3. Ergebnisse

Die hier dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei Versuche.

3.1. Immunblotuntersuchungen zur Expression von sGC, NOS-1, NOS-3 und BVR

Zum qualitativen Nachweis von sGC und der Enzyme, die die sGC möglicherweise für ihre Signaltransduktion benötigen, wurden Immunblots mit Homogenaten verschiedener Organe von Ratte und Hamster durchgeführt. Gleichzeitig konnte dadurch die Monospezifität der eingesetzten Antikörper überprüft werden.

3.1.1. sGC in Rattenorganen

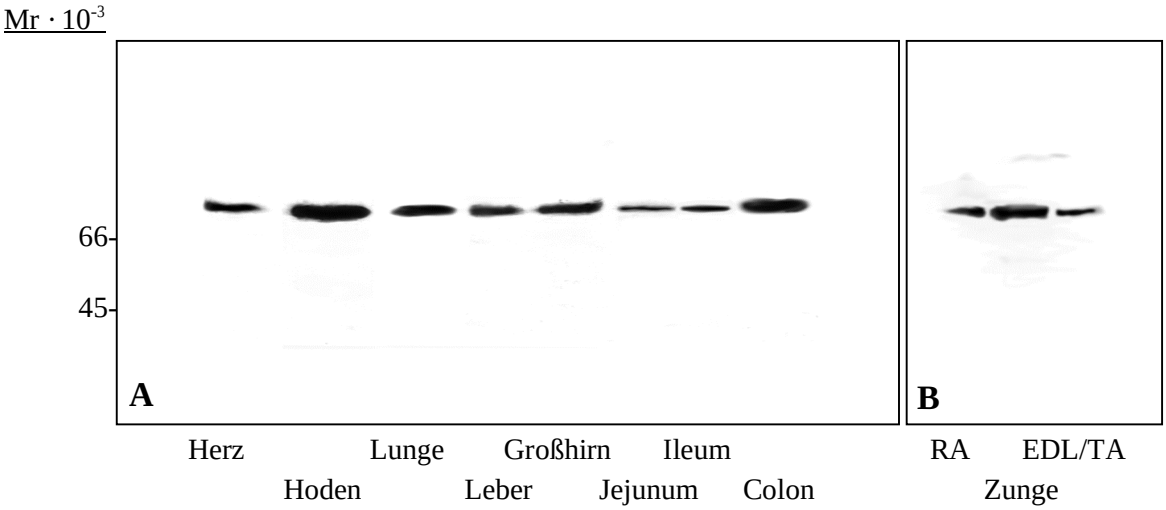


Abb. 4: sGC-Immunblots mit Organ- (A) und Muskelhomogenaten (B) der Ratte. 1 g der jeweiligen Organe wurde in Solubilistationspuffer homogenisiert, 50 µg pro Bahn in der SDS-PAGE (10 % PAG) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit dem peptidspezifischen, polyklonalen anti-β_1-sGC-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 inkubiert. Für alle untersuchten Organe wurden Banden in Höhe von 70 kDa gefunden (RA = M. rectus abdominis; EDL/TA = M. extensor digitorum longus / M. tibialis anterior).

Die β_1-sGC-Immunblots zeigen, daß die β_1-Untereinheit der sGC in allen untersuchten Organen der Ratte, d.h. in den Organen des kardiopulmonalen Systems (Herz, Lunge), des Verdauungssystems (Leber, Jejunum, Ileum, Colon), des Reproduktionssystems (Hoden), des ZNS (Großhirn) und in Skelettmuskeln (RA, EDL/TA, Zunge) vorhanden ist (**Abb. 4**). Der eingesetzte Antikörper erkennt monospezifisch die sGC in den untersuchten Rattenorganen. Da für alle Bahnen identische Proteinmengen (50 µg) in der SDS-PAGE eingesetzt wurden,

läßt sich von der Stärke der Bande im sGC-Immunblot auf die Konzentration der β_1-Untereinheit der sGC schließen. In Hoden, Colon und Zungenmuskulatur ist die sGC-Konzentration am höchsten und deutlich schwächer im Dünndarm (Jejunum, Ileum).

3.1.2. sGC in Skelettmuskeln des Hamsters

Um zu klären, ob die sGC in Skelettmuskeln speziesunabhängig vorkommt, wurden zum Vergleich sGC-Immunblots mit Muskelhomogenaten des Hamsters angefertigt.

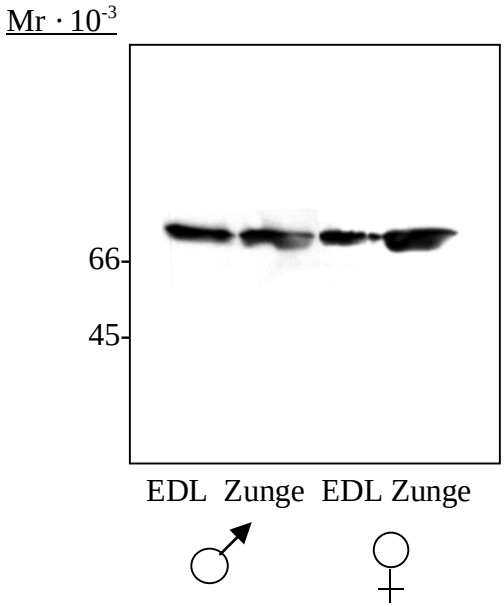


Abb. 5: sGC-Immunblot mit verschiedenen Muskelhomogenaten des Hamsters. Probenaufbereitung, SDS-PAGE, Westernblot und Inkubation mit dem anti-β_1-sGC-Antikörper erfolgte wie bei der Untersuchung der sGC in der Rattenorganen (**Abb. 4**). Mit Homogenaten von EDL und Zunge von männlichen und weiblichen Tieren finden sich Banden in Höhe von 70 kDa. Geschlechtsunabhängig sind die Banden für die Zunge kräftiger als für den EDL.

Der eingesetzte Antikörper erkennt monospezifisch die sGC in den Skelettmuskeln von Hamstern, bei denen die sGC-Konzentration in der Zunge ebenfalls höher als in anderen Skelettmuskeln ist (**Abb. 5**). Geschlechtsspezifische Unterschiede fehlen.

3.1.3. NOS-1 und NOS-3 in Rattenorganen

Nachdem die sGC in Organen des Verdauungs-, Reproduktions- und des Kardiopulmonal-Systems sowie vor allem in Skelettmuskeln von Ratte und Hamster nachgewiesen wurde, sollte anschließend untersucht werden, ob in diesen Organen auch die potentiell mit der sGC

wechselwirkenden Enzyme vorhanden sind. Ausgehend von NO als stärkstem physiologischen Aktivator der sGC wurden deshalb die konstitutiv exprimierten Stickstoffmonoxidsynthasen NOS-1 und NOS-3 im Immunblot untersucht.

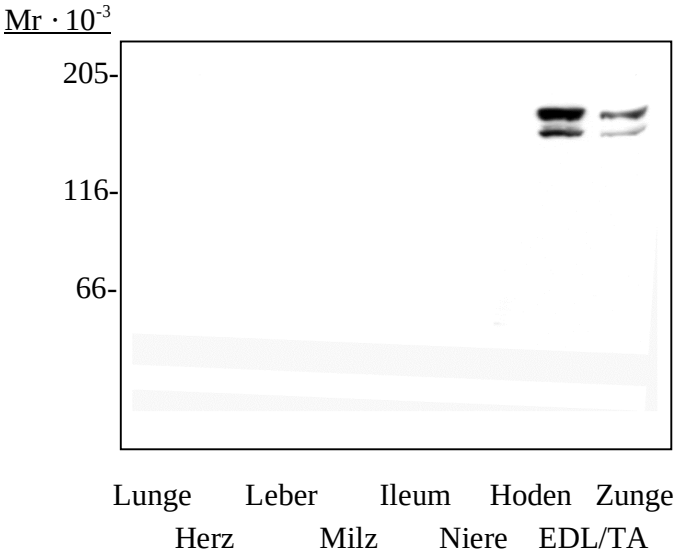


Abb. 6: NOS-1-Immunblot mit verschiedenen Organhomogenaten von Ratten. 1 g der jeweiligen Organe wurde in Solubilistationspuffer homogenisiert, 50 µg pro Bahn in der SDS-PAGE (12,5 % PAG) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit einem Gemisch aus zwei peptidspezifischen, polyklonalen anti-NOS-1-Antikörpern, die gegen die Aminosäuren 1409-1429 und 251-270 der NOS-1 gerichtet sind, in der Verdünnung von jeweils 1:5.000 in PBS inkubiert. Im EDL/TA und der Zunge zeigen sich jeweils zwei Banden bei 160 und 140 kDa.

Die NOS-1 ist im Immunblot von Skelettmuskeln mit zwei Banden bei 160 und 140 kDa nachweisbar (**Abb. 6**). In Organen des kardiopulmonalen Systems (Herz, Lunge), den Abdominalorganen Leber, Milz und Ileum sowie Organen des Urogenitaltraktes (Niere, Hoden) ließ sich die NOS-1 mit dem durchgeführten Protokoll nicht zeigen. Die eingesetzten Antikörper erkennen monospezifisch die NOS-1.

