

4. Diskussion

Die sGC spielt in der Signaltransduktion des von NO-Synthasen gebildeten NO und des von Häm-Oxygenasen beim Häm-Abbau freigesetzten CO eine bedeutende Rolle. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit vor allem in zahlreichen Rattenorganen zunächst mit Immunblot-Methoden die Koexpression der sGC mit den konstitutiv exprimierten NO-Synthasen NOS-1 und NOS-3 sowie den ebenfalls konstitutiv exprimierten Häm-Oxygenasen HO-2 und HO-3 untersucht. Außerdem habe ich mich mit der Koexpression der BVR beschäftigt, die den HOs beim Häm-Abbau nachgeschaltet und damit indirekt an der Signaltransduktion beteiligt ist. Anschließend geht die Arbeit der Koloaklisation dieser vier potentiell interagierenden Enzyme nach und benutzt dazu histochemische Methoden, denn erst durch Lokalisationsstudien sind genauere Aussagen über die molekularen Zusammenhänge bei der hier untersuchten NO/CO-cGMP Signaltransduktionskaskade möglich. Koloaklisationsuntersuchungen wurden an Skelettmuskeln durchgeführt, weil deren Fasern molekular und funktionell besonders gut charakterisiert sind.

4.1. Expression und Lokalisation der sGC

Immunblots gegen die β_1 -Untereinheit der sGC mit membran-angereicherten Pellets zeigen, daß diese Untereinheit in allen untersuchten Organen der Ratte einschließlich der Skelettmuskulatur und in Skelettmuskeln des Hamsters vorkommt. Immunhistochemisch findet sich die α_1 - und β_1 -Untereinheit, neben der erwarteten Lokalisation im Sarkoplasma, **zusätzlich** in Endplatten und im nicht-junktionalen Sarkolemm-Bereich in den NOS-1-reichen Muskeln Zunge und EDL.

Expressionsexperimente haben ergeben, daß für ein aktives Enzym sowohl eine α -Untereinheit als auch die β_1 -Untereinheit benötigt wird (*Harteneck et al. 1990; Buechler et al. 1991*). Das α_1/β_1 -Heterodimer ist die ubiquitäre Isoform der sGC (*Budworth et al., 1999*), wogegen ein α_2/β_1 -Heterodimer, das erstmals aus der humanen Plazenta präzipitiert werden konnte, eher die Ausnahme darstellt (*Russwurm et al., 1998*). Daß die β_2 -Untereinheit dimerisiert, konnte bisher nicht gezeigt werden (*Koesling und Friebe, 1999*). Da in der Skelettmuskulatur sowohl α_1 - als auch β_1 -Untereinheit im Sarkolemm-Bereich vorhanden sind, kann angenommen werden, daß hier eine aktive sGC für NO und CO als Rezeptor-Molekül vorliegt.

Die Lokalisation der sGC nicht nur im Sarkoplasma sondern auch im junktionalen und nicht-

junktionalen Sarkolemm in Skelettmuskeln von Nagern wurde erstmals von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (*Feussner et al., 2001*). Übereinstimmend hiermit hatten zuvor *Kobzik et al. (1994)* das von der sGC produzierte cGMP zusammen mit der NOS-1 immunhistochemisch im Sarkolemm-Bereich nachgewiesen. Im Sarkoplasma wurde in dieser Studie kein cGMP gefunden. Dies deutet darauf hin, daß die sGC in Muskelfasern lediglich im Sarkolemm-Bereich enzymatisch aktiv ist. Das vor allem in Typ-I-Fasern (slow oxidative, SO) und Typ-IIa-Fasern (fast glycolytic oxidative, FOG) sowie in geringerer Menge in den Typ-IIb-Fasern (fast glycolytic, FG) enthaltene Myoglobin (*Krenacs et al., 1989*) könnte ein "scavenger" für die Aktivator-Gase NO und CO sein und damit tieferes Eindringen in die Fasern verhindern. Weiterhin sind viele der bisher beschriebenen Funktionen von cGMP und NO auf den Sarkolemm-Bereich beschränkt, die auch dafür sprechen, daß die sGC wie die NOS-1 im Sarkolemm-Bereich konzentriert ist.

