

Aus der Abteilung für Zellphysiologie  
Institut für Physiologie der Universität Hamburg  
Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. K. Baumann

**KINETISCHE STUDIEN AN DEN LEITENZYMEN ALKALISCHE  
PHOSPHATASE, NEUTRALE  $\alpha$ -GLUCOSIDASE UND  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPASE  
EINER RENALEN BÜRSTENSAUMMEMBRANFRAKTION VON RATTEN MIT  
EINEM AKUTEN ODER CHRONISCHEN, STREPTOZOTOCIN-INDUZIERTEN  
DIABETES**

**DISSERTATION**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Helene Renz  
aus Kirowsk

Hamburg, 2000

Angenommen von dem Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 23. Januar 2001

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin  
der Universität Hamburg

Sprecher : Prof. Dr. H.-P. Leichtweiß

Referent : Prof. Dr. K. Baumann

Korreferent :

## INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1. EINLEITUNG</b>	5
<b>2. METHODEN</b>	7
2.1. Streptozotocininduzierter Diabetes bei Ratten	7
2.2. Gewinnung der renalen Bürstensaummembranfraktion	7
2.3. Charakterisierung der renalen Bürstensaummembranfraktion	8
2.4. Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten der Leitenzyme alkalische Phosphatase, neutrale $\alpha$ -Glucosidase und $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase	9
2.4.1. Durchführung der photometrischen Messungen und Berechnung der kinetischen Konstanten	9
2.4.2. Kinetische Messungen an der alkalischen Phosphatase	10
2.4.3. Kinetische Messungen an der neutralen $\alpha$ -Glucosidase	12
2.4.4. Kinetische Messungen an der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase	14
2.5. Verwendete Substanzen und Geräte	17
2.6. Statistik und Programme	17
<b>3. ERGEBNISSE UND ABBILDUNGEN</b>	18
3.1. Charakterisierung der renalen Bürstensaummembranfraktion	18
3.1.1. Leitenzyme und ihre Anreicherungsfaktoren	18
3.1.2. Tabelle Leitenzyme und ihre Anreicherungsfaktoren	20
3.2. Alkalische Phosphatase	22
3.2.1. Kinetik der alkalischen Phosphatase	22
3.2.2. Abbildungen alkalische Phosphatase	24
3.3. Neutrale $\alpha$ -Glucosidase	33
3.3.1. Kinetik der neutralen $\alpha$ -Glucosidase	33
3.3.2. Abbildungen neutrale $\alpha$ -Glucosidase	34

	Seite
3.4. Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	42
3.4.1. Kinetik der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	42
3.4.2. Abbildungen Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	43
3.5. Zusammenstellung der enzymkinetischen Daten von Bürstensaum- membranfraktionen akut und chronisch diabetischer Ratten	51
3.5.1. Kinetik der Enzyme alkalische Phosphatase, neutrale α-Glucosidase und Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	51
3.5.2. Tabelle enzymkinetische Daten	52
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>54</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>61</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>62</b>
<b>7. LEBENSLAUF</b>	<b>68</b>
<b>8. DANKSAGUNG</b>	<b>69</b>

## 1. EINLEITUNG

Nach früheren Studien unserer Arbeitsgruppe (Blank et al. 1985, 1989) veränderte sich die Kinetik des natriumabhängigen D-Glucosetransportes in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln in diabetischen relativ zu Kontrollratten. Der nicht-insulinpflichtige Diabetes wurde durch einmalige Injektion von Streptozotocin erzeugt. Vier Tage nach der Streptozotocininjektion (akuter Diabetes) waren die anscheinenden Transportkonstanten  $K_t$  und  $V_{\max}$  zweifach höher als normal.

Verglichen mit diesen akut diabetischen Ratten, konnten die chronisch diabetischen Ratten (mindestens bis vier Wochen nach Streptozotocininjektion) die erhöhte maximale Glucosetransportrate aufrechterhalten, solange sie ihr Körpergewicht hielten. Die schwerkranken, ketoacidotischen Ratten hatten 28 Tage nach der Streptozotocininjektion ihre erhöhte Transportfähigkeit eingebüßt. Zusätzlich hatte die Affinität des Transporters für Glucose weiterhin abgenommen.