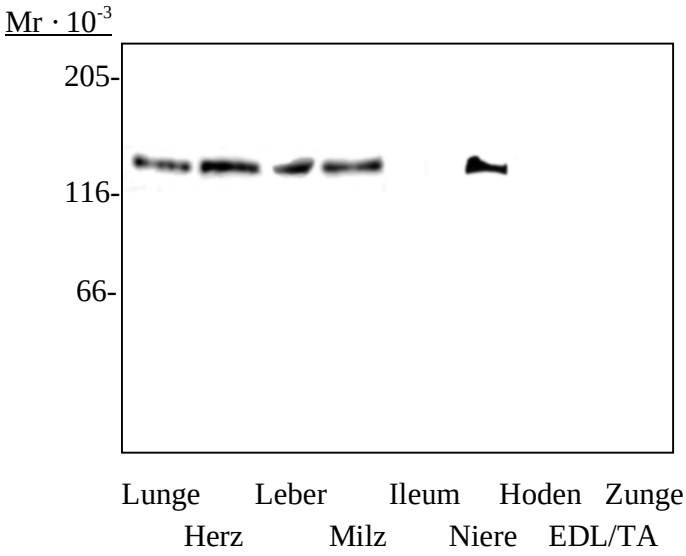


Abb. 7: NOS-3-Immunblot mit verschiedenen Organhomogenaten der Ratte. 1 g der jeweiligen Organe wurde in Solubilistationspuffer homogenisiert, 50 µg pro Bahn in der SDS-PAGE (12,5 %-PAG) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit einem peptid-spezifischen, polyklonalen Antikörper, der gegen die Aminosäuren 1025-1203 der humanen NOS-3 gerichtet ist, in der Verdünnung von 1:1.000 in PBS inkubiert. In Lunge, Herz, Leber, Milz und der Niere finden sich 135 kDa-Banden, die dem Mr der NOS-3 entspricht.

Der NOS-3-Immunblot zeigt, daß das Enzym in Lunge, Herz, Leber, Milz und Niere vorkommt und in Ileum, Hoden und in den Skelettmuskeln (EDL/TA, Zunge) fehlt **(Abb. 7**).

3.1.4. Biliverdinreduktase in Rattenorganen

Ein weiteres, wenn auch schwächeres Aktivatormolekül der sGC ist CO. CO entsteht beim Abbau von Häm zu Bilirubin, an dem die Häm-Oxygenasen und nachgeschaltet die BVR beteiligt sind. Deshalb wurde die BVR in verschiedenen Rattenorganen im Immunblot untersucht.

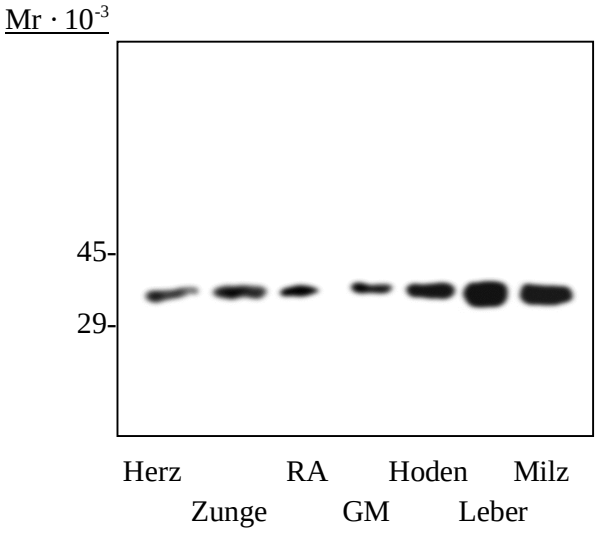


Abb. 8: BVR-Immunblot mit verschiedenen Rattenorganen. 1 g der jeweiligen Organe wurde in Solubilistationspuffer homogenisiert, 50 µg pro Bahn in der SDS-PAGE (12,5 % PAG) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit dem gegen das Gesamtprotein gerichteten, polyklonalen anti-BVR-Antikörper (OSA-400) 1:2.000 inkubiert. Es zeigen sich in allen Organen und im GM Banden bei 33 kDa.

Mit dem BVR-Immunblot wurde die BVR in Herz, Skelettmuskulatur (Zunge, RA, GM), Hoden, Leber und Milz nachgewiesen (**Abb. 8**). Die Banden liegen bei 33 kDa und sind in den Organen am intensivsten, in denen die beim Häm-Abbau der BVR vorgeschalteten Häm-Oxygenasen physiologisch am stärksten exprimiert sind (Hoden: HO-2; Leber: HO-1 und HO-2; Milz: HO-1). Der eingesetzte Antikörper erkennt monospezifisch die BVR in den untersuchten Organen der Ratte.

Zusammengenommen zeigen die Immunblots, daß in Skelettmuskeln von Ratte und Hamster zusammen mit der sGC auch NOS-1 und BVR exprimiert werden. Die NOS-3 wurde im Immunblot von Skelettmuskeln nicht gefunden.Dagegen kommt die NOS-3 in Lunge, Herz, Leber, Milz und Niere, die BVR besonders in Leber, Milz und Hoden vor. Die NOS-1 konnte außerhalb von Skelettmuskeln nicht nachgewiesen werden.

3.2. Untersuchungen mit den anti-HO-2- und anti-HO-3-Antikörpern

3.2.1. Sensititvität und Spezifität der anti-HO-2- und anti-HO-3-Antikörper

CO, das beim Abbau von Häm zu Biliverdin durch die Häm-Oxygenasen entsteht, ist neben NO, der zweite, wenngleich schwächere physiologische Aktivator der sGC. Die beiden

konstitutiv exprimierten Isoformen HO-2 und HO-3 sind zu 90 % homolog, so daß mit dem kommerziellen anti-HO-2-Antikörper eine Unterscheidung dieser Enzyme bei Immunblots und immunhistochemischen Untersuchungen nicht möglich ist. Außerdem ist bisher kein anti-HO-3-Antikörper kommerziell erhältlich. Deshalb wurden 3 Kaninchen mit dem HO-2-spezifischen Peptid DRNKDHPAFAPL und 3 Kaninchen mit dem HO-2-spezifischen Peptid KETQPVPFTRE immunisiert. Die Sensititvität der so gewonnenen peptidspezifischen, polyklonalen Antikörper wurden mit Verdünnungsreihen getestet und die optimale Konzentration der Antikörper für Immunblots bestimmt.

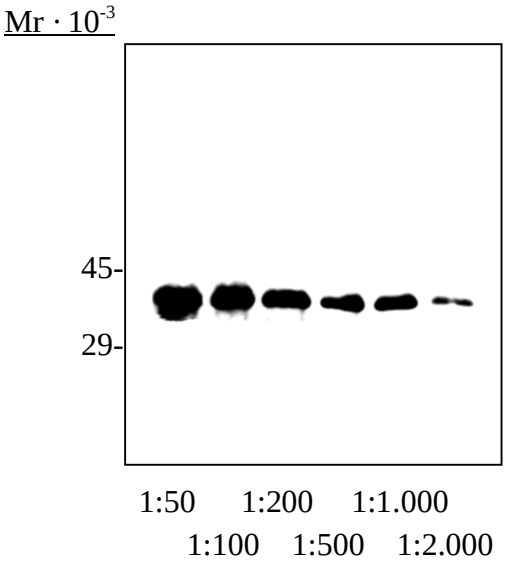


Abb. 9: Bestimmung der Sensitivität des anti-HO-2-Antikörpers in Immunblots. 1 g Rattenhoden wurde in Solubilistationspuffer homogenisiert, 50 µg pro Bahn in der SDS-PAGE (12,5 % PAG) aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Nitrozellulose wurde nach der Ponceau-Färbung in die einzelnen Bahnen zerschnitten und mit verschiedenen Konzentrationen des anti-HO-2-Antikörpers (1:50 bis 1:2.000 in PBS) inkubiert. Die Bandenstärken bei 36 kDa werden mit zunehmender Verdünnung des Antikörpers geringer.

Im HO-2 Immunblot sind Banden zu erkennen, die monospezifisch für ein 36 kDa Protein sind. Das entspricht dem Mr der HO-2. Der anti-HO-2-Antikörper erkennt dieses Protein bis zu einer maximalen Verdünnung von 1:2.000 (**Abb. 9**). In der Verdünnung von 1:500 markiert der Antikörper eine klar abgegrenzte, vollständige Bande. In weiteren Immunblots wurde der Antikörper deshalb in dieser optimalen Verdünnung eingesetzt.

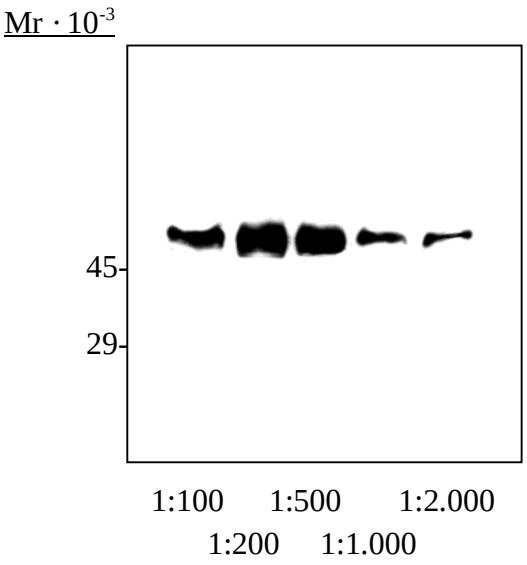


Abb. 10: Bestimmung der Sensitivität des anti-HO-3-Antikörpers in Immunblots. 1 g Rattenherz wurde in Solubilistationspuffer homogenisiert, 50 µg pro Bahnin der SDS-PAGE (12,5 %-PAG) aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Nitrozellulose wurde nach der Ponceau-Färbung in die einzelnen Bahnen zerschnitten und mit verschiedenen Konzentrationen des anti-HO-3-Antikörpers (1:100 bis 1:2.000 in PBS) inkubiert. Banden bei 50 kDA sind bis zu einer maximalen Verdünnung von 1:2.000 sichtbar.