Im Gegensatz zu den hier erhobenen Befunden konnten *Schoser und Behrends (2001)* die α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheiten der sGC in humanen Muskeln (M. vastus lateralis und tibialis anterior) in Endplatten, nicht dagegen im nicht-junktionalen Sarkolemm-Bereich nachweisen. Ursache dafür könnten Speziesunterschiede im Expressionsmuster der sGC sein. Dennoch zeigt auch diese Untersuchung, daß die eigentlich lösliche GC partikulär vorliegen kann, wobei bisher in der Proteinsequenz der sGC keine sichere Bindungsstelle dieser drei Untereinheiten an das Sarkolemm bekannt ist, an die die sGC z.B. über eine Isoprenylierung gebunden werden könnte. *Russwurm et al. (2001)* konnten die α_2/β_1 -Isoform über Interaktionen mit dem synaptischen Protein PSD-95 plasmalemmal assoziiert in Synapsen des Rattenhirns nachweisen, wogegen die α_1/β_1 -Isoform im neuronalen Zytosol vorlag. Immunhistochemische Untersuchungen wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Dem von der sGC gebildeten cGMP werden in Skelettmuskelfasern verschiedene Funktionen zugeschrieben. So scheint die NO-sGC-cGMP-Kaskade die Fusion embryonaler Myoblasten des Huhns (*Lee et al., 1994*) und die Signaltransduktion an den Endplatten ausdifferenzierter Skelettmuskelfasern zu beeinflussen. Z.B. konnten *Wang et al. (1995)* in Kulturen von Myozyten und Neuronen mit NO-Donatoren und direkten Aktivatoren der sGC eine retrograde synaptische Signalwirkung nachweisen.

In Skelettmuskelfasern scheint cGMP vor allem die Muskelkraft und die Glucose-Aufnahme zu beeinflussen. *Kobzik et al. (1994)* und *Abraham et al. (1998)* konnten im M. soleus und im Diaphragma, die beide überwiegend aus Typ I-Fasern bestehen und damit relativ NOS-1-arm

sind, durch das cGMP-Analogon 8-Br-GMP, den PDE-Inhibitor Dipyridol und mit NO-Donatoren (SNAC, SNP) eine Reduktion der Kraftentwicklung bei isometrischer Kontraktion zeigen, wogegen die NOS-Inhibitoren 7-Nitroindazol, Aminoguanidin und Nitro-L-Arginin sowie der sGC-Inhibitor LY 83583 eine Steigerung der entwickelten Kraft bewirkten. Dagegen soll die Kontraktionsgeschwindigkeit durch cGMP gesteigert werden (*Maréchal und Beckers-Bleukx, 1998*). Da hier mit NOS-1 armen Muskeln mit geringer NO-Konzentration gearbeitet wurde bzw. unphysiologische Bedingungen vorlagen, ist die Bedeutung für die Funktion der Skelettmuskelfasern eher von geringer Relevanz.

Der Einfluß von cGMP auf die Veränderung der Glucose-Aufnahme wird kontrovers diskutiert. Während *Kapur et al. (1997)* mit dem cGMP-Analogon 8-Br-GMP im M. soleus keine Veränderung der basalen oder Insulin-stimulierten Glucose-Aufnahme messen konnten, stellten *Young und Leighton (1998)* mit diesem cGMP-Analogon im gleichen Muskel in maximal doppelter Konzentration im Vergleich zu *Kapur et al.* eine bis zu 50 % gesteigerte Glucose-Oxidation fest. *Etgen et al. (1997)* konnten ebenfalls mit 8-Br-GMP eine bis zu 6-fach erhöhte Glucose-Aufnahme messen, ohne daß Kalzium-Spiegel, Kontraktilität oder Phosphatidylinositol-3-Kinase beeinflußt wurden.

Die über die sGC laufende cGMP-vermittelte Signaltransduktion scheint demnach eine wichtige, wenngleich noch nicht vollständig aufgeklärte Rolle für die Funktion der Skelettmuskelfasern zu spielen. Die oben beschriebenen Mechanismen laufen überwiegend im Sarkolemm-Bereich ab, was ebenfalls für eine Aktivität der sGC in diesem Bereich spricht.

4.2. Expression und Lokalisation der NOS-1

Die NOS-1 konnte mit Immunblots in Lunge, Herz, Leber, Milz, Ileum, Niere und Hoden nicht nachgewiesen werden. Diese Daten decken sich weitgehend mit den Literaturangaben (*Park et al., 2000*).

Guembe und Villaro (1999) wiesen die NOS-1 immunhistochemisch und katalytisch-histochemisch in der fetalen und neonatalen Mauslunge in nitrergen Neuronen und Nervenplexus, jedoch nicht in Pneumozyten nach. *Shermann et al. (1999)* fanden die NOS-1 immunhistochemisch und mit der NADPHd in der Schaflunge unabhängig vom Entwicklungsstadium im Alveolarepithel. Immunblots zur Expression der NOS-1 in der Lunge liegen nicht vor.