Interessanterweise wurden durch die Computeranalyse der Transportdaten zwei Arbeitsweisen eines renalen  $\text{Na}^+$ /Glucose-Symporters (oder die Existenz zweier  $\text{Na}^+$ /Glucose-Symporter mit unterschiedlicher Stöchiometrie) identifiziert (Blank et al. 1989).

Parallel zu den Transportkonstanten änderte sich die spezifische Aktivität von Leitenzymen im Nierenkortex diabetischer Ratten, wobei die untersuchten Leitenzyme der Bürstensaummembran ein unterschiedliches Verhalten zeigten. Mit der Dauer des Diabetes stieg die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase, während diejenige der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase abnahm. Das Leitenzym der basolateralen Zellmembran, die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, zeigte keine signifikanten Änderungen (Blank et al. 1985). Zur weiteren Charakterisierung der Veränderung von Leitenzymen wurden in der vorliegenden Arbeit Messungen zur Enzymkinetik der alkalischen Phosphatase, neutralen  $\alpha$ -Glucosidase und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in renalen

Bürstensaummembranfraktionen und im Homogenat des Nierenkortex von 4- und 28-Tage-diabetischen Ratten und korrespondierenden Kontrollratten durchgeführt.

## **2. METHODEN**

### **2.1. Streptozotocininduzierter Diabetes bei Ratten**

Männliche Wistar Ratten (Winkelmann, Kirchborchen) erhielten eine Standarddiät (Altromin<sup>®</sup>), bei der sie freien Zugang zu Trinkwasser hatten. Die Ratten wurden in ventilerten Räumen mit kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit bei regelmäßigen Lichtzyklen gehalten. Etwa 250 g schwere Ratten in leichter Äthernarkose erhielten durch intracardiale Injektion etwa 0.5 ml einer frisch zubereiteten Streptozotocin-Lösung (50 mg/kg Körpergewicht). Streptozotocin war in einem 5 mM Citratphosphatpuffer (pH 6.8) gelöst. Zur Herstellung der renalen Bürstensaummembranfraktion wurden experimentelle Tiere 4 oder 28 Tage nach Streptozotocininjektion und entsprechende unbehandelte Kontrolltiere in Gruppen von 9 Tieren eingeteilt. Die Plasmaglukosekonzentration wurde mit der Glucoseoxidase-Methode gemessen (Reflomat, Boehringer Mannheim) und betrug in allen diabetischen Ratten über 400 mg/dl. Die Blutgasanalyse und Messungen des pH-Wertes des Blutes wurden nicht routinemäßig durchgeführt. Tests von gemischtem arteriellem und venösem Blut von schwer beeinträchtigten 4-Wochen-diabetischen Tieren, besonders wenn sie 40% oder mehr an Gewicht verloren hatten, ergaben eine schwere Acidose (pH < 7.1) und Ketose (Ketostix).

### **2.2. Gewinnung der renalen Bürstensaummembranfraktion**

Ratten wurden durch Genickschlag getötet und die Bauchhöhle eröffnet. Die Nieren wurden vom Blut freigespült indem die distale abdominale Aorta abgeklemmt wurde und etwa 15 ml eiskalte isotone NaCl-Lösung in die thorakale Aorta injiziert wurden. Die Nieren wurden sofort herausgenommen, von der Capsula adiposa befreit und bis zur weiteren Versuchsdurchführung in eisgekühlter isotoner NaCl-Lösung gelagert.