Im HO-3-Immunblot sind Banden zu erkennen, die monospezifisch für ein 50 kDa Protein sind (**Abb. 10**), das vom Mr der HO-3 abweicht. Der anti-HO-3-Antikörper erkennt dieses Protein bis zu einer maximalen Verdünnung von 1:2.000. In der Verdünnung von 1:500 markiert der Antikörper eine klar abgegrenzte, vollständige Bande. In weiteren Immunblots wurde der Antikörper deshalb in dieser optimalen Verdünnung eingesetzt.

Um die Peptidspezifität der beiden hergestellten Antikörper zu zeigen, wurden Immunblots mit dem jeweiligen Antikörper und dem entsprechenden Immunisierungspeptid im Überschuß inkubiert. Unterbleibt die Antikörperbindung an die Nitrozellulose bei Koinkubation mit dem Peptid, beweist dies die Spezifität der Antikörperbindung an ihr Zielpeptid.

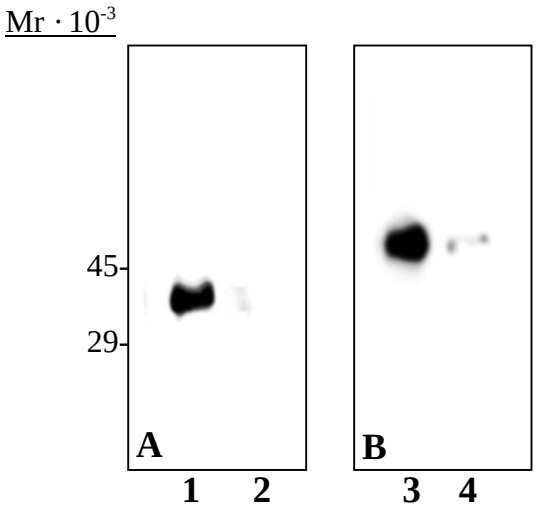


Abb. 11: HO-2- (A) und HO-3-Immunblots (B) bei Koinkubation mit den Immunisierungspeptiden. 1 g Rattenhoden wurde in Solubilistationspuffer homogenisiert, 50 µg pro Bahn in der SDS-PAGE (12,5 % PAG) aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Nitrozellulose wurde in die einzelnen Bahnen aufgetrennt**.** Bahn 1 wurde mit dem anti-HO-2-Antikörper in der Verdünnung 1:500, Bahn 2 wurde mit dem anti-HO-2-Antikörper (1:500) und mit 10 µg des Immunisierungspeptids (Aminosäuresequenz DRNKDHPAFAPL) inkubiert. Bahn 3 wurde mit dem anti-HO-3-Antikörper in der Verdünnung 1:500, Bahn 4 wurde mit dem anti-HO-3-Antikörper (1:500) und mit 10µg des Immunisierungspeptids (Aminosäurensequenz KETQPVPFTRE) inkubiert. Bei Koinkubation mit dem anti-HO-2-Immunisierungspeptid ist keine Bande (A), bei Koinkubation mit dem anti-HO-3-Immunisierungspeptid eine deutlich abgeschwächte Bande (B) sichtbar.

Es zeigt sich, daß die aus Kaninchen gewonnen, peptidspezifischen, polyklonalen anti-HO-2- und anti-HO-3-Antikörper spezifisch an die eingesetzten Immunisierungspeptide binden (**Abb. 11**). Die beiden Antikörper sind demnach peptidspezifisch für die Immunisierungspeptide.

3.2.2. HO-2 in Rattenorganen

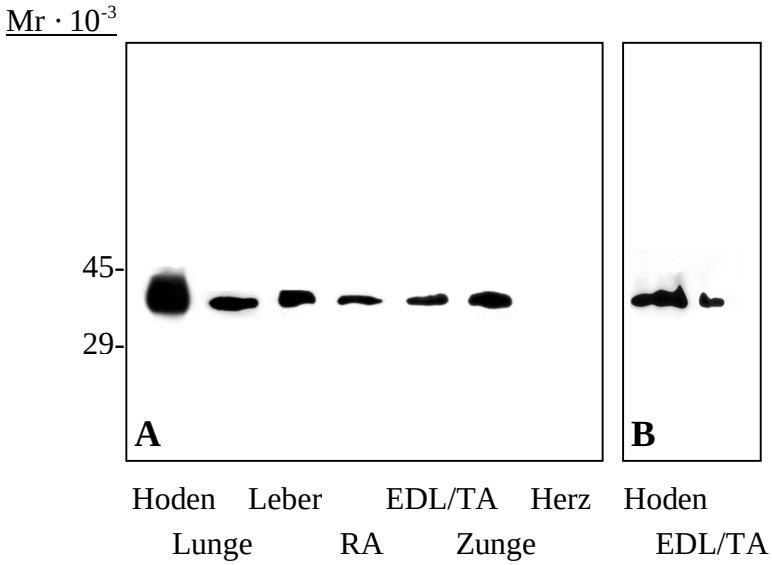


Abb. 12: HO-2-Immunblot mit verschiedenen Rattenorganen. 1 g der jeweiligen Organe wurde in Solubilistationspuffer homogenisiert, 50 µg pro Bahn in der SDS-PAGE (12,5 % PAG) aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. In Bild **A** wurde der peptidspezifische, poly-klonale Anti-HO-2-Antikörper (1:500), in Bild **B** der kommerzielle, gegen das Gesamtprotein gerichtete, polyklonale anti-HO-2-Antikörper (OSA-200; 1:2.000) eingesetzt. Die stärkste Bande findet sich mit beiden Antikörpern für den Hoden. Im Herzen zeigt sich keine Bande.

Mit dem aus Kaninchen gewonnenen peptidspezifischen, polyklonalen anti-HO-2-Antikörper läßt sich monospezifisch eine 36 kDa-Bande in Lunge, Leber, Skelettmuskeln (RA, EDL/TA, Zunge) und Hoden nachweisen, die der HO-2 entspricht (**Abb. 12 A**). Die höchste Konzentration kommt im Hoden vor, gefolgt von der Leber. Sowohl mit dem kommerziellen, gegen das Gesamtprotein gerichteten, polyklonalen Antikörper (**Abb. 12 B**) als auch mit dem aus Kaninchen gewonnenen peptidspezifischem, polyklonalen Antikörper (**Abb. 12 A**) kann die HO-2 in Skelettmuskeln nachgewiesen werden. Im Herzen fehlt mit beiden Antikörpern eine Expression der HO-2 (Ergebnis für den kommerziellen Antikörper nicht dargestellt). Die HO-2 läßt sich weiterhin mit beiden Antikörpern in ZNS, Niere und Gastrointestinaltrakt nachweisen (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.2.3. Charakterisierung des vom anti-HO-3-Antikörper erkannten Proteins

Die HO-3 besitzt nach den Literaturdaten ein Mr von 34 kDa. Mit dem aus Kaninchen gewonnenen, peptidspezifischen, polyklonalen anti-HO-3-Antikörper läßt sich ein Protein von ca. 50 kDa nachweisen. Um dieses Protein näher zu charakterisieren, wurden weitere

biochemische Untersuchungen durchgeführt.

3.2.3.1. Immunblots von Rattenorganen mit dem anti-HO-3-Antikörper

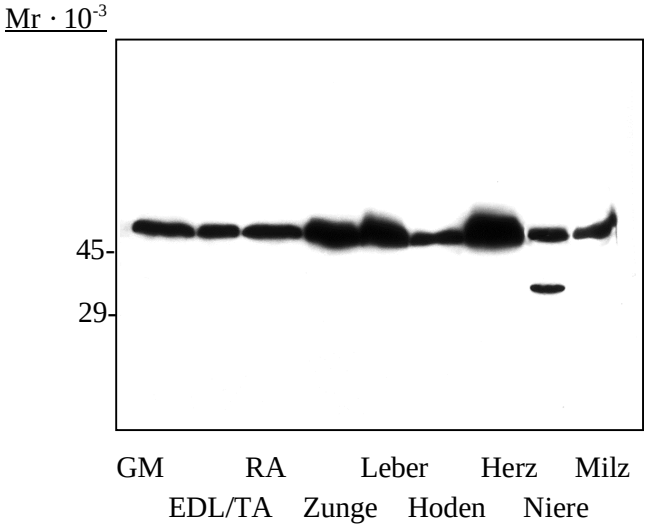


Abb. 13: HO-3-Immunblot mit verschiedenen Rattenorganen. 1 g der jeweiligen Organe wurde in Solubilistationspuffer homogenisiert, 50 µg pro Bahn in der SDS-PAGE (12,5 % PAG) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit dem anti-HO-3-Antikörper (1:500) inkubiert. Für alle Organe zeigen sich Banden bei ca. 50 kDa. Die Banden mit den Homogenaten von Zunge, Leber und Herz sind besonders kräftig. Bei der Niere tritt zusätzlich eine zweite Bande in Höhe von ca. 34 kDa auf.