Xu et al. (1999) konnten die NOS-1 im Herzen von Mensch und Kaninchen mit Immunblots sowie immunhistochemisch im Licht- und Elektronenmikroskop nachweisen. Für die Immunblots verwendeten die Autoren isoliertes und angereichertes sarkoplasmatisches Retikulum und fanden lediglich zarte Banden. Deshalb ist vorstellbar, daß im nicht angereicherten Homogenat der relative NOS-1-Anteil unterhalb der Nachweisgrenze für Immunblots liegt.

Park et al. (2000) konnten in der humanen Leber NOS-1 mRNA nicht nachweisen. Immunblot-Untersuchungen zur NOS-1 in der Leber fehlen. *Esteban et al. (1997)* zeigten die NOS-1 immunhistochemisch lediglich in nitrergen Nervenfasern und -plexus um die Leberarterie sowie des Gallengangs aber nicht in Hepatozyten.

Ebenfalls *Park et al. (2000)* fanden die NOS-1 mit dem Immunblot im Dünndarm. Hier könnten ebenfalls Speziesunterschiede im Expressionsmuster der NOS-1 vorliegen; wahrscheinlicher ist allerdings, daß das Enzym aus Zellen der intramuralen Plexus und nicht aus Enterozyten stammt.

Für die Niere kann Ähnliches wie für das Herz gelten. Während immunhistochemische und katalytisch-histochemische Untersuchungen das Enzym in der Macula densa zeigen (*Mundel et al., 1992; Bian et al., 1999*), könnte die Gesamtmenge an NOS-1 im nicht angereicherten Nierenhomogenat wie im Herzen unterhalb der Nachweisgrenze des NOS-1-Immunblots liegen.

Für den Hoden ist eine spezielle mRNA-splice-Variante der NOS-1 beschrieben worden (*Brenman et al., 1997; Wang et al. 1997*). *Park et al. (2000)* konnten die NOS-1 in humanem Hoden mit dem Immunblot nachweisen; während sich im hier untersuchten Rattenhoden keine NOS-1 fand. Möglicherweise liegen Speziesunterschiede vor

Die NOS-1 zeigt in den Immunblots in der Skelettmuskulatur das erwartete Mr von 160 kDa. *Silvagno et al. (1996)* beschreiben eine muskelspezifische, NOS-1 μ , genannte alternative Splice-Variante, die über ein zusätzliches 102-Basenpaare großes Insert zwischen Exon 16 und 17 verfügt. Die daraus resultierenden zusätzlichen 34 Aminosäuren erhöhen das Mr gegenüber der aus dem Gehirn isolierten Splice-Form, auch α -NOS-1 genannt, auf 164 kDa. Während die NOS-1 μ bisher nur im Skelett- und Herzmuskel nachgewiesen werden konnte, kommt die α -NOS-1 auch in der Skelettmuskulatur vor. Da die von mir eingesetzten 7,5 %-PAGs einen Unterschied von 4 kDa im Mr nicht auflösen können, haben die eingesetzten

Antikörper wahrscheinlich beide Splice-Formen erkannt.

Die hier vorgelegten Befunde zeigen bei ca. 140 kDa eine zweite Bande, bei der es sich um die von *Brennan et al. (1997)* beschriebenen NOS-1 β handeln könnte. Dieser Isoform fehlt das Exon 2, das keine katalytische Aktivität besitzt, sondern die NOS-1 über die sogenannte PDZ-Domäne an α_1 -Syntrophin und damit an den Dystrophin-Komplex im Plasmalemm bindet. Das Mr beträgt 134 kDa und könnte somit dem der zweiten Bande entsprechen. Das Exon 2 reicht bis zur Aminosäure 236. Der eingesetzte peptidspezifische, polyklonale Antikörper gegen das N-terminale Ende der NOS-1 ist gegen Aminosäuren ab Nummer 251 gerichtet, die sich schon im Exon 3 befinden und damit auch in der NOS-1 β vorhanden sind. Hierfür spricht neben dem übereinstimmenden Mr weiterhin, daß mit einem monoklonalen Antikörper gegen die Aminosäuren 1-188 aus Exon 2 sich im Immunblot nur eine Bande bei 160 kDa findet (unveröffentlichte Daten). Mit dieser Vorstellung ist nicht vereinbar, daß eine Isoform ohne PDZ-Domäne, d.h., ohne Sarkolemm-Bindungsstelle histochemisch im Sarkoplasma lokalisiert sein sollte, was bisher nicht gezeigt werden konnte. Grund für das Fehlen einer sarkoplasmatischen NOS-1 könnte die Diffusion der nicht sarkolemmal gebundenen NOS-1 ins Inkubationsmedium sein.

