

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Kompensationsmechanismen
im Skelettmuskel von neuronaler Stickstoffmonoxid-
Synthase (nNOS) defizienten Mäusen**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Sebastian Jähne
aus Löbau

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. A. R. Pries
2.: Prof. Dr. med. J. Vogel
3.: Priv. – Doz. Dr. med. H.-D. Orzechowski

Datum der Promotion: 16. Mai. 2010

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung und Zielsetzung | 7 |
| 1.1 | Das gasförmige Signalmolekül NO und NO-Synthasen | 7 |
| 1.2 | Expression des nNOS/NO-Systems im Skelettmuskel..... | 10 |
| 1.3 | Funktionen des nNOS/NO-Systems im Skelettmuskel..... | 12 |
| 1.4 | Zielsetzung der Arbeit | 14 |
| | | |
| 2 | Material und Methoden | 15 |
| 2.1 | Material | 15 |
| 2.1.1 | Geräte | 15 |
| 2.1.2 | Verbrauchsmaterialien | 16 |
| 2.1.3 | Kits | 16 |
| 2.1.4 | Versuchstiere | 17 |
| 2.2 | Methoden | 17 |
| 2.2.1 | Tierexperimente | 17 |
| 2.2.2 | Herstellung eines Muskelpulvers zur Probenextraktion..... | 17 |
| 2.2.3 | Proteinanalytische Methoden | 18 |
| 2.2.3.1 | Gewinnung von Proteinextrakten für SDS-PAGE..... | 18 |
| 2.2.3.2 | Gewinnung von Proteinextrakten für 2D-PAGE | 18 |
| 2.2.3.3 | Proteinbestimmung | 19 |
| 2.2.3.4 | Puffer und Lösungen für Proteinbiochemische Methoden..... | 20 |
| 2.2.3.5 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 21 |
| 2.2.3.6 | Western-Blotting..... | 22 |
| 2.2.3.7 | 2D-Gelelektrophorese | 24 |
| 2.2.3.8 | Färbung von PAGE-Gelen mit kolloidalem Coomassie-Blau | 28 |
| 2.2.3.9 | Silberfärbung von PAGE-Gelen | 29 |
| 2.2.3.10 | Färbungen von Blot-Matrices mit Ponceau-Rot..... | 30 |
| 2.2.3.11 | Auswertung der Gele mit PD-Quest | 30 |
| 2.2.3.12 | Massenspektroskopie von Proteinen und Peptiden | 32 |
| 2.2.4 | Molekularbiologische Methoden..... | 34 |
| 2.2.4.1 | Puffer und Lösungen..... | 34 |
| 2.2.4.2 | RNA-Isolierung..... | 34 |
| 2.2.4.3 | RNA-Konzentrationsmessung | 35 |
| 2.2.4.4 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 35 |
| 2.2.4.5 | Agarose-Gelelektrophorese | 36 |
| 2.2.4.6 | Herstellung externer Standards für die RT Q-PCR | 37 |
| 2.2.4.7 | Primerauswahl für die Polymerase-Kettenreaktion | 37 |
| 2.2.4.8 | Quantitative Realtime-PCR (RT Q-PCR) | 38 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3 | Ergebnisse..... | 41 |
| 3.1 | Optimierung der 2D-PAGE zur Auftrennung von Proteinen aus dem EDL..... | 41 |
| 3.1.1 | Bestimmung der optimalen Auftrennungsmenge | 41 |
| 3.1.2 | Linearität der Silberfärbung..... | 45 |
| 3.2 | Vergleichende Analyse des Proteinexpressionsmusters im EDL von C57 und nNOS knockout-Mäusen | 47 |
| 3.2.1 | Charakterisierung der C57 und nNOS knockout-Mäuse..... | 47 |
| 3.2.2 | 2D-PAGE-Analyse | 47 |
| 3.2.3 | Validierung der Ergebnisse der 2D-PAGE-Analyse durch Immunblot | 53 |
| 3.2.4 | Bestimmung der Kopiezahlen der für die zwischen C57 und nNOS knockout- Mäusen unterschiedlich konzentrierten Proteine kodierenden mRNA..... | 55 |
| 3.3 | Expression von Enzymen zur Synthese von Vasodilatoren im EDL von C57 und nNOS knockout-Mäusen | 56 |
| 4 | Diskussion..... | 57 |
| 4.1 | 2D-PAGE-Analyse veränderter Expressionsmuster..... | 57 |
| 4.1.1 | Differentiell exprimierte Spots | 57 |
| 4.1.2 | nNOS-knockout-Mausmodell | 57 |
| 4.2 | Kompensation von nNOS (NO) als Radikalfänger | 58 |
| 4.3 | Kompensation von nNOS als Vasodilatator im Skelettmuskel der nNOS-knockout-Maus | 62 |
| 5 | Zusammenfassung | 64 |
| 6 | Literatur | 66 |
| 7 | Anlagen..... | 78 |
| | Verwendete Abkürzungen | |
| | Veröffentlichungsliste | |
| | Lebenslauf | |
| | Selbständigkeitserklärung | |
| | Danksagung | |

1 Einleitung

1.1 Das gasförmige Signalmolekül NO und NO-Synthasen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges, freies Radikal ¹ mit hohem Redoxpotential. Noch vor 30 Jahren wurde NO ausschließlich mit Umweltverschmutzung in Verbindung gebracht, da es sich in der Atmosphäre besonders durch die Verbrennung von fossilen Brennstoffen anreichert. Dann stellte sich jedoch heraus, dass NO auch im lebenden Organismus an der Umsetzung biologischer Prozesse beteiligt ist. So berichtete die Gruppe von F. Murad im Jahr 1977, dass Nitrate nach Abbau zu NO über eine Aktivierung der Guanylatcyclase zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führen, womit sie den Wirkmechanismus von Nitroglyzerin-Präparaten bei der medikamentösen Behandlung von Angina Pectoris identifiziert hatten (Arnold et al., 1977). Später konnten Ignarro et al. (1987) und Moncada et al. (1988) nachweisen, dass endogen produziertes NO mit dem endothelialen Relaxationsfaktor (EDRF) identisch ist, dessen Existenz zuvor von R. Furchgott propagiert worden war (Furchgott und Zawadzki, 1980). Für ihre Arbeiten zur Rolle von NO als Botenstoff im Herz-Kreislauf-System bekamen Furchgott, Ignarro und Murad im Jahr 1998 den Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen. Inzwischen ist durch intensive Forschung herausgefunden worden, daß NO nicht nur eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle des Blutdrucks einnimmt, sondern auch an der unspezifischen Immunabwehr gegen invasive Pathogene oder Tumorzellen sowie der Neuromodulation im zentralen und peripheren Nervensystem beteiligt ist (Bredt und Snyder, 1994).

Wegen seiner elektrischen Neutralität kann NO leicht durch biologische Membranen diffundieren und dadurch sowohl intra- als auch extrazellulär wirken. Diese physikochemische Eigenschaft erklärt auch, dass NO sowohl auto- als auch parakrine Effekte vermittelt. Seine sehr kurze Halbwertszeit wird dabei vor allem durch Bindung an verschiedene Fe²⁺ oder Zn²⁺-haltige Scavenger-Proteine bestimmt (Davis et al., 2001). Beispielsweise wird NO in Skelettmuskelfasern durch Bindung an Myoglobin sowie an Hämoglobin in den Erythrozyten benachbarter Kapillaren inaktiviert. Außerdem kann NO mit Superoxid zu Peroxinitrit reagieren und so seine funktionellen Eigenschaften verlieren (Reid, 1998).

¹ das Stickstoffmonoxidradikal NO• wird vereinfachend als NO dargestellt

In Zellen wird NO von NO-Synthasen (NOS) durch eine NADPH-abhängige Oxidation der Guanidino-Stickstoffgruppe des L-Arginins mit Hilfe von molekularem Sauerstoff und mehreren Kofaktoren [FAD, FMN, Tetrahydrobiopterin (BH₄), Häm] synthetisiert (Übersicht bei Nathan und Xie, 1994). Es gibt drei verschiedene NOS-Formen, die von unterschiedlichen Genen kodiert werden: die neuronale NOS (nNOS, NOS-1), die induzierbare NOS (iNOS, NOS-2) sowie die endotheliale NOS (eNOS, NOS-3). Obwohl sowohl nNOS also auch eNOS ursprünglich als konstitutive Enzyme bestimmter Neurone des Gehirns bzw. des Gefäßendothels beschrieben worden sind, konnten beide NOS-Formen inzwischen in zahlreichen anderen Zelltypen nachgewiesen werden, in denen sie NO in relativ geringen Konzentrationen (µM-Bereich) für die Transduktion von intrazellulären Signalen produzieren. Im Gegensatz hierzu ist das NO, das durch iNOS in Makrophagen bei Entzündungen in höherer Konzentration (mM-Bereich) synthetisiert wird, vor allem antimikrobiell wirksam. Folgerichtig wird die iNOS erst nach Induktion durch Zytokine oder Bakterienbestandteile exprimiert.

Obwohl sie sich in Struktur, Funktion und Lokalisation unterscheiden, weisen die drei NO-Synthasen einen ähnlichen Domänenaufbau auf (**Abb. 1**). In der N-terminalen Oxygenase-Domäne finden sich die Bindungsstellen für Zn²⁺, Häm, Tetrahydrobiopterin und Arginin, während in der C-terminalen Reduktase-Domäne, die in der Primärstruktur der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase ähnelt (Bredt et al., 1991; Daff et al., 2001), die Bindungsstellen für die prosthetischen Gruppen NADPH, FAD und FMN lokalisiert sind (Förstermann et al., 1994; McMillan und Masters, 1995; Nakane et al., 1993).

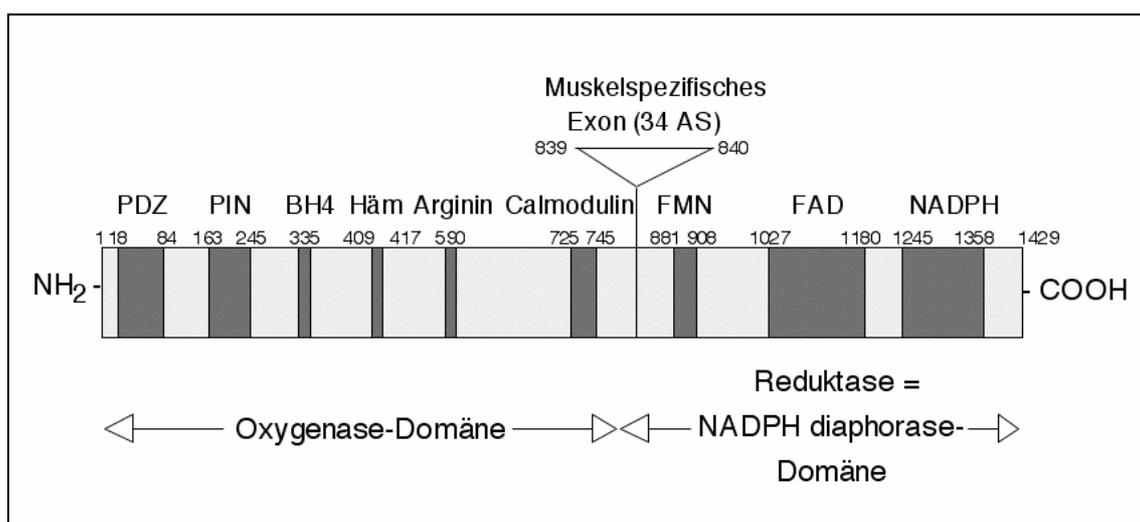


Abb. 1: Schematische Darstellung der nNOS-Primärstruktur. Die Ziffern kennzeichnen die Grenzen der Proteindomänen in der humanen Aminosäuresequenz.

Beide Domänen sind durch eine Ca^{2+} /Calmodulin-bindende Domäne miteinander verbunden. Bei der durch NO-Synthasen katalysierten Reaktion entsteht aus L-Arginin und Sauerstoff durch eine NADPH-abhängige Oxidation NO (möglicherweise über Peroxinitrit) und das Koprodukt Citrullin (Knowles und Moncada, 1994; Marletta, 1994). Eine sogenannte PDZ-Domäne, durch die eine Wechselwirkung mit PDZ-Domänen anderer Proteine zur Verankerung an der Plasmamembran möglich ist (Hung und Sheng, 2002), exprimiert nur die nNOS (Brenman et al., 1996). Als Signaltransduktionsenzym ist die Aktivität der nNOS streng reguliert, u.a. durch die Konzentration von freiem intrazellulärem Ca^{2+} und Calmodulin (Hayashi et al., 1999). Die cDNA der nNOS besitzt außerdem eine Konsensus-Sequenz, die auf eine Regulation durch Phosphorylierung hindeutet, wobei für die Proteinkinasen A und C sowie für die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase ein hemmender Effekt auf die *in vitro*-Enzymaktivität nachgewiesen wurde (Bredt et al., 1992). Durch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen, z.B. mit PIN (Jaffrey und Snyder, 1996) oder CAPON (Segalat et al., 2005), kann die Aktivität der nNOS ebenfalls reguliert werden (Kone et al., 2003).

Das Gen für nNOS ist mit etwa 160.000 Nucleotiden (davon 29 Exone mit einer Länge von insgesamt nur 4372 Nucleotiden) eines der größten Gene im humanen Genom (Hall et al., 1994). Alternatives Spleißen des Exon-1, das als 5'-UTR nicht in Proteinsequenz umgeschrieben wird, stellt einen grundlegenden Mechanismus dar, um die Transkription von nNOS-mRNA zu modulieren. Vom Exon-1 gibt es mindestens neun Varianten, die aufgrund unterschiedlicher Promotoren zellspezifisch und mit variabler Effizienz transkribiert werden (Lee et al., 1997; Wang et al., 1999). So etwa wird die Transkription einer bestimmten nNOS Exon-1c mRNA-Variante in glatten Muskelzellen erst nach einem hypoxischen Stimulus induziert (Newton et al., 2003; Ward et al., 2005). Daneben gibt es auch Spleißvarianten der nNOS, die zur Translation unterschiedlicher Isoformen mit differierenden biochemischen Eigenschaften führen. Neben der α -Isoform als Hauptvariante der nNOS mit einem Molekulargewicht von 160 kDa kommen im zentralen und peripheren Nervensystem die β -Isoform (136 kDa) und die γ -Isoform (125 kDa) vor (Brenman et al., 1997).

Zum enzymhistochemischen Nachweis von NOS-Aktivitäten ist die NADPH-Diaphorase-Reaktion geeignet, bei der an der Reduktase-Domäne Elektronen von NADPH über die Kofaktoren FMN und FAD auf wasserlösliches Tetrazoliumsalz

übertragen werden. Dieses wandelt sich dadurch zu wasserunlöslichem Formazan um und fällt auf dem Gewebeschnitt aus, wodurch die NADPH-Diaphorase lokalisiert werden kann (Hope et al., 1991). Da jedoch auch noch mindestens acht weitere Enzyme NADPH-Diaphorase-Aktivität besitzen (Planitzer et al., 2000), muss die Spezifität der enzymhistochemischen Reaktion zum Nachweis der nNOS durch Zugabe von 2 M Harnstoff im Inkubationsmedium erhöht werden (Baum et al., 2002).

NO wirkt vor allem durch Stimulation der löslichen Guanylatcyclase (sGC), wodurch die Konzentration an cGMP ansteigt. Dieser Second Messenger vermag dann die Proteinkinase G zu aktivieren, die am Anfang zahlreicher Signalkaskaden steht (Übersicht bei Hofmann, 2005). Darüber hinaus kann NO die Aktivität/Struktur anderer Proteine auch direkt durch entweder nicht-kovalente (Hämbindung) oder kovalente (S-Nitrosylierung und Nitrotyrosylierung) Modifikationen beeinflussen (Übersichten bei Alderton et al., 2001 und Murad, 1999).

1.2 Expression des nNOS/NO-Systems im Skelettmuskel

In Skelettmuskeln zahlreicher Säuger einschließlich Mensch, Maus und Ratte wird NO vorwiegend von der nNOS produziert (Übersichten bei Marechal und Gailly, 1999; Reid, 1998; Stamler und Meissner, 2001). Sowohl immunhistochemisch als auch katalytisch-histochemisch konnte gezeigt werden, dass die nNOS in hoher Konzentration und Aktivität im Sarkolembereich von intra- und extrafusalen Muskelfasern lokalisiert ist (Grozdanovic et al., 1995; Kobzik et al., 1994), wo sie vor allem in Costameren (Baum et al., 2000b; Gossrau, 1998) motorischen Endplatten (Kusner und Kaminski, 1996) und Muskel-Sehnen-Verbindungen (Chang et al., 1996) vorkommt.

Caveolin-3 inhibiert die nNOS (Venema et al., 1997). Phosphofruktokinase-M (Firestein und Bredt, 1999) und PIN (Jaffrey und Snyder, 1996) werden als weitere Moleküle diskutiert, die mit der nNOS in Skelettmuskelfasern wechselwirken. Die funktionelle Relevanz dieser Protein-Protein-Interaktionen ist allerdings noch weitgehend unklar (Kone et al., 2003).

Über die Expression von nNOS in bestimmten Skelettmuskelfasertypen liegen unterschiedliche Befunde vor. Einige Untersuchungen haben das Enzym entweder ausschließlich (Kobzik et al., 1994) oder vorwiegend (Chao et al., 1998; Grozdanovic et al., 1995; Kapur et al., 1997) in schnellen (Typ II) Skelettmuskelfasern von Nagern nachgewiesen, während in anderen Studien eine vom Fasertyp unabhängige Verteilung des Enzyms beschrieben wurde (Tews et al., 1997). Für den M. vastus lateralis des

Menschen wird berichtet, dass die nNOS vor allem in den langsamen Typ I-Skelettmuskelfasern vorkommt (Frandsen et al., 1996). Möglicherweise ist es für die Zuordnung der nNOS zu bestimmten Fasertypen hilfreich, neben der Kontraktionsgeschwindigkeit noch den Stoffwechselltyp zur Charakterisierung der Skelettmuskelfasern heranzuziehen. Dann lässt sich zeigen, dass in der Ratte die nNOS in den schnell-oxidativen (FOG; Typ IIa)-Fasern aktiver ist als in den langsam-oxidativen (SO; Typ I)- oder schnell-glykolytischen (FG; Typ IIb)-Fasern (Planitzer et al., 2001).

Im Skelettmuskel wird nNOS vor allem als μ -Isoform exprimiert (Silvagno et al., 1996). Diese Isoform entsteht durch alternatives Spleißen der mRNA von nNOS zwischen dem 16. und 17. Exon, wodurch im Skelettmuskel eine um 34 Aminosäuren längere Variante (165 kDa) der nNOS translatiert wird, die jedoch eine ähnliche katalytische Aktivität wie die ursprünglich im Gehirn nachgewiesene nNOS (160 kDa) besitzt (Silvagno et al., 1996). Die biologische Relevanz der ebenfalls im Skelettmuskel vorkommenden β -Isoform ist Gegenstand intensiver Forschung (Baum et al., 2004; Planitzer et al., 2001). Im Skelettmuskel wird NO nur zu einem geringen Anteil von eNOS synthetisiert (Kobzik et al., 1995). Die iNOS konnte im Skelettmuskel bislang überwiegend nur nach Induktion, z.B. bei einer bakteriellen Sepsis, nachgewiesen werden (Reid, 1998). Eine Ausnahme machen bestimmte Meerschweinchenspezies, in deren Muskelfasern die iNOS auch ohne vorherige Induktion vorkommt (Gath et al., 1999).

Da die nNOS im Skelettmuskel mit α 1-Syntrophin wechselwirkt (Adams et al., 2001; Brenman et al., 1996; Kameya et al., 1999) und deshalb zum erweiterten Dystrophin-Glykoproteinkomplex (DGC) gezählt wird (Cohn und Campbell, 2000), ist vermutet worden, dass die bei Patienten mit Duchenne Muskeldystrophie (DMD) und bei mdx-Mäusen (einem DMD-Tiermodell) beobachtete Reduktion und Verlagerung der nNOS vom Sarcolemm ins Sarcoplasma zur Pathogenese der DMD (Brenman et al., 1995) und/oder zu Sarcoglykanopathien (Crosbie et al., 2002) beiträgt. Allerdings zeigten Untersuchungen an mdx-Mäusen und nNOS-knockout/mdx-Doppelmutanten, dass beide Dystrophinopathien offenbar nicht direkt von nNOS-Aktivitäten hervorgerufen werden (Chao et al., 1998; Crosbie et al., 1998). Vielmehr deuten andere Befunde darauf hin, dass die DMD- oder mdx-Pathogenese durch die veränderte Expression der nNOS im dystrophischen Skelettmuskel allenfalls verstärkt wird, indem der NO-Mangel zur Ischämie beiträgt (Sander et al., 2000) oder zytotoxische Makrophagen aktiviert (Wehling et al., 2001).

1.3 Funktionen des nNOS/NO-Systems im Skelettmuskel

Das nNOS/NO-System kann im Skelettmuskel eine Vielzahl von biologischen Prozessen beeinflussen. Die drei am eindringlichsten charakterisierten Funktionen der in den Skelettmuskelfasern lokalisierten nNOS beziehen sich auf die autokrine Modulation der Muskelkontraktion und der Glukoseaufnahme sowie der parakrinen Regulation der Muskeldurchblutung durch Vasodilatation (Stamler und Meissner, 2001). In allen drei Fällen sorgt nNOS produziertes NO dafür, dass entweder der Glukoseverbrauch vermindert wird oder anaplerotische Reaktionen aktiviert werden, so dass letztendlich die zur Verfügung stehende Glukosekonzentration in den Skelettmuskelfasern ansteigt. Darüber hinaus vermag nNOS regulierend auf die Myoblastenfusion während der Ontogenese, die Aktivierung von Satellitenzellen, die Endplattenbildung und die Signaltransduktion an den Endplatten ausdifferenzierter Skelettmuskelfasern einzuwirken (Anderson, 2000; Stamler und Meissner, 2001).

Der Wirkmechanismus von NO auf die Kontraktion wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Übersicht bei Marechal und Gailly, 1999). Nach Kobzik et al. (1994) wird die nNOS-Aktivität während der Kontraktion durch einströmende Ca^{2+} -Ionen erhöht und damit vermehrt NO freigesetzt, wodurch die lösliche Guanylatcyclase als wesentlicher NO-Rezeptor aktiviert wird und vermehrt cGMP bildet. Ähnlich wie in glatten Muskelzellen, postulieren Kobzik et al. (1994), vermag cGMP dann die Kräfte zu begrenzen, die während der Kontraktion auftreten. Aghdasi et al., (1997) wiesen hingegen nach, dass die im Skelettmuskel vorhandene cGMP-Konzentration nur sehr gering ist, was sie zur Schlussfolgerung führte, dass NO die Kontraktion eher direkt beeinflusst. Dass NO tatsächlich die Muskelkontraktionseigenschaften direkt über Regulation der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration modulieren kann, ist durch den Nachweis von redox- und NO-sensitiven Ca^{2+} -Kanälen am endoplasmatischen Retikulum von Cardiomyozyten belegt (Xu et al., 1999).

Das nNOS/NO-System greift auch in den Stoffwechsel der Skelettmuskelfasern ein, indem es die insulin-unabhängige Glukoseaufnahme während der Kontraktion erhöht (Balon, 1998; Kapur et al., 1997; Young et al., 1997). Die Details dieser Wechselwirkung sind aber noch nicht bekannt bzw. umstritten (Übersicht bei Stamler und Meissner, 2001).

Während der Muskelkontraktion bzw. unter Belastung kommt es im Skelettmuskel zur verstärkten Ausschüttung von adrenergen Substanzen, die eigentlich zu einer

α 1-adrenergen Vasokonstriktion führen müssten, wäre nicht unter diesen Bedingungen die Sensitivität der Blutgefäße gegenüber diesen Substanzen deutlich vermindert (Thomas et al., 1994). Stattdessen steigt bei Überlast die Durchblutung des Muskels deutlich an (Belastungshyperämie), wodurch eine erhöhte Stoffwechselleistung der Skelettmuskelfasern ermöglicht wird. Thomas et al. (1998) konnten zeigen, dass das nNOS/NO-System der Skelettmuskelfasern wesentlich zu der Antagonisierung der kontraktions-induzierten α 1-adrenergen Vasokonstriktion beiträgt und somit als Vasodilatator wirkt. Um diese Funktion ausüben zu können, muss die nNOS sarkolemmal verankert sein (Thomas et al., 2003). Die Studien von Lau et al. (2000) und Grange et al. (2001) belegen, dass neben der eNOS auch nNOS zur cGMP-abhängigen Kontraktion von glatten Muskelzellen in der Skelettmuskulatur beitragen kann, so dass beide NOS-Formen vasodilatatorisch wirken.

