niedriger als die $c_{50\%}$ -Werte für die GAPDH, bei denen es aber ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Fasertypen gab.

Das NOS-1/NO-System im Skelettmuskel der Ratte ist also in Fasern aktiver, in denen wegen ihres vorwiegend oxidativen Stoffwechsels zugleich auch eine hohe Aktivität an potentiellen Zielmolekülen vorliegt.