

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Lichtmikroskop Axioskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen
Power Macintosh G3	Apple Computer, Cupertino, USA
Kühlzentrifuge Sigma 202 MK	Christ, Osterode
Tischzentrifuge Heraeus Biofuge	A Leybold-Heraeus, Köln
pH-Meter	Knick, Berlin
Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Kryostat, Frigocut 2700	Reichert Jung, Nußloch
Potter S-Homogenisator	Braun, Melsungen
Wärme- und Trockenschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Schüttelmaschine GFL 3005	GFL, Burgwedel
Mini-Elektrophorese-System Protean II	BioRad, München
Elektrophorese-System Protean II xi Cell	BioRad, München
Mini-Tank-Blot Electrophoretic Transfer	BioRad, München
Power Supply 250/2.5	BioRad, München
Electrophoresis Power Supply ST 606	Gibco BRL, Detroit, USA
Ultra-Turrax	Janke & Kunkel, Staufen
Spektralphotometer Ultraspec III	Pharmacia, Freiburg

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Die üblichen Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) in analytischer Qualität bezogen. Hersteller spezieller Chemikalien, Antikörper und anderer Reagenzien sind bei der folgenden Darstellung der Methoden erwähnt.

.2.2. Tiere

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewachsene männliche und weibliche Wistar-Ratten, Hamster, C57 Bl-10-Mäuse sowie NOS-1 und NOS-3 defiziente (knockout, KO) eigener Zucht verwendet. Die NOS-1- und NOS-3-KO-Mäuse wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA), die C 57-Mäuse von Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA) bezogen und dann damit eine eigene Zucht aufgebaut. Der NOS-1-KO-Stamm wurde ursprünglich von *Huang et al. (1993)* und der NOS-3-KO-Stamm mit der von *Huang et al. (1993)* beschriebenen Methoden von *Shesely et al. (1996)* hergestellt. Die Tiere wurden bei konstanter Temperatur von $22 \pm 2^{\circ} \text{C}$ und 40-60 % Luftfeuchtigkeit gehalten und erhielten altromin Haltungsfutter (Altromin GmbH, Lage) sowie Leitungswasser ad libitum.

2.3. Methoden

2.3.1. Organentnahme

Für die Organentnahme (Genehmigungsnummer O 0002/98) wurden den Tieren in tiefer Isoflurane-Narkose der Thorax eröffnet, die großen, herznahen Gefäße durchtrennt, EDL/TA, Zunge und infrahyale Muskulatur schnell entnommen und für die histochemischen Untersuchungen mit Tissue freezing medium (Jung, Nussloch) auf Korkplättchen montiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Gewebeblöcke in luftdichten Plastikbeuteln bis zur Weiterverwendung bei -30°C gelagert. Für die proteinbiochemischen Untersuchungen wurden die Organe wie für die histochemischen entnommen, in Eppendorfcups (Eppendorf, Hamburg) gegeben, ebenfalls sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -30°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.3.2. Proteinbiochemie

2.3.2.1. Herstellung von Homogenaten

Die Aufarbeitung der Organe für proteinbiochemische Methoden erfolgte modifiziert nach *Josic et al. (1985)*. Dazu wurden die Organe aufgetaut und mit 1 ml Solubilisationspuffer versetzt.

Solubilisationspuffer:

2 % (v/v) 100 mM EDTA	
0,1 % (v/v) Proteaseinhibitoren	300 µg/ml Aprotinin 300 µg/ml Leupeptin 300 µg/ml Pepstatin
1 % (v/v) 1 mM PMSF	Stammlösung: 100 mM in Isopropanol, erst unmittelbar vor Gebrauch Zugabe zum Solubilisationspuffer in PBS (pH 7,4)

Die Organe wurden mit dem Ultra-Turrax zerkleinert und anschließend mit dem Potter S mit 20 Hüben bei 1500 U/min^{-1} im Eisbad homogenisiert. Durch Zentrifugation (10 min, 10.000 g) wurden die im Überstand enthaltenen zytosolischen Proteine von den im Pellet enthaltenen membran-assoziierten Proteinen getrennt. Der Überstand wurde verworfen. Dem Solubilisationspuffer wurde 1 % (v/v) Triton X-100 zugesetzt und das darin enthaltene Pellet resuspendiert. Die Solubilisierung erfolgte über 1 h bei 4°C und konstantem Schütteln. Durch erneute Zentrifugation (5 min, 10000g) wurden die im Überstand enthaltenen löslichen von den unlöslichen Proteinen im Pellet getrennt. Der Überstand wurde weiterverarbeitet, das Pellet verworfen.