Danach wurden dünne Schnitte der Rinde beider Nieren freihändig mit einer Rasierklinge präpariert. Bei der verwendeten Schnittstärke sollten die Bürstensaummembranvesikel in erster Linie aus dem S<sub>1</sub> und S<sub>2</sub> Segment proximaler Tubuli stammen. Die Zwei-Schritt-Mg<sup>2+</sup>-Ausfällungsmethode (Biber et al. 1981) wurde benutzt, um aus den dünnen Nierenkortexschnitten Bürstensaummembranfraktionen von Kontroll-, 4-Tage- und 4-Wochen-diabetischen Ratten herzustellen. Die Nierenschnitte wurden im Tris/HCl-Puffer (Tris 6 mM, Mannit 150 mM, EGTA 2.5 mM, pH 7.4) für 2 min homogenisiert (Polytron, Stufe 5). Das Homogenat wurde während der Magnesiumchloridzugabe 15 min im Eisbad gerührt und auf Sorvall-Tubes verteilt. Das Homogenat wurde für 15 min bei 4500 Upm und anschließend der Überstand für 30 min bei 1600 Upm zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge). Das Pellet wurde in Tris/HCl-Puffer aufgenommen, gepottert und anschließend während der Magnesiumzugabe für 15 min gerührt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4500 Upm für 15 min und der gewonnenen Überstände bei 1600 Upm für 30 min. Das Sediment wurde in Tris/HCl-Puffer für die photometrischen Bestimmungen aufgenommen.

### **2.3. Charakterisierung der renalen Bürstensaummembranfraktion**

Die Güte der Präparation wurde bestimmt durch die Messung der spezifischen Aktivität folgender Leitenzyme in der Membranfraktion relativ zu dem Ausgangshomogenat. Alkalische Phosphatase und neutrale  $\alpha$ -Glucosidase dienten als Leitenzyme für die Bürstensaummembran, die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase als Leitenzym für die basolaterale Zellmembran, die die Bürstensaummembranfraktion kontaminierte. Bei der Proteinbestimmung (modifiziert nach Schacterle u. Pollack 1973) wurde Rinderserumalbumin (kristallin, reinst, 99%) als Standard verwendet. Die Proteineichkurve wurde durch Kontrollmessungen an jedem Bestimmungstag überprüft. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem Spektralphotometer PMQ 3 bei einer Wellenlänge von 650 nm. Der Grad der Bürstensaummembrananreicherung, relativ zum

Ausgangshomogenat, war für alle Tiergruppen gleich. Im Mittel wurde die alkalische Phosphatase und die neutrale  $\alpha$ -Glucosidase 9.5- bzw 12.5-fach angereichert. Der Grad der basolateralen Membrankontamination war niedrig und konstant für alle Präparationen. Im Mittel betrug der Anreicherungsfaktor für die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 0.86, was einer Abreicherung entspricht.

Die Bestimmung der Leitenzyme zur Berechnung der Anreicherungsfaktoren erfolgte nach Standardmethoden bei Substratsättigung. Die Messung der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase (EC 3.2.1.20) erfolgte mit Maltase als Substrat (Pape et al. 1983). Die zinkaktivierte alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1.) wurde mit der Merckotest-Methode (Merck, Darmstadt) mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat bestimmt. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (EC 3.6.1.3) und die totale ATPase Aktivität wurde in Gegenwart und Abwesenheit von Ouabain gemessen (Heller u. Hanaham 1972, Witt 1979).

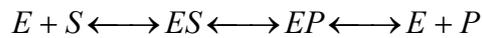
## **2.4. Bestimmung der enzymatischen Aktivitäten der Leitenzyme alkalische Phosphatase, neutrale $\alpha$ -Glucosidase und $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase**

### **2.4.1. Durchführung der photometrischen Messungen und Berechnung der kinetischen Konstanten**

Für jede Küvette wurden die gemessenen Extinktionen aufgezeichnet und der Differentialquotient  $d\text{Abs}/dT$  (die Änderung der Absorption mit der Zeit) ermittelt. Dieser Wert wurde als beste Annäherung an  $v_0$  betrachtet und diente zur Bestimmung von  $V_{\text{max}}$  und  $K_m$  durch direkte Kurvenanpassung an die Michaelis-Menten-Gleichung.