Im Immunblot kommt mit dem anti-HO-3-Antikörper monospezifisch ein Protein von ca. 50 kDa in allen untersuchten Organen vor, d.h. in Skelettmuskeln (GM, EDL/TA, RA, Zunge), Herz, Bauchorganen (Leber, Milz) und Hoden (**Abb. 13**). Auch in anderen Organsystemen, d.h. ZNS sowie Organen des Respirations- und Gastrointestinalsystems wird das 50 kDa Protein in der Ratte exprimiert (Ergebnisse nicht dargestellt). In der Niere bindet der anti-HO-3-Antikörper zusätzlich an ein zweites Protein, dessen Mr ca. 34 kDa beträgt und damit dem der HO-3 entspricht.

3.2.3.2. Immunblots von Skelettmuskeln des Hamsters mit dem anti-HO-3-Antikörper

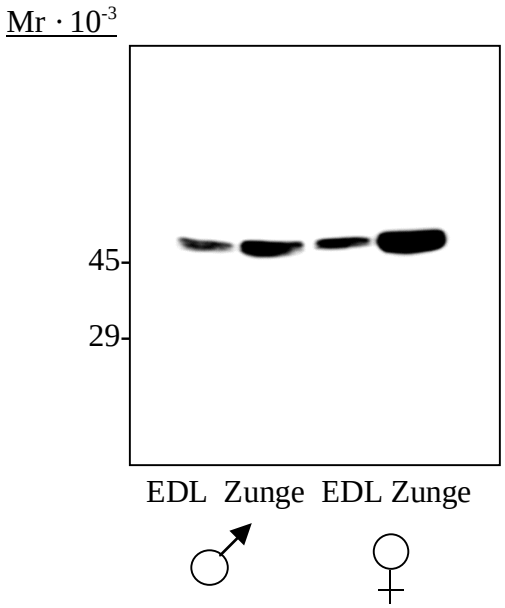


Abb. 14: HO-3-Immunblot mit verschiedenen Skelettmuskeln des Hamsters. 1 g der jeweiligen Skelettmuskeln wurde in Solubilistationspuffer homogenisiert, 50 µg pro Bahn in der SDS-PAGE (12,5 % PAG) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit dem anti-HO-3-Antikörper (1:500) inkubiert. Es zeigen sich bei männlichen und weiblichen Tieren Banden in Höhe von ca. 50 kDa, die in der Zunge jeweils stärker als in den anderen Skelettmuskeln sind.

Wie bei Organhomogenaten der Ratte bindet der anti-HO-3-Antikörper in Muskelhomogenaten des Hamsters an ein 50 kDa-Protein (**Abb. 14**). Ähnlich dem sGC-Immunblot in Muskelhomogenaten des Hamsters (**Abb. 5**) zeigt auch dieser Blot eine höhere Konzentration in der Zunge als im EDL männlicher und weiblicher Tiere.

3.2.3.3. Immunblots von Skelettmuskeln von C 57-Maus sowie NOS-1- und NOS-3-KO-Maus mit dem anti-HO-3-Antikörper

Nach den Untersuchungen an Muskelhomogenaten von Ratte und Hamster erfolgte die Testung des peptidspezifischen, polyklonalen anti-HO-3-Antikörpers an Muskelhomogenaten der NOS-1- und NOS-3-positiven C 57-Maus. Um Hinweise für eine mögliche Funktion des 50 kDa-Proteins zu erhalten, wurden NOS-1- und NOS-3-KO-Mäuse in die Untersuchungen einbezogen.

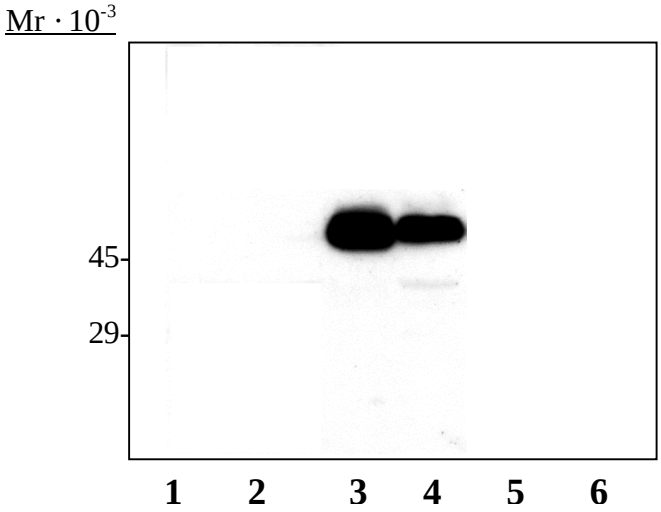


Abb. 15: HO-3-Immunblot vom EDL von C 57-Mäusen (1, 2), homozygoten NOS-1 KO-Mäusen (3, 4) und homozygoten NOS-3 KO-Mäusen (5, 6). 0,5 g des EDL wurde in Solubilistationspuffer homogenisiert, 50 µg pro Bahn in der SDS-PAGE (12,5 % PAG) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit dem anti-HO-3-Antikörper (1:500) inkubiert. In Bahn 1 und 2 sind Proben von zwei C 57-Mäusen aufgetragen, keine Antikörperbindung zeigen. Bei Bahn 3 und 4 handelt es sich um Proben von zwei NOS-1 KO-Mäusen mit deutlichen Banden bei ca. 50 kDa. Bahn 5 und 6 sind Proben von zwei NOS-3 KO-Mäusen ohne Antikörperbindung.

Im Gegensatz zu Ratte und Hamster ist im Homogenat des EDL von C 57-Wildtypmäusen kein 50 kDa-Protein nachweisbar, das von dem peptidspezifischen, polyklonalen anti-HO-3-Antikörper erkannt wird. Dagegen wird dieses Protein in NOS-1 KO-Mäusen konstitutiv exprimiert (**Abb. 15**). Im Immunblot von Muskelhomogenaten homozygoter NOS-3 KO-Mäuse zeigt sich keine Expression des Proteins.

3.2.3.4. Biochemische Charakterisierung des vom anti-HO-3-Antikörper erkannten Proteins

Der anti-HO-3-Antikörper, der aus Kaninchen nach Immunisierung mit einem Peptid aus der Sequenz der HO-3 gewonnen wurde, erkennt im Immunblot unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen (Normalfall) ein Protein mit einem Mr von ca. 50 kDa, das nicht mit dem der HO-3 von 34 kDa übereinstimmt. Zur weiteren Charakterisierung dieses 50 kDa-Proteins wurden Immunblots unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

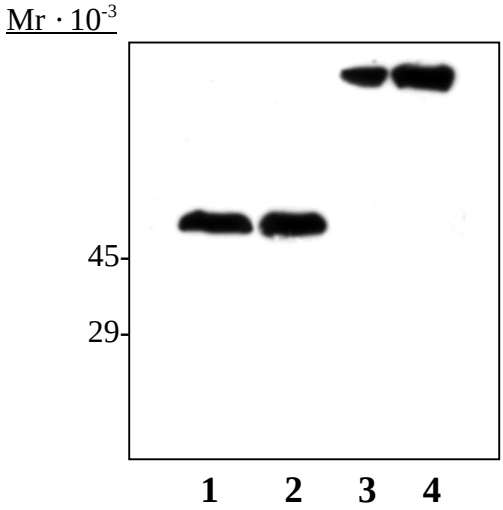


Abb. 16: HO-3-Immunblot der Rattenlunge unter unterschiedlichen Bedingungen. 1 g Rattenlunge wurden in Solubilistationspuffer homogenisiert. Für die SDS-PAGE wurden die Proben verschiedenartig vorbereitet: **Bahn 1** (Normalfall)**:** SDS-Probenpuffer + 10 mM DTT (reduziert) und 5 min im Wasserbad gekocht (denaturiert); **Bahn 2:** SDS-Probenpuffer + 10 mM DTT (reduziert) + ø denaturiert; **Bahn 3:** SDS-Probenpuffer + ø reduziert + denaturiert; **Bahn 4:** SDS-Probenpuffer + ø reduziert + ø denaturiert. 50 µg pro Bahn wurden in der SDS-PAGE (12,5 % PAG) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit dem anti-HO-3-Antikörper (1:500) inkubiert. In Bahn 1 und 2 zeigen sich Banden in Höhe von ca. 50 kDa. In Bahn 3 und 4 sind Banden mit deutlich höherem Mr am Oberrand des Gels zu erkennen.

Die Denaturierung durch Kochen hat keinen Einfluß auf das Laufverhalten des mit dem anti-HO-3-Antikörpers erkannten Proteins (**Abb. 16, Bahn 2**). Der Antikörper erkennt ein Protein mit einem Mr von ca. 50 kDa. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen erkennt der Antikörper ein höhermolekulares Protein (**Abb. 16, Bahn 3**). Dies deutet auf eine kovalente Bindung von 50 kDa-Monomeren durch Disulfid-Brücken unter nicht-reduzierenden Bedingungen hin. Da das 12,5 %-PAG zwar optimal für die Darstellung des 50 kDa-Proteins ist, jedoch höhermolekulare Proteine schlechter auftrennt, wurden SDS-PAGE und HO-3-Immunblot unter nicht reduzierenden Bedingungen mit einem 7,5 %-PAG wiederholt.

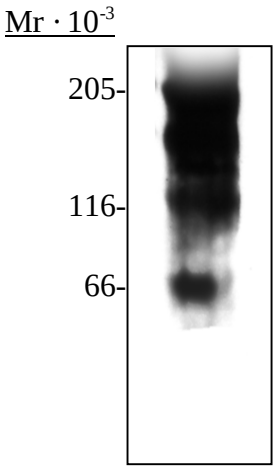


Abb. 17: HO-3-Immunblot einer denaturierten, nicht reduzierten Probe aus Homogenat der Rattenlunge. Das Homogenat wurde wie in Abb. 16, Bahn 3 beschrieben, vorbereitet, 50 µg pro Bahn wurden in der SDS-PAGE (**7,5 %-PAG**) aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit dem anti-HO-3-Antikörper (1:500) inkubiert. Banden befinden sich bei 66, 120, 150 und 200 kDa. Der unspezifische Hintergund ist durch die schlechtere Auftrennung aufgrund ungünstigerer Elektrophorese-Eigenschaften unter nicht reduzierenden Bedingungen zu erklären.