2.3.2.2. Proteinbestimmung

Da Triton X-100 bei vielen Methoden der Proteinbestimmung stört, gleichzeitig aber für die Isolierung von membran-assoziierten Proteinen notwendig ist, wurde die von Detergentien unabhängige BCA-Methode (Bicinchoninsäure-Methode) verwendet. Dazu wurde der "BCA Protein Assay Reagentkit" (Pierce, Rockford, USA) benutzt und nach Firmenvorschrift durchgeführt.

2.3.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach *Laemmli (1970)* durchgeführt.

Lösung A:

29,2 g Acrylamid
 0,8 g Bisacrylamid
 (beide Amide kombiniert in rotiphorese,
 Roth, Karlsruhe)
 auf 100 ml mit entm. H₂O

Lösung B (Trenngelpuffer):

18,15 g Tris
 0,40 g SDS
 (mit 10 N HCl auf pH 8,8 einstellen)

Lösung C (Sammelgelpuffer):

6,0 g Tris
 0,4 g SDS
 auf 100 ml mit entm. H₂O (mit 10 N HCl auf pH 6,8 einstellen)

TEMED (Roth, Karlsruhe)	APS 10 % (w/v) (Sigma, München)	1,0 g Ammoniumpersulfat auf 10 ml mit H ₂ O
----------------------------	------------------------------------	---

Laufpuffer (10-fach konzentriert):

Glycin	720,0 g
Tris	151,4 g
SDS	50,0 g
Auf 5 l mit entm. H ₂ O, pH 8,8	

Reduzierender Probenpuffer (5-fach):

Tris-HCl, pH 6,8	300 mM
1,4-Dithiotreit	10 mM
Bromphenolblau	0,015 % (w/v)
Glycerin	50 % (v/v)
SDS	15 % (w/v)

Gelansätze (für 2 Gele):

Trenngel 7,5 %, (je 9 ml)

Trenngel 10 %, (je 9 ml)

Lösung A	2,25 ml	3,0 ml
Lösung B	2,25 ml	2,25
Lösung C	---	---
Entm. H ₂ O	4,5 ml	3,75 ml
APS	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Trenngel 12,5 %, (je 9 ml)

Sammelgel (4 ml), 4 %

Lösung A	3,75 ml	0,53 ml
Lösung B	2,25	---
Lösung C	---	1,0 ml
Entm. H ₂ O	3,0 ml	2,47 ml
APS	50 µl	16 µl
TEMED	5 µl	4 µl

Laufbedingungen: Gel: 9x8 cm; 0,75 mm Dicke; Spannung = 200 V; Stromstärke variabel
Marker zur Bestimmung von Molekulargewichten: Sigma, Wide Range Color Marker

Standards: 205 kDa, 116 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 29 kDa, 20 kDa, 14,2 kDa, 6,5 kDa

Die Lösung für das Trenngel (5 ml) wurde gemischt, bis 1,8 cm unter den oberen Rand der kleinen Glasplatte gegossen und vorsichtig mit entm. H₂O zum Luftabschluß überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das entm. H₂O entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Mit einem Kamm wurden im Sammelgel zehn Auftragsaschen für die Proben geformt. Die Elektrophoresekammer wurde zusammengesetzt und mit Laufpuffer aufgefüllt. Für die SDS-PAGE unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen wurden die Proben 5:1 mit 5-fach Probenpuffer versetzt, 5 min im Wasserbad gekocht und nach dem Abkühlen in die Taschen des auspolymerisierten Sammelgels gefüllt. Dabei wurde je eine Bahn des jeweiligen Polyacrylamidgels mit dem Molekulargewichtsmarker beschickt. Die Elektrophorese wurde mit konstanter Spannung von 200 V durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande das untere Ende des Trenngels erreicht hatte.

2.3.2.4. Western-Blotting

Beim Western-Blotting werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem PAG auf eine Nitrozellulosemembran (Protran, Schleicher & Schüll, Dassel) zur nachfolgenden Immundetektion überführt. Dieses Blotting wurde im Tank-Blot-Verfahren durchgeführt.