Die durchgeführten Berechnungen beruhen auf der Annahme eines einzelnen zentralen Komplexes nach Henri, Michaelis und Menten in der enzymatischen

Reaktion. Das bedeutet, ein einzelnes Substrat liefert ein einzelnes Produkt. Die Gleichung hierfür lautet:



Die Gleichung vereinfacht sich unter der Annahme, daß die Rückreaktion zu vernachlässigen ist, und damit nur der Komplex ES zu betrachten ist:



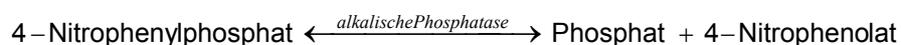
Diese gemachten Voraussetzungen liefern ebenso wie eine Steady-State Betrachtung (nach Briggs und Haldane) die in der vorliegenden Arbeit verwendete Form der Michaelis-Menten-Gleichung:

$$\frac{v}{V_{\max}} = \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

$V_{\max}$  wird in den Abbildungen der Kurvenanpassungen als Parameter **a** in mol/(mg\*min) angegeben,  $K_m$  ist **b** in der Dimension mol/l äquivalent. Als Programme wurden TableCurve<sup>®</sup> und SigmaPlot<sup>®</sup> verwendet.

#### 2.4.2. Kinetische Messungen an der alkalischen Phosphatase

Der Bestimmung der alkalischen Phosphatase liegt folgende Reaktion zugrunde:



**Reaktionslösung (eisgekühlt)****Lösung A**

10 ml Pufferlösung

100  $\mu$ l ZnCl<sub>2</sub>-Lösung, 100 mmol/l

1. Zu 950  $\mu$ l Lösung A wurden 50  $\mu$ l *p*-Nitrophenolphosphat in unterschiedlichen Konzentrationen gegeben. Im einzelnen wurden folgende Endkonzentrationen eingestellt:  $10^{-2}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  und  $10^{-5}$  mol/l

MG (*p*-Nitrophenolphosphat): 371.1 g/mol

Stocklösung: 742.2 mg/10 ml Lösung A; daraus ergibt sich eine Endkonzentration des Substrates in der Küvette von  $10^{-2}$  mol/l. Die weiteren Konzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnung hergestellt.

oder

2. In 10 ml Lösung A wurde 1 Substrattablette gelöst (zur Kontrolle bzw. Vergleich des Umsatzes unter der Bedingung der Substratsättigung).

In der Regel wurde das Homogenat 1:20 und die Bürstensaumfraktion 1:500 mit Puffer verdünnt.

**Durchführung der Bestimmung**

Küvetten: Halbmikro,  $d = 1$  cm

Meßtemperatur: 37°C

1 ml Reaktionslösung wurden in eine Küvette pipettiert, auf 37°C temperiert und für 15 min inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 2 Umläufe des automatischen Küvettenwechslers mit 10 s Wechselzeit durchgeführt und darauf geachtet, daß die Werte konstant waren. War das der Fall, wurden 20  $\mu$ l verdünntes Homogenat oder verdünnte Membranfraktion

bzw. entsprechend verdünnter Puffer (für die jeweiligen Leerwerte, LW) zupipettiert.

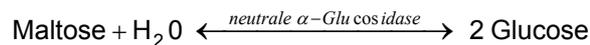
Wechselzeit: 30 s

Umläufe: 9

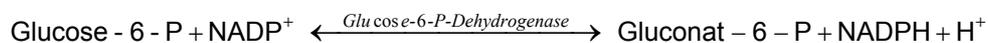
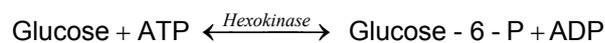
Sowohl Meßwerte als auch Leerwerte wurden als 3-fach Bestimmungen durchgeführt. Die Extinktion wurde bei 405 nm Wellenlänge gemessen. Es wurde darauf geachtet, daß das  $\Delta E/\text{Umlauf}$  zwischen 0.010 und 0.200 lag (als Differenz zum  $\Delta E_{LW}$ ).

### 2.4.3. Kinetische Messungen an der neutralen $\alpha$ -Glucosidase

Der Bestimmung der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase liegt folgende Reaktion zugrunde:



Der eigentlichen Reaktion sind zur direkten photometrischen Registrierung des Umsatzes folgende Reaktionen nachgeschaltet:



Aus der Stöchiometrie ergibt sich, daß 2 Mole NADPH einem Mol Maltose äquivalent sind.

