

## **5. 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  $\alpha$ -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 Stoffwechsellkapazität (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.