Eine alternative Erklärungsmöglichkeit für die zweite Bande bei ca. 140 kDa könnte die von *Fujisawa et al. (1994)* beschriebene NOS-1/2-Isoform sein. Dieser Splice-Variante, die bisher nur auf mRNA-Ebene beschrieben wurde, fehlen die katalytisch hochaktiven Exons 9 und 10. Für das vorhergesagte Protein würde sich ein Mr von 144 kDa ergeben. Sollte sie in den Skelettmuskelfasern vorkommen, könnte diese Isoform, da die NOS-1 als Dimer vorliegt, als dominant negativer Regulator fungieren, d.h. eine Dimerisierung mit einer nicht aktiven Splice-Variante würde den gesamten Enzymkomplex hemmen und die NO-Produktion verhindern. Ob die 144-kDa-Isoform der von *Ogilvie et al. (1995)* beschriebenen, inaktiven NOS-1₁₄₄-Isoform entspricht, die ebenfalls ein Mr von 144 kDa aufweist, ist bisher nicht geklärt. Diese katalytisch inaktive Isoformen wären über ihre PDZ-Domänen am Sarkolemm verankert und kämen nicht im Sarkoplasma vor.

Übereinstimmend mit *Kobzik et al. (1994)* und *Grozdanovic et al. (1995)* kommt die NOS-1 immunhistochemisch und mit der NADPHd-Reaktion in den NOS-1-reichen Muskeln EDL und Zunge von Ratte und Hamster im junktionalen und nicht-junktionalen Sarkolemm-Bereich der Skelettmuskelfasern vor. Die NOS-1-Immunhistochemie ist die spezifischere, aber weniger sensitive Methode. Demgegenüber ist die NOS-1-NADPH-Diaphorase-Reaktion

weniger spezifisch aber sensitiver. Die NOS-1 ist mit der sGC im gesamten Sarkolemm-Bereich der Skelettmuskulatur zumindest von Nagern kolokalisiert. Durch die unmittelbare Nachbarschaft von NOS-1 mit der sGC scheint hier ein effektiver Signaltransduktionsweg vorzuliegen.

Nach *Aghdasi et al. (1997)* soll auch eine direkte, nicht-cGMP-vermittelte NO-Wirkung auf die Skelettmuskelfasern vorliegen, da die Konzentrationen von cGMP zu gering sind, um sämtliche NO-Wirkungen auf die Skelettmuskelfasern zu erklären. Wie *Xu et al. (1998)* in Kardiomyozyten konnten *Aghdasi et al.* redox- und NO-sensitive Ca^{2+} -Kanäle im sarkoplasmatischen Retikulum von Skelettmuskelfasern nachweisen, über die ihre Kontraktion direkt moduliert wird. *Reid (1998)* verweist auf mögliche Wechselwirkungen von NO mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die während der Muskelkontraktion entstehen, um die Rolle von NO in Skelettmuskelfasern zu erklären. Danach soll NO durch Nitrosylierung von Sulfhydrylgruppen in redox-sensitiven Regulatorproteinen, z.B. dem ryanodinsensitiven 106 kDa Ca^{2+} -Kanalprotein im Sarkolemm der transversalen Tubuli, die ROS-abhängige Bildung von funktionell wichtigen Disulfid-Brücken in diesen Proteinen verhindern (*Zaidi et al., 1989; Reid et al., 1993, Barouch et al. 2002*). Dadurch könnten NO und ROS antagonistisch auf Kohlehydrat-Stoffwechsel, Ca^{2+} -Homeostase, mitochondrialen Sauerstoffverbrauch und verschiedene Membrantransportmechanismen wirken. Außerdem sind nach *Reid (1998)* ROS für die elektromechanische Kopplung während der Kontraktion notwendig, da sie regulatorische Sulfhydrylgruppen am sarkoplasmatischen Retikulum oxidieren und dadurch die Ca^{2+} -Freisetzung aus dieser Organelle fördern. Durch Nitrosylierung dieser redox-sensitiven SH-Gruppen würde NO den Effekt der ROS auf die elektromechanische Kopplung hemmen und die Kraftentwicklung des Skelettmuskels begrenzen. Weiterhin wurde für NO eine antioxidative Wirkung beschrieben, die 1000-fach höher als die von α -Tocopherol ist (*Darley-Usmar et al., 1995*) und für die eine protektive Rolle bei Muskelverletzungen nachgewiesen wurde (*Kanter et al., 1993*). In hohen Konzentrationen wie bei einer Sepsis, bei der das high-output Enzym NOS-2 induziert wird, soll NO jedoch über die Bildung des hochreaktiven Radikals Peroxynitrit, das durch die Reaktion von NO mit Superoxidanionen entsteht, auch prooxidativ wirken (*Reid, 1998*).