Transferpuffer:

Tris	6,06 g	25 mM
Glycin	17,1 g	114 mM
Methanol	200 ml	10 % (v/v)
Auf 2 l entm. H ₂ O		

30 min vor Abschluss der SDS-PAGE wurden die Nitrozellulosemembranen in Transferpuffer äquilibriert. Das Blot-Sandwich wurde luftblasenfrei nach Beendigung der Gelelektrophorese zusammengesetzt, wobei die Nitrozellulose zur Anode, das Gel zur Kathode gerichtet war. Der Transfer fand bei 4 °C für 1 h bei einer konstanten Spannung von 100 V statt.

2.3.2.5. Färbungen

2.3.2.5.1. Coomassie-Blue G-250

Färbelösung:

Entfärber:

40 % (v/v) Ethanol	7,5 % (v/v) Essigsäure
10 % (v/v) Essigsäure	5 % (v/v) Ethanol
0,1 % (w/v) Serva Blue G-250	in entm. H ₂ O
In entm. H ₂ O	

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in der Färbelösung, die das Gel ca. 1 cm bedeckte für 1 h geschüttelt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch Schütteln des Gels für 2 h in der Entfärbelösung entfernt, die etwa alle 30 min gewechselt wurde.

2.3.2.5.2. Ponceau-Rot

Die reversible Färbung von Blot-Matrices mit Ponceau-Rot dient zur Überprüfung des elektrophoretischen Transfers von Proteinen aus PAGE auf Nitrozellulosemembranen.

Ponceau-Rot-Färbelösung (10-fach konzentriert):

2,0 % (w/v) Ponceau-Rot S (Serva 33429)
0,1 % (v/v) Essigsäure
1,5 % (w/v) TCA
1,5 % (w/v) Sulfosalicylat
In entm. H ₂ O

Entfärber:

5 % (v/v) Essigsäure in entm. H ₂ O
--

Um den Erfolg des Proteintransfer zu überprüfen, wurde nach dem Blot die Nitrozellulose 30 sec in der Ponceau-Lösung (1:10 mit entm. Wasser verdünnt) gefärbt und danach mit Entfärber entwickelt. Die Membran konnte anschließend mit PBS vollständig entfärbt werden.

2.3.2.6 Immunblot

Nach dem Transfer der Proteine aus dem PAG auf die Blot-Matrix können die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine spezifisch durch Immunreaktionen mit Primärantikörpern erfaßt werden. Die Primärantikörper, die an die auf der Nitrozellulose immobilisierten Antigene gebunden haben, können dann im nächsten Schritt durch speziesspezifische, an Peroxidase kovalent gekoppelte Sekundärantikörper (Goat-Anti-Rabbit IgG H+L; Jackson Immuno Reseach, West Grove, USA) erkannt werden. Durch Inkubation mit dem Peroxidase-spezifischen Reagenz Luminol (SuperSignal West Pico Chemiluminiscent Substrate; Pierce, Rockford, USA) kann das Enzym und dadurch der gesamte Immunkomplex dargestellt werden. Bei der katalytischen Umsetzung des Luminol entsteht eine Chemoluminiszenz, die Röntgenfilme belichten kann.

Waschpuffer:

0,1 % (v/v) Tween 20 (Serva, Heidelberg) in PBS, pH 7,4

Blockierungspuffer:

5 % (w/v) Trockenmilch (Fluka, Neuulm) in Waschpuffer

Nach dem Proteintransfer und nach dem Entfärben der Ponceau-Färbung wurden die Nitrozellulosemembranen mit Blockierungspuffer für 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt und danach bei 4 °C über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Für den sGC-Immunblot wurde ein peptidspezifischer, polyklonaler Antikörper (antiserum to soluble Guanylyl Cyclase; Alexis Biochemicals, Grünberg) gegen die α_1 - (Aminosäuren 414-432) und β_1 -Untereinheit (Aminosäuren 188-207) der humanen Aminosäuren-Sequenz (erkennt überwiegend die β_1 -Untereinheit; Verdünnung 1:1.000), für den NOS-1-Immunblot ein Gemisch aus peptidspezifischen, polyklonalen NOS-1-Antikörpern (Sigma, N 7280 und N 7155, München), gegen die Aminosäuren 1409-1429 und 251-270 der NOS-1 (Verdünnung jeweils