Offenbar hat nNOS-produziertes NO auch einen aktivierenden Einfluss auf die Angiogenese im Skelettmuskel (Hudlicka et al., 2000; Williams et al., 2006a). Angiogenese ist das Wachstum des Kapillarsystems im Rahmen der Angioadaptation (Zakrzewicz et al., 2002). Bislang sind zwei unterschiedliche Mechanismen beschrieben worden, durch die im Skelettmuskel Angiogenese realisiert wird. Bei der Intussuszeption bzw. Splitting bilden die Kapillarendothelzellen intraluminale Invaginationen aus, die miteinander verschmelzen können. In die dabei entstehenden Endothelzellbrücken wandern dann so lange extrazelluläre Matrixbestandteile und interstitielle Zellen ein, bis sich letztendlich das Kapillarlumen teilt (Djonov et al., 2003; Egginton et al., 2001). Eine Erhöhung der Wandschubspannung (Shear Stress), die tangential auf die Kapillaren wirkt, stellt einen Auslöser für die intussuszeptive Angiogenese dar (Da Silva-Azevedo et al., 2002; Zhou et al., 1998). Bei der Kapillarsprossung (Sprouting) kommt es zu abluminalen Aussprossungen der Endothelzellen, die sich dann zu tubenartigen Fortsätzen organisieren. Nach Anschluss dieser Sprossen an existierende Kapillaren werden glatte Muskelzellen bzw. Perizyten zur Gefäßwandverstärkung rekrutiert. Sprouting kann im Überlast-Modell ausgelöst werden (Übersicht bei Hudlicka, 1998). Sowohl Intussuszeption als auch Sprouting werden durch nNOS-vermittelte Vasodilatation ausgelöst bzw. verstärkt (Williams et al., 2006b).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ausgehend von der Beobachtung, dass der Skelettmuskel-Phänotyp von nNOS-knockout-Mäusen im Vergleich zu C57Bl6-Wild-Typ-Mäusen weitgehend unverändert ist, soll in dieser Studie untersucht werden, ob sich Kompensationsmechanismen im nNOS-knockout-Stamm entwickelt haben, die die nNOS in diesem Gewebe funktionell ersetzen. Für diese Aufgabenstellung sollen zwei verschiedene Verfahrensansätze bearbeitet werden. Im ersten Ansatz sollen durch zweidimensionale Polyacrylamid Gelelektrophorese diejenigen Proteine identifiziert werden, die im EDL von nNOS-knockout-Mäusen ein anderes quantitatives Expressionsmuster als im EDL von C57-Mäusen aufweisen („Proteomics“). Der zweite Ansatz ist mehr funktionsorientiert. Ausgehend von der Beteiligung der nNOS an der Vasodilatation sollen systematisch die Konzentrationen von anderen vasomodulatorischen Proteinen im EDL der beiden Mausstämme bestimmt werden. Differenzen im Expressionsmuster könnten auf Kompensation der nNOS-Defizienz hinweisen.

Im Einzelnen soll/sollen:

1. 2D-PAGE zur Herstellung von Silber-gefärbten Gelen etabliert und optimiert werden, um nach densitometrischer Analyse diejenigen Proteine zu bestimmen, die im EDL von nNOS-knockout-Mäusen anders konzentriert sind als im EDL von C57-Mäusen,
2. eine präparative 2D-PAGE durchgeführt werden, um Proben für eine Tandem-MS-Analyse zu gewinnen, durch die zwischen C57 und nNOS-knockout-Mäusen differentiell-exprimierte Proteine identifiziert werden können,
3. mittels quantitativen Immunblottings auf EDL-Proben die Ergebnisse der Proteomics-Analyse verifiziert werden und
4. systematisch die quantitativen Expressionsmuster von Proteinen gemessen werden, die an der Vasodilatation im EDL beteiligt sind.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Proteinbiochemie

| | |
|---|--|
| Spektrophotometer, Novaspec 2 | Pharmacia Biotech, Cambridge, England |
| Zentrifuge, 5417R | Eppendorf, Hamburg |
| 2D-Kammer Protean II xi Cell | BioRad, München |
| IPG-Elektrophoresegerät Multiphor II | Pharmacia Biotech, Cambridge, England |
| Powersupply Standard Power Pack P25 | Biometra, Göttingen |
| Elektrophoresis Power Supply EPS 3501XL | Amersham, Freiburg |
| Vortexer ReaxControl | Heidolph, Kelheim |
| Schüttler Duomax 1030 | Heidolph, Kelheim |
| Magnetrührer RH basic | IKA Labortechnik, Staufen |
| SDS-PAGE Kammer Mini Protean II | BioRad, München |
| Heizblock Dri-Block DB 2A | Eppendorf, Hamburg |
| Ultraschallgerät Sonifier B-12 Cell Disruptor | Branson Sonic Power Company, Conneticut, USA |
| „Gewebezerkleinerer“ Ultra-Turrax T8 | IKA Werke, Staufen |
| Waage Portable Advanced | OHAUS, Gießen |
| Waage Sartorius CP225D | Sartorius, Göttingen |
| pH-Meter pH/Ion 510 | Eutech Instruments, Singapore |
| Reinstwasser-System Clear | SG, Hamburg |
| Thermostat | Biometra, Göttingen |
| Ettan Dalt six electrophoresis unit | Amersham Biosciences, Freiburg |
| Dalt gradient maker | Amersham Biosciences, Freiburg |

Molekularbiologie

| | |
|---|-----------------------|
| Power Macintosh G3 | Apple, Cupertino, USA |
| Thermoblock Uno-II Thermocycler | Biometra, Göttingen |
| WT 15 Standard Wipptisch „Rocking Platform“ | Biometra, Göttingen |

| | |
|--|---|
| DNA/RNA Elektrophoresekammer Mini Sub-Gel | BioRad, München |
| Power PAC 300, Elektrophorese-Steuereinheit | BioRad, München |
| Lichtmikroskop Axiophot mit F10 CCD-Kamera | Carl Zeiss, Oberkochen |
| Real-Time Cycler, Rotor Gene-2000 | Corbett Research, Australien |
| Zentrifuge 5417R | Eppendorf, Hamburg |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg |
| Reinraumwerkbank Typ Laminair HB 2448 | Heraeus, Hanau |
| Tischzentrifuge Heraeus Biofuge A | Heraeus, Hanau |
| Shake ´n Stack, Hybridisierungssofen | Hybaid, Teddington, England |
| Dispergiergerät Ultra -Turrax T 8 | IKA Werke, Staufen |
| Autoklav Typ 23 | Merk, Darmstadt |
| GelPrint 2000i Workstation | MWG, Ebersberg |
| Gene Quant II Spektrophotometer mit 5 mm Quarz UltramicroKüvetten | Pharmacia Biotech, Cambridge, England |
| Kryostat, Frigocut 2700 | Reichert-Jung, Nußloch |
| OneDScan | Scanalytics/CSDI, Fairfax, Virginia, USA |
| GEArray Analyzer, Version 1.3 | Super Array, Stanford, USA |
| ScanAlyze Version 2.35 | Super Array, Stanford, USA |
| UV-Leuchtschirm Typ OJ II | Victor Recker, Berlin |
| FotoFinish Zsoft 3.0 | World Star, Georgia, USA |

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) in analytischer Qualität bezogen. Die Hersteller spezieller Reagenzien werden bei der Beschreibung der jeweiligen Methode gesondert erwähnt.

2.1.3 Kits

Proteinbiochemie

Western Lightning Kit

Perking Elmer, Rodgau - Jügesheim

Plus One 2-D Quant Kit

Amersham Biosciences, Freiburg

Ready Prep 2-D Cleanup Kit

BioRad, München

Molekularbiologie

| | |
|-------------------------------|----------------|
| RNeasy Mini Kit | Qiagen, Hilden |
| MinElute PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden |
| QantiTect SYBR Green PCR Kit | Qiagen, Hilden |

2.1.4 Versuchstiere

Es wurden 25 bis 30 g schwere, männliche C57B1/6-Mäuse sowie 25 bis 28 g schwere, männliche nNOS-knockout-Mäuse aus eigener Zucht verwendet. Der nNOS-knockout-Stamm wurde von den Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) bezogen und initial von Huang und Mitarbeitern gezüchtet (Huang et al., 1993). Die gesunden Tiere waren 3 bis 5 Monate alt und wurden bei einer Raumtemperatur von 22 ± 5 °C, 40-60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Sie erhielten „altromin“-Haltungsfutter (Altromin, Lage) sowie Leitungswasser *ad libitum*.

2.2 Methoden**2.2.1 Tierexperimente**

Die Tierexperimente sind im Tierversuchsvorhaben G 0239/02 vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LaGetSi) genehmigt und unter Einhaltung der Tierschutzrichtlinien durchgeführt worden.

Die Mäuse wurden durch Injektion von 0,016 ml pro g Körpergewicht Narcoren (Merial GmbH, Halbergmoos) getötet und der EDL sowie der TA beidseits entnommen. Für die folgenden proteinchemischen und molekularbiologischen Arbeitsschritte wurden die Muskeln in flüssigem Stickstoff blitzgefroren und falls erforderlich bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2 Herstellung eines Muskelpulvers zur Probenextraktion

Die gefrorenen EDL und TA-Muskeln wurden jeweils unter Zugabe von flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser zu Muskelpulver zerstoßen.

2.2.3 Proteinanalytische Methoden

2.2.3.1 Gewinnung von Proteinextrakten für SDS-PAGE

Extraktionspuffer (bezogen auf 5 ml)

| Stammlösung in mM | Endkonzentration in mM | Volumen in μ l |
|-----------------------------------|------------------------|---|
| PBS 150 | 148 | 4915 |
| CaCl 1 | 0,001 | 5 |
| PMSF 100 | 1 | 50 |
| Proteinaseinhibitoren 10 mg/ml | 2 μ g/ml | je 10 (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A) |

Durchführung:

- (1) Präparation der EDL und Herstellung des Muskelpulvers.
Schritte (2) bis (6) wurden bei 4 °C durchgeführt
- (2) Zugabe von Extraktionspuffer zum Muskelpulver
- (3) Zellyse mit Ultraschallgerät dreimal 10 s mit einer Pause von etwa 30 s
- (4) Inkubation der Proben für 20 min auf Eis
- (5) Zentrifugation der Proben bei 20000xg für 15 min bei 4°C
- (6) Entnahme der Überstände
- (7) Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

2.2.3.2 Gewinnung von Proteinextrakten für 2D-PAGE

Extraktionspuffer (bezogen auf 20 ml)

| Stammlösung | Endkonzentration in | Volumen |
|--------------------------|---------------------|---|
| Harnstoff | 7 M | 8,84 g |
| Thioharnstoff | 2 M | 3,04 g |
| Chaps | 2 % | 0,4 g |
| IPG Puffer 3-10 | 1 % | 0,2 ml |
| DTT | 1 % | 0,2 g |
| PMSF | 1 mM | 200,0 μ l |
| Proteinaseinhibitoren | 2 μ g/ml | Je 40 μ l (Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A) |
| auf 20 ml mit Aq. bidest | | |

Durchführung:

- (1) Präparation der EDL und Herstellung des Muskelpulvers
Schritte (2) bis (6) wurden bei 4 °C durchgeführt
- (2) Zugabe von Extraktionspuffer zum Muskelpulver
- (3) Weitere Zellyse mit Ultraschallgerät dreimal 10 s mit einer Pause von etwa 30 s
- (4) Inkubation der Proben für 20 min auf Eis.
- (5) Zentrifugation der Proben bei 20000 x g für 15 min bei 4°C
- (6) Entnahme der Überstände
- (7) Reinigung der Probe von störenden Substanzen, z.B. DNA und RNA mittels ReadyPrep 2-D Cleanup Kit (BioRad, München) nach Firmenvorschrift. Dieser Schritt ist essentiell zur Vermeidung von so genanntem „Streaking“ auf den 2D-PAGE-Gelen.
- (8) Proteinkonzentrationsbestimmung mittels PlusOne 2-D Quant Kit (Amersham) gemäß Firmenvorschrift
- (9) gewünschte Proteinmengen mit Extraktionspuffer auf Gesamtvolumen von 300 µl bringen, optional Zusatz von Bromphenolblau zu den Proben

2.2.3.3 Proteinbestimmung

Die Methode nach Bradford (1976) basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine, in deren Folge eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbkomplexes auftritt (465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein). Die Steigerung der photometrisch bestimmbaren Absorption bei 595 nm gibt so Aufschluss über die Proteinkonzentration der Probelösung. Obwohl die Verschiedenheit der Farbgebung unterschiedlicher Proteine bei dieser Methode ebenso wie die Pipettierarbeit minimal ausfällt, ist doch zu beachten, dass starke Laugen sowie verwendete Detergenzien zu sehr ungenauen Ergebnissen führen. Aus diesem Grund wurde eine weitere Proteinbestimmungsmethode in Form des PlusOne 2-D Quant Kit (Amersham) benutzt, bei dessen vorschriftsmäßiger Verwendung das Protein der Proben zunächst ausgefällt wird, um die störenden Substanzen auszuschließen. Diese Methode beruht auf der direkten Bestimmung von freien Cu^{2+} -Ionen, die sowohl mit den Proteinen als auch mit einem vom Hersteller gelieferten Farbstoff reagieren. Der Cu^{2+} -Farbstoff-Komplex weist ein Absorptionsmaximum bei 492nm auf. Entsprechend wird die Absorption dieses Komplexes geringer, je größer die Proteinkonzentration ist.

2.2.3.4 Puffer und Lösungen für Proteinchemische Methoden

| <i>Lösung A</i> | <i>Lösung B</i> | <i>Lösung C</i> |
|------------------------------|---|---|
| 121,9 g Acrylamid (Fluka) | 18,15 g Tris | 12,1 g Tris |
| 3,13 g DAP (Fluka) | auf 100 ml mit Aq. bidest | auf 100 ml mit Aq. bidest |
| auf 250 ml mit Aq. bidest | (mit 10 N HCl auf pH 8,8 einstellen) | (mit 10 N HCl auf pH 6,8 einstellen) |

APS 10 %ig (w/v)

1,0 g Ammoniumpersulfat auf 10 ml mit Aq. bidest

*TEMED (Serva)**SDS 10 %ig (w/v)*

50 g Natrium-dodecylsulfat auf 500 ml mit Aq. bidest

PBS (Phosphate Buffered Saline)

| | | |
|---|--------|--------|
| NaCl | 8,77 g | 150 mM |
| KCl | 0,20 g | 3 mM |
| Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O | 1,15 g | 8 mM |
| NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O | 0,20 g | 1 mM |
| auf 1 l mit Aq. bidest (mit 10 N HCl auf pH 7,2 einstellen) | | |

| <i>Laufpuffer 1 (Kathodenpuffer)</i> | <i>Laufpuffer 2 (Anodenpuffer)</i> |
|---|--------------------------------------|
| 17,92 g Tricin | 48,44 g Tris |
| 12,11 g Tris | auf 2,0 l mit Aq. bidest |
| 10,0 ml SDS einer 10 %igen Stammlösung | (mit 10 N HCl auf pH 8,9 einstellen) |
| auf 1,0 l mit Aq. bidest | |

2.2.3.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) können unter Standardbedingungen Peptide unter 10 kDa nicht mehr aufgetrennt werden. Wenn Tricin statt Glycin als Leition verwendet wird, können dagegen kleine Peptide besser aufgelöst werden, ohne die Acrylamidkonzentration erhöhen zu müssen. Die Tris-Tricin-Gelelektrophorese wurde nach Schagger und von Jagow (1987) durchgeführt.

Probenpuffer (1x)

50 mM NaP pH 7,0

100 mM DTT

2 % SDS

10 % Glycerol

0,1 % Bromophenolblau

Gelansätze (für 2 Gele):

| | <i>Trenngel</i> (20ml) | | | | <i>Sammelgel</i> (10 ml) |
|-----------------|---------------------------|------|-----|-----|-----------------------------|
| | 8% | 10% | 12% | 14% | 5% |
| Lösung A (ml) | 3,2 | 4,0 | 4,8 | 5,6 | 1,0 |
| Lösung B (ml) | 5,0 | 5,0 | 5,0 | 5,0 | |
| Lösung C (ml) | | | | | 1,3 |
| APS 10% (µl) | 200 | 200 | 200 | 200 | 100 |
| TEMED (µl) | 8,0 | 8,0 | 8,0 | 8,0 | 10,0 |
| Aq. bidest (ml) | 11,4 | 10,6 | 9,8 | 9,0 | 7,5 |
| SDS 10% (ml) | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 100 |

Laufbedingungen:

Gele: 9 x 8 cm; 0,75 und 1,0 mm

Es werden 60-90 V benötigt, solange sich die Proben im Sammelgel befinden, dann 120-150 V, bis die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht.

Marker zur Bestimmung des Molekulargewichtes: All Blue Mark von Biorad, Mr in kDa:
250; 150; 100; 75; 50; 37; 25; 20; 15; 10.

Durchführung:

Für die SDS-PAGE wurde den Proteinextrakten 5fach-Probenpuffer zugegeben, bis eine Verdünnung auf 1,5-fach Probenpuffer erreicht wurde. Anschließend folgte eine Inkubation der Proben für 15 min bei 65°C.

2.2.3.6 Western-Blotting

Beim Western-Blotting werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran überführt. Nitrozellulosemembranen finden insbesondere Anwendung bei nachfolgender Immundetektion, während PVDF-(Polyvinylidendifluorid) Membranen, die chemisch resistent sind, als Trägermedium für eine nachfolgende chemische Analytik (Sequenzierung von Peptiden oder Analytik der Kohlenhydratstrukturen von Peptiden) Verwendung finden.

Das Blotting wurde in Anlehnung an Towbin et al. (1979) und im Tank-Blot-Verfahren oder Semi-Dry-Blot (Kyhse-Andersen, 1984) durchgeführt.

Der Vorteil des Semi-Dry-Blots beruht in der geringen Menge an verwendetem Transferpuffer und kurzen Übertragungszeiten. Proteine über 200 kDa lassen sich nur unzureichend mit dieser Methode darstellen.

Nach dem Transfer aus PAGE-Gelen auf Blot-Matrices sind die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine immunologischen Nachweisen durch Verwendung von spezifischen Primärantikörpern zugänglich. Die Primärantikörper, die an die auf der Nitrozellulose immobilisierten Antigene gebunden haben, werden dann in einem zweiten Schritt durch spezies-spezifische Sekundärantikörper erkannt, an die ein Enzym (z.B. Peroxidase) kovalent gekoppelt ist. Durch Inkubation mit einem geeigneten Substrat kann dieses Enzym und somit der gesamte Immunkomplex visualisiert werden (Immunblot). Ein sehr empfindliches Substrat ist das Luminolreagenz, das bei der katalytischen Umsetzung durch die Peroxidase chemoluminiszierende Lichtblitze ausstrahlt, deren Energie dazu ausreicht, Röntgenfilme zu schwärzen.

Transferpuffer

| | | |
|--------------------------|--------|------------|
| Tris | 3 g | 25 mM |
| Glycin | 11,2 g | 150 mM |
| Methanol | 100 ml | 10 % (v/v) |
| auf 1,0 l mit Aq. bidest | | |

Waschpuffer:

0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS, pH 7,2

Blockierungspuffer:

5 % (w/v) Trockenmilch (Glücksklee, bezogen durch Reichelt, Berlin) in Waschpuffer

Verwendete Antikörper:

| | Verdünnung | Sekundärantikörper* | Verdünnung |
|---------------------------------|------------|----------------------|------------|
| Anti-HO-3 *** | 1:500 | Ziege-Anti-Kaninchen | 1:5000 |
| Anti-HO-1(StressGen, Kanada) | 1:500 | Ziege-Anti-Kaninchen | 1:5000 |
| Anti-nNOS (Sigma, München) | 1:10000 | Ziege-Anti-Kaninchen | 1:5000 |
| Anti-eNOS (BD, Germany) | 1:2000 | Kaninchen-Anti-Maus | 1:5000 |
| Anti-iNOS (BD, Germany) | 1:2000 | Kaninchen-Anti-Maus | 1:5000 |
| Anti-PRDX6 ** | 1:5000 | Ziege-Anti-Kaninchen | 1:5000 |

* Sekundäre Antikörper wurden von der Firma Dako (Dänemark) bezogen.

** Arbeitsgruppe von Prof. Aaron Fisher, University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia

*** peptidspezifisches Antiserum gegen die Sequenz: NH₂-KETQPVPFTREC-CONH₂
Pineda Antikörper Service, Berlin

Transferbedingungen:

Gele 9 × 8 cm : 0,75 und 1,0 cm dick

Stromstärke (mA) : 250

Spannung (V) : variabel

Durchführung:

- (1a) Äquilibrieren der Nitrozellulose-Membran (Schleicher und Schüll, 0,45 µm Porengröße) in Transferpuffer für 10 min.
- (1b) PVDF-Membran (BioRad) für 5 min in Methanol p.A. inkubieren, anschließend für 10 min in Transferpuffer inkubieren.
- (2) Zusammensetzung des „Blot-Sandwich“ (luftblasenfrei), das SDS-Gel befindet sich auf der kathodischen Seite.
- (3) Elektrophoretischer Transfer (Blotkammer im Eisbad)

- (4) Entweder direkt nach dem Proteintransfer oder nach Entfärbung der Ponceau-Färbung wurde die Nitrozellulose mit Blockierungspuffer bei 4°C über Nacht inkubiert.
- (5) Am nächsten Tag erfolgte für eine Dauer von 2 Stunden die Inkubation mit dem ersten Antikörper, der in Blockierungspuffer verdünnt wurde.
- (6) Anschließend wurde der Blot 30 min (3 x 10 min) gewaschen, danach mit Peroxidase gekoppelten, mit Blockierungspuffer verdünnten Sekundärantikörper für eine Dauer von 45 min inkubiert.
- (7) Nach sorgfältigem Waschen (3 x 10 min) wurde der Blot auf eine Folie gelegt, mit Filterpapier getrocknet und unter Rotlicht für 1 min mit 1 ml Luminolreagenz (Western Lightning Kit, Perkin Elmer) bedeckt. Erneut wurde der Blot getrocknet und mit einer zweiten Lage Plastikfolie bedeckt, um anschließend unter schnellem Arbeiten auf Kodak XR-5-Film aufgelegt zu werden. Üblicherweise wurden mehrere Expositionszeiten durchgeführt, um das bestmögliche Verhältnis von Sensitivität und Auflösung/Hintergrund zu erreichen. Der Film wurde danach durch übliche phototechnische Methoden (Entwickler und Fixierer) entwickelt.

2.2.3.7 2 D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese wurde 1975 von Klose und O'Farrell unabhängig voneinander entwickelt und kombiniert die Auftrennung von Proteinen nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht in zwei unterschiedlichen Dimensionen.

Die Proteine werden zunächst durch hohe Konzentrationen (bis 10 M) von Harnstoff und Thioharnstoff (2.5 M) sowie nichtionische (Triton X-100, NP-40) bzw. zwitterionische (CHAPS) Detergenzien extrahiert und denaturiert, um ihre physiologische Ladung aufrechtzuerhalten. In der ersten Dimension bewegen sich die denaturierten Proteine bzw. Peptide so lange im elektrischen Feld entlang eines pH-Gradienten, bis ihre Nettoladung Null beträgt. Ist dieser stoffspezifische pH-Wert oder Isoelektrische Punkt erreicht, findet keine Bewegung mehr statt. Ursprünglich wurde mit mobilisierten pH-Gradienten gearbeitet, die erreicht wurden, indem sich die Träger-Ampholyte entlang der Gelröhren während der Elektrophorese verteilten. In der Anode befindet sich eine H₃PO₄-Lösung, während in der Kathode eine NaOH-Lösung vorliegt. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass der pH-Gradient vor allem im basischen Bereich nicht stabil ist, da sowohl die Ampholyte als auch die Proteine während der

erforderlichen langen Fokussierungszeit in die Kathode weiterwandern und somit in der Elektrodenlösung verloren gehen, was als kathodische Drift bezeichnet wird.

Aus Gründen der besseren Reproduzierbarkeit wurden für die isoelektrische Fokussierung immobilisierte pH-Gradientenstreifen (IEF-Streifen) verwendet (nach Görg et. al, 1985). Hierbei liegen die Ampholyte nicht frei in einer Lösung vor, sondern sind kovalent in einer Polyacrylamidmatrix gebunden. Auf diesem Wege wird zusätzlich die Möglichkeit eröffnet, Ampholytgradienten zu nutzen, die linear oder nicht linear angeordnet sind.

Nach dieser Auftrennung werden die Streifen in einem SDS-DTT-Puffer inkubiert, wobei das SDS in einem konstanten stöchiometrischen Verhältnis mit den Proteinen sogenannte negativ geladene Micellen bildet, die eine weitere elektrische Trennung der Proben ermöglichen.

DTT wirkt reduzierend und verhindert eine Interaktion der einzelnen Peptide.

Damit sind alle Bedingungen geschaffen, um die Proteine in der nun folgenden 2. Dimension nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Hierfür wird der IEF-Streifen auf das Gel der zweiten Dimension unter Abschluss durch Agarosegel übertragen.

1. Dimension (Isoelektrische Fokussierung)

IEF-Streifen: immobilisierte, nichtlineare Streifen pH 3-10 (Amersham)

Durchführung:

- (10) Die Proben wurden durch die Methode der „in gel rehydration“ (Rehydrierung bzw. Sättigung des IEF-Streifen mit der Probenlösung) über Nacht bei Raumtemperatur im „Rehydration/Equilibration Tray“ (BioRad) nach erfolgter Mineralölüberschichtung (Dry Strip Cover Fluid, Amersham) der Streifen aufgetragen.
 - (11) Am nächsten Tag: Vorbereitung der IEF-Kammer (Pharmacia) gemäß Firmenvorschrift
 - (12) Übertragung der IEF-Streifen auf das Gerät; Fokussierung mit ca. 53,3 kWh bei 20°C
 - (13) Nach Abschluss der Elektrophorese: Aufbewahrung der Streifen bei -80°C
- Programmierung des Gerätes:

| | | | |
|---------|---------|---------|---------|
| 1. Set: | 2. Set: | 3. Set: | 4. Set: |
| 500 V | 500 V | 3500 V | 3500 V |
| 5 W | 5 W | 5 W | 5 W |
| 1 mA | 1 mA | 1 mA | 1 mA |
| 1 min | 5 h | 5 h | 9,5 h |

2. Dimension: Das Medium stellt ein lineares Gradientengel von 7-14 % Polyacrylamid dar, was einen theoretischen Trennbereich von 200-12 kDa gewährleistet.

Gelansätze (für 6 Gradientengele 7-14 %; Spacers: 1mm; für Ettan Dalt Six Kammer, Amersham)

| | 7% | 14% |
|------------------|-------|------|
| Lösung A (ml) | 32,2 | 60,2 |
| Lösung B (ml) | 57,6 | 53,8 |
| SDS 10% (ml) | 2,4 | 2,2 |
| Aq. bidest (ml) | 135,4 | 78,0 |
| Glycerol (ml) | 0,0 | 18,5 |
| APS 10% (ml) | 2,4 | 2,2 |
| TEMED (μ l) | 92 | 86 |

Gelansätze (für 2 Gradientengele 7-14%; Spacers: 1mm; für Protean II xi cell, BioRad)

| | 7% | 14% |
|--------------------|------|-------|
| Lösung A (ml) | 5,32 | 10,64 |
| Lösung B (ml) | 9,5 | 9,5 |
| SDS 10% (μ l) | 380 | 380 |
| Aq. bidest (ml) | 22,2 | 17 |
| APS 10% (μ l) | 380 | 380 |
| TEMED (μ l) | 21 | 14 |

Displacing solution (für 100 ml)

| | |
|-------------------------------------|--------------------|
| Tris HCl pH 8,8 0,375 M | 25 ml der Lösung B |
| Glycerol 50% | 50 ml |
| Bromophenolblau | 2 mg |
| mit Aq. bidest auf 100 ml auffüllen | |

IEF-Streifen Lösung: (für 250 ml)

| | |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| Harnstoff 6 M | 90,1 g |
| Glycerol 30 % | 75,0 g |
| SDS 2 % | 50 ml einer 10% igen Stammlösung |
| Tris HCl pH 8,8 0,05 M | 8,3 ml der Lösung B |
| mit Aq. bidest auf 250 ml auffüllen | |

Agaroselösung: (für 100 ml)

| | |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| Agarose 0,5 % | 0,5 g |
| Tris HCl pH 8,8 0,375 M | 25 ml der Lösung B |
| SDS 0,1 % | 1 ml der 10 %igen Stammlösung |
| Bromophenolblau 0,001 % | 10 mg |
| Mit Aq. bidest auf 100 ml auffüllen | |

Durchführung:

- (14) In verschließbaren Glasröhren (BioRad) erfolgt unter ständigem Schütteln und Lichtabschluss die 15 min Inkubation der IEF-Streifen mit jeweils 10 ml IEF-Streifenlösung mit einem Zusatz von 100 mg DTT pro 10 ml Lösung.
- (15) Nach dem Dekantieren der Lösung aus den Glasröhren und Zugabe von jeweils 10 ml IEF-Streifenlösung mit Zusatz von 400 mg Iodacetamid pro 10 ml Lösung erfolgt abermals eine 15 min Inkubation unter Lichtabschluss und ständigem Schütteln.
- (16) IEF-Streifen aus Glasröhren entnehmen, auf Filterpapier abtropfen lassen.
- (17) IEF-Streifen und Filterpapierstücke mit Molekulargewichtsmarker auf Gradientengele übertragen und luftblasenfrei mit Agaroselösung überschichten.
- (18) Durchführung der Elektrophorese nach Schägger und von Jagow (1987) mit Laufpuffer 1 (Kathodenpuffer) und Laufpuffer 2 (Anodenpuffer).

Marker zur Bestimmung des Molekulargewichtes: (AppliChem, Darmstadt; Mr in kDa)

Protein Marker 2 prestained (200,0; 116,0; 68,0; 43,0; 29,0; 20,0; 14,4; 6,5)

Protein Marker 3 (200,0; 116,0; 68,0; 43,0; 29,0; 20,0; 14,4; 6,5)

Laufbedingungen:

Protean II xi cell, BioRad; 2 Gele (18,5 cm × 19 cm, Spacer 1mm):

Stromstärke: 20 mA/Gel

Spannung: variabel

Elektrophorese über Nacht bei 20°C ; Elektrophorese dauer: 13-15 h

Ettan Dalt Six Kammer, Amersham; 6 Gele (20,0 cm × 20,0 cm, Spacer 1mm)

Stromstärke: 16 mA/Gel

Spannung: variabel

Elektrophorese über Nacht bei 20°C ; Elektrophorese dauer: 14-16 h

2.2.3.8 Färbung von PAGE-Gelen mit kolloidalem Coomassie-Blau G-250

Coomassie-Blau färbt fast alle Proteine und zwar bindet der Farbstoff an basische sowie aromatische Aminosäuren. Die Färbung mit kolloidalem Coomassie-Blau erzeugt praktisch keinen Hintergrund und weist eine relativ hohe Sensitivität auf (20-30 ng pro Bande). Des Weiteren ist diese Färbemethode sehr geeignet zur Identifikation von Proteinen mittels Massenspektrometrie.

| <i>Fixierlösung</i> | | <i>Färbelösung (2 l für 4 Gele)</i> | |
|-------------------------|---------|-------------------------------------|--------|
| 2 % (w/v) Phosphorsäure | 47 ml | 2 % (w/v) Phosphorsäure | 47 ml |
| 50 % (v/v) Methanol | 1000 ml | 17 % (w/v) Ammoniumsulfat | 340 g |
| in Aq. bidest | | 34 % (v/v) Methanol | 680 ml |
| | | 0,066% (w/v) Coomassie-Blau G-250 | 1,32 g |
| | | mit Aq. bidest auf 2 l auffüllen | |

Entfärber

Aq. bidest

Durchführung:

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für mindestens 4 h in der Fixierlösung und anschließend 4 bis 5 Tage in der Färbelösung geschüttelt. Eine vollständige Entfärbung wurde durch Schütteln des Gels in Aq. bidest für 2 h erreicht, wobei das Wasser alle 30 min gewechselt wurde.

2.2.3.9 Silberfärbung von PAGE-Gelen

Die Silberfärbung ist die empfindlichste Methode zur Detektion von Proteinen in Elektrophoresegelen mit einer Nachweisgrenze von mindestens 1 ng pro Bande oder 50-100 pg je mm² pro Spot. Sie wurde in abgewandelter Form nach Shevtchenko (1996) durchgeführt. Die Bindungsreaktion der Silberionen mit den entsprechenden Zielstrukturen, wie Proteine oder DNA findet auf der Geloberfläche statt. Dabei werden die Silberionen in Anwesenheit von Formaldehyd unter Bildung eines aus Silbersulfid bestehenden braunen Präzipitats reduziert. Der größte Nachteil dieses Verfahrens liegt in der Inkompatibilität mit massenspektrometrischen Analysen der Proteine.

| | |
|--|---|
| <i>Fixierlösung</i> 40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure in Aq. bidest | <i>Waschlösung</i> 30 % (v/v) Ethanol in Aq. bidest |
|--|---|

| | |
|--|---|
| <i>Sensitizer</i> 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat in Aq. bidest | <i>Silbernitratlösung</i> 0,15 % (w/v) Silbernitrat in Aq. bidest |
|--|---|

| | |
|---|--|
| <i>Entwickler</i> 2 % (w/v) Natriumcarbonat 0,0005 % Natriumthiosulfat 0,04 % (v/v) Formaldehyd in Aq. bidest | <i>Stoplösung</i> 0,5 % (w/v) Glycin in Aq. bidest |
|---|--|

Durchführung:

- (1) Fixieren des Gels für mindestens 4 h in Fixierlösung
- (2) Waschen des Gels in Waschlösung zweimal für 20 min

- (3) Waschen des Gels in Aq. bidest dreimal für 30 min
- (4) Inkubation des Gels für 1 min in Sensitizer Lösung
- (5) Waschen des Gels in Aq. bidest dreimal für 20 s
- (6) Inkubation des Gels in Silbernitratlösung für 20 min bei 4°C
- (7) Waschen mit Aq. bidest dreimal für 20 s
- (8) Entwicklung: Inkubation des Gels mit Entwickler für 3-5 min
- (9) Waschen mit Aq. bidest zweimal für 30 s
- (10) Stop: Inkubation des Gels in Stopplösung

2.2.3.10 Färbung von Blot-Matrices mit Ponceau-Rot

Die Färbung von Blot-Matrices mit Ponceau-Rot dient zur Überprüfung des Ergebnisses des elektrophoretischen Transfers von Proteinen aus SDS-PAGE-Gelen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen (Salinovich und Montelaro, 1986). Diese Färbung ist reversibel.

Ponceau-Rot-Färbelösung (Sigma, München)

Entfärber

5 % (v/v) Essigsäure
in Aq. bidest

Durchführung:

- (1) Blotmembran für 5 min in Ponceau-Rot-Färbelösung inkubieren
- (2) Entfärbung der Blotmembran unter mehrmaligem Wechsel von Entfärber, rot angefärbte Proteinbanden werden sichtbar (Markieren der Banden des Molekulargewichtsstandards)
- (3) vollständige Entfärbung der Blotmembran mit PBS

2.2.3.11 Auswertung der Gele mit PD-Quest

Nach abgeschlossener Silberfärbung erfolgte die softwaregestützte Auswertung der zweidimensionalen Gele. PD-Quest Version 7.0 der Firma BioRad ist eine Software, die neben der Aufnahme und Digitalisierung von 2D-Gelen eine Detektion der einzelnen Spots mit anschließendem Vergleich der Gelbilder und Aufbau einer Bilddatenbank ermöglicht. Die Arbeitsgrundlage bilden ein PC (Pentium 4) mit Windows 2002 Betriebssystem sowie ein Scanner Scanmaker 9800XL der Firma Microtek.

1. Digitalisierung der 2D-Gele

Das Einscannen der 2D-Gele erfolgt im Transmissionsmodus (als „Dia-Vorgabe“ wählbar) bei 300 dpi als 16 bit Graustufenbilder, die als *.tif Formate in das Analyseprogramm importiert werden. Die Abbildungen können nun vielfältig bearbeitet werden. Genaues Zuschneiden und Rotieren der Bilder schafft ebenso wie die Entfernung von graphischen Artefakten durch Auswahl entsprechender Filtertypen eine Erhöhung der Analysequalität.

2. Spot-Erkennung

Die Funktion des „Spot Detection Wizard“ ermöglicht nun dem Benutzer durch manuelles Markieren des je schwächsten und kleinsten Punktes sowie des dichtesten Spotclusters die Definition eines Proteinspots auf den 2D-Gelen. Durch weitere Variation der Messsensitivität und der Angabe bezüglich qualitätsmindernder Effekte wie „Streaking“ wird ein Parameter-Set erstellt, nach welchem alle Gele der Untersuchungsreihe der Spoterkennung zugeführt und Störerscheinungen minimiert werden.

Es handelt sich um eine densitometrische Bestimmung, wobei die Dichtewerte der Graustufen entsprechend der manuellen Festlegung als Spots oder Hintergrund ermittelt werden. Nach Subtraktion der Hintergrundwerte ergibt sich für jeden Punkt ein Zahlenwert, der als Spot „Quantity“ bezeichnet wird und neben weiteren Informationen wie Spot „Quality“ (Form und Grenzen des Punktes; Angabe in Prozent) sowie der Spotlokalisierung im Gel als Punktinformation abrufbar ist.

3. Matching und Analyse

Den nächsten Schritt bildet ein Gelvergleich innerhalb eines „Matchsets“, bei dem deckungsgleichen Spots in allen Gelen übereinstimmende Nummern zugewiesen werden. Diese automatisch erkannten Punkte sind grün gekennzeichnet, nicht erkannte hingegen rot.

Sind gleiche Punkte in allen Gelen vorhanden, aber nur in einigen erkannt worden, ist eine manuelle Anpassung möglich.

Um eine Aussage über die Intensität eines Spots in verschiedenen Gelen treffen zu können, müssen diese zuvor „normalisiert“ werden.“ Normalisierung“ bedeutet, dass die Pixelanzahl eines einzelnen Spots durch die Gesamtmenge aller im Gel vorhandenen Pixel geteilt wird. Dabei werden z.B. höhere rohe Spotquantitäten, die eventuell auf

Abweichungen im Färbevorgang beruhen, auf den gleichzeitig auch vorliegenden höheren Hintergrund bezogen und somit relativiert.

Das Programm bietet zahlreiche Analysemöglichkeiten, die von statistischen Punktvergleichen individuell angelegter Spotsets über eine Darstellung der Spotquantitäten in Form von Histogrammen reichen.

2.2.3.12 Massenspektroskopie von Proteinen und Peptiden

Seit den 60er Jahren ist mit Hilfe von Massenspektrometern eine Massenbestimmung und Strukturaufklärung von flüchtigen molekularen Stoffen möglich. Hierbei wird der Dampf der zu analysierenden Probe mit Elektronen beschossen (70 eV), die zu einem Aufbrechen von Molekülbindungen und somit zur Ionisation der Fragmente führen. Die nachfolgende Ablenkung im magnetischen Feld hängt von Ladung und Masse der Ionen ab. So kann bei bekannter Teilchenladung das Molekulargewicht eines Stoffes ermittelt werden.

Proteine und Peptide sind sehr große, geladene und nicht flüchtige Moleküle, die durch den Einsatz von „matrix-assisted laser-desorption ionization“ (MALDI) bestimmt werden können.

Dieses Verfahren wurde Ende der 80er Jahre von Franz Hillenkamp (1991) entwickelt und beruht auf dem Einbau von Proteinen in Kristalle, die im Hochvakuum durch Pulse eines UV oder IR-Lasers Proteinionen freisetzen können. Die kristallbildenden Moleküle wie z.B. Gentisinsäure, Sinapinsäure, die fähig sind, Protonen auf Proteine zu übertragen, um sie positiv zu laden, und darüber hinaus UV-Licht absorbieren, werden auch als Matrix bezeichnet.

Die nun in der Gasphase vorliegenden Proteinionen werden in einem elektrischen Feld beschleunigt und erhalten in Abhängigkeit von Masse und Ladung eine spezielle Geschwindigkeit:

$$v \sim 1/\sqrt{m/Q}$$

v...Geschwindigkeit der Teilchen

m... Masse der Teilchen

Q... Ladung der Teilchen

Die Geschwindigkeit der Proteinionen kann mit Hilfe eines Flugzeitanalysators oder TOF (time of flight) bestimmt werden. Es handelt sich um eine feldfreie Vakuumröhre, in der alle Ionen die gleiche Strecke zurücklegen, jedoch entsprechend ihrem Masse/Ladungsverhältnis zu unterschiedlichen Zeiten am Ende der Röhre auf den

Detektor treffen. Ein MALDI-TOF bestimmt innerhalb von Minuten die Masse eines Proteins mit einer Abweichung der Genauigkeit von 0,1 bis 0,001 Promille.

Dieses Verfahren dient in besonderer Weise der Identifizierung von unbekanntem Proteinen, z.B. in 2D-Gelen. Die Proteine werden mit Proteasen verdaut und die Molekularmasse/Ladungsverhältnisse der Peptide bestimmt, die nun in Datenbanken (z.B. SwissProt, EMBL, Heidelberg) einem Vergleich unterzogen werden. In der Regel reicht die Kenntnis von fünf Peptiden aus, um ein Protein zu identifizieren.

Die Schaltung zweier bzw. mehrerer Massenspektrometer in Reihe ermöglicht die weitere Analyse von Peptidionen durch Tandem-MS bzw. MS/MS. Nach Erzeugung und Detektion von Peptidionen wird in einem nachgeschalteten Analysator ein Peptid isoliert, das in einer Kollisionskammer mit einem Edelgas (Ar) fragmentiert wird. Die Massen/Ladungsverhältnisse der entstandenen Fragmente werden dann von einem dritten Analysator ermittelt.

Durch Tandem-MS kann die Sequenz von Peptiden indirekt bestimmt werden. Die sequentielle Peptidfragmentierung erzeugt eine Reihe von Bruchstücken, die sich jeweils im Massen/Ladungsverhältnis einer Aminosäure unterscheiden. Da dieses für jede mögliche Aminosäure bekannt ist, kann das isolierte Peptid in seiner Primärsequenz aufgeklärt werden.

Zur Erhöhung der Nachweissensitivität komplexer organischer Stoffgemische ist es des Weiteren möglich, verschiedene Techniken mit der Massenspektrometrie zu kombinieren, wie z.B. bei der LC-MS/MS. Hierbei wird eine analytische HPLC (High Performance Liquid Chromatographie) dem Massenspektrometer vorgeschaltet. Dieses Auftrennungsverfahren beruht auf spezifischen chemischen Wechselwirkungen eines Stoffes mit einer Säulenmatrix und führt so zu einer Anreicherung der gewünschten Analyte. Das entstandene Säuleneluat wird direkt in das Massenspektrometer überführt. Auf diese Weise erfolgte die Identifikation aller in dieser Dissertation dargestellten Proteine, wobei die LC-Tandem-Massenspektrometrie der Proben von der Arbeitsgruppe um Manfred Heller (Department of Clinical Research, Inselspital-University Hospital of Bern, CH-3009 Bern) durchgeführt wurde. Bei den überreichten Proben handelte es sich um „ausgestanzte“, in 30 % Ethanollösung gelagerte Proteinspots, die zuvor mittels PD-Quest auf den Coomassie gefärbten, mit 500 µg Protein beladenen 2D-Gelen ermittelt wurden.

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Puffer und Lösungen

| | | | | |
|--------------------------------------|----------|---------------------------------------|--------|--|
| <i>Ladepuffer 5x (RNA):</i> | | <i>FA Puffer</i> | | <i>DEPC-Wasser</i> |
| FA Puffer 10-fach | 2,0 ml | MOPS | 41,9 g | 1% DEPC in Aqua bidest; über Nacht schütteln zweimal für 50 min bei 1 bar autoklavieren |
| Formaldehyd 37% | 360,0 µl | Na-Acetat 3H ₂ O | 6,8 g | |
| Glycerol 100% | 1,0 ml | EDTA 0,5 M | 20,0ml | |
| Formamid | 1,6 ml | mit DEPC-H ₂ O auf 1000 ml | | |
| EDTA 0.5 M pH 8.0 | 40,0 µl | | | |
| Xylencyanol Lösung | 8,0 µl | | | |
| Bromophenol Blau Lsg. | 8,0µl | | | |
| mit DEPC-H ₂ O auf 5,0 ml | | | | |

| | | | |
|-----------------|-------|----------------------------|--------|
| <i>TBE 10 x</i> | | <i>Ladepuffer 6x (DNA)</i> | |
| Tris | 89 mM | Ficoll | 10% |
| Borsäure | 8,9 M | Tris | 1 M |
| EDTA | 25 mM | EDTA | 500 mM |
| | | Bromophenolblau | 1% |
| | | Xylencyanol | 1% |

2.2.4.2 RNA-Isolierung

Der entscheidende Schritt bei der Isolierung von RNA aus lebenden Zellen ist der zügige Zellaufschluss, bei welchem endogene Ribonukleasen möglichst vollständig inaktiviert werden müssen, um der Zerstörung der zellulären RNA entgegenzuwirken. Eine übliche Methode ist die Verwendung von Zellaufschlusspuffern, die chaotrope Salze wie z.B. Guanidiniumisothiocyanat (GITC) enthalten (Chomczynski und Sacchi 1987). Durch dieses potente Denaturierungsmittel werden nicht nur die zellulären Ribonukleasen inaktiviert, sondern auch die Zellmembran, der Kern und zelleigene Organellen aufgeschlossen.

Die Gesamt-RNA wurde mittels des RNeasy-Kits von Qiagen (Hilden) gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert: Das Muskelpulver eines TA wurde unter Verwendung eines milden Detergens (600 µl RLT-Puffer) und β-Mercaptoethanol (1 Volumen β-Mercaptoethanol auf 100 Volumen RLT-Puffer) mittels eines Dounce-Homogenisators

lysiert, der zuvor über Nacht bei 200°C inkubiert worden war. Anschließend wurden je 300 µl Lysat mit 590 µl RNase-freiem Wasser und 20 µl Proteinase K versetzt und bei 55°C für 10 min inkubiert. Zur Abtrennung von Zellresten wurden die Proben bei 10000 × g 3 min bei 25°C zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das gewonnene Lysat wurde mit 450 µl 100% Ethanol gemischt und auf eine Trennsäule übertragen. Die Isolierung der RNA erfolgte mittels Säulenchromatographie: Beim Zentrifugieren der Probe in einer kleinen Trennsäule bei 8000 × g für 15 s adsorbiert freigewordene RNA an einer Silicagelmembran. Es folgte ein DNase-Verdau. Nach mehreren Waschvorgängen wurde die adsorbierte RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser ausgewaschen.

2.2.4.3 RNA-Konzentrationsmessung

Die Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA wurde photometrisch bestimmt. Es wurde die Absorption der Probe bei 260 nm (A₂₆₀) gemessen, was dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren entspricht. Da eine Absorption von 1,0 bei 260 nm eine RNA-Konzentration von 40 ng/µl bedeutet, lässt sich die RNA-Konzentration wie folgt berechnen:

$$\text{Konzentration [ng/µl]} = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Proteine besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm (A₂₈₀). Der Quotient aus A₂₆₀ und A₂₈₀ ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurepräparation und sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die zwischen bekannten Sequenzen liegen. Dabei wird der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang zunächst denaturiert, so dass an die resultierenden DNA-Einzelstränge bei niedrigerer Temperatur je ein komplementäres Oligonukleotid hybridisieren kann (annealing). Diese beiden Oligonukleotide dienen einer DNA-Polymerase als Primer, die vom 3'-Ende der Primer jeden Einzelstrang wieder zu einem Doppelstrang verlängert (Elongation). Durch erneute Denaturierung der nun doppelten Anzahl von DNA-Doppelsträngen kann unter Hybridisierung neuer Primermoleküle der Vorgang mehrfach wiederholt werden, so dass eine exponentielle Amplifikation des ursprünglichen DNA-Fragmentes (Template) erreicht wird. Um diese Zyklen wiederholen zu können, bedarf es einer thermostabilen DNA-Polymerase, die während

Denaturierungs- und Annealingphase nicht hitzeinaktiviert wird. Zu den thermostabilen DNA-Polymerasen gehören z.B. Taq- und Pfu-DNA-Polymerase, die aus den Bakterien *Thermus aquaticus* und *Pyrococcus furiosus* isoliert wurden. Die Reaktionsspezifität für das zu amplifizierende DNA-Fragment wird durch die Primersequenz erzielt.