Neben den indirekten, cGMP-vermittelten und direkten Wirkmechanismen von NO auf die Skelettmuskelfasern werden noch direkte Einflüsse auf die vasale glatte Muskulatur beschrieben. Während der Muskelkontraktion und unter Belastung kommt es zur verstärkten Ausschüttung vasokonstriktorischer Substanzen wie Endothelin-1 (*King-VanVlack et al.*

2002) und Noradrenalin (*Lau et al. 1998*), wogegen Angiotensin hierfür eine untergeordnete Rolle spielt (*Thomas und Victor, 1998a*). Das von der NOS-1 im Sarkolemm-Bereich generierte NO antagonisiert in den glatten Muskelzellen der Arteriolen, diesen Effekt, indem es eine sGC/cGMP-vermittelte Vasodilatation hervorruft. Die vasale Wirkung von NO zeigen auch Untersuchungen an mdx-Mäusen, denen die NOS-1 im Sarkolemm fehlt und deren Skelettmuskulatur unter Belastung deutlich weniger durchblutet wird (*Thomas et al. 1998b*).

Die Bedeutung des NOS-1-/NO-Systems für die ungestörte Funktion der Skelettmuskulatur muß allerdings relativiert werden, da in homozygoten NOS-1-KO-Mäusen keine morphologischen oder funktionellen Veränderungen festgestellt werden konnten (*Huang, 1999*). Es scheint eine ausreichende Kompensation durch alternative Signaltransduktionswege zu geben, z.B. durch das HO-/CO-System über die HO-2, die wir in mdx-Mäusen, denen die NOS-1 im Sarkolemm-Bereich fehlt, in diesem Kompartiment zeigen konnten (*Baum et al., 2000*).

4.3 Expression und Lokalisation der NOS-3

In Immunblots konnte die NOS-3 in Muskelhomogenaten der Ratte nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu ließ sich immunhistochemisch das Enzym im Kapillarendothel der Skelettmuskulatur zeigen. Auch hier ist wieder vorstellbar, daß die Probenaufbereitung mit membrangereicherten Pellets für einen Nachweis im Immunblot nicht geeignet ist. Im Gegensatz zu *Kobzik et al. (1995)*, die die NOS-3 immunhistochemisch fasertyp-unabhängig im Sarkosol von einigen, aber nicht allen Muskelfasern fanden, konnte in der vorliegenden Arbeit, in der ein anderer Antikörper eingesetzt wurde, keine NOS-3-Immunreaktivität in den Muskelfasern gezeigt werden. Die NOS-3 im Kapillarendothel könnte nach *Mathie und Griffith (1999)* den Sauerstoffverbrauch der Muskelfasern beeinflussen, indem NO, das durch erhöhten shear stress freigesetzt wird, die Mitochondrien erreicht, die Atmungskette blockiert, und damit die Muskelkraft vermindert.

In Übereinstimmung mit den Literaturdaten ließ sich in den stark vaskularisierten Organen Lunge (*Xue et al, 1996*), Herz (*Everett et al, 1998*), Leber (*Shah et al., 1997*), Milz (*Park et al., 2000*) und Niere (*Weiner et al, 1994*) die NOS-3 mit dem Immunblot nachweisen. In diesen Organen, die keine oder wenig NOS-1 exprimieren und damit auch kaum über von der NOS-1 produziertes NO verfügen, spielt das NOS-3-/NO-System vermutlich eine wichtige modulatorische Rolle bei der Gefäßregulation (*Baylis et al., 1996; Shah et al., 1999, Park et al., 2000*).