**Reaktionslösung:****Lösung1**

Substrate (ATP, NADP): Pulver 1 (Boehringer Testkombination Glucose) wurde in 150 ml bidestilliertem Wasser gelöst und auf pH 6.8 eingestellt.

**Lösung2**

Enzyme: Gemisch aus Hexokinase (HK) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wurde mit 5 ml H<sub>2</sub>O verdünnt.

**Citrat-Phosphat-Puffer (C-P-Puffer)**

a) 0.2 mol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (35.6 g/l)

b) 0.1 mol/l Citronensäuremonohydrat (21.0 g/l)

wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und auf pH 6.8 eingestellt.

Der Ansatz der Reaktionslösung erfolgte nach folgendem Schema:

1. 7.6 ml Lösung 1
2. 0.6 ml DMT (11.42 mg, 114.2 mg bzw. 1.142 g Maltose und jeweils 1.550 g Turanose mit C-P-Puffer auf 10 ml auffüllen.
3. 0.5 ml Lösung 2

**Durchführung der Bestimmung**

Küvetten: Halbmikro, d = 1 cm

Meßtemperatur: 37°C

540 µl Reaktionslösung wurden in die Küvette pipettiert und auf 37°C temperiert (15 min Inkubation). Analog der Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase erfolgten 2 Umläufe mit 10 s Wechselzeit, wobei die Werte ebenfalls keinen Shift erkennen lassen durften.

Im Anschluß daran wurden 60 µl verdünnte Membranfraktion, Homogenat (1:5, 1:10), BB (1:50), bzw. entsprechend verdünnter Puffer (jeweiliger Leerwert) dazugegeben.

Wechselzeit: 30 s

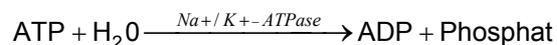
Umläufe: 9

Sowohl Probenwerte als auch Leerwerte wurden als 3-fach Bestimmungen durchgeführt. Die Änderung der Extinktion aus der G6P-DH-Reaktion wurde bei einer Wellenlänge von 334 nm gemessen (die günstigere Wellenlänge von 340 nm stand für diese Art von Photometer nicht zur Verfügung).

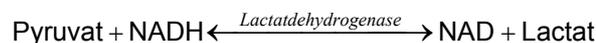
Es wurde darauf geachtet, daß das  $\Delta E/\text{Umlauf}$  zwischen 0.010 und 0.200 lag (als Differenz zum  $\Delta E_{LW}$ ).

#### 2.4.4. Kinetische Messungen an der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

Der Bestimmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität liegt folgende Reaktionsgleichung zugrunde:



Der eigentlichen Reaktion sind zur direkten photometrischen Registrierung des Umsatzes folgende Reaktionen nachgeschaltet:



Zur Durchführung der Messungen wurden folgende Lösungen hergestellt:

	<b>Substanz</b>	<b>MG</b>	<b>Einwaage</b>	<b>Vol.</b>	<b>Konz.</b>	<b>pH</b>
			<b>[mg]</b>	<b>[ml]</b>	<b>[mmol/l]</b>	
<b>Lösung 1</b>	PEP	208	18.3	2	44	
<b>Lösung 2</b>	NADH	709	25.5	2	18	
<b>Lösung 3a</b>	MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	203	274	500	2.7	7.2
	Imidazol	68	3400		100	
<b>Lösung 3b</b>	3a+Ouabain	729	182.3	250	1	
						Lösung 3a
<b>Lösung 4a</b>	MgCl <sub>2</sub> ·6 H <sub>2</sub> O	203	503	500	4.95	
	NaCl	58.5	14480		495	
	KCl	74.6	4100		110	
<b>Lösung 4b</b>	wie Lösung 4a, aber ohne NaCl					
<b>Lösung 5</b>	ATP-Na <sub>2</sub> ·3 H <sub>2</sub> O	605	133.1	10	22	
<b>Enzyme</b>	LDH 140 µl					
	PK 200 µl	H <sub>2</sub> O ad 1000 µl				

### Reaktionslösung:

(a) 1 ml Lösung 1+400 µl Lösung2+12.2 ml Lösung 3a

(b) 1 ml Lösung 1+400 µl Lösung2+12.2 ml Lösung 3b

### Durchführung der Bestimmung

Küvetten: Halbmikro, d = 1 cm

Meßtemperatur: 37°C

### **Vorbehandlung der Proben bzw. der Leerwerte**

Die entsprechend verdünnten Proben wurden für die Bestimmung

- a) der Gesamt ATPase-Aktivität in zwei Volumenteilen 4a
- b) der ATPase Aktivität bei gehemmter  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (mit Ouabain) in zwei Volumenteilen 4b 15 min bei 37°C inkubiert.