Bei Auftrennung des Homogenates in einem 7,5 %-PAG sind vier kräftige Banden bei ca. 66, 120, 150 und 200 kDa zu erkennen, die Vielfachen des kleinsten Mr von 66 kDa entsprechen könnten (**Abb. 17**). Die Abstände der Molekulargewichte legen nahe, daß im nicht reduzierten Proteingemisch das detektierte Protein neben einem Monomer als Dimer, Trimer und Tetramer vorliegt.

Um die Annahme zu bestätigen, daß es sich bei den unterschiedlichen Banden um Oligomere des 50 kDa-Proteins handelt, wurde eine modifizierte zweidimensionale Gelelktrophorese entwickelt. Dafür wurde zuerst Homogenat der Rattenlunge mit Probenpuffer ohne DTT versetzt und 5 min im Wasserbad gekocht (denaturierende, ø reduzierende Bedingungen) und anschließend durch SDS-PAGE (7,5 %-PAG) aufgetrennt. Anschließend wurden die Bahnen auseinander geschnitten und 20 min mit Probenpuffer und 20 mM DTT bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurden die Proteine im Gelstreifen reduziert. Die Gelstreifen wurden kurz mit entm. H_2O gespült und dann quer so auf ein 12,5 %-PAG gelegt, daß die höhermolekularen Proteine am Oberrand des 7,5 %-PAG links im 12,5 %-PAG liefen. In dieser Weise wurden zwei Gele beschickt. Im Coomassie-Blue gefärbten Gel erkennt man die Auftrennung der höhermolekularen Proteine am linken und der niedermolekularen Proteine am rechten Gelrand (**Abb. 18 A**). Mit dieser modifizierten zweidimensionalen Gelelektrophorese war es möglich, in einer ersten Elektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen in

Oligomeren vorkommende Proteine mit dadurch höherem Mr anzureichern und diese dann in einer zweiten Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen in ihre Monomere aufzutrennen. Durch diese zweifache Elektrophorese wurde die Trennschärfe der Isolierung von Proteinen mit ähnlichem Mr erhöht. Das zweite Gel wurde auf Nitrozellulose geblottet und mit dem anti-HO-3- Antikörper (1:500) inkubiert (**Abb. 18 B**).

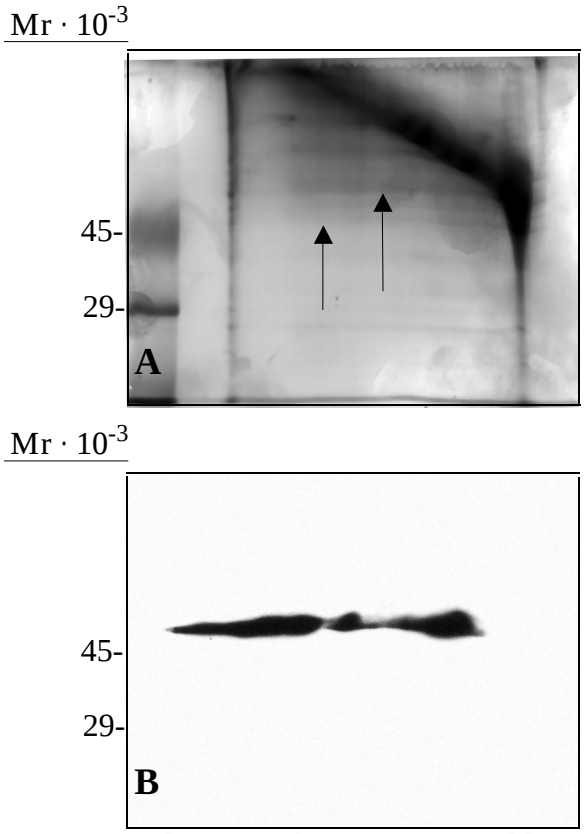


Abb. 18 A und B: Coomassie-Gel (A) und HO-3-Immunblot (B) nach modifizierter zweidimensionaler Gelelektrophorese. 1 g Rattenlunge wurde solubilisiert, mit Probenpuffer ohne DTT versetzt, 5 min im Wasserbad gekocht (denaturiert, ø reduziert) und im 7,5 %-PAG aufgetrennt. Anschließend wurden die Bahnen aus dem Gel getrennt, für 20 min mit Probenpuffer + 20 mM DTT bei Raumtemperatur inkubiert (reduziert) und kurz mit entm. H_2O gespült. Dann wurde jeweils eine Bahm quer auf ein 12,5 %-PAG ohne Taschen gelegt, wodurch die oberen Enden mit den höhermolekularen Proteinen links zu liegen kamen. Nach der SDS-PAGE wurde eines der Gele Coomassie-Blue gefärbt (**A**). Von links nach rechts sind Proteine abnehmenden Molekulargewichts aufgetrennt. Die querverlaufenden Streifen (Pfeile) entstehen durch Proteine, die zu Monomeren kleineren Molekulargewichts reduziert wurden. Parallel wurde ein zweites Gel auf Nitrozellulose geblottet und mit dem anti-HO-3-Antikörper (1:500) inkubiert (**B**). Die durchgehende Bande bei 50 kDa repräsentiert Monomere, die unter nicht reduzierenden Bedingungen Oligomere von 66, 120, 150 und 200 kDa bilden.

Der HO-3-Immunblot nach zweidimensionaler Gelelektrophorese zeigt eine durchgehende Bande bei 50 kDa (**Abb. 18 B**). Deshalb ist anzunehmen, daß die Banden bei 66, 120, 150 und 200 kDa im HO-3-Immunblot nach SDS-PAGE im 7,5 %-PAG (**Abb. 17**) Oligomere des

50 kDa-Proteins mit der vom anti-HO-3-Antikörper erkannten Peptidsequenz sind.

Mit dieser neuen Gelelektrophorese, die sich speziell für Proteine eignet, die über Disulfid-Brücken kovalent miteinander verbunden sind, wurde versucht, das Protein zu isolieren und durch Edmann-Abbau zu sequenzieren. Um eine höhere Proteinkonzentration zu erreichen wurden 1,5 mm dicke Gele eingesetzt und mit 100 µg Homogenat pro Bahn beschickt. Nach der SDS-PAGE wurde durch Nitrozellulose auf eine PVDF-Membran geblottet, so daß das Proteingemisch auf Nitrozellulose und PVDF-Membran verteilt wurde. Die PVDF-Membran wurde mit Coomassie gefärbt und mit dem Bandenmuster des Immunblots verglichen, indem der entwickelte Film über die PVDF-Membran gelegt wurde. Die den Banden entsprechenden Areale auf der PVDF-Membran wurden ausgeschnitten. Der Edmann-Abbau zur Protein-sequenzierung vom N-terminalen Ende wurde von Dr. Werner Schröder (Institut für Organische Chemie, FU Berlin) durchgeführt. Die bisherigen Ergebnisse sind jedoch noch nicht eindeutig. Auch mit konventioneller, 2-dimensionaler Elektrophorese mit immo-bilsierten pH-Gradienten-Streifen gefolgt von SDS-PAGE und Immunblot (Ergebnisse nicht dargestellt) ließ sich im Edmann-Abbau kein eindeutiges Signal finden. Weiterhin wurde versucht, das Protein mittels Säulen-Trennung über eine Mono-Q-Säule (BioRad, München) mit ansteigender Elektrolytkonzentration zu isolieren und durch den Edmann-Abbau zu sequenzieren (Ergebnisse nicht dargestellt). Hierdurch gelang es bisher ebenfalls nicht das Protein zu isolieren und zu sequenzieren.

Zusammenfassend läßt sich für das vom anti-HO-3-Antikörper erkannte Protein Folgendes feststellen:

1. Die aus Kaninchen gewonnenen, peptidspezifischen, polyklonalen anti-HO-3-Antikörper erkennen ein Protein mit einem Mr von ca. 50 kDa.
2. In allen untersuchten Organen der Ratte wird dieses Protein exprimiert. In der Niere wird ein zweites Protein vom anti-HO-3-Antikörper erkannt, das eine Größe von ca. 34 kDa aufweist und damit dem Mr der HO-3 entspricht.
3. Das Expressionsmuster des 50 kDa-Proteins ähnelt dem der sGC in Organen der Ratte und in Skelettmuskeln des Hamsters.
4. Unter nicht reduzierenden Bedingungen lagern sich die 50 kDa-Proteine zu Oligomeren zusammen.
5. Eine Sequenzierung des Proteins ist bisher nicht gelungen.

3.3. Immunhistochemische und katalytisch histochemische Untersuchungen der sGC, NOS-1, NOS-3, HO-2 und BVR in Skelettmuskeln

3.3.1. sGC-Untereinheiten in Skelettmuskeln der Ratte

Immunblots wiesen die sGC in allen untersuchten Organen der Ratte und in Skelettmuskeln des Hamsters nach. Dabei wurden ähnliche Konzentrationen gefunden (**Abb. 4 und 5**). Mit der sGC-Immunhistochemie sollte nun die Lokalisation dieses Enzyms in der Skelettmuskulatur festgestellt werden.