1:5000), für den NOS-3-Immunblot ein peptidspezifischer, polyklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren 1025-1203 der humanen NOS-3 (Transduction, Lexington, USA; Verdünnung 1:2000), für den HO-2-Immunblot ein polyklonaler Antikörper gegen das aus Rattenhoden isolierte Gesamtprotein (OSA-200, Stressgen, Victoria, Kanada; Verdünnung 1:2000) und für den BVR-Immunblot ein polyklonaler Antikörper (OSA-400, Stressgen, Victoria, Kanada; Verdünnung 1:2000) gegen die BVR aus Rattenleber in Waschpuffer eingesetzt. Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern wurden die Blots 1 h gewaschen und mit Peroxidasegekoppelten Goat-Anti-Rabbit-Sekundär-Antikörpern (Verdünnung 1:10.000) in Waschpuffer inkubiert. Nach mindestens drei Waschvorgängen von jeweils 5 min wurden die Blotmembranen 1 min mit 2 ml Luminol (je 1 ml Enhancer und Developer vermischt) bedeckt. Anschließend wurden die Blots mit einer Plastikfolie bedeckt und ein Kodak XR-5-Film aufgelegt. Für die Entwicklung wurden mehrere Expositionszeiten zwischen 0,5 und 30 min verwendet. Die Entwicklung des Films erfolgte durch aufeinanderfolgende Inkubationen in Entwickler (Kodak, GBX developer and replenisher, Rochester, USA), Leitungswasser und Fixierer (Kodak, Paris, Frankreich) bei Rotlicht.

2.3.3. Herstellung peptidspezifischer, polyklonaler Antikörper gegen HO-2 und HO-3

Zur Unterscheidung der HO-2 und HO-3 bei 90 %-iger Homologie wurden geeignete Peptidsequenzen zur Herstellung peptidspezifischer, polyklonaler Antikörper mit dem Computerprogramm Advanced Blast 2 anhand von vier Kriterien festgelegt. 1. wurden die Bereiche mit Sequenzunterschieden ermittelt und aus diesen hydrophile Bereiche ermittelt, denn nur diese versprechen eine ausreichende Antikörperbindung, 2. wurden anhand von geladenen Aminosäuren Sequenzbereiche mit hoher Avidität, d.h. Bindungskraft, herausgesucht, 3. wurden mögliche N-Glykosylierungsstellen ausgeschlossen, über die Proteine an Membranen gebunden sein können und 4. wurde mit dem Computerprogramm SwissProt ausgeschlossen, daß die ausgewählten Sequenzen in anderen, bekannten Proteinen vorhanden sind. Insgesamt ergab sich, daß für die HO-2 die Aminosäuren 84-95 (Aminosäuresequenz DRNKDHPAFAPL) und für die HO-3 die Aminosäuren 146-156 (Aminosäuresequenz KETQPVPFTRE) für eine Immunisierung am besten geeignet sind. Die Kaninchen wurden von Dr. J. Pineda (Antikörper-Service, Berlin) immunisiert. Nach Durchführung von Immunblots mit Präimmunsereen in unserem Labor wurden pro Peptid jeweils drei Kaninchen ausgewählt. Die Immunisierung erfolgte in vier Zyklen über jeweils dreißig Tage, wobei nach jeder Immunisierung von mir Immunblots durchgeführt wurden. Nach dem letzten Zyklus wurden die Antiseren über mit den jeweiligen Immun-

isierungspeptiden bestückten Säulen Affinitäts-gereinigt und anschließend die so gereinigten Antikörper eluiert. Die Antikörper wurden zur Konservierung mit Natriumazid versetzt und bei -40°C gelagert.

2.3.4. Histologie

2.3.4.1. Kryostatschnittherstellung, HE-Färbung

Mit dem Kryostaten wurden $10\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte hergestellt, auf Poly-L-Lysin beschichtete, zimmerwarme Objektträger montiert und sofort für die Enzym- und Immunhistochemie benutzt. Um die Qualität der Kryostatschnitte zu kontrollieren, wurden Probeschnitte mit HE nach *Romeis (1968)* gefärbt. Dazu wurden die Schnitte nacheinander 5 min mit Mayers Hämalaun gefärbt, zur Bläuung 5-10 min mit Leitungswasser gewaschen, 1 min mit 0,1 % wässriger Eosinlösung gefärbt, wiederum mit Leitungswasser gewaschen, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 95 %, 100 %) entwässert, in Xylol eingestellt und in Eukitt eingedeckt. Die Zellkerne werden durch dieses Verfahren blau und das Zytoplasma rot-orange gefärbt.

2.3.4.2 Immunhistochemie

Der immunhistochemische Nachweis der NOS-1 erfolgte nach *Grozdanovic et al. (1995)*. Die Kryostatschnitte wurden 10 min in 4 % (w/v) Formaldehyd ($\text{pH}=7,4$) bei Raumtemperatur fixiert, anschließend 10 min fließend gewässert, mit entm. H_2O kurz gespült, für 60 min mit 1 % BSA (w/v) (Sigma, München) inkubiert um mögliche unspezifische Bindungsstellen des Primärantikörpers zu blockieren. Danach wurden die Schnitte sofort weiterverarbeitet um eine Austrocknung zu verhindern. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach der Blockierung wurden die Schnitte direkt mit den o.g. peptidspezifischen, polyklonalen NOS-1-Antikörpern inkubiert (Verdünnung 1:1000 in PBS). Nach drei Waschvorgängen mit PBS wurden die Schnitte mit Cy3-konjugierten Sekundärantikörpern (Goat-Anti-Rabbit, Jackson Immuno Research, West Grove, USA) 1:200 in PBS für 2 h inkubiert, erneut drei mal in PBS gewaschen und mit aquatex (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Bei Anwendung dieser Methode wurden immer Negativkontrollen mit PBS ohne NOS-1-Antikörper durchgeführt, bei sonst identischen Arbeitsschritten. Die fertigen Schnitte wurden lichtgeschützt bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die Immunreaktion der spezifisch gebundenen Antikörper wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Alternativ wurde zur Visualisierung der Primärantikörper

eine modifizierte ABC-Methode mit dem DAB-H₂O₂-System benutzt (Vectastain, Linaris, Wertheim). Die Vorbehandlung der Schnitte wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Primärantikörper wurden ebenfalls über Nacht in gleicher Verdünnung bei Raumtemperatur inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach Firmenvorschrift.

Für den immunhistochemischen Nachweis der NOS-3, HO-2, BVR wurden die o.g. eingesetzten Antikörper eingesetzt (Verdünnung jeweils 1:200). Die sGC wurden neben dem o.g. polyklonalen Antikörper (Verdünnung 1:100) mit zwei nicht-kommerziellen pepidspezifischen, polyklonalen Antikörpern gegen die α_1 - und β_1 -Untereinheiten, die gegen die Aminosäuresequenz KDVEEANANFLGKASGID (α_1) bzw. SRKNTGTEETE QDEN (β_1) gerichtet sind, untersucht (freundlicherweise von Frau Prof. Dr. D. Koesling, Berlin, jetzt Bochum zur Verfügung gestellt; Verdünnung 1:100).

2.3.4.3. NADPHd

Die NADPHd-Reaktion zum Nachweis der NOS-1 durch ihre Diaphorase-Aktivität wurde an Kryostatschnitten mit der ursprünglich von *Thomas und Pearse (1961)* und dann von *Scherer-Singler et al. (1983)* modifizierten Tetrazoliumsalz-Methode durchgeführt. In dieser Arbeit wurde die Reaktion als Doppelinkubation, d.h. am gleichen Schnitt mit dem immunhistochemischen Nachweis der HO-2 durchgeführt, wobei zuerst die Diaphorase und dann die HO-2 nachgewiesen wurde.

Diaphorase-Standardmedium:

NBT 0,3mM (Serva, Heidelberg)	0,25 mg
β -NADPH 1,1mM (Biomol, Hamburg)	5 mg
Triton X-100 0,5 % (v/v) (Roth, Karlsruhe)	5 μ l
In 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,6)	1 ml

Die Kryostatschnitte wurden in 4 % Formaldehyd (pH 7,4) für 10 min bei 4 °C fixiert und gründlich mit Leitungswasser in der Küvette gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 60 min in einer feuchten Kammer bei 37 °C mit dem Medium inkubiert, anschließend mit PBS gespült, dann der immunhistochemische Nachweis der HO-2 (s.o.) durchgeführt, erneut mit

PBS gespült und in aquatex (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Die NOS-1-Diaphorase wurde bei diesem Verfahren durch Bildung von Formazan sichtbar. Das violette Formazan konnte dann in den Schnitten im Durchlicht, die Fluoreszenz der Antikörper-Komplexe im Auflicht untersucht werden.