4.4. Expression und Lokalisation der HO-2

Für den neu hergestellten, peptidspezifischen, polyklonalen anti-HO-2-Antikörper konnte gezeigt werden, daß er im Immunblot reproduzierbare Resultate liefert und spezifisch die HO-2 in fast allen untersuchten Rattenorganen erkennt. Nur im Herzmuskel konnte übereinstimmend mit *Maines (1997)* die HO-2 nicht nachgewiesen werden. Damit steht erstmals ein peptidspezifischer, polyklonaler anti-HO-2-Antikörper für den Immunblot zur Verfügung, der zwar die HO-2, nicht aber die HO-3 erkennt. Immunhistochemisch ließ sich damit jedoch keine HO-2 nachweisen. Ursache dafür könnte sein, daß peptidspezifische HO-2-Antikörper für die Immunhistochemie kaum geeignet sind. Darauf deutet auch hin, daß kommerziell erhältliche "RABBIT ANTI-HEME OXYGENASE-2 POLYCLONAL ANTIBODY" der Firma Chemicon, der gegen eine andere Peptidsequenz der HO-2 gerichtet ist, nach Herstellerangaben und eigenen Erfahrungen für die Immunhistochemie ungeeignet ist.

In der Skelettmuskulatur ließ sich im Immunblot die HO-2 mit dem kommerziellen und mit dem nicht-kommerziellen Antikörper nachweisen.

Die Lokalisation der HO-2 im nicht-junktionalen Sarkolemm der Skelettmuskulatur wurde erstmals von *Baum et al. (2000)* beschrieben. Im Gegensatz zu *Kusner et al. (1999)*, die die HO-2 lediglich in Endplatten gefunden haben, konnten wir hier keine HO-2-Immunreaktivität finden. Zur Zeit beschäftigen wir uns mit den Ursachen für diese unterschiedlichen Befunde, denn von beiden Arbeitsgruppen wurde der gleiche Primärantikörper verwendet und die gleiche Spezies untersucht.

Die HO-2 hat im Skelettmuskel möglicherweise verschiedene Funktionen. Das beim Häm-Abbau freigesetzte CO könnte ein direkter Aktivator der ebenfalls im Sarkolemm-Bereich lokalisierten sGC sein. Die Aktivierung dieses Enzyms durch CO wurde bereits für verschiedene extramuskuläre Organsysteme beschrieben. Im olfaktorischen System bzw. seinen Neuronen konnte die Produktion von cGMP durch den selektiven, potenten Inhibitor der HO-2, Zn-Protoporphyrin-9, vollständig unterbunden werden (*Verma et al., 1993*). *Stone und Marletta (1994)* zeigten mit CO eine 4,4-fache Aktivierung der aus Rinderlunge isolierten sGC, die jedoch ca. 30-fach schwächer war als die NO-Wirkung. *Kharitonov et al. (1995)* schlagen als Modell für die Aktivierung der sGC durch CO die Umlagerung zu einem 6-valenten Protein-Häm-CO-Komplex vor, der sich durch eine hohe Dissoziationsgeschwindigkeit von CO auszeichnet, wodurch die relativ geringe Aktivierung der sGC durch CO erklärt werden kann.

In Anwesenheit von YC-1, einem Aktivator der sGC, ist die durch CO erreichbare Stimulierbarkeit der sGC durch CO mit der von NO vergleichbar (*Friebe et al., 1996; McLaughlin et al., 2000*). Sollte ein physiologisches Analogon zu YC-1 existieren, könnte CO als effektiver Aktivator der sGC wirken. *Koesling und Friebe (1999)* bezeichnen die Aktivierung der sGC über CO, mit dem dadurch bedingten Abbau von Häm, allerdings als "kostspielig". In Skelettmuskelfasern fällt vor allem in SO- und FOG-Fasern durch den Myoglobinumsatz das HO-2-Substrat Häm an. Allerdings gibt es über den genauen Umsatz des Häm im Myoglobinmolekül keine Literaturangaben.

Brüne und Ullrich (1987) zeigten eine CO-induzierte Hemmung der Thrombozyten-Aggregation bei erhöhtem cGMP-Spiegel. *Ramos et al. (1989)* fanden in kultivierten glatten Muskelzellen aus der Aorta eine CO-abhängige Veränderung des cGMP-Gehalts und *Utz und Ullrich (1991)* konnten eine CO-abhängige Verdoppelung des cGMP-Spiegels mit gleichzeitig verbundener Relaxation im Ileum von Meerschweinchen nachweisen, während *Burstyn et al. (1995)* keine Aktivierung der aus der Rinderlunge isolierten sGC durch CO feststellen konnten. Auch die Kollokalisierung von HO-2 und sGC oder cGMP in NOS-armen oder -freien Zellen legen eine Wirkung des HO-2/CO-Systems auf die cGMP-Synthese nahe (*Maines, 1997*). Beispiele für diese Kollokalisierung sind die Purkinje-Zellen sowie Neurone in Hippocampus, Locus coeruleus und Bulbus olfactorius (*de Vente et al., 1989; Maines, 1993; Verma et al., 1993*). *Ingi et al. (1996)* konnten einen direkt proportionalen Zusammenhang zwischen endogener CO-Produktion und dem cGMP-Spiegel in zerebellaren Körnerzellen messen. Damit stimmen unsere Befunde gut überein, die als erstes nicht neuronales Beispiel eine Kollokalisierung von HO-2 und sGC im Sarkolemm-Bereich der Skelettmuskulatur gezeigt haben.

Weiterhin ist eine Interaktion des von HO gebildeten CO mit NOS beschrieben. Das CO kann an den Häm-Komplex der NOS binden und diese damit inhibieren (*McKillan et al., 1989; White und Marletta, 1992*). Im Skelettmuskel wäre daher an eine Hemmung der NOS-1 durch CO bei gleichzeitiger basaler Stimulation der sGC zu denken. Dies könnte bedeuten, daß bei Kontraktion der Muskelfasern die Ca^{2+} -abhängige NOS-1 durch Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum aktiviert wird, die NO-Konzentration ansteigt und dadurch NO seine cGMP-abhängigen und -unabhängigen Effekte auf die Skelettmuskelfasern ausübt.

Neben CO fällt beim Abbau von Häm durch die HO Biliverdin an, daß über die BVR (s.u.) zu

Bilirubin abgebaut wird. Beiden Substanzen wird eine antioxidative Kapazität zugeschrieben (Stocker und Peterhans, 1989). Ob diesem Effekt in Skelettmuskelfasern eine Bedeutung zukommt, ist bisher unklar.

4.5. Expression der HO-3

Die HO-3 wurde erstmals und seitdem nicht mehr von *McCoubrey et al. (1997)* beschrieben. Demnach ist die HO-3 ein ubiquitär exprimiertes Enzym mit einem Mr von 33 kDa, das wenig aktiv ist und dem eher eine Häm-bindende Rolle zugeschrieben wird. Dabei wurde die HO-3 in Eukaryonten nicht auf Protein-Ebene nachgewiesen, sondern das Protein wurde über ein Expressionsplasmid in *E. coli* exprimiert.

Mit den hergestellten peptidspezifischen, polyklonalen anti-HO-3-Antikörpern konnte in allen untersuchten Rattenorganen und auch in Skelettmuskeln von Hamstern ein Protein mit einem Mr von ca. 50 kDa nachgewiesen werden, das im folgenden HO-3' genannt wird.

Eine Isolierung und Sequenzierung des Proteins gelang bisher noch nicht. Gründe hierfür könnten ein ungenügende Aufreinigung oder eine N-terminale Blockierung des Proteins sein, denn mit der Sequenzierung wurde am N-terminalen Ende begonnen. Eine N-terminale Blockierung, z.B. durch einem Palmitinsäure-Rest weisen ca. 50 % aller Proteine auf. Hier erfolgen derzeit weitere, u.a. auch molekularbiologische Untersuchungen, um die Sequenz der HO-3' zu erhalten.

Die Aminosäuresequenz, gegen die der Antikörper gerichtet ist, konnte mit der Datenbankrecherche auf die HO-3 eingegrenzt werden. Wie die Suppressionsuntersuchungen mit dem Immunisierungspeptid zeigen, ist der anti-HO-3-Antikörper spezifisch für dieses Peptid. Als Erklärungen für diese differenten Befunde kommen drei Hypothesen in Betracht:

1. könnte der Antikörper ein bisher unbekanntes Protein erkennen, das die HO-3-Immunisierungssequenz ebenfalls enthält.

2. existiert die HO-3 möglicherweise in mindestens zwei verschiedenen splice-Formen. Hierfür spricht, daß in der Rattenniere neben der HO-3' ein weiteres Protein mit dem erwarteten Mr von 34 kDa vorkommt. Dies widerspricht nicht den Befunden von *McCoubrey et al. (1997)*, denn diese Autoren setzten eine kurze Sonde in der 5'-UTR ein, womit sich Isoformen mit einem anderen Mr nicht ausschließen lassen.

3. könnten die Antikörper mit einem anderen Protein kreuzreagieren. In diesem Fall müßte aber im Immunblot neben der HO-3' mit einem Mr von 50 kDa in allen Rattenorganen ein weiteres Protein bei 34 kDa vorhanden sein.

Vorstellbar ist, daß *Mc Coubrey et al. (1997)* beim Sequenzieren der cDNA lediglich die kürzere splice-Form der HO untersucht haben, die wahrscheinlich auch andere katalytische Eigenschaften als ein größeres Protein haben und die relativ geringe Aktivität der von diesen Autoren beschriebenen HO-3 erklären könnte.