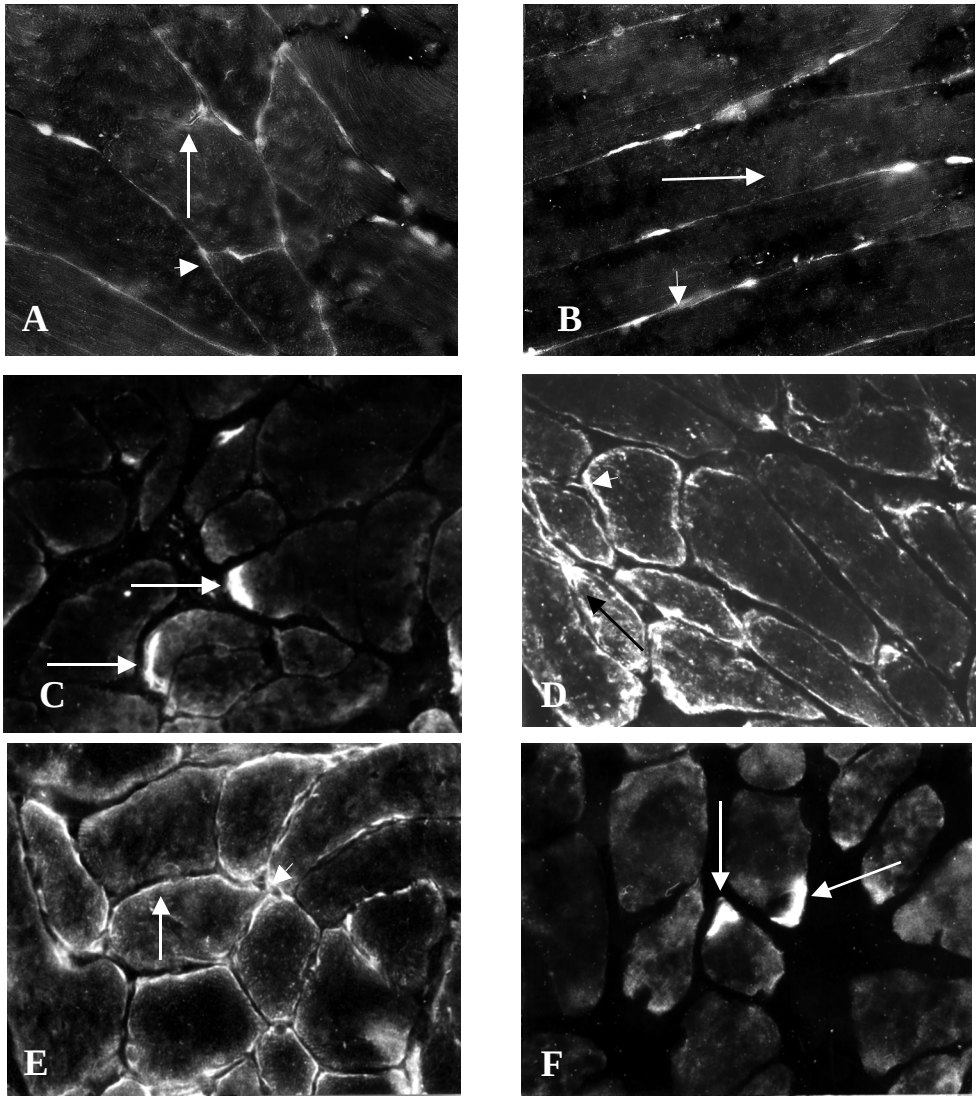


Abb. 19: Immunhistochemie der α_1-Untereinheit (A, B, C) und der β_1-Untereinheit (D, E, F) der sGC in EDL (A, B, D, E) und Zunge (C, F) der Ratte. 10 µm Kryoschnitte wurden Formaldehyd-fixiert, mit BSA blockiert und mit den Primärantikörpern gegen die α_1-Untereinheit (A, B, C) und die β_1-Untereinheit (D, E, F) jeweils in der Verdünnung 1:100 in PBS inkubiert. Die Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes erfolgte mit Cy-3-

gekoppelten Sekundärantikörpern. Immunreaktivität gegen die α_1-Untereinheit findet sich in quer- (A) und längsgeschnittenen (B) Muskelfasern im Bereich von Sarkoplasma (Pfeile) und Sarkolemm (Pfeilspitze). Anti-β_1-Immunreaktivität kommt in quer- (D) und längsgeschnittenen (B) Muskelfasern im Bereich von Sarkoplasma (Pfeile) und Sarkolemm (Pfeilspitze) vor. In Endplatten (Pfeile in C, F) der Zunge ist Immunreaktivität gegen beide Untereinheiten zu erkennen (Vergrößerung x 400).

α_1-Untereinheit und β_1-Untereinheit der sGC sind im EDL der Ratte sarkoplasmatisch **und** sarkolemmal lokalisiert (**Abb. 19**). In Endplatten ist die Immunreaktivität gegen beide Untereinheiten besonders ausgeprägt (**Abb. 19 C, F**).

3.3.2. sGC-Untereinheiten in Skelettmuskeln des Hamsters

Um zu sehen, ob die Lokalisation der sGC speziesunabhängig ist, wurden zum Vergleich mit der Ratte Skelettmuskeln des Hamsters mit Antikörpern gegen die sGC-Untereinheiten untersucht.

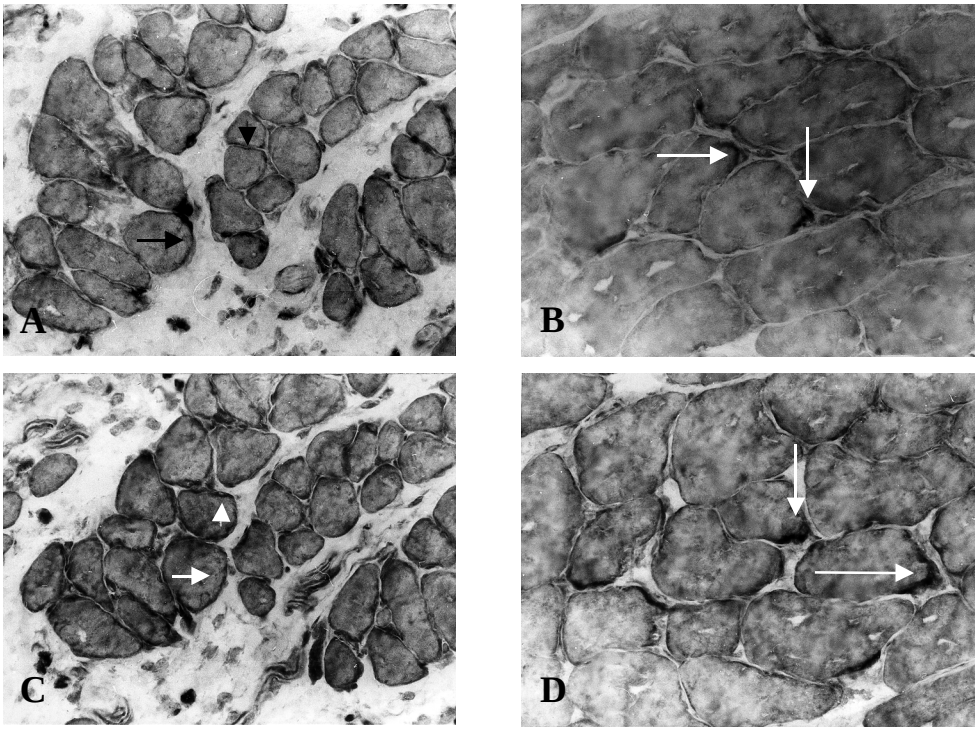


Abb. 20: Immunhistochemische Untersuchung der α_1-Untereinheit (A, B) und der β_1-Untereinheit (C, D) der sGC in der Zunge des Hamsters. 10 µm Kryoschnitte wurden Formaldehyd-fixiert und mit den anti-α_1- und anti-β_1-Antikörpern inkubiert (Verdünnung jeweils 1:100). Die Immunreaktion wurde mit der DAB-Peroxidase-H_2O_2-Methode visualisiert. Die zwei Untereinheiten der sGC zeigen jeweils Immunreaktivität im Bereich von Sarkoplasma (Pfeile) und Sarkolemm (A, C, Pfeilspitzen, Vergrößerung x 250). Im Bereich von Endplatten findet sich Immunreaktivität gegen beide Untereinheiten (B, D; Pfeile, Vergrößerung x 400).

Die α_1- und β_1-Untereinheit sind in der Hamsterzunge sarkoplasmatisch **und** sarkolemmal lokalisiert (**Abb. 20**). Wie bei der Ratte sind damit in beiden Kompartimenten die Voraussetzungen für einen funktionell vollständigen Enzymkomplex gegeben. In Endplatten sind ebenfalls beide Untereinheiten nachweisbar (**Abb. 20 B, D**). Auch in anderen Skelettmuskeln des Hamsters, z.B. im EDL, ist die sGC sarkoplasmatisch und sarkolemmal exprimiert (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.3.3. NOS-1 in Skelettmuskeln der Ratte

Die oben beschriebenen Immunblots haben gezeigt, daß außer der sGC die NOS-1 Skelettmuskeln vorkommt (**Abb. 6**). Um neben der im Immunblot gefundenen Koexpression auch die Kolokalisation zu untersuchen, wurde die NOS-1 in Skelettmuskeln der Ratte immunhistochemisch nachgewiesen.

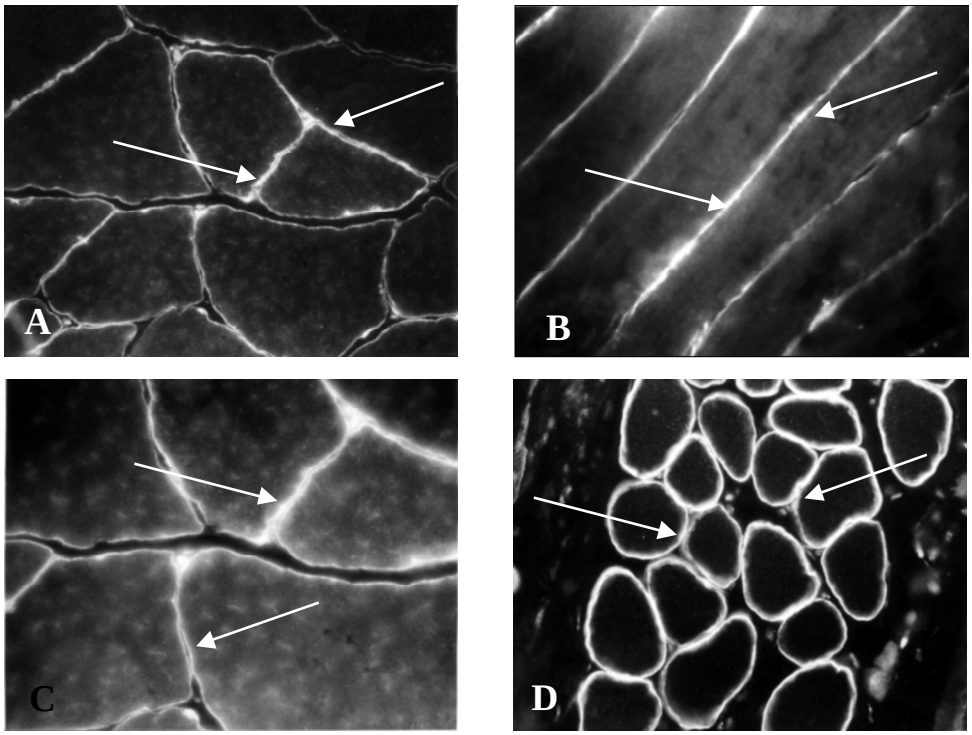


Abb. 21: Immunhistochemie der NOS-1 in Skelettmuskeln der Ratte. 10 µm dicke, Formaldehyd-fixierte Kryoschnitte wurden und mit dem peptidspezifischen, polyklonalen anti-NOS-1-Antikörper, der gegen das C-terminale Ende gerichtet ist, in einer Verdünnung von 1:1.000 inkubiert. NOS-1-Immunreraktivität findet sich sowohl im EDL (Abb. A, B, C) als auch in der Zunge (D) im Sarkolemm-Bereich. Vergrößerungen A, B, D x 400, C x 600.

Die NOS-1 kommt in Skelettmuskeln der Ratte im nicht-junktionalen Sarkolemm-Bereich (**Abb. 21**) sowie in Endplatten und Muskel-Sehnen-Verbindungen (nicht dargestellt) vor. Im

Gegensatz zur sGC konnte keine sichere NOS-1-Immunreaktivität im Sarkoplasma nachgewiesen werden. In der Zunge sind vereinzelt NOS-1-haltige Neurone und nitrerge Fasern in Nerven sowie periarteriellen Plexus sichtbar (nicht dargestellt).

3.3.4. NOS-3 in der Skelettmuskeln der Ratte

NOS-3-Immunblots der Ratte zeigen keine Expression der NOS-3 in Skelettmuskeln (**Abb. 8**). Dieses Ergebnis wurde mit der Immunhistochemie überprüft.

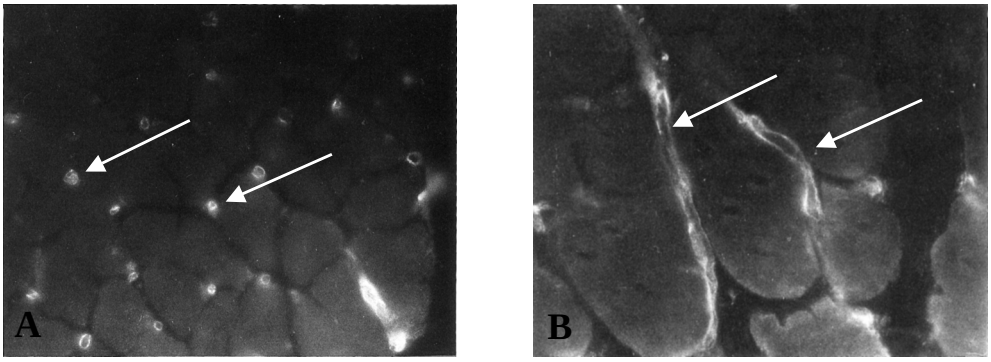


Abb. 22: Immunhistochemische Untersuchung der NOS-3 im EDL der Ratte. 10 µm Kryoschnitte wurden Formaldehyd-fixiert und mit peptidspezifischen, polyklonalen Antikörpern in einer Verdünnung von 1:200 inkubiert. Im quergeschnittenen (Abb. A; Vergrößerung x 400) und schräggeschnittenen Muskel (Abb. B, Vergrößerung x 600) zeigen sich NOS-3-Immunkomplexe im Kapillarendothel (Pfeile). In den Muskelfasern findet sich keine NOS-3-Immunreaktivität.

Im Gegensatz zum negativen NOS-3-Immunblot tritt NOS-3-Protein im Kapillarendothel auf, während die Muskelfasern frei davon sind (**Abb. 22**).

3.3.5. HO-2 in Skelettmuskeln der Ratte

Im Immunblot konnte die HO-2 mit dem aus Kaninchen gewonnenen, peptidspezifischen, polyklonalen Antikörper und dem kommerziellen, gegen das Gesamtprotein gerichteten, polyklonalen Antikörper in Skelettmuskeln der Ratte nachgewiesen werden (**Abb. 12**). In der Immunhistochemie zeigte der peptidspezifische, polyklonale anti-HO-2-Antikörper jedoch keine zufriedenstellende Bindung an das HO-2-Antigen. Auch in denaturierten und reduzierten Kryostatschnitten wurde keine sichtbare Antikörperbindung gefunden. Deshalb wurde für die HO-2 Immunhistochemie der kommerziell erhältliche, gegen das Gesamtprotein gerichtete anti-HO-2-Antikörper (OSA-200), eingesetzt.

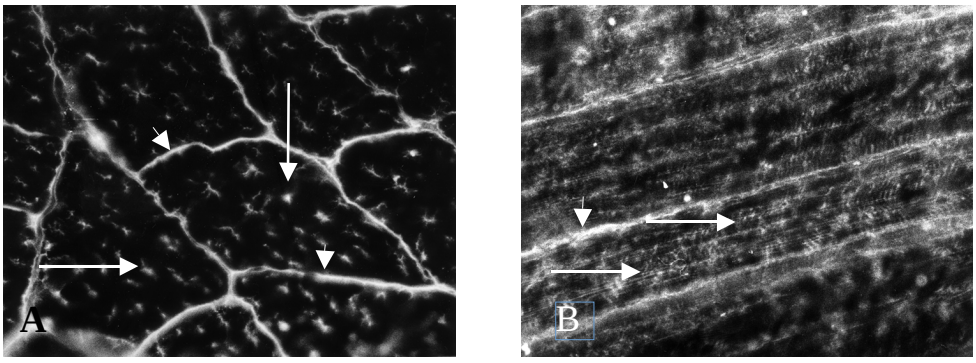
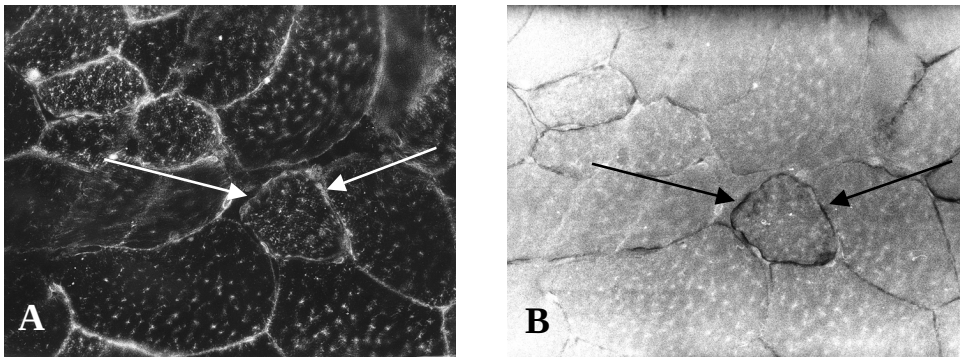


Abb. 23: Immunhistochemische Untersuchung der HO-2 im EDL der Ratte. 10 µm Kryoschnitte wurden Formaldehyd-fixiert und mit dem gegen das Gesamtprotein gerichteten, polyklonalen Antikörper in der Verdünnung 1:200 inkubiert. In quergeschnittenen Fasern (A) finden sich HO-2-Immunkomplexe im Sarkolemm-Bereich (Pfeilspitzen) und sarkoplasmal (Pfeile) als Netzwerk. In längsgeschnittenen Fasern (B) zeigen sich HO-2-Immunkomplexe im Bereich des Sarkolemms (Pfeilspitze) und im Sarkoplasma (Pfeile). Vergrößerung x 600.

Die HO-2 ist in Skelettmuskeln sarkolemmal und sarkoplasmatisch exprimiert (**Abb. 23**). Die Immunreaktivität im Sarkoplasma weist die Form eines irregulären Netzwerks auf.

3.3.6. Histochemischer Nachweis von HO-2 und NOS-1 durch Immunhistochemie bzw. katalytische Histochemie

Wie in **3.3.3.** und **3.3.5.** gezeigt kommen NOS-1 und HO-2 jeweils im Sarkolemm-Bereich vor. Zur genaueren Untersuchung der Kolokalisation in diesem Kompartiment wurden Doppelinkubationen mit HO-2-Immunhistochemie und der NADPHd durchgeführt. Mit dieser Reaktion kann die NOS-1 katalytisch-histochemisch nachgewiesen werden.



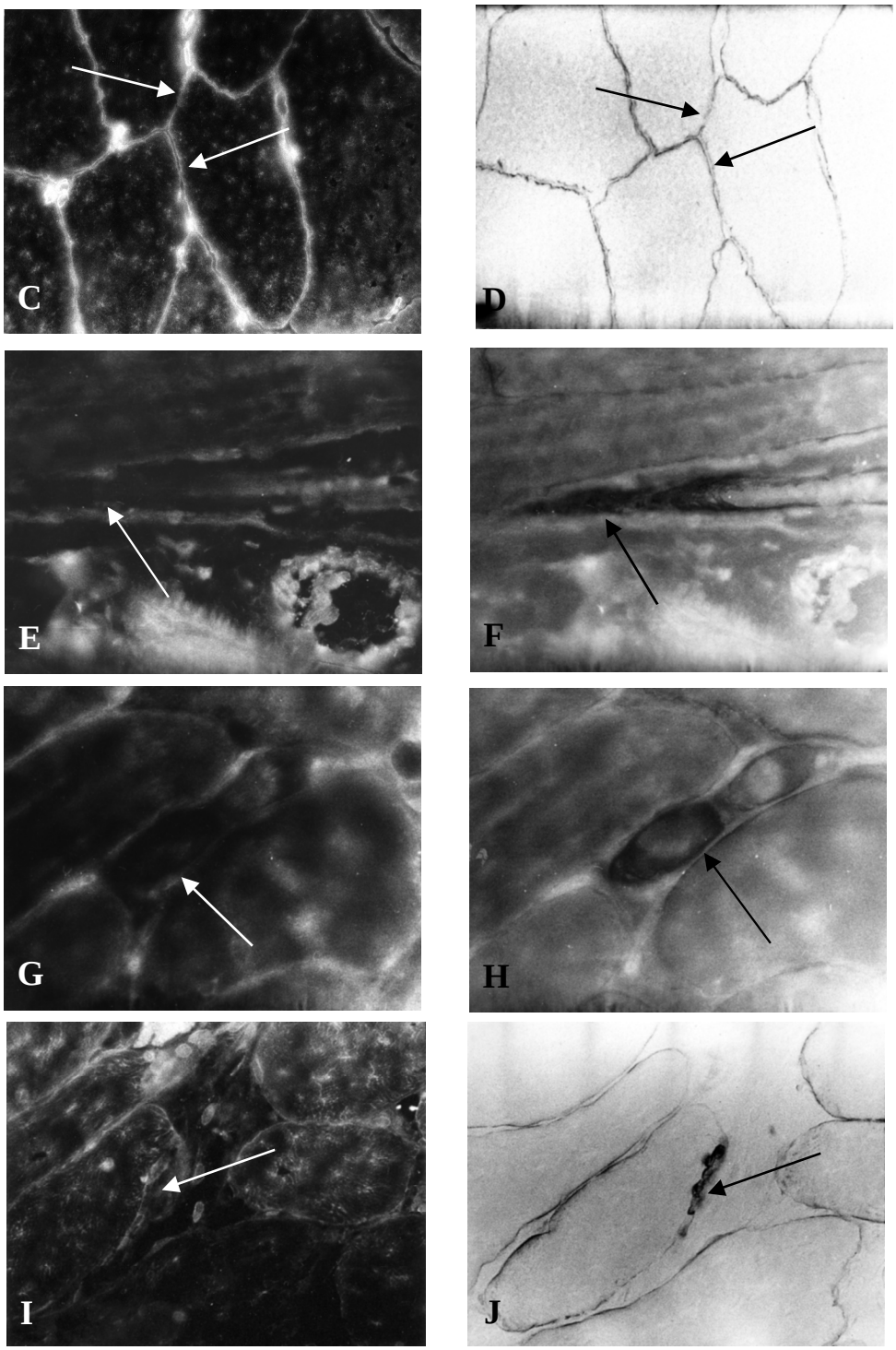


Abb. 24: Doppelinkubationen mit dem anti-HO-2-Antikörper (links) und NADPH-Diaphorase-Medium (rechts). 10 µm Kryoschnitte wurden Formaldehyd-fixiert, 1 h mit dem Diaphorasemedium inkubiert, gespült und anschließend über Nacht mit dem gegen das Gesamtprotein gerichteten, polyklonalen anti-HO-2-Antikörper (1:200) inkubiert. Die Visualisierung der Immunkomplexe erfolgte durch Cy3-Fluoreszenz. Die Formazan-präzipitate wurden im Durchlicht photographiert. Sarkolemmal finden sich HO-2-Immun-komplexe (Pfeile in A, C) und von der NOS-1 produziertes Formazan (Pfeile in B, D). Im Bereich der Muskel-Sehnen-Verbindungen (Pfeil in F), intrafusalen Muskelfasern (Pfeil in H)

und Endplatten (Pfeil in J) kommt NOS-1-Diaphorase vor, während HO-2-Immunkomplexe fehlen (E, G, I). (Vergrößerung A, B x 400, C-H x 600).

NOS-1 und HO-2 sind nur im nicht-junktionalen Sarkolemm-Bereich kolokalisiert (**Abb. 24, A-D**). Die HO-2-Immunreaktivität findet sich außerdem im Sarkoplasma in Form eines irregulären Netzwerks, nicht aber in Muskel-Sehnen-Verbindungen, intrafusalen Muskelfasern und Endplatten (**Abb. 24, E-H**), in denen die NOS-1-Diaphorase vorkommt.

3.3.7. HO-3 in Skelettmuskeln der Ratte

Mit dem peptidspezifischen, polyklonalen anti-HO-3-Antikörper zeigt sich immunhistochemisch keine sichtbare Antigenbindung. Auch nach Denaturierung und Reduzierung waren keine positiven Ergebnisse zu erzielen.

3.3.8. BVR in Skelettmuskeln der Ratte

Im BVR-Immunblot (**Abb. 8**) kommt die BVR in Skelettmuskeln der Ratte vor. Deshalb wurde die Lokalisation der BVR in Skelettmuskeln immunhistochemisch untersucht.

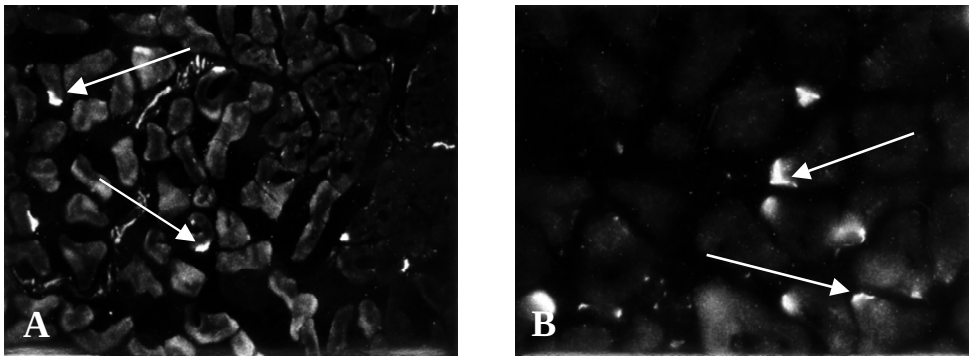


Abb. 25: Immunhistochemische Untersuchung der BVR in der Rattenzunge. 10 µm Kryoschnitte wurden Formaldehyd-fixiert und mit dem gegen das Gesamtprotein gerichteten, polyklonalen anti-BVR-Antikörper (1:200) inkubiert. In Endplatten finden sich BVR-Immunkomplexe (Pfeile; Vergrößerung A x 200, B x 400). In extrajunktionalen Bereichen des Sarkolemms zeigt sich keine Immunreaktivität.

Die den Häm-Oxygenasen nachgeschaltete Biliverdinreduktase ist in der Zunge im Bereich der Endplatten lokalisiert (**Abb. 25**). Auch Untersuchungen anderer Muskeln, z.B. des EDL, ergaben positive Resultate (Ergebnisse nicht dargestellt), wobei die Anzahl der Endplatten geringer ist. In der Zunge sind außerdem vereinzelt BVR-haltige Neurone sichtbar (nicht dargestellt).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die sGC, NOS-1 und HO-2 in Skelettmuskeln im extrajunktionalem Sarkolemm-Bereich kolokalisiert sind. Die sGC, NOS-1 und BVR sind in Endplatten kolokalisiert. Im Bereich von Muskel-Sehnen-Verbindungen und intrafusalen Muskelfasern findet sich lediglich die NOS-1. NOS-3-Immunreaktivität ist in den Muskelfasern nicht nachweisbar. Mit den aus Kaninchen gewonnenen, peptidspezifischen, polyklonalen anti-HO-2- und anti-HO-3-Antikörpern konnten die entsprechenden Proteine immunhistochemisch nicht detektiert werden.