4 µl (entsprechend 200 ng der ursprünglichen gesamt-RNA) der cDNA-Präparation wurden für die RT-PCR eingesetzt. Als negative Kontrolle wurde nicht umgeschriebene Gesamt-RNA (keine reverse Transkription) als Template für die PCR verwendet. Der PCR-Ansatz (50 µl) enthielt: 7.5 mM Tris-HCl, pH: 8,8; 2 mM (NH₄)₂SO₄; 1.5 µM MgCl₂; 1 µM Primer; 0.2 µM dNTP, 1 U Taq Polymerase. Um eine Verdampfung während der Reaktion zu vermeiden, wurde der Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Im Thermocycler wurden die Proben initial denaturiert (94°C, 5 min) und mit 35 Zyklen amplifiziert (94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 75 s). Zum Abschluss erfolgte eine Endelongation für 5 min bei 72°C.

2.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Qualität der isolierten RNA sowie der RT-PCR Fragmente zu überprüfen, wurde die Agarose-Elektrophorese angewendet. Die Agarose-Gelelektrophorese von DNA und RNA ermöglicht sowohl die analytische als auch die präparative Auftrennung von DNA- bzw. RNA-Molekülen im elektrischen Feld nach ihrer Größe. Die diesbezügliche Zuordnung wird mittels mitgeführter DNA-Längenstandards, so genannten Leitern, durchgeführt. Die elektrophoretische Mobilität der Nukleinsäuren im Gel verhält sich proportional zum negativen, natürlichen Logarithmus der Anzahl der Basenpaare des Moleküls. Weiterhin beeinflussen die Porengröße des Gels und die angelegte elektrische Spannung die innerhalb eines bestimmten Zeitraums zurückgelegte Strecke. Agarose ist ein lineares Polysaccharid, das bei Erwärmung in einem geeigneten Puffer (hier TBE-Puffer) und nachfolgender Abkühlung eine gelartige Polymermatrix bildet, deren Porengröße über die Agarosekonzentration beeinflusst werden kann. Die Darstellung der aufgetrennten Nukleinsäuren im Gel erfolgt durch Anfärbung mit einem intercalierenden Fluoreszenzfarbstoff wie z.B. Ethidiumbromid. Die Nukleinsäure-Anfärbung lässt sich mittels Transillumination mit ultraviolettem Licht (246 nm) sichtbar machen.

1-2 % Agarosegele wurden in speziell dafür vorgesehenen Kammern gegossen. Durch geeignete Kämmen wurden im Gel Taschen ausgespart, in welche die Proben

aufgetragen wurden. Nach Abkühlung wurde das polymerisierte Gel in einer Elektrophorese-Apparatur platziert und mit 1x TBE-Puffer überschichtet.

10,0 µl der PCR-Reaktion wurden mit 2,0 µl des 6-fach Ladepuffers vermengt und in die vorbereiteten Taschen geladen. Die Betriebsspannung betrug 80 Volt, die Laufzeit ca. 1 h. Die Gele wurden im Anschluss durch ein fünfminütiges Tauchbad in Aqua bidest. mit 0,5% Ethidiumbromid auf dem Wipptisch gefärbt. Nach einem weiteren fünfminütigen Tauchbad in Aqua bidest. erfolgte die UV-Transillumination und Erfassung der Banden mit einer Digitalkamera.

2.2.4.6 Herstellung externer Standards für die RTQ-PCR

Alternativ wurden cDNA-Amplifikate als externe Standards für die quantitative Real-Time PCR (RTQ-PCR) direkt aus dem PCR-Ansatz aufgereinigt. Hierzu wurden zunächst die zu untersuchenden mRNA-Moleküle differentiell exprimierter Proteine und ein konstant exprimiertes „Housekeeping“ Gen (hier GAPDH) mittels RT-PCR amplifiziert. Die errechnete Fragmentlänge wurde mittels DNA Leiter (100bp DNA Step Ladder, Promega, Mannheim) im Agarosegel verifiziert.

Die resultierenden PCR-Produkte wurden mittels eines Skalpell aus dem Ethidiumbromid gefärbten Gel ausgeschnitten, mit dem MinElute PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und die Konzentration photometrisch (260 nm) bestimmt.

Für die Erstellung der Standards wurde die Anzahl der Moleküle pro µl durch Verwendung der Formel:

Konzentration / (Basenpaarlänge x 660) x 6,022 x 10²³ = Anzahl der Moleküle /µl berechnet.

Für die Erstellung der Standardkurve wurde nachfolgend für jedes Gen eine Verdünnungsreihe von 10¹⁰ bis 10² Kopien/µl hergestellt.

2.2.4.7 Primerauswahl für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Suche wurden folgende Kriterien gewählt: ca. 200 - 500 bp Produktlänge, 18-21 bp Primerlänge, 58- 65°C „annealing“ Temperatur, 40 - 60% CG Gehalt. Verwendet wurde das Programm Primer3 (Version 1.1.4-1; URL: [by SourceForge](http://primer3.sourceforge.net/); Lizenzen: BSD, GPL). Primer3 ist ein Programm für das Design von flankierenden Oligonukleotiden für die DNA- Vervielfältigung.

Tabelle 1: Primersequenzen

| Gen | Primer | Primersequenz | Produktlänge |
|-----------------------|------------------|-----------------------------------|--------------|
| GAPDH | sense | 5`-GCA GTG GCA AAG TGG AGA TT-`3 | 900 |
| | antisense | 5`-CCC TGT TGC TGT AGC CGT AT-`3 | |
| | nested sense | 5`-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG-`3 | 223 |
| | nested antisense | 5`-ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA-`3 | |
| Prohibitin | sense | 5`-GTG GCG TAC AGG ACA TTG TG-3` | 307 |
| | antisense | 5`-AGC TCT CGC TGG GTA ATC AA-`3 | |
| | nested sense | 5`-CCT CAT CCC TTG GGT ACA GA-`3 | 178 |
| | nested antisense | 5`-ATC ATA GTC CTC GCC AAT GC-`3 | |
| Myoglobin | sense | 5`-AGA CCC AAT TGC TCA TCC AG-3` | 416 |
| | antisense | 5`-AAA GTC CCC GGA ATG TCT CT-3` | |
| | nested sense | 5`-CAC CCT GAG ACC CTG GAT AA-3` | 146 |
| | nested antisense | 5`-GCA GCA TGT TGT CCC TTC TT-3` | |
| Heat shock Protein 25 | sense | 5`-GAC TGG TAC CCT GCA CAC AG-3` | 563 |
| | antisense | 5`-TTG GCT CCA GAC TGT VTCA GA-3 | |
| | nested sense | 5`-GAA GAA AGG CAG GAC GAA CA-3 | 184 |
| | nested antisense | 5`-CGA AAG TAA CCG GAA TGG TG-3 | |
| Peroxiredoxin 3 | sense | 5`-ACG GAG TGC TGT TGG AAA GT-3` | 260 |
| | antisense | 5`-GGC CTA CTG ATG GAC CTT CTC-3` | |
| | nested sense | 5`-TCG TCA AGC ACC TGA GTG TC-3` | 157 |
| | nested antisense | 5`-GCT GTT GGA CTT GGC TTG AT-3` | |
| Peroxiredoxin 6 | sense | 5`-TCA TGG GGC ATT CTC TTT TC-3` | 237 |
| | antisense | 5`-AAG GTC CCT GCC CTT ATC AT-3` | |
| | nested sense | 5`-CCA GTG TGC ACC ACA GAA CT-3` | 162 |
| | nested antisense | 5`-CAA CTT TTC CGT GGG TGT TT-3` | |
| Superoxid-dismutase | sense | 5`-CCA GTG CAG GAC CTC ATT TT-3` | 292 |
| | antisense | 5`-GTT TAC TGC GCA ATC CCA AT-3` | |
| | nested sense | 5`-CGG ATG AAG AGA GGC ATG TT-3` | 146 |
| | nested antisense | 5`-TTG TTT CTC ATG GAC CAC CA-3` | |
| NDK B | sense | 5`-GGC CTC TGA AGA ACA CCT GA-3` | 216 |
| | antisense | 5`-CTG CCA ACT TGA ATG CAG AA-3` | |
| | nested sense | 5`-GCA GCA TTA CAT CGA CCT GA-3` | 165 |
| | nested antisense | 5`-ATG GTG CCT GGT TTT GAA TC-3` | |

2.2.4.8 Quantitative Realtime RT-PCR (qRT-PCR)

Grundlage der Echtzeit (realtime) PCR ist die Polymerase- Kettenreaktion. Im Unterschied zur konventionellen PCR wird jedoch das doppelsträngige

Amplifikationsprodukt in jedem Amplifikationszyklus am Ende der Elongationsphase mit Hilfe des interkalierenden Fluorophors SYBR Green quantifiziert. Damit ist der gesamte Verlauf der PCR sichtbar, so dass die bei der klassischen PCR nötige Optimierung der Zyklenzahl entfällt. Durch Amplifikation externer Standards lässt sich die Echtzeit-PCR darüber hinaus einfacher quantifizieren als die konventionelle PCR.

Eine RTQ-PCR Reaktion lässt sich in drei Abschnitte einteilen:

Frühphase (auch background-Phase)

Exponentielle Phase (auch log-Phase)

Plateau-Phase

In der Frühphase überwiegen vorerst die Hintergrundsignale. Sie wird abgeschlossen, wenn die Hintergrundfluoreszenz von den spezifischen Signalen des PCR-Produkts übertroffen wird. Die dazu notwendige Zyklenzahl ist abhängig von der Ziel-cDNA Konzentration im Reaktionsansatz. Durch die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz des Amplifikats die der Hintergrundstrahlung übersteigt bzw. den hierdurch definierten Schwellenwert übertrifft, ist der „Crossing Point“ definiert.

Der Frühphase folgt die exponentielle Phase (auch log-Phase), in welcher die DNA exponentiell amplifiziert wird. Die Steigung des Fluorogramms reflektiert die Amplifikationseffizienz (Eff), die sich mit folgender Formel berechnen lässt:

$$\text{Eff} = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$$

Die Quantifizierung mittels externer Standards ist bei exponentieller Amplifikation nach folgender Gleichung möglich (Wittwer et al. 2004):

$$K = T_0 E^{Cp}$$

K... Kopienzahl am Crossing Point

E... Amplifikationseffizienz

T₀... eingesetzte Kopienzahl

C_p... Crossing Point

Die Crossing Points verhalten sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der initial eingesetzten Kopienzahl. Durch den Einsatz externer Standards können bekannten Molekülkonzentrationen bestimmte Crossing Points zugeordnet werden. Durch die Darstellung der ermittelten Crossing Points (C_p) gegen die Kopienzahl (T₀) der Verdünnung lässt sich eine Standardkurve (Regressionsgerade) nach folgender Gleichung darstellen:

$$Cp = -(1/\log E) * \log T_0 + (\log K / \log E)$$

Die dieser Standardkurve zugrunde liegende Schwellenwertlinie (threshold line) wird nun benutzt, um Crossing Points bei der PCR von Proben mit unbekannter Templatemenge zu definieren. Diese Crossing Points entsprechen daher den ihnen durch die Standardkurve zugeordneten cDNA bzw. mRNA Ausgangskonzentrationen bzw. Kopiezahlen. Die beschriebenen Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Programmes Rotor Gene (Version 2000, Corbett Research, Australien).

Zur Darstellung der Amplifikate während der Echtzeit-PCR wurde als Fluorophor das nicht sequenzspezifische, DNA intercalierende SYBR-Green gewählt. In Lösung ist SYBR-Green nur gering fluoreszierend, emittiert jedoch ein starkes Signal nach Bindung an doppelsträngige DNA, wodurch das Amplifikat am Ende einer Elongationsphase quantifiziert werden kann (Morrison et al., 1998).

Für die qRT-PCR wurden „nested“ Primer verwendet, deren Zielsequenz innerhalb der als Standards verwendeten Amplifikate des jeweiligen Gens lagen und ein Produkt von ca. 150 bp generierten.

Als Template dienten die Verdünnungsreihen der cDNA-Standards sowie die cDNA aus den Muskeln der Versuchsgruppen. Der Reaktionsansatz enthielt als Template 1 µl der jeweiligen Verdünnungsreihe oder der jeweiligen RT, 4 µl der „nested“ Primer für das jeweilige Gen oder GAPDH (1.6 µM), 5 µl DEPC-Wasser und 10 µl Mastermix SYBR-Green (QantiTect SYBR Green PCR Kit, Qiagen, Hilden). Folgende Schritte wurden für den Real-Time Cycler (Rotor Gene 2000, Corbett Research, Australien) eingestellt:

Denaturierung: 95°C für 900 s („Hot start“: Aktivierung der Taq-Polymerasen)

Amplifizierung: 94°C für 15 s; 56°C für 30 s; 72°C für 75 s (45 Wiederholungen)

Endelongation: 50°C für 60 s

Schmelzkurve: 50°C bis 95°C je 5 s

Für jede der untersuchten Proben wurde die ermittelte Anzahl von mRNA-Molekülen mit dem entsprechenden Wert für das „housekeeping“ Gen GAPDH normiert

($\text{Testgen}_{\text{Kopienzahl}} / \text{GAPDH}_{\text{Kopienzahl}}$).

Weil bei Housekeeping Genen die Expression im Verhältnis zur Gesamt-RNA konstant ist, konnten so mögliche Konzentrationsunterschiede der verschiedenen cDNA-Proben sowie eventuelle Effektivitätsunterschiede der RT und der PCR ausgeglichen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der 2D-PAGE zur Auftrennung von Proteinen aus dem EDL

3.1.1 Bestimmung der optimalen Auftrennungsmenge

Mittels zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Proteine identifiziert, die im *M. extensor digitorum longus* (EDL) von C57- und nNOS knockout-Mäusen unterschiedlich exprimiert werden. Die Proben wurden zunächst durch eine isoelektrische Fokussierung (IEF) in einem IPG-Streifen (pH 3-10) und dann durch SDS-PAGE in einem 7-14% Gradientengel aufgetrennt. Zur quantitativen Darstellung des Proteinmusters wurden die Gele anschließend mit Silber gefärbt und nach digitaler Dokumentation (Flachbettscanner) densitometrisch analysiert. Zunächst wurde diejenige Proteinmenge ermittelt, bei deren Auftrennung eine möglichst große Anzahl von Proteinspots bei gleichzeitiger optimaler Trennschärfe nachweisbar war. Hierfür wurde eine Versuchsserie durchgeführt, in der die silbergefärbten Proteinmuster in Gelen nach 2D-PAGE mit 15 µg, 30 µg, 60 µg bzw. 90 µg Protein aus dem EDL einer nNOS knockout-Maus miteinander verglichen wurden (**Abb. 2a, b**).

Obwohl die vier Gele offensichtlich unterschiedlich stark mit Silber gefärbt waren, wiesen sie ein ähnliches Proteinmuster auf, was die hohe Reproduzierbarkeit der Methode belegte. Allerdings waren einige Spots aufgrund von Überladung insbesondere im Gel, das mit 90 µg Protein beladen worden war, zu stark angefärbt (etwa das 45 kDa große Aktin). Außerdem nahm mit der Proteinauftragsmenge offensichtlich auch der Hintergrund zu. Die EDL-Proteine wurden besonders gut im niedrigeren Molekulargewichts- (< 50 kDa) und neutral/sauren (pH < 8) pI-Bereich aufgetrennt, während sie im hochmolekularen und basischen Bereich verschmiert erschienen (Streaking). Dennoch waren im hochmolekularen Bereich (besonders in den 60 µg und 90 µg Gelen) Ketten von Proteinen zu identifizieren, die typisch für Glykosylierungsvarianten von Membranproteinen sind.

Bei einer Auftragsmenge von 15 µg Protein waren 415 Spots, bei 30 µg Protein 602 Spots, bei 60 µg Protein 822 Spots und bei 90 µg Protein 855 Spots nachweisbar. Offensichtlich nahm die Anzahl der Spots mit der Proteinauftragsmenge zu. Über 60 µg wurde jedoch ein Plateau erreicht (**Abb. 3**).

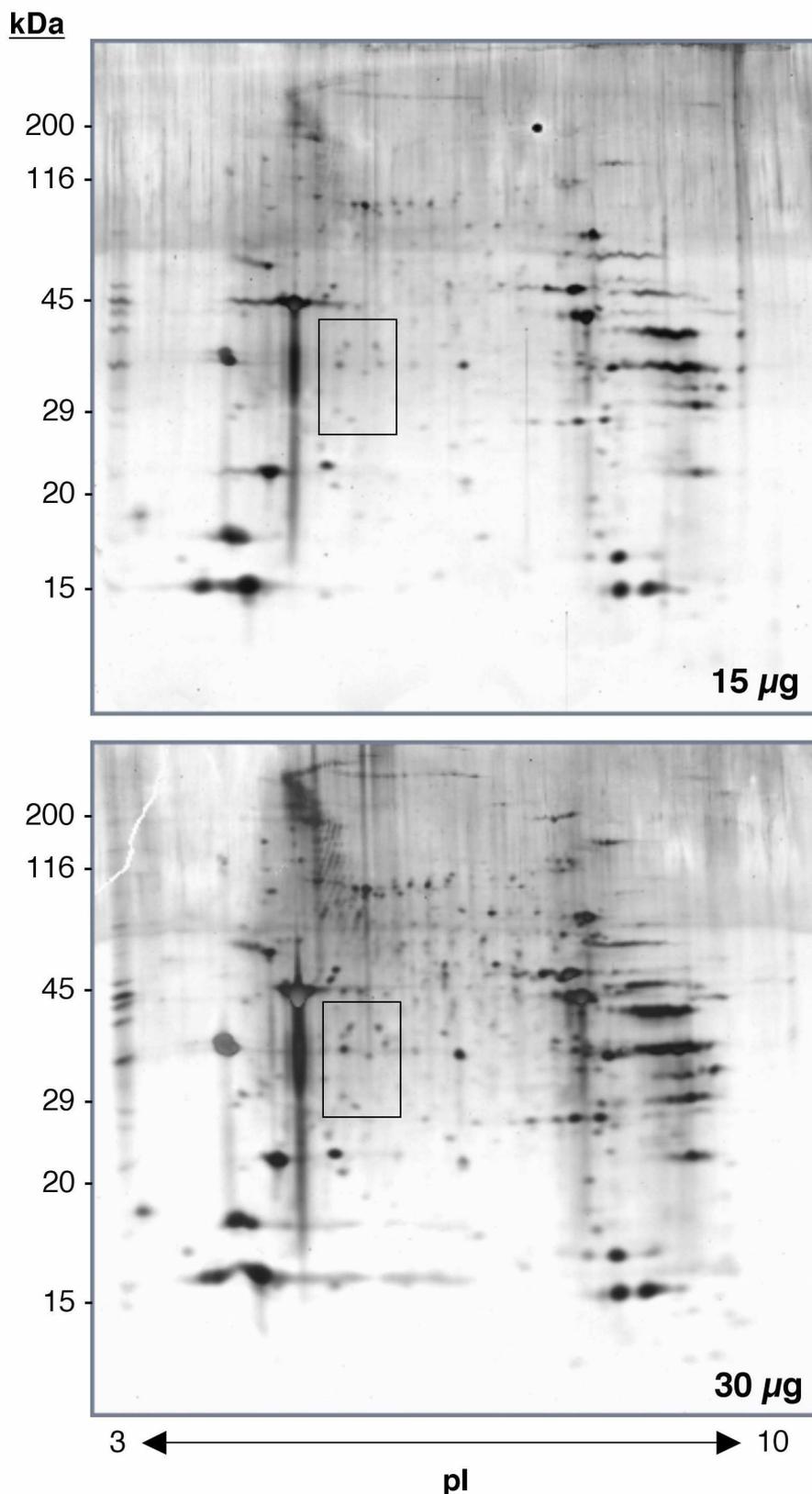


Abb. 2a: 2D-PAGE von 15 µg und 30 µg Protein aus dem EDL einer nNOS-knockout-Maus. Nach IEF in einem IPG-Streifen (pH 3-10) und anschließender SDS-PAGE in einem 7-14% Gradientengel wurden die Spotmuster mit Silberfärbung dargestellt. Der Rahmen markiert den Bereich der Gele, der zur Analyse der Linearität der Silberfärbung herangezogen wurde (siehe Abb. 5).

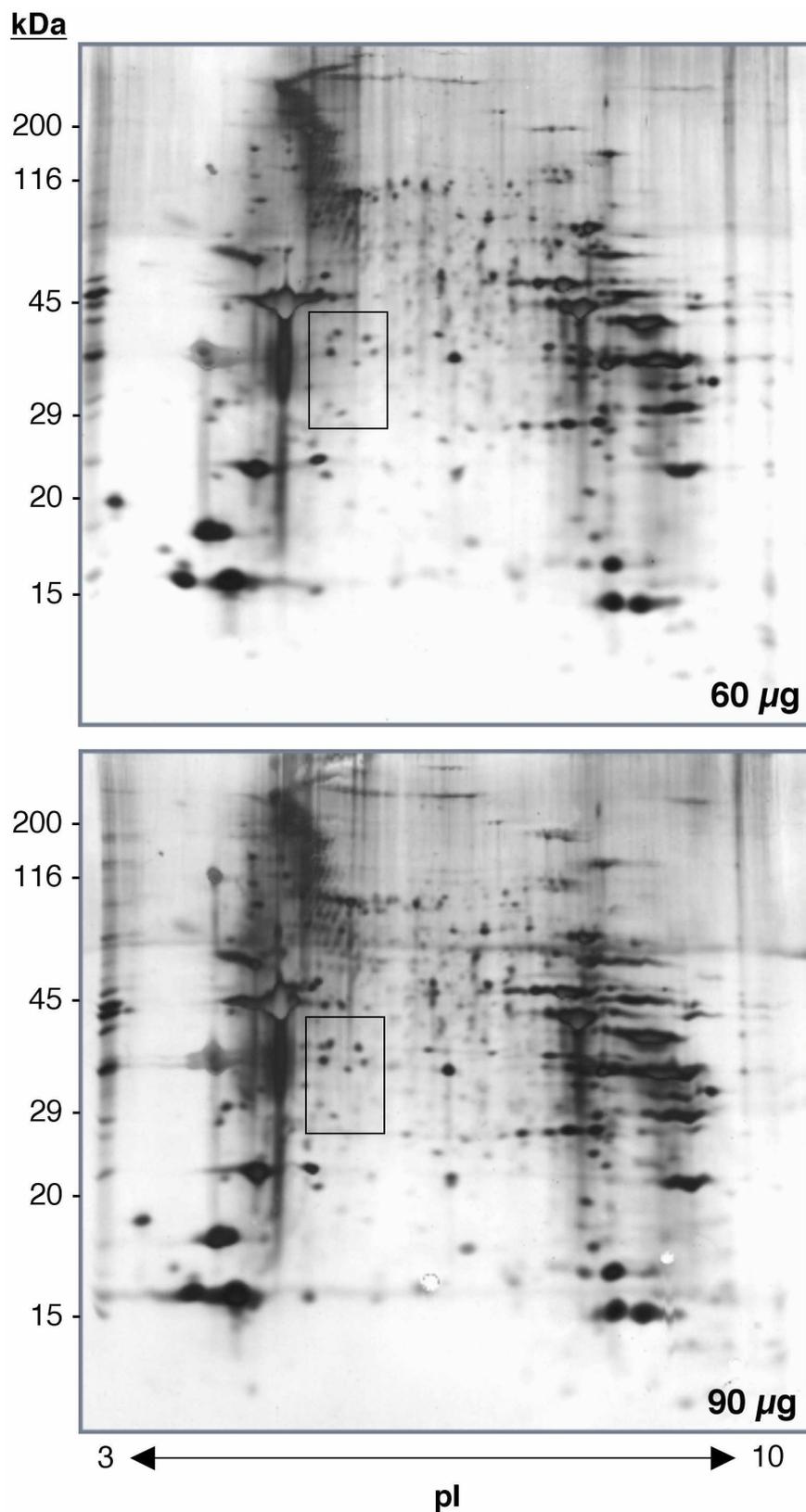


Abb. 2b: 2D-PAGE von 60 µg und 90 µg Protein aus dem EDL einer nNOS-knockout-Maus. Nach IEF in einem IPG-Streifen (pH 3-10) und anschließender SDS-PAGE in einem 7-14% Gradientengel wurden die Spotmuster mit Silberfärbung dargestellt. Der Rahmen markiert den Bereich der Gele, der zur Analyse der Linearität der Silberfärbung herangezogen wurde (siehe Abb. 5).

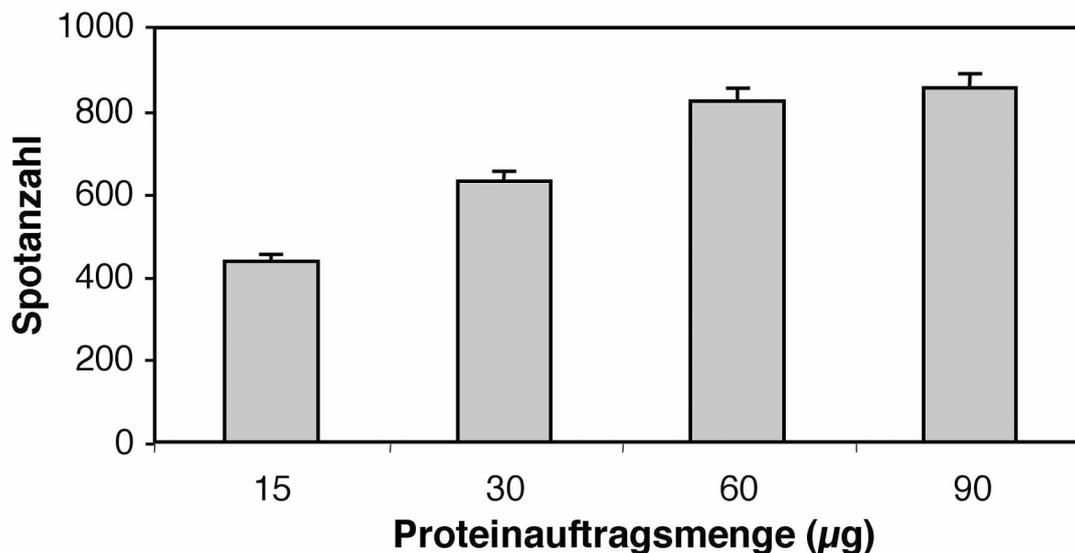


Abb. 3: Bestimmung der Anzahl von Spots in Gelen nach 2D-PAGE aus dem EDL einer nNOS-knockout-Maus als Funktion der Proteinauftragsmenge.

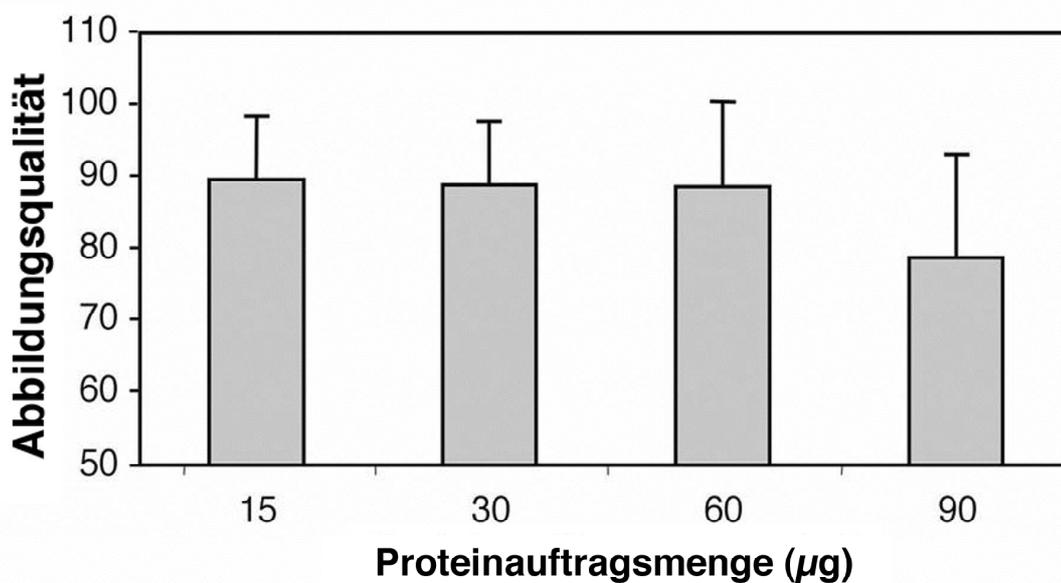


Abb. 4: Bestimmung der Abbildungsqualität in Gelen nach 2D-PAGE aus dem EDL einer nNOS-knockout-Maus als Funktion der Proteinauftragsmenge.

Das für die Analyse eingesetzte Computerprogramm berechnet den Parameter ‚Abbildungsqualität‘, in dem sich vor allem die Auftrennungsschärfe widerspiegelt. Hierbei werden die Spots bezüglich gegenseitiger Abgrenzung und Überlagerung durch „Streaking“ beurteilt, indem jedem Punkt des Gels ein numerischer Wert von 0 bis 100 zugeordnet wird. Spots mit dem Zahlenwert 100 haben die höchste „Abbildungsqualität“. Die computergestützte Berechnung der Abbildungsqualität nahm bei 90 µg bereits ab, was darauf hindeutet, dass die Beladungskapazität mit dieser Proteinauftragsmenge überschritten wurde (**Abb. 4**).

3.1.2 Linearität der Silberfärbung

Es wurde eine Gruppe von sechs Spots (**Abb. 2**) densitometrisch ausgewertet (**Abb. 5**), die niedrig bis hochexprimierte Proteine umfasste. Die Identität dieser sechs Proteine konnte mittels Tandem-Massenspektroskopie durch Dr. Manfred Heller (Universität Bern) aufgeklärt werden (Spot 1 und Spot 6: Isocitratdehydrogenase alpha Untereinheit (IDH3A), Spot 2: F-actin capping protein alpha 2 Untereinheit (CAZA2), Spot 3: F-actin capping protein alpha 1 Untereinheit (CAZA1) Spot 4: F-actin capping protein alpha 1 und 2 Untereinheit (CAZA1 und CAZA2), Spot 5: Laktatdehydrogenase (LDHB). Während der Nachweis der Spots 1 und 4 über die vier Auftragsmengen hinweg linear war, flachte der Intensitätsanstieg der Spots 2, 3 und 6 zwischen 30 µg und 60 µg allmählich ab. Bei Spot 5 konnte ein verminderter Anstieg ab 60 µg Proteinauftrag beobachtet werden. Für hochexprimierte Proteine ist also schon bei Auftragsmengen von 30-60 µg der Sättigungsbereich der Silberfärbung erreicht.

Die Auswertung der Parameter „Anzahl identifizierbarer Spots“, „Abbildungsqualität“ und der lineare Bereich der Silberfärbung für unterschiedlich hochexprimierte Proteine in Abhängigkeit von der Gesamtproteinbeladung zeigte, dass unter Berücksichtigung aller drei Kriterien eine Beladung des Gels mit 60 µg Protein optimal ist.

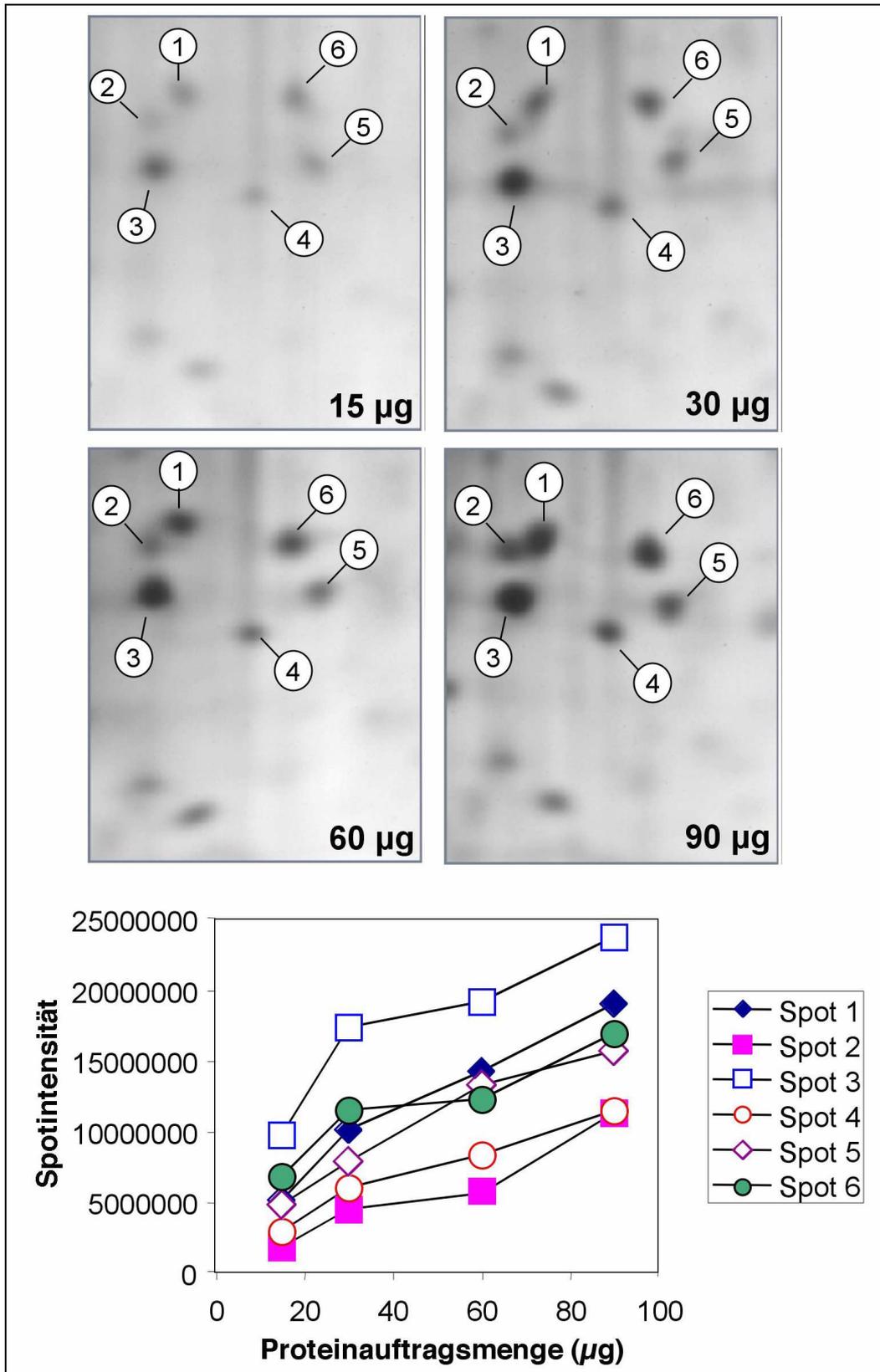


Abb. 5: Intensität der Silberfärbung unterschiedlich stark exprimierter Spots als Funktion der Gesamteproteinauftragsmenge (vergl. Abb 2) am Beispiel der Spots 1-6. Die Spotintensitäten wurden densitometrisch ermittelt und gegen den Hintergrund normalisiert.

3.2 Vergleichende Analyse des Proteinexpressionsmusters im EDL von C57 und nNOS knockout-Mäusen

3.2.1 Charakterisierung der C57 und nNOS knockout-Mäuse

Um sicherzustellen, dass sich die in dieser Studie untersuchten beiden Mausstämme in ihrer nNOS-Expression im EDL unterscheiden, wurde eine Immunblotanalyse durchgeführt (**Abb. 6**). Im EDL von C57/Bl6-Mäusen war die charakteristische 160 kDa-nNOS Doppelbande vorhanden, während im EDL von nNOS knockout-Mäusen keine nNOS nachzuweisen war.

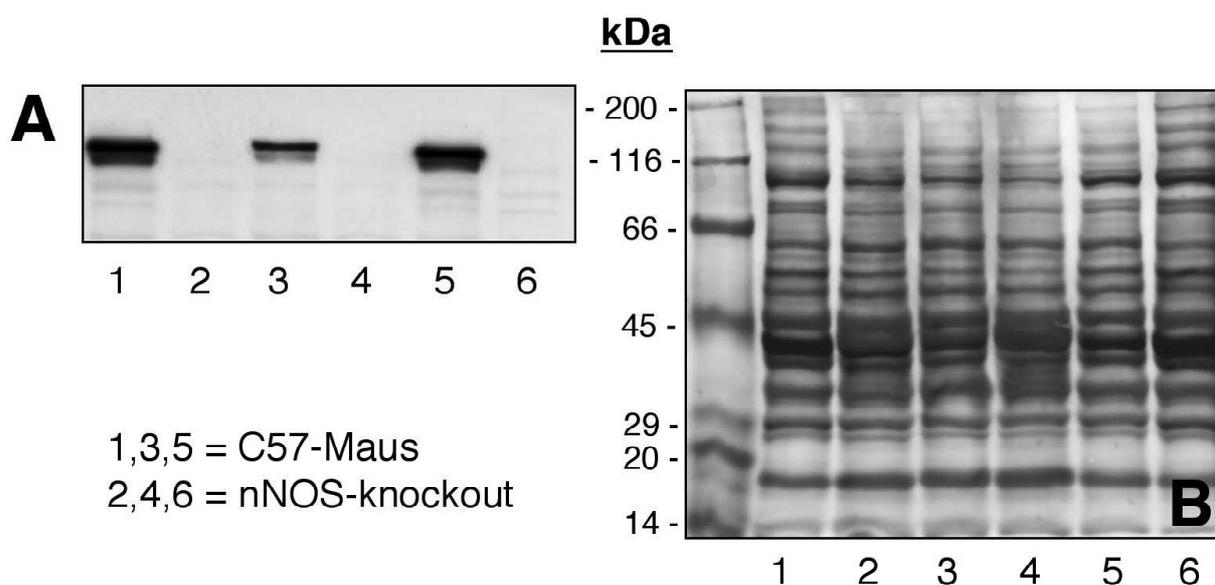


Abb. 6: Nachweis der nNOS-Expression in C57-Mäusen und der nNOS-Defizienz im EDL von nNOS knockout-Mäusen. Die Analyse erfolgte durch Immunblot mit anti-nNOS-Antikörpern (A). Ponceau-Färbung derselben Blotmatrix (B).

3.2.2. 2D-PAGE-Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurden durch quantitative 2D-PAGE-Analyse diejenigen Proteine identifiziert, die im EDL von nNOS-knockout-Mäusen in anderer Konzentration als im EDL von C57-Mäusen exprimiert werden. Hierfür wurden insgesamt 32 2D-Gele (Duplikate von je acht Mäusen von beiden Mausstämmen) mit je 60 µg Protein Auftragsmenge hergestellt und mit Silber gefärbt (**Abb. 7**). Nach densitometrischer Analyse konnte für alle Spots eine statistisch quantitative Analyse ihrer Expression durchgeführt werden. Proteine, deren Konzentration in den 2D-Gelen offensichtlich nicht moduliert war, wurden zum Nachweis der Reproduzierbarkeit der Methode herangezogen (**Abb. 8**).

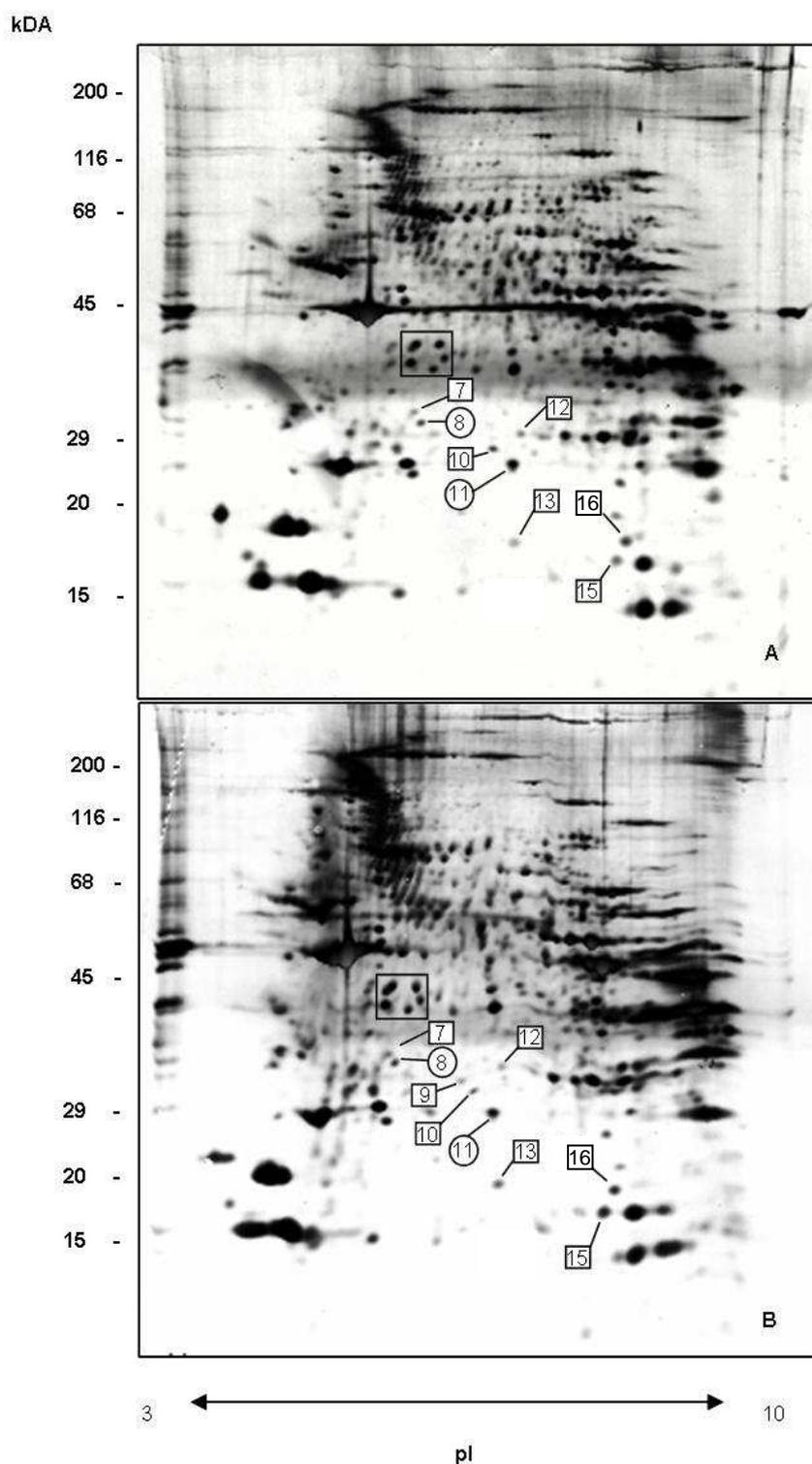


Abb. 7: 2D-PAGE aus dem EDL einer C57 (A) und nNOS-knockout-Maus (B). Nach IEF (pH 3-10) und SDS-PAGE in einem 7-14% Gradienten wurde das Gel bei einer Proteinauftragsmenge von 60 μ g mit Silber gefärbt. Alle mit Nummern gekennzeichneten Spots wurden mittels LC-MS/MS identifiziert und zur statistischen Analyse herangezogen (siehe Abb. 8 und 10). Die mit eckigen Rahmen umgebenen Nummern kennzeichnen Spots, die differentiell exprimiert waren.

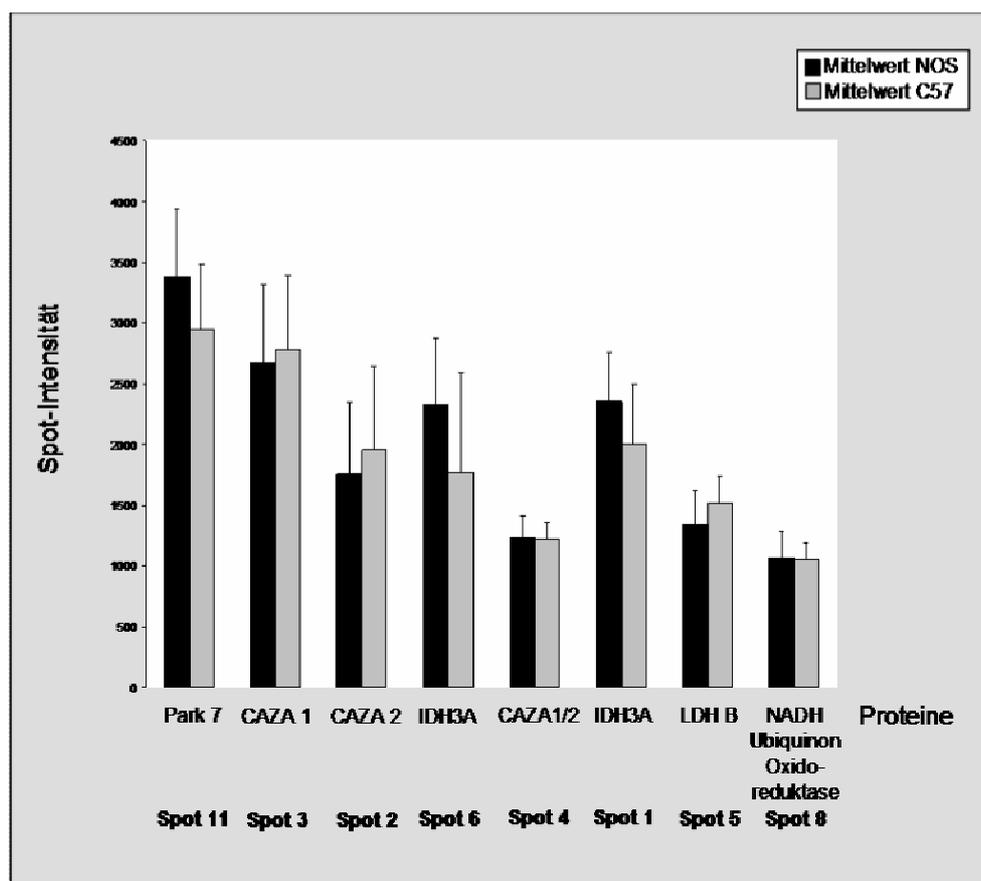


Abb. 8: Reproduzierbarkeit von 2D-Gelen. Die schwarzen und grauen Balken stellen die densitometrisch bestimmten Spotmittelwerte mit entsprechender Standardabweichung aus $n=5$ unabhängigen Experimenten bei Zweifachbestimmung dar. Die schwarzen Balken bezeichnen die Spotmittelwerte der nNOS-/- Mäuse, die grauen Balken repräsentieren die Spotmittelwerte der C57 Mäuse. Die Expression der Spots C57 vs. nNOS -/- war statistisch (Mann-Whitney-Test) nicht-signifikant unterschiedlich ($p>0,05$).

Gleichzeitig konnten durch die densitometrische Analyse im Mr-Bereich von 12-30 kDa und im pI-Bereich von 5,9-8,0 sieben Proteine identifiziert werden, die im EDL der beiden Mausstämmen differentiell exprimiert waren (**Tab. 1 und Abb. 10**). Die experimentell ermittelten Mr und pI dieser sieben Proteine entsprachen weitgehend den theoretischen Werten.

Besonders deutlich reguliert ist das 25 kDa Protein Peroxiredoxin-6 (Spot 9), das im EDL der C57-Mäusen fehlte und nur im EDL der nNOS-knockout-Maus exprimiert war (**Abb. 9**).

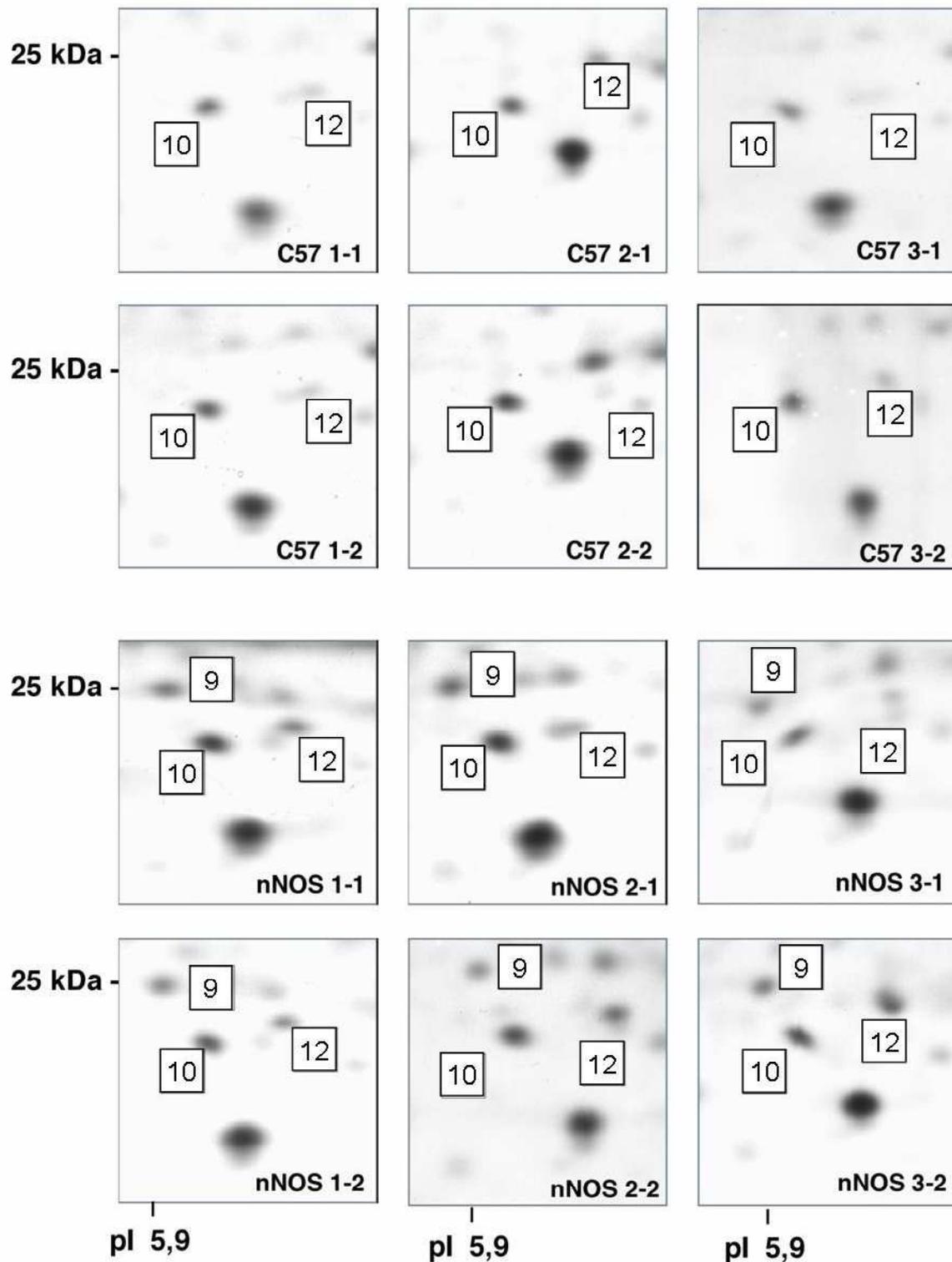


Abb. 9: 2D-PAGE vom EDL von C57- und nNOS-knockout-Maus im Bereich von 25 kDa und pI-Bereich um 5,9. Dargestellt sind Beispiele von 12 mit Silber gefärbten Gelen (Duplikate von je drei Tieren). Nummern der Spots beziehen sich auf die Auflistung in Tab. 1. Spot 9: Peroxiredoxin 6, Spot 10: Peroxiredoxin 3, Spot 12: Heat shock protein β 1 (HSP 25)

Tab. 2: Auflistung der Proteine, die durch die 2D-PAGE-Analyse als differenziell exprimiert im EDL von C57- und nNOS knockout-Mäusen nachgewiesen und massenspektrometrisch identifiziert worden sind. Nach densitometrischer Analyse von je 10 silbergefärbten nNOS-/- Gelen (Duplikate von 5 knock-out-Tieren) mit 10 C57 Gelen (Duplikate von 5 C57-Tieren).

| Spot | kDa | | pI | | Regulation | | | Protein | Swissprot Accession | Sequenz deckung |
|------|--------|------|--------|------|------------|--------------------|----------|-------------------------------------|------------------------|---------------------|
| | Theor. | Exp. | Theor. | Exp. | nNOS | C57 | nNOS/C57 | | | |
| 7 | 30 | 30 | 5,6 | 5,4 | 754±235 | 385±186 | 2,0 | Prohibitin | P67778 | 24,30% 6 Peptide |
| 9 | 24,7 | 24,5 | 5,7 | 5,9 | 631±212 | nicht vorhanden | - | Peroxiredoxin 6 | O08709 | 52,50% 8 Peptide |
| 10 | 28,1 | 23 | 6,1 | 6,1 | 1239±385 | 653±252 | 1,9 | Peroxiredoxin 3 | P20108 | 27,80% 5 Peptide |
| 12 | 23 | 23 | 6,1 | 6,4 | 816±333 | 491±383 | 1,7 | Heat shock protein β1 | P14602 | 33,90% 7 Peptide |
| 13 | 16 | 16 | 6 | 6,4 | 1536±894 | 819±368 | 1,9 | Superoxid- Dismutase | P08228 | 32,7% 4 Peptide |
| 15 | 17 | 15 | 7,2 | 7,5 | 1897±1387 | 711±895 | 2,7 | Myoglobin | P04247 | 64,70% 6 Peptide |
| 16 | 17 | 17 | 7 | 7,6 | 2631±523 | 1030±627 | 2,6 | Nucleosid diphosphat kinase B | Q01768 | 66,5% 8 Peptide |

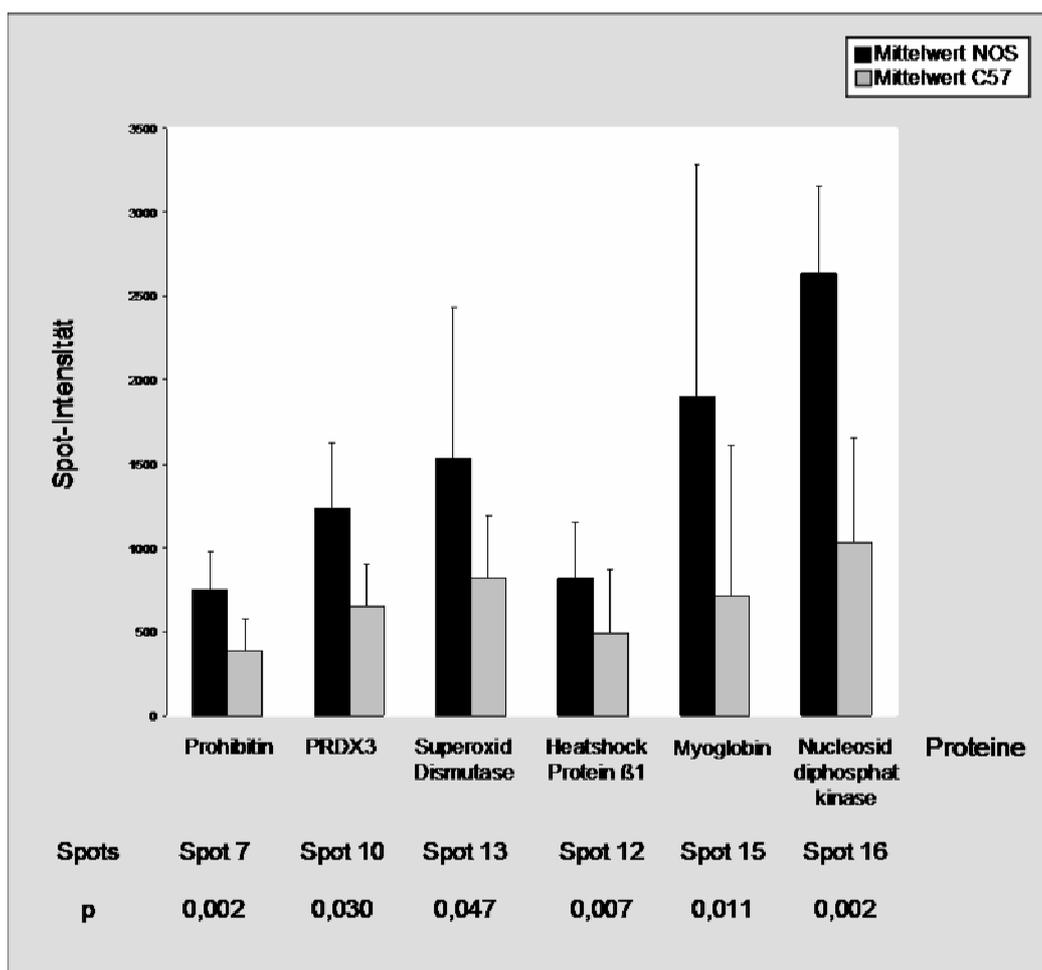


Abb. 10: Regulation von differentiell-exprimierten Proteinen.

Die schwarzen und grauen Balken stellen die densitometrisch bestimmten Spotmittelwerte mit entsprechender Standardabweichung aus $n=5$ unabhängigen Experimenten bei Zweifachbestimmung dar. Die schwarzen Balken bezeichnen die Spotmittelwerte der nNOS^{-/-} Mäuse, die grauen Balken repräsentieren die Spotmittelwerte der C57 Mäuse. Die Expression der Spots C57 vs. nNOS^{-/-} war statistisch (Mann-Whitney-Test) signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$).

Zuletzt wurde eine präparative 2D-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt, um die Spots für eine in Kooperation mit Dr. Manfred Heller (Universität Bern) durchgeführte LC-MS/MS-Analyse zu isolieren, mit der Proteine, die zwischen C57 und nNOS-knockout-Mäusen differentiell exprimiert wurden, identifiziert werden konnten (**Tab. 2 und 3**).

Tab. 3: Sequenzermittlung von Peptiden des Peroxiredoxin 6 mittels LC-MS/MS.
m/z: für das Peptid spezifischer Quotient aus Masse und Ladung.

| Sequenz | m/z |
|-----------------------|--------|
| DINAYNGETPTEK | 726.88 |
| DLAILLGMLDPVEK | 772.44 |
| KGESVMVPTLSEEEAK | 616.97 |
| LPFPIIDDK | 529.32 |
| PGGLLLGDEAPNFEANTTIGR | 1072.1 |
| VVDSLQLTGTKPVATPVDWK | 719.18 |
| VVFIFGPKD | 511.25 |
| VVFIFGPKK | 575.35 |

3.2.3 Validierung der Ergebnisse der 2D-PAGE-Analyse durch Immunblot

Nachdem Peroxiredoxin 6 mittels 2D-PAGE nur im EDL von nNOS knockout-Mäusen nachweisbar war, wurde zur Validierung dieses Ergebnisses ein Immunblot nach SDS-PAGE durchgeführt (**Abb. 11A**). Auf einem 10%-igen Gel wurden jeweils identische Proteinmengen aus dem EDL sowie Lungengewebe (Positivkontrolle) einer C57, als auch aus dem EDL einer nNOS-knockout-Maus aufgetragen. In der Lungenprobe wurde eine sehr prominente Bande bei 25 kDa sichtbar. Dies entspricht dem Molekulargewicht von Peroxiredoxin 6. Die 25 kDa Bande war auch im EDL der nNOS knockout-Maus, nicht aber der C57-Maus nachweisbar.

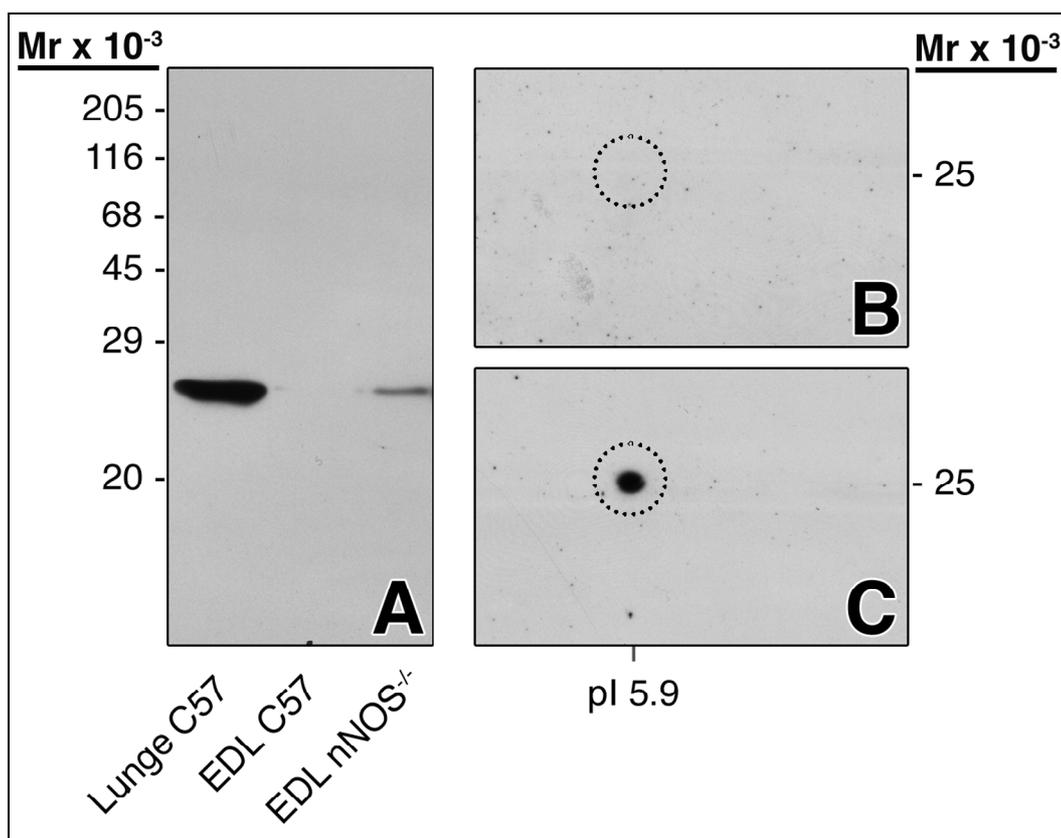


Abb. 11: Nachweis der Peroxiredoxin 6-Expression durch Immunblot.

A: Auf Immunblots nach SDS-PAGE mit anti-Peroxiredoxin-6-Antikörpern wurde eine Bande (25 kDa) in EDL-Extrakten der nNOS knockout-Maus sichtbar, die nicht in EDL-Extrakten der C57-Maus nachweisbar war. Als Positivkontrolle diente Lungenextrakt einer C57-Maus. **B,C:** Auf Immunblots nach 2D-PAGE wurde in EDL-Extrakten der nNOS knockout-Maus (C) nicht aber der C57-Maus (B) ein 25 kDa Protein mit einem pI von 5.9 nach Inkubation mit anti-Peroxiredoxin-6-Antikörpern angefärbt. Die gestrichelte Linie auf beiden 2D-Blotmatrizen markiert die entsprechende Fläche.

Darüber hinaus wurde ein Immunblot nach der 2D-PAGE durchgeführt (**Abb. 11B,C**), um sicherzustellen, dass Peroxiredoxin 6 dem Spot 9 entspricht, der aus dem präparativen 2D-Gel der nNOS knockout-Maus ausgestanzt und mittels LC-MS/MS analysiert worden war. In der Tat wies das 25 kDa-Protein, das von den Anti-Peroxiredoxin-6-Antikörpern erkannt wurde, einen pI von 5.9 auf, was dem pI von Peroxiredoxin-6 entspricht. Die Ergebnisse der Immunblotversuche belegen, dass der Spot, der am stärksten in der 2D-PAGE-Analyse reguliert erschien, Peroxiredoxin-6 repräsentiert.

3.3 qRT-PCR zur Bestimmung der mRNA-Konzentrationen der differentiell exprimierten Gene

Um den Beitrag der transkriptionellen Regulation auf die Expression der Proteine zu bestimmen, die in der 2D-PAGE-Analyse unterschiedlich exprimiert waren, wurde eine quantitative Echtzeit-RT-PCR-Analyse durchgeführt (**Abb. 12**). Es zeigte sich, dass Peroxiredoxin 6, Peroxiredoxin 3, Superoxid Dismutase-1, Heat-shock Protein beta-1 (HSP 25) sowie NDP Kinase auch auf mRNA-Ebene im EDL der nNOS knockout-Maus in höheren Konzentrationen als im EDL der C57-Maus vorliegen. Die mRNA-Konzentration von Prohibitin und Myoglobin dagegen war in den nNOS defizienten Tieren reduziert.

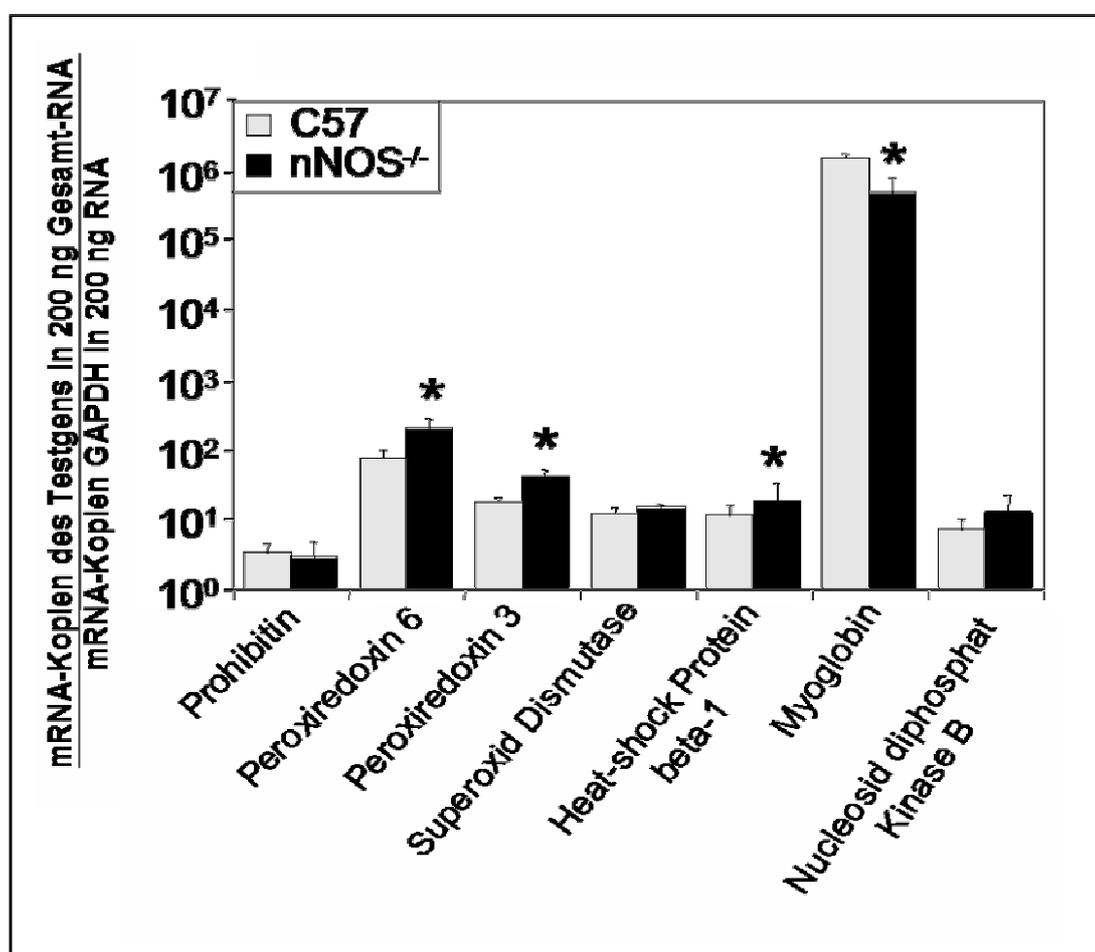


Abb.12: Quantitative Echtzeit-RT-PCR-Analyse. Aus EDL-Homogenaten von C57 und nNOS-knockout Mäusen wurden die mRNA-Konzentrationen der sieben Gene, deren Produkte in der 2D-PAGE-Analyse verändert waren, unter Verwendung von externen Standards ermittelt und ins Verhältnis zur GAPDH-Konzentration gesetzt. Triplicatwerte von n=5 Tieren in beiden Gruppen. * : $p \leq 0.05$ nNOS^{-/-} vs. C57

3.4 Expression von Enzymen zur Synthese von Vasodilatoren im EDL von C57 und nNOS knockout-Mäusen

Weil nNOS an der Vasodilatation im Skelettmuskel beteiligt ist, wurden mittels Immunblotanalyse systematisch die quantitativen Expressionsmuster von Proteinen gemessen, die an der Vasodilatation im EDL beteiligt sind (**Fig. 13**). Nach Auftrag identischer Mengen an Homogenatprotein wiesen eNOS, iNOS und HO-1 keine unterschiedlichen Konzentrationen auf, während eine reaktive Bande nach Zugabe von Anti-HO-3-Antikörpern nur im EDL der nNOS knockout-Maus, nicht aber der C57-Maus nachweisbar war.

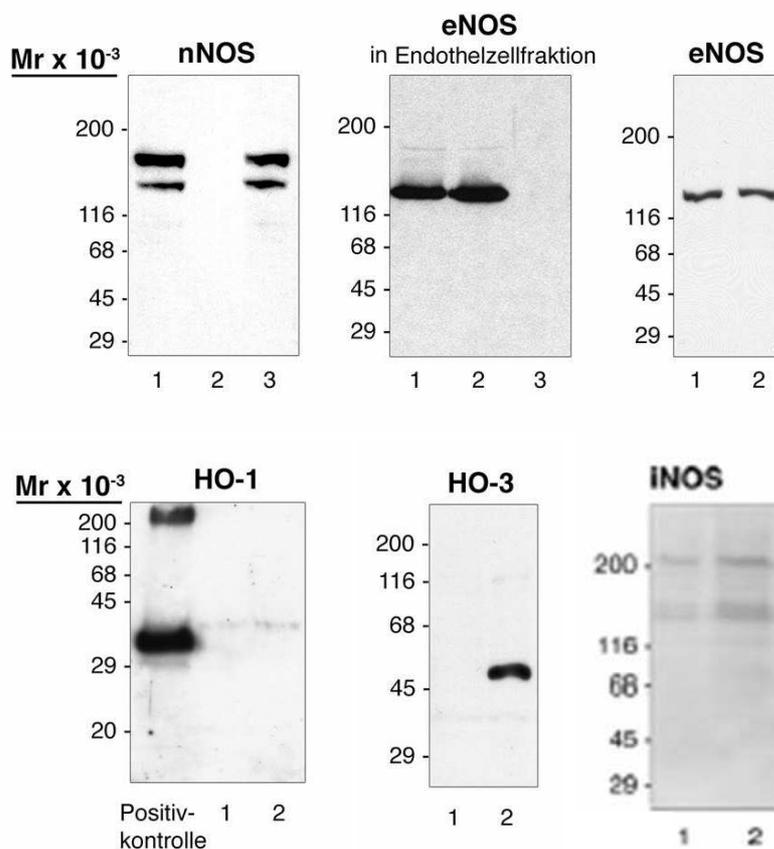


Abb. 13: Immunblot zum quantitativen Nachweis von vasodilatatorisch wirkenden Proteinen im EDL. eNOS: endotheliale NO-Synthase; iNOS: induzierbare NO-Synthase; HO-1/3: Hämoxygenase 1/3; 1 = C57-Maus, 2 = nNOS-knockout-Maus, 3: eNOS-knockout-Maus. Endothelzellfraktion wurde bezogen von Herrn Dr. Da Silva-Azevedo, Charite Berlin. (Da Silva-Azevedo et al., 2002)

4 Diskussion

4.1 2D-PAGE-Analyse veränderter Expressionsmuster

4.1.1 Differentiell exprimierte Spots

Nach 2D-PAGE wurden durch den Vergleich der Expressionsmuster sieben Proteine identifiziert, die im EDL von nNOS-knockout-Mäusen höher konzentriert sind als im EDL der C57Bl/6-Maus (Peroxiredoxin-6; Myoglobin; Nukleosiddiphosphatkinase B; Prohibitin; Peroxiredoxin-3; Cu²⁺/Zn²⁺-abhängige Superoxiddismutase sowie Heat shock protein beta-1). Vier dieser Gene (Peroxiredoxin-6; Peroxiredoxin-3; Cu²⁺/Zn²⁺-abhängige Superoxid dismutase sowie Heat shock protein beta-1) sind auch auf mRNA-Ebene in den nNOS-knockout-Mäusen erheblich aufreguliert, wie es die qRT-PCR-Analyse zeigte.

4.1.2 nNOS-knockout-Mausmodell

Für die Untersuchungen standen nNOS-knockout-Mäuse zur Verfügung, aus deren Genom das Exon-2 entfernt wurde (Huang et al., 1993). Als auffälligste phänotypische Veränderung weisen diese Mäuse einen vergrößerten Pylorus auf, da in diesem Organteil kein funktionsfähiger Plexus myentericus vorhanden ist. In den Neuronen der Großhirnrinde ist die NMDA-stimulierte Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat unterdrückt (Son et al., 1996). Die Langzeitpotenzierung (LTP) im Hippocampus verläuft normal (Son et al., 1996), obwohl pharmazeutische Studien eine Beteiligung der nNOS an diesem retrograden Prozeß suggeriert hatten, der die Grundlage für erfolgreiches Lernen darstellt. Im Alter wird der linke Herzventrikel der nNOS-knockout-Mäuse hypertroph, was jedoch nicht zur Hypertension führt (Barouch et al., 2002). Außerdem ist die nNOS-knockout-Maus insulin-resistenter (Shankar et al., 2000). In der Niere ist die nNOS-knockout-Maus durch eine Reduktion des Primärharnabflusses und der Reabsorption von Bikarbonat charakterisiert, da beide Funktionen durch NO-abhängige Innervation moduliert werden (Wang et al., 2000). nNOS-knockout-Mäuse weisen ein geringeres Körpergewicht auf, da im Vergleich zu den C57Bl/6-Kontrollmäusen die Masse der Skelettmuskulatur signifikant vermindert ist (Huang, 1999; Wadley et al., 2007; Kobayashi et al., 2008). Dieser phänotypische Unterschied ist in Anbetracht der bedeutenden Funktionen der nNOS im Skelettmuskelsystem als sehr gering einzuschätzen. Im Gegensatz zur Annahme, dass es in der nNOS-knockout-Maus mit deletiertem Exon-2 noch geringe nNOS-Aktivitäten gibt (Brenman et al., 1996), zeigten

die in unserer Studie verwendeten nNOS-knockout-Mäuse keine Expression von nNOS-Isoformen im Skelettmuskel (Abb. 6, 13 und Baum et al., 2002).

Es ist daher denkbar, dass die chronisch fehlende Expression eines Gens/Proteins in einem knockout-Stamm durch die (konstitutive) Heraufregulation der Expression eines funktionellen Agonisten kompensiert wird. Solche Regulationsmechanismen sind in der eNOS-knockout-Maus beobachtet worden, in der die nNOS für die eNOS zur Etablierung des retinalen Gefäßsystems beiträgt (Al-Shabrawey et al., 2003) und den Blutfluss durch Koronararterien erhöht (Talukder et al., 2004). In der nNOS-knockout-Maus ist ein solcher Kompensationsprozess ebenfalls diskutiert worden, da die eNOS die nNOS beim LTP offenbar funktionell ersetzen kann (Son et al., 1996).

4.2 Kompensation von nNOS (NO) als Radikalfänger

Unter den Proteinen/Genen, die im EDL der nNOS-knockout-Mäuse höher exprimiert werden, war Peroxiredoxin-6 sowohl auf Protein- als auch mRNA-Ebene am stärksten reguliert. Obgleich dieses Enzym in vielen Organen und Geweben von Nagern nachgewiesen werden kann, finden sich die mit Abstand höchsten Peroxiredoxin-6-Konzentrationen in der Lunge (Wang et al., 2003; Mo et al., 2003). Im Skelettmuskel lassen sich dagegen nur geringe Mengen von Peroxiredoxin-6 belegen, wie es auch in dieser Studie in der Immunoblotanalyse von EDL-Proben gefunden wurde. Peroxiredoxin-6 ist ein Protein, das (mindestens) zwei Funktionen hat (Manevich und Fisher, 2005). Durch Oxidation von Glutathion kann es überschüssiges H_2O_2 und andere Hydroperoxide reduzieren und so neutralisieren. Gleichzeitig ist aber auch beobachtet worden, dass Peroxiredoxin-6 eine Phospholipase A2-ähnliche katalytische Aktivität vermittelt und so an der zellulären Signaltransduktion mitwirken kann. Es erscheint daher möglich, daß Peroxiredoxin-6 in der nNOS-knockout-Maus vermehrt hergestellte reaktive Sauerstoffspezies (ROS), im Speziellen Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$), eliminieren hilft und so den Muskel vor Beschädigung durch aggressive Oxidantien schützt. Im Einklang mit dieser Hypothese wurde spekuliert, dass Melanomzellen gegen ROS-Einwirkung empfindlich sind, da in diesen Zellen Peroxiredoxin-6 supprimiert wird (de Souza et al., 2006). In Ableitung von der zweiten Funktion scheint es jedoch auch möglich, dass höhere Peroxiredoxin-6-Pegel in der nNOS-knockout-Maus dazu beitragen, Signaltransduktionaktivitäten zu kompensieren, die in genetisch unveränderten Tieren durch NOS vermittelt werden.

Fünf weitere der sechs Proteine, die in EDL der nNOS-knockout-Mäuse neben Peroxiredoxin-6 hochreguliert sind, sind ebenfalls im ROS-Metabolismus involviert. Mitochondriales Peroxiredoxin-3 ist in die Redox-Regulation einbezogen (Chang et al., 2004) und schützt auf Radikale empfindliche Enzyme vor oxidativer Inaktivierung (Wood et al., 2003). Die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -abhängige Superoxiddismutase, die mit der Entwicklung der amyotrophen Lateralsklerose assoziiert ist, zerstört ROS durch Reduktion (Zelko et al., 2002). Mitochondriales Prohibitin schützt vor ROS, die in der Atmungskette entstehen (Coates et al., 2001; Theiss et al., 2006). Das vor allem in kontraktile Zellen hergestellte Heat shock protein beta-1 hemmt Scherkräfte und trägt zur Aktinorganisation bei (Dalle-Donne et al., 2001; Escobedo, et al. 2004; Golenhofen et al., 2004). Die zytoplasmatische Nukleosiddiphosphatkinase B katalysiert die reversible Umwandlung von Nukleosiddiphosphat zu Nukleosidtriphosphaten und ist somit hauptsächlich für die Balancierung des Energiemetabolismus notwendig. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Nukleosiddiphosphatkinase B daran beteiligt ist, BAF3-Zellen vor oxidativer Beschädigung zu schützen (Arnaud-Dabernat et al., 2004). In der 2D-PAGE-Analyse war eine Form von Myoglobin hochreguliert. Weil diese Myoglobinform nicht näher charakterisiert werden konnte, war es auch nicht möglich, Primer für die qRT-PCR Analyse auszusuchen, die zur spezifischen Amplifikation nur dieser Form führten. Da stattdessen Primer benutzt wurden, die an alle Myoglobinformen banden, muß davon ausgegangen werden, dass die ermittelte Suppression von Myoglobin auf mRNA/cDNA-Ebene sich nicht auf die in der 2D-PAGE identifizierte Form bezieht.

Es sollte auch noch darauf hingewiesen werden, dass alle Proteine, die durch die 2D-PAGE-Analyse als differentiell exprimiert identifiziert wurden, innerhalb eines engen Bereiches von Molekulargewichten (von 15 bis 30 kDa) bzw. isoelektrischen Punkten (von 5,4 bis 7,6) zu finden sind. Möglicherweise würde man noch weitere Proteine mit unterschiedlichen quantitativen Expressionsmustern im EDL von C57 und nNOS-knockout-Maus identifizieren können, wenn man die Elektrophoresebedingungen für IEF und SDS-PAGE mit entsprechend anderen Gradientenoptima durchführt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der 2D-PAGE-Analyse eine auffallende Anzahl von Enzymen hochreguliert war, die in der Elimination von ROS beteiligt sind. Diese Aktivierung weist darauf hin, dass die nNOS-Defizienz im Knockout-Mausstamm mit einer Erhöhung der ROS-Konzentration im Skelettmuskel einhergeht.

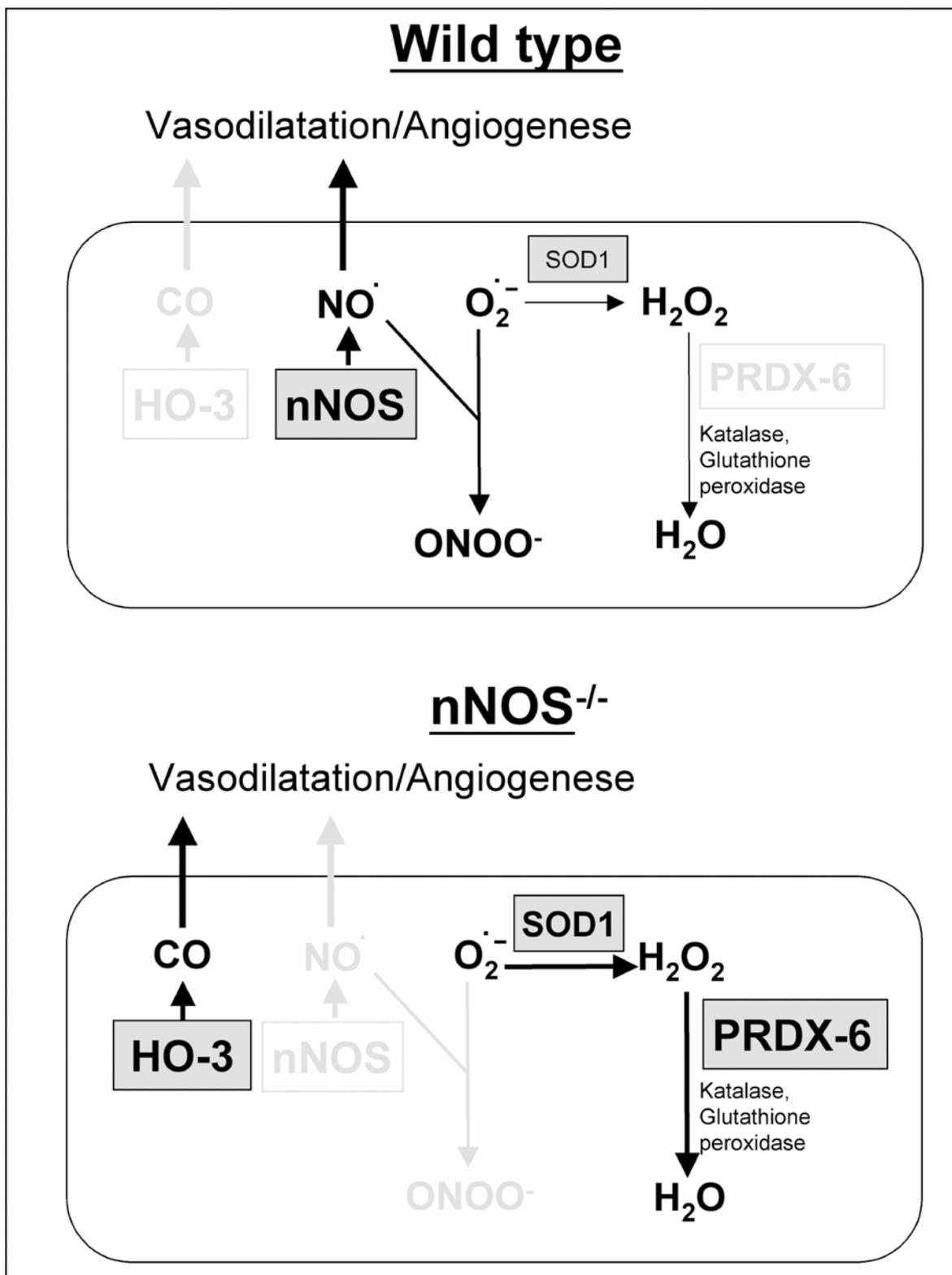


Abb. 14: Schematische Zusammenfassung über mögliche funktionelle Zusammenhänge einiger Kompensationsmechanismen im Skelettmuskel der nNOS-knockout-Maus im Vergleich zur C57B16-Maus. Die Details werden im Diskussionstext erläutert. Verwendete Abkürzungen: HO-3: Hämoxygenase-3; nNOS: neuronale NO-Synthase; prdx-6: Peroxiredoxin-6; SOD1: Cu²⁺/Zn²⁺-abhängige Superoxid-Dismutase; CO: Kohlenmonoxid; O₂⁻: Superoxidanion; ONOO⁻: Peroxinitrit; NO: Stickstoffmonoxid; H₂O₂: Wasserstoffperoxid

Die indirekten und direkten Wechselwirkungen zwischen NO und ROS-Systemen im Skelettmuskel sind in den Grundzügen charakterisiert (Übersichten bei Reid, 1988; Smith und Reid, 2006; Jackson et al., 2006).

Bereits Reid (1998) verweist darüber hinaus auf indirekte (kompetitive) Wechselwirkungen von NO mit ROS, die wichtige biologische Auswirkungen im Skelettmuskel haben. NO verhindert durch Nitrosylierung der Sulfhydrylgruppen von redox-sensitiven, intrazellulären Regulatorproteinen (z.B. dem Ryanodin-sensitiven 106 kDa Ca^{2+} -Kanalprotein), die ROS-abhängige Bildung von funktionell wichtigen Disulfidbrücken an diesen Proteinen. Hierdurch wirken NO und ROS antagonistisch auf den Kohlenhydrat-Stoffwechsel, die Ca^{2+} -Homeostase, den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und verschiedene Membrantransportmechanismen. Außerdem sind ROS für die elektro-mechanische Kopplung während der Kontraktion der Skelettmuskulatur notwendig, da sie regulatorische Sulfhydrylgruppen von Ca^{2+} -Kanälen am endoplasmatischen Retikulum oxidieren und dadurch die Ca^{2+} -Freisetzung ins Zytosol fördern. Durch Nitrosylierung dieser redox-sensitiven Gruppen blockiert NO diesen ROS-Effekt und begrenzt die Kraftentwicklung des Skelettmuskels.

NO kann mit Superoxid direkt zu Peroxinitrit reagieren (**Abb. 14**), wodurch dieses ROS etwa dreimal effektiver als mit der $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -Superoxiddismutase eliminiert wird (Jackson et al., 2006). Die Peroxinitritreaktion kann auf diese Weise im Skelettmuskel der nNOS-knockout-Maus nicht ablaufen. Um zu verhindern, dass sich in diesem Gewebe toxische Superoxidanionen anreichern, scheint es möglich, dass die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -Superoxiddismutase aufreguliert wird, die das Superoxid zu Wasserstoffperoxid oxidiert. Die in diesem Fall auftretenden erhöhten Konzentrationen von Wasserstoffperoxid könnten dann wiederum durch Peroxiredoxin-6 zu Wasser reduziert werden. Auch die vier anderen Enzyme, die im Knockout-Stamm hochreguliert waren (Prdx-3 und Prohibitin in Mitochondrien; Nukleosiddiphosphatkinase B und Heat shock protein beta 1 im Zytosol), könnten am Abbau von ROS beteiligt sein, die durch die Defizienz von nNOS (und somit von NO) im Skelettmuskel der nNOS-knockout-Maus entstehen. Weitere Untersuchungen konnten dies inzwischen bestätigen (DaSilva, Jähne et al., 2009).

4.3 Kompensation von nNOS als Vasodilatator im Skelettmuskel der nNOS-knockout-Maus

Ausgehend von ihrer Lokalisation im Sarkolembereich haben verschiedene Studien beschrieben, dass die nNOS parakrin die Mikrozirkulation im Skelettmuskel beeinflussen kann. So trägt das nNOS/NO-System erheblich zur Antagonisierung der alpha2-adrenerg-induzierten Vasokonstriktion bei, indem es als Vasodilatator wirkt (Thomas et al., 1998; 2003).

Weil die nNOS im EDL der nNOS-knockout-Mäuse folgerichtig nicht als Vasodilatator zur Verfügung steht, wurde mit Antikörpern gegen Proteine, die gasförmige vasodilatatorische Signalstoffe produzieren (Übersicht bei Clifford und Hellsten, 2004), systematisches Immunblotting durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die beiden anderen NOS-Formen (eNOS und iNOS) nicht differentiell reguliert werden. In Korrespondenz zu früheren Publikationen konnte HO-1 (Vesely et al., 1999) in EDL-Homogenaten nachgewiesen werden, wobei sich jedoch kein Unterschied in den Konzentrationen zwischen C57-Mäusen und nNOS-knockout-Mäusen zeigte. Bei Verwendung eines polyklonalen Antiserums, das gegen eine spezifische Peptidsequenz der HO-3-Primärstruktur induziert worden war, wurde auf den Immunblots nur in den EDL-Extrakten der nNOS-knockout-Maus, nicht aber der C57-Maus ein 48 kDa Protein sichtbar. Eventuell reagiert der Skelettmuskel der nNOS-knockout-Maus auf die nNOS-Defizienz mit einer starken Induktion der Expression der HO-3 (**Abb. 14**).

Hämoxygenasen sind Enzyme, die CO herstellen, das ebenso wie NO zur Gefäßerweiterung führen kann. HO-3 ist eine von drei Hämoxygenaseformen, die den oxidativen Abbau von Häm zu Biliverdin, Eisen und CO katalysieren (Maines, 1997). Die drei HO-Formen unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur, in der Gewebeverteilung und in ihrer biologischen Funktion. HO-1 (synonym: HSP32) ist ein ubiquitär induzierbares Protein, das als Signaltransduktionsmolekül wirkt (Maines, 1997). HO-2 ist dagegen ein konstitutiv-exprimiertes Protein, das für den regulären Katabolismus von Häm aus Hämoglobin sowie anderen hämhaltigen Proteinen verantwortlich ist und deshalb vor allem in der Milz exprimiert wird (McCoubrey und Maines, 1994). HO-3 ist bislang weniger intensiv als die anderen beiden HO-Formen charakterisiert worden. Die Transkription des HO-3-Gens wurde in verschiedenen Rattenorganen einschließlich Milz, Leber, Niere und Gehirn nachgewiesen (McCoubrey et al., 1997). Obwohl die abgeleitete Aminosäuresequenz der HO-3 derjenigen der HO-2 sehr ähnlich ist (etwa 90%ige Homologie), weist das gereinigte rekombinante HO-3-Protein eine bedeutend

schwächere katalytische Aktivität als die HO-2 auf (McCoubrey et al., 1997). Noch ist unklar, ob die HO-3 nur ein Pseudogen darstellt (und somit lediglich als mRNA-Transskript existiert) oder tatsächlich in ein Protein übersetzt wird (Scapagnini et al., 2002). Es ist auch zu bemerken, dass das in dieser Studie eingesetzte anti-HO-3-Antiserum im Immunblot an ein 48 kDa Protein band, obwohl das errechnete Mr des HO-3-Proteins 32 kDa darstellt. Möglicherweise weist die HO-3 in der Maus eine andere Primärstruktur als in der Ratte auf. Nachfolgende Untersuchungen sollten durchgeführt werden, um diese Frage zu klären.

Ob das Protein, das mit dem anti-HO-3-Antiserum reagiert, durch CO-Produktion auch funktionell nNOS kompensieren kann, muß ebenso noch analysiert werden. Diese Hypothese wird jedoch durch die Beobachtung unterstützt, dass das HO-3 immunreaktive Protein denselben Regulationsmechanismen bei der mit Prazosin induzierbaren, wandschubspannungsabhängigen Angiogenese wie die nNOS unterliegt, da die HO-3 bei diesem Prozess im EDL der nNOS-knockout-Mäuse herunterreguliert war (mündliche Mitteilung von Herrn Dr. rer. nat. Oliver Baum), wie es zuvor bei der nNOS beobachtet worden ist (Baum et al., 2004).

5 Zusammenfassung

In Skelettmuskelfasern wird das Signaltransduktionsmolekül Stickstoffmonoxid (NO) in hohen Konzentrationen durch die am Sarkolemm verankerte neuronale NO Synthase (nNOS) produziert. Aus der Literatur ist bekannt, daß die nNOS an verschiedenen physiologischen Prozessen im Skelettmuskel beteiligt ist. So kann der oxidative Stoffwechsel durch nNOS-Aktivität auf verschiedenen Stufen gedrosselt werden, indem enzymatische Reaktionen (in der Glykolyse und der Atmungskette) blockiert, die Muskelkontraktion abgeschwächt oder die Glucoseaufnahme gesteigert werden. Außerdem vermag nNOS-produziertes NO als Vasodilatator die Perfusion der Endstrombahn des Skelettmuskels zu erhöhen. nNOS-knockout-Mäuse zeigen jedoch keine phänotypischen Veränderungen im Skelettmuskel. Daher wurde in dieser Studie nach differentiell exprimierten Proteinen gesucht, die den Verlust der nNOS im Skelettmuskel kompensieren könnten.

Von ungefähr 800 erfassten Spots nach zweidimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE) waren sieben differentiell exprimiert. Ihre Identität wurde durch LC-MS/MS aufgeklärt. Peroxiredoxin-6 war nur im EDL von nNOS-knockout-Mäusen nachzuweisen. Prohibitin, Peroxiredoxin-3, Cu²⁺/Zn²⁺-Superoxid-Dismutase, Heat shock protein beta-1, eine nicht näher charakterisierte Form von Myoglobin sowie Nukleotiddiphosphat Kinase B waren im EDL von nNOS-knockout-Mäusen höher konzentriert als im EDL von C57-Mäusen. Darüber hinaus wurde die Identität von Peroxiredoxin-6 im EDL der nNOS-knockout-Mäuse durch Immunblotting verifiziert. Durch quantitative Echtzeit-RT-PCR wurde gezeigt, dass Peroxiredoxin-6, Peroxiredoxin-3, Cu²⁺/Zn²⁺-Superoxid-Dismutase auch auf mRNA-Ebene im EDL der nNOS-Maus hochreguliert sind, während Myoglobin herunterreguliert ist. Da die nNOS an der Vasodilatation im Skelettmuskel beteiligt ist, wurden die Konzentrationen von anderen vasomodulatorischen Proteinen im EDL der beiden Mausstämme durch quantitatives Immunoblotting vergleichend ermittelt. Dabei zeigte sich, dass es keine offensichtlichen Unterschiede in der Proteinkonzentration der endothelialen eNOS, der induzierbaren iNOS und der Hämoxygenase (HO)-1 zwischen der C57-Maus und der nNOS-knockout-Maus gibt. Demgegenüber wurde eine starke immunreaktive HO-3-Bande in EDL-Homogenaten von nNOS-knockout-Mäusen gefunden, die in EDL-Homogenaten von C57-Mäusen nicht nachzuweisen war.

Prohibitin, Peroxiredoxin-6, Peroxiredoxin-3, Cu²⁺/Zn²⁺-Superoxid dismutase, Heat shock protein beta-1 und Nukleotiddiphosphat Kinase B sind in der Literatur als Enzyme

beschrieben, die reaktive Sauerstoffintermediate (ROS) beseitigen können. Ihre Heraufregulation, insbesondere die von Peroxiredoxin-6 zur Kompensation der nNOS-Defizienz, deutet darauf hin, dass die Hauptfunktion des nNOS-generierten NO weniger die Regulation des Skelettmuskelstoffwechsels oder des Vasotonus als vielmehr der Abbau von Sauerstoffradikalen ist.

6 Literatur

Adams, M.E., Mueller, H.A. und Froehner, S.C.
In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4.
J Cell Biol 2001;155:113-122.

Aghdasi, B., Reid, M.B. und Hamilton, S.L.
Nitric oxide protects the skeletal muscle Ca²⁺ release channel from oxidation induced activation.
J Biol Chem 1997;272:25462-25467.

Alderton, W.K., Cooper, C.E. und Knowles, R.G.
Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition.
J Biochem 2001;357:593-615.

Al-Shabrawey, M., El-Remessy, A., Gu, et al.
Normal vascular development in mice deficient in endothelial NO synthase: possible role of neuronal NO synthase.
Mol Vis 2003;9:549-558.

Anderson, J.E.
A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells.
Mol Biol Cell 2000;11:1859-1874.

Arnaud-Dabernat, S., Masse, K., Smani, et al.
Nm23-M2/NDP kinase B induces endogenous c-myc and nm23-M1/NDP kinase A overexpression in BAF3 cells. Both NDP kinases protect the cells from oxidative stress-induced death.
Exp Cell Res 2004;301:293-304.

Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S. und Murad, F.
Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations.
Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:3203-3207.

Balon, T.W.
Role of nitric oxide in contraction induced glucose transport.
Adv Exp Med Biol 1998;441:87-95.

Barouch, L.A., Harrison, R.W., Skaf, M.W., et al.
Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms.
Nature 2002;416:337-339.

Baum, O., Da Silva-Azevedo, L., Willerding, G., et al.
Endothelial NOS is main mediator for shear stress-dependent angiogenesis in skeletal muscle after prazosin administration.
Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004;287:H2300-2308.

Baum, O., Miethke, A., Wöckel, A., Willerding, G. und Planitzer, G.
The specificity of the histochemical NADPH diaphorase reaction for nitric oxide synthase-1 in skeletal muscles is increased in the presence of urea.
Acta Histochem 2002;104:3-14.

Baum, O., Feussner, M., Richter, H. und Gossrau, R.
Heme oxygenase-2 is present in the sarcolemma region of skeletal muscle fibers and is non-continuously co-localized with nitric oxide synthase-1.
Acta Histochem 2000a;102:281-298.

Baum, O., Planitzer, G., Richter, H. und Gossrau, R.
Irregular costameres represent nitric oxide synthase-1-positive sarcolemma invaginations enriched in contracted skeletal muscle fibres.
Histochem J 2000b;32:743-751.

Bustin, SA., Nolan, T.
Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction.
J Biomol Tech 2004;15:155-166.

Bradford, M. M.
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 1976;72:248-254.

Bredt, D.S., Ferris, C.D. und Snyder, S.H.
Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites.
J Biol Chem 1992;267:10976-10981.

Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R. und Snyder, S.H.
Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase.
Nature 1991;351:714-718.

Bredt, D.S. und Snyder, S.H.
Nitric oxide: a physiologic messenger molecule.
Annu Rev Biochem 1994;63:175-195.

Brenman, J.E., Chao, D.S., Gee, S.H., et al.
Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains.
Cell 1996;84:757-767.

Brenman, J.E., Chao, D.S., Xia, H., Aldape, K. und Bredt, D.S.
Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy.
Cell 1995;82:743-752.

- Brenman, J.E., Xia, H., Chao, D.S., Black, S.M. und Bredt, D.S.
Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts.
Dev Neurosci 1997;19:224-231.
- Chang, T.S., Cho, C.S., Park, S., Yu, S., Kang, S.W. und Rhee, S.G.
Peroxisome oxidoreductase III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria.
J Biol Chem 2004;279:41975-41984.
- Chang, W.J., Iannaccone, S.T., Lau, K.S., et al.
Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy.
Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:9142-9147.
- Chao, D.S., Silvagno, F. und Bredt, D.S.
Muscular dystrophy in mdx mice despite lack of neuronal nitric oxide synthase.
J Neurochem 1998;71:784-789.
- Chomczynski, P., Sacchi, N.
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal. Biochem. 1987;162:156-159.
- Clifford, P.S. und Hellsten, Y.
Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle.
J Appl Physiol 2004;97:393-403.
- Coates, P.J., Nenutil, R., McGregor, A., et al.
Mammalian prohibitin proteins respond to mitochondrial stress and decrease during cellular senescence.
Exp Cell Res 2001;265:262-273.
- Cohn, R.D. und Campbell, K.P.
Molecular basis of muscular dystrophies.
Muscle Nerve 2000;23:1456-1471.
- Crosbie, R.H., Barresi, R. und Campbell, K.P.
Loss of sarcolemma nNOS in sarcoglycan-deficient muscle.
FASEB J 2002;16:1786-1791.
- Crosbie, R.H., Straub, V., Yun, H.Y., et al.
mdx muscle pathology is independent of nNOS perturbation.
Hum Mol Genet 1998;7:823-829.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Milzani, A., Di Simplicio, P. und Colombo, R.
The actin cytoskeleton response to oxidants: from small heat shock protein phosphorylation to changes in the redox state of actin itself.
Free Radic Biol Med 2001;31:1624-1632.

- Da Silva-Azevedo, L., Baum, O., Zakrzewicz, A. und Pries, A.R.
Vascular endothelial growth factor is expressed in endothelial cells isolated from skeletal muscles of nitric oxide synthase knockout mice during prazosin-induced angiogenesis.
Biochem Biophys Res Commun 2002;297:1270-1276.
- Daff, S., Noble, M.A., Craig, D.H., et al.
Control of electron transfer in neuronal NO synthase.
Biochem Soc Trans 2001;29:147-152.
- Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V. und Murad, F.
Novel effects of nitric oxide.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001;41:203-236.
- de Souza, G.A., Godoy, L.M., Teixeira, V.R., et al.
Proteomic and SAGE profiling of murine melanoma progression indicates the reduction of proteins responsible for ROS degradation.
Proteomics 2006;6:1460-1470.
- Djonov, V., Baum, O. und Burri, P.H.
Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis.
Cell Tissue Res 2003;314:107-117.
- Egginton, S., Zhou, A.L., Brown, M.D. und Hudlicka, O.
Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle.
Cardiovasc Res 2001;49:634-646.
- Escobedo, J., Pucci, A.M. und Koh, T.J.
HSP25 protects skeletal muscle cells against oxidative stress.
Free Radic Biol Med 2004;37:1455-1462.
- Firestein, B.L. und Bredt, D.S.
Interaction of neuronal nitric-oxide synthase and phosphofructokinase-M.
J Biol Chem 1999;274:10545-10550.
- Frandsen, U., Lopez-Figueroa, M. und Hellsten, Y.
Localization of nitric oxide synthase in human skeletal muscle.
Biochem Biophys Res Commun 1996;227:88-93.
- Furchgott, R.F. und Zawadzki, J.V.
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.
Nature 1980;288:373-376.
- Förstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., et al.
Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions.
Hypertension 1994;23:1121-1131.

Gath, I., Ebert, J., Godtel-Armbrust, U., Ross, R., Reske-Kunz, A.B. und Förstermann, U.

NO synthase II in mouse skeletal muscle is associated with caveolin 3.
Biochem J 1999;340:723-728.

Golenhofen, N., Perng, M.D., Quinlan, R.A. und Drenckhahn, D.
Comparison of the small heat shock proteins alphaB-crystallin, MKBP, HSP25, HSP20, and cvHSP in heart and skeletal muscle.
Histochem Cell Biol 2004;122:415-425.

Gorg, A., Postel, W., Gunther, S.
The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.
Electrophoresis. 1988;9:531-46.

Gossrau, R.
Nitric oxide synthase I (NOS I) is a costameric enzyme in rat skeletal muscle.
Acta Histochem 1998;100:451-462.

Grange, R.W., Isotani, E., Lau, K.S., Kamm, K.E., Huang, P.L. und Stull, J.T.
Nitric oxide contributes to vascular smooth muscle relaxation in contracting fast-twitch muscles.
Physiol Genomics 2001;5:35-44.

Grozdanovic, Z., Nakos, G., Dahrmann, G., Mayer, B. und Gossrau, R.
Species-independent expression of nitric oxide synthase in the sarcolemma region of visceral and somatic striated muscle fibers.
Cell Tissue Res 1995;281:493-499.

Gyurko, R., Leupen, S. und Huang, P.L.
Deletion of exon 6 of the neuronal nitric oxide synthase gene in mice results in hypogonadism and infertility.
Endocrinology 2002;143:2767-2774.

Hall, A.V., Antoniou, H., Wang, Y., et al.
Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1).
J Biol Chem 1994;269:33082-33090.

Hayashi, Y., Nishio, M., Naito, Y., et al.
Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases.
J Biol Chem 1999;274:20597-20602.

Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R.C., Chait, B.T.
Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers.
Anal Chem. 1991;63:1193A-1203A.

Hofmann, F.
The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases.
J Biol Chem 2005;280:1-4.

Hope, B.T., Michael, G.J., Knigge, K.M. und Vincent, S.R.
Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase.
Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:2811-2814.

Huang, P.L.
Neuronal and endothelial nitric oxide synthase gene knockout mice.
Braz J Med Biol Res 1999;32:1353-1359.

Huang, P.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S., Snyder, S.H. und Fishman, M.C.
Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene.
Cell 1993;75:1273-1286.

Hudlicka, O.
Is physiological angiogenesis in skeletal muscle regulated by changes in microcirculation?
Microcirculation 1998;5:5-23.

Hudlicka, O., Brown, M.D. und Silgram, H.
Inhibition of capillary growth in chronically stimulated rat muscles by N(G)-nitro-L-arginine, nitric oxide synthase inhibitor.
Microvasc Res 2000;59:45-51.

Hung, A.Y. und Sheng, M.
PDZ domains: structural modules for protein complex assembly.
J Biol Chem 2002;277:5699-5702.

Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E. und Chaudhuri, G.
Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.
Proc Natl Acad Sci USA 1987;84:9265-9269.

Jackson, M.J., Pye, D. und Palomero, J.
The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle.
J Appl Physiol. 2006 (im Druck).

Jaffrey, S.R. und Snyder, S.H.
PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase.
Science 1996;274:774-777.

Kameya, S., Miyagoe, Y., Nonaka, I., et al.
alpha1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration.
J Biol Chem 1999;274:2193-2200.

Kapur, S., Bedard, S., Marcotte, B., Cote, C.H. und Marette, A.
Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action.
Diabetes 1997;46:1691-1700.

- Klose, J., Kobalz, U.
Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome.
Electrophoresis. 1995;16:1034-59.
- Knowles, R.G. und Moncada, S.
Nitric oxide synthases in mammals.
Biochem J 1994;298:249-258.
- Kobzik, L., Reid, M.B., Bredt, D.S. und Stamler, J.S.
Nitric oxide in skeletal muscle.
Nature 1994;372:546-548.
- Kobzik, L., Stringer, B., Balligand, J.L., Reid, M.B. und Stamler, J.S.
Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships.
Biochem Biophys Res Commun 1995;211:375-381.
- Kone, B.C., Kuncewicz, T., Zhang, W. und Yu, Z.Y.
Protein interactions with nitric oxide synthases: controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide.
Am J Physiol Renal Physiol 2003;285:F178-190.
- Kusner, L.L. und Kaminski, H.J.
Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate.
Brain Res 1996;730:238-242.
- Laemmli, U. K.
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 1970;227:680-685.
- Lau, K.S., Grange, R.W., Isotani, E., et al.
nNOS and eNOS modulate cGMP formation and vascular response in contracting fast-twitch skeletal muscle.
Physiol Genomics 2000;2:21-27.
- Lee, M.A., Cai, L., Hubner, N., Lee, Y.A. und Lindpaintner, K.
Tissue- and development-specific expression of multiple alternatively spliced transcripts of rat neuronal nitric oxide synthase.
J Clin Invest 1997;100:1507-1512.
- Maines, M.D.
The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 1997;37:517-554.
- Manevich, Y. und Fisher, A.B.
Peroxiredoxin 6, a 1-Cys peroxiredoxin, functions in antioxidant defense and lung phospholipid metabolism.
Free Radic Biol Med 2005;38:1422-1432.

- Marechal, G. und Gailly, P.
Effects of nitric oxide on the contraction of skeletal muscle.
Cell Mol Life Sci 1999;55:1088-1102.
- Marletta, M.A.
Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis.
Cell 1994;78:927-930.
- McCoubrey, W.K., Jr., Huang, T.J. und Maines, M.D.
Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3.
Eur J Biochem 1997;247:725-732.
- McCoubrey, W.K., Jr. und Maines, M.D.
The structure, organization and differential expression of the gene encoding rat heme oxygenase-2.
Gene 1994;139:155-161.
- McMillan, K. und Masters, B.S.
Prokaryotic expression of the heme- and flavin-binding domains of rat neuronal nitric oxide synthase as distinct polypeptides: identification of the heme-binding proximal thiolate ligand as cysteine-415.
Biochemistry 1995;34:3686-3693.
- Mo, Y., Feinstein, S.I., Manevich, Y., et al.
1-Cys peroxiredoxin knock-out mice express mRNA but not protein for a highly related intronless gene.
FEBS Lett 2003;555:192-198.
- Moncada, S., Palmer, R.M. und Higgs, E.A.
The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator.
Hypertension 1988;12:365-372.
- Morrison, TB., Weis, JJ., Wittwer, CT.
Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green 1 monitoring during amplification.
Biotechniques 1998;24:960-962.
- Mungrue, I.N., Bredt, D.S., Stewart, D.J. und Husain, M.
From molecules to mammals: what's NOS got to do with it?
Acta Physiol Scand 2003;179:123-135.
- Murad, F.
Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP.
Braz J Med Biol Res 1999;32:1317-1327.
- Nakane, M., Schmidt, H.H., Pollock, J.S., Forstermann, U. und Murad, F.
Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle.
FEBS Lett 1993;316:175-180.

Nathan, C. und Xie, Q.W.

Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls.

Cell 1994;78:915-918.

Newton, D.C., Bevan, S.C., Choi, S., et al.

Translational regulation of human neuronal nitric-oxide synthase by an alternatively spliced 5'-untranslated region leader exon.

J Biol Chem 2003;278:636-644.

O'Farrell, P.H.

High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.

J. Biol. Chem. 1975;250:4007-4021.

Planitzer, G., Baum, O. und Gossrau, R.

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

Histochem J 2000;32:303-312.

Planitzer, G., Miethke, A. und Baum, O.

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

Cell Tissue Res 2001;306:325-333.

Reid, M.B.

Role of nitric oxide in skeletal muscle: synthesis, distribution and functional importance.

Acta Physiol Scand 1998;162:401-409.

Salinovich, O. and Montelaro, RC.

Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

Anal Biochem. 1986;156:341-7.

Sander, M., Chavoshan, B., Harris, S.A., et al.

Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy.

Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:13818-13823.

Scapagnini, G., D'Agata, V., Calabrese, V., et al.

Gene expression profiles of heme oxygenase isoforms in the rat brain.

Brain Res 2002;954:51-59.

Schägger, H. und von Jagow, G.

Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.

Anal.Biochem. 1987;166:368-379.

Segalat, L., Grisoni, K., Archer, J., Vargas, C., Bertrand, A. und Anderson, J.E.

CAPON expression in skeletal muscle is regulated by position, repair, NOS activity, and dystrophy.

Exp Cell Res 2005;302:170-179.

Shankar, R.R., Wu, Y., Shen, H.Q., Zhu, J.S. und Baron, A.D.
Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance.
Diabetes 2000;49:684-687.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. und Mann, M.
Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.
Anal Chem 1996;68:850-858.

Silvagno, F., Xia, H. und Bredt, D.S.
Neuronal nitric-oxide synthase-mu, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle.
J Biol Chem 1996;271:11204-11208.

Smith, M.A. und Reid, M.B.
Redox modulation of contractile function in respiratory and limb skeletal muscle.
Respir Physiol Neurobiol. 2006;151:229-241.

Son, H., Hawkins, R.D., Martin, K., et al.
Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase.
Cell 1996;87:1015-1023.

Stamler, J.S. und Meissner, G.
Physiology of nitric oxide in skeletal muscle.
Physiol Rev 2001;81:209-237.

Talukder, M.A., Fujiki, T, Morikawa, K., et al.
Up-regulated neuronal nitric oxide synthase compensates coronary flow response to bradykinin in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice.
J Cardiovasc Pharmacol 2004;44:437-445.

Tews, D.S., Goebel, H.H., Schneider, I., Gunkel, A., Stennert, E. und Neiss, W.F.
Expression of different isoforms of nitric oxide synthase in experimentally denervated and reinnervated skeletal muscle.
J Neuropathol Exp Neurol 1997;56:1283-1289.

Theiss, A.L., Idell, R.D., Srinivasan, S., et al.
Prohibitin protects against oxidative stress in intestinal epithelial cells.
FASEB J 2006.

Thomas, G.D., Hansen, J. und Victor, R.G.
Inhibition of alpha 2-adrenergic vasoconstriction during contraction of glycolytic, not oxidative, rat hindlimb muscle.
Am J Physiol 1994;266:H920-929.

Thomas, G.D., Sander, M., Lau, K.S., Huang, P.L., Stull, J.T. und Victor, R.G.
Impaired metabolic modulation of alpha-adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle .
Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:15090-15095.

- Thomas, G.D., Shaul, P.W., Yuhanna, I.S., Froehner, S.C. und Adams, M.E.
Vasomodulation by skeletal muscle-derived nitric oxide requires alpha-syntrophin-mediated sarcolemmal localization of neuronal nitric oxide synthase.
Circ Res 2003;92:554-560.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1979;76:4350-4354.
- Venema, V.J., Ju, H., Zou, R. und Venema, R.C.
Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain.
J Biol Chem 1997;272:28187-28190.
- Vesely, M.J., Sanders, R., Green, C.J. und Motterlini, R.
Fibre type specificity of haem oxygenase-1 induction in rat skeletal muscle.
FEBS Lett 1999;458:257-260.
- Wang, T., Inglis, F.M. und Kalb, R.G.
Defective fluid and HCO₃⁻ absorption in proximal tubule of neuronal nitric oxide synthase-knockout mice.
Am J Physiol Renal Physiol 2000;279:F518-524.
- Wang, Y., Newton, D.C. und Marsden, P.A.
Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance.
Crit Rev Neurobiol 1999;13:21-43.
- Wang, X., Phelan, S.A., Forsman-Semb, K., et al.
Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress.
J Biol Chem 2003;278:25179-25190.
- Ward, M.E., Toporsian, M., Scott, J.A., et al.
Hypoxia induces a functionally significant and translationally efficient neuronal NO synthase mRNA variant.
J Clin Invest 2005;115:3128-3139.
- Wehling, M., Spencer, M.J. und Tidball, J.G.
A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice.
J Cell Biol 2001;155:123-131.
- Williams, J.L., Cartland, D., Hussain, A. und Egginton, S.
A differential role for nitric oxide in two forms of physiological angiogenesis in mouse.
J Physiol 2006a;570:445-454.
- Williams, J.L., Weichert, A., Zakrzewicz, A., et al.
Differential gene and protein expression in abluminal sprouting and intraluminal splitting forms of angiogenesis.
Clin Sci (Lond) 2006b.

Wittwer, C., Hahn, M., Kaul, K.
Rapid Cycle Real-Time PCR-Methods and Applications.Quantification.
Springer, Berlin 2004.

Wong, ML., Medrano, JF.
Real-time PCR for mRNA quantitation.
Biotechniques 2005;39:75-85.

Wood, Z.A., Schroder, E., Robin Harris, J. und Poole, L.B.
Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins.
Trends Biochem Sci 2003;28:32-40.

Xu, K.Y., Huso, D.L., Dawson, T.M., Bredt, D.S. und Becker, L.C.
Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum.
Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:657-662.

Young, M.E., Radda, G.K. und Leighton, B.
Nitric oxide stimulates glucose transport and metabolism in rat skeletal muscle in vitro.
Biochem J 1997;322:223-228.

Zakrzewicz, A., Secomb, T.W. und Pries, A.R.
Angioadaptation: keeping the vascular system in shape.
News Physiol Sci 2002;17:197-201.

Zelko, I.N., Mariani, T.J. und Folz, R.J.
Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression.
Free Radic Biol Med 2002;33:337-349.

Zhou, A., Egginton, S., Hudlicka, O. und Brown, M.D.
Internal division of capillaries in rat skeletal muscle in response to chronic vasodilator treatment with alpha1-antagonist prazosin.
Cell Tissue Res 1998;293:293-303.

Verwendete Abkürzungen

| | |
|-----------------|--|
| APS | Ammoniumperoxidsulfat |
| AS | Aminosäure |
| BH ₄ | Tetrahydrobiopterin |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CHAPS | 3-((3 Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DMD | Duchennesche Muskeldystrophie |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDL | M. extensor digitorum longus |
| EDRF | endothelialer Relaxationsfaktor |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinucleotid |
| FMN | Flavin-Mononucleotid |
| GITC | Guanidiniumisothiocyanat |
| GAPDH | Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase |
| HO | Hämoxygenase |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| IEF | Isoelektrische Fokussierung |
| Ig | Immunglobulin |
| IPG | immobilisierter pH-Gradient |
| kDa | Kilodalton |
| MALDI | Matrix-assisted laser-desorption ionization |
| MALDI-TOF | Matrix-assisted laser-desorption ionization time of flight |
| MOPS | 3-Morpholino-1-propansulfonsäure |
| Mr | relatives Molekulargewicht |
| MS | Massenspektrometrie |
| NADPH | reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxid-Synthase |
| eNOS | endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase |
| nNOS | neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfleurid |
| PRDX6 | Peroxiredoxin 6 |
| PVDF | Polyvinylidendiflourid |
| SDS | Natrium-Dodecylsulfat |
| sGC | lösliche Guanylatcyclase |
| TA | M. tibialis anterior |
| TEMED | N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Tris-(hydroximethyl)-aminomethan |

Veröffentlichungsliste

1. Originalarbeiten

Da Silva-Azevedo L, **Jähne S**, Hoffmann C, Stalder D, Heller M, Pries AR, Zakrzewicz A, Baum O. Up-regulation of the peroxiredoxin-6 related metabolism of reactive oxygen species in skeletal muscle of mice lacking neuronal nitric oxide synthase. J Physiol. 2009 Feb 1;587(Pt 3):655-68. Epub 2008 Dec 1

2. Kongressmitteilungen

S. Jähne, L. Da Silva-Azevedo, O. Baum, A. Zakrzewicz, A.R. Pries:

Search for proteins differentially expressed in skeletal muscles of nNOS-knockout mice compared to C57/B16 wild-type mice by 2D-PAGE.

84. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Göttingen, 2005
Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 449 (Suppl. 1): S76 (2005)

S. Jähne, L. Da Silva-Azevedo, C. Hoffmann, M. Heller, O. Baum, A. Zakrzewicz and A.R. Pries:

Up-regulation of enzymes involved in metabolism of reactive oxygen species (ROS) in skeletal muscle of mice lacking neuronal nitric oxide synthase (nNOS)

L. Da Silva-Azevedo, **S. Jähne**, H. Manfred, O. Baum, A. Zakrzewicz, A.R. Pries:

Induction of peroxiredoxin-6 and peroxiredoxin 3 in skeletal muscle of mice lacking neuronal nitric oxide synthase (nNOS) 24th European Conference on Microcirculation "From Vascular Biology to Clinical Microcirculation", Amsterdam, 2006

L. Da Silva-Azevedo, **S. Jähne**, H. Manfred, O. Baum, A. Zakrzewicz, A.R. Pries:

Peroxiredoxin-6 is induced in skeletal muscle of mice lacking neuronal nitric oxide synthase. Joint Meeting of the German Physiologic Society and the Federation of European Physiologic Societies, Munich, 2006
Acta Physiol. 186 (Suppl. 1): 224 (2006)

L. Da Silva-Azevedo, **S. Jähne**, S. Gul, S. Hahn, A. Zakrzewicz, A.R. Pries, O. Baum:

Heme oxygenase-3 is up-regulated in skeletal muscle of mice lacking neuronal nitric oxide synthase and might compensate for neuronal nitric oxide synthase function in shear stress-dependent angiogenesis.

Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie (in association with DGKMH), Rostock, 2005
J. Vasc. Res. 43: 52 (2006)

L. Da Silva-Azevedo, **S. Jähne**, O. Baum, J. Gobom, A. Zakrzewicz, A.R. Pries:

Proteome analysis of shear stress-regulated proteins in human endothelial cells. 84. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, Göttingen, 2005
Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 449 (Suppl. 1): S72 (2005)

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Erklärung

„Ich, Sebastian Jähne, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Kompensationsmechanismen im Skelettmuskel von neuronaler Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) defizienten Mäusen selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. Axel R. Pries danke ich für die Überlassung des Themas.

Danken möchte ich Herrn Dr. Andreas Zakrzewicz und Herrn Dr. Oliver Baum für die sehr gute fachliche Betreuung und die mich mit Ihrer großen Erfahrung und konstruktiven Kritik stets unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Luis da Silva-Azevedo für die hilfreiche und freundliche Unterstützung während der experimentellen Phase meiner Arbeit.