In homozygoten NOS-1-KO-Mäusen konnte im Gegensatz zum Wildtyp eine deutliche Expression der HO-3' gezeigt werden. Dadurch könnte die HO-3, sollte sie als zweite splice-Form mit einem Mr von 50 kDa mit höherer Aktivität vorkommen, auch kompensatorische Funktionen haben, indem durch erhöhte CO-Konzentrationen die sGC in den homozygoten NOS-1-KO-Mäusen aktiviert wird, zumal in diesen Maus-Mutanten keine veränderte Morphologie und Funktion der Skelettmuskelfasern beschrieben wurde (*Huang, 1999*).

Unabhängig davon ist damit erstmals ein Protein gezeigt worden, daß in NOS-1-KO-Mäusen hochreguliert wird. Außerdem läßt die Expression der HO-3, wie von *Mc Coubrey et al. (1997)* in *E. coli* durchgeführt, keine Aussage über eine mögliche Oligomerisierung zu. Die HO-3' liegt wahrscheinlich als Dimer, Trimer und Tetramer vor, wie in der hier vorgelegten Untersuchung unter nichtreduzierenden Bedingungen gezeigt werden konnte. Vorstellbar wäre auch die Expression einer enzymatisch aktiven Isoform (HO-3') und einer inaktiven Isoform (HO-3), die als negativ dominanter Regulator fungieren könnte, wie es auch für die sGC und die NOS-1 beschrieben wurde (*Behrends et al., 1995; Fujisawa et al., 1994*).

Für die Aufreinigung und Isolierung der HO-3' konnte in der vorliegenden Arbeit eine neuartige, 2-dimensionale Gelelektrophorese etabliert werden, die sich speziell für Proteine eignet, die über Disulfid-Brücken kovalent miteinander verbunden sind. Diese Methode zeigt eine gute Reproduzierbarkeit bei geringem materiellen Aufwand.

Für die Immunhistochemie an Skelettmuskeln ist der polyklonale, peptidspezifische anti-HO-3-Antikörper ungeeignet (4.4.).

4.6. Expression und Lokalisation der BVR

Die BVR ist das den HO nachgeschaltete Enzym beim Häm-Abbau, damit nicht direkt an der

sGC-vermittelten Signaltransduktion beteiligt, aber für den vollständigen Häm-Abbau nötig.

Mit Immunblots läßt sich die BVR in allen untersuchten Organen nachweisen und ist immunhistochemisch im Skelettmuskel in den Endplatten lokalisiert. Eine Kolokalisation mit einer vorgeschalteten HO konnte nicht gefunden werden. Damit bleibt offen, woher das BV, als Substrat stammt, für das dieses Enzym hochspezifisch ist (*Maines, 1988*). Auch hier müssen weitere Untersuchungen Klarheit schaffen, denn wir konnten die BV produzierende HO-2 in Endplatten nicht finden (*Baum et al., 2000*), während *Kusner et al. (1999)* das Enzym hier nachweisen konnten (s.o.).

Die biologische Funktion der BVR bzw. ihres Reaktionsproduktes Bilirubin in den Endplatten ist offen. Das Bilirubin ist ein potentes Antioxidans mit einem 20-fach höheren Redoxpotential als α -Tocopherol (*Stocker et al., 1987*). *Minetti et al. (1998)* berichten einen antioxidativen BR-Effekt bei der peroxynitrit-induzierten Proteinoxidation im Blutplasma. Peroxynitrit ist eines der physiologischen Reaktionsprodukte von NO. Da die NO-produzierende NOS-1 ebenfalls in Endplatten lokalisiert ist, könnte die BVR einen protektiven Einfluß vor Oxidation in Endplatten ausüben. *Panahian et al. (1999)* beschrieben eine erhöhte Expression der BVR nach permanenter fokaler Ischämie im Rattenhirn. Auch hier könnte das BR als Redoxsubstanz für das hierbei unter Ischämie entstehenden und dann toxischen NO bzw. seiner Metabolite dienen (*Samdani et al., 1997*).

Durch die Kolokalisation von NOS-1, HO-2 und sGC im Sarkolemm-Bereich der Skelettmuskelfasern könnten die alternativen Aktivierungswege der sGC durch NO und CO insgesamt regulatorisch wirken. NO bewirkt dabei eine starke Aktivierung der sGC mit hohem oxidativem Potential aufgrund des Radikalcharakters von NO und CO führt zu einer basalen Aktivierung der sGC mit hohem Redox-Potential durch das konsekutiv anfallende BR bei gleichzeitiger Hemmung der NOS.