Messung der Gesamt-ATPase-Aktivität:

680 µl Reaktionslösung (a), Inkubation für 10 min bei 37 °C

100 µl ATP-Lösung + 10 µl Enzyme, nach 5 min Inkubation bei 37 °C ⇒ 2 Umläufe mit 10 s Wechselzeit, waren die Absorptionswerte konstant, wurden

300 µl Lösung aus Vorbehandlung a) zugegeben.

Zur Bestimmung der ATPase-Restaktivität (Gesamtaktivität minus Aktivität in Gegenwart von Ouabain) wurde die entsprechende Reaktionslösung (b) bzw. die vorbehandelte Probe (b) verwendet. Die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase-Aktivität errechnete sich aus der Differenz der beiden Bestimmungen, wobei die Probenwerte jeweils durch die Leerwerte korrigiert wurden.

Auswertung:

Aus den letzten Umläufen wurden drei zur Berechnung des Mittelwertes herangezogen. Die Schwankungen des  $\Delta E/\text{Umlauf}$  sollten nicht über 10% liegen und nicht systematisch kleiner oder größer von Umlauf zu Umlauf werden.

Messung: Die Extinktion wurde durch Abnahme der NADH-Konzentration geringer (der Anfangswert lag im Mittel bei einer Absorption von ca. 1.5)

Sowohl Probenwerte als auch Leerwerte wurden als 3-fach Bestimmungen durchgeführt. Die Änderung der Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 334 nm gemessen (die günstigere Wellenlänge von 340 nm stand für diese Art von Photometer nicht zur Verfügung).

Es wurde darauf geachtet, daß das  $\Delta E$ /Umlauf nicht größer als 0.100 und nicht kleiner als 0.003 (als Differenz zum Leerwert) war.

## 2.5. Verwendete Substanzen und Geräte

Streptozotocin wurde bei Sigma (St. Louis, MO, USA) und Rinderserumalbumin bei Serva (Heidelberg) erworben. Enzyme, Substrate und alle anderen Reagenzien in p.a. Qualität wurden von Boehringer (Mannheim) bzw. Merck (Darmstadt) bezogen.

Folgende Geräte wurden verwendet:

- Photometer:     a. Spektralphotometer PMQ 3, Carl Zeiss, Oberkochen  
                  b. Filterphotometer Typ 6118 mit automatischem Küvettenwechsler,  
                      Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz, Hamburg
- Zentrifuge:     Sorvall RC5, Du Pont Instruments, Bad Nauheim
- Potter:           Elvehjem-Homogenisator, Braun, Melsungen
- Thermomixer:   Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz, Hamburg

## 2.6. Statistik und Programme

Statistische Analysen zur Bestimmung von Signifikanzniveaus wurden mit Hilfe des Student t-Tests durchgeführt. Kurvenanpassungen mit Darstellung von Vertrauensintervallen und Vorhersagesicherheiten wurden mit den Programmen TableCurve<sup>®</sup> von Jandel Scientific, 40699 Erkrath, und SigmaPlot<sup>®</sup> von SPSS Science Software, 40699 Erkrath, gerechnet.

### **3. ERGEBNISSE UND ABBILDUNGEN**

#### **3.1. Charakterisierung der renalen Bürstensaummembranfraktion**

##### **3.1.1. Leitenzyme und ihre Anreicherungsfaktoren**

Die Tabelle 1 der vorliegenden Arbeit wurde von Blank et al. (1985) übernommen. In dieser Tabelle sind die spezifischen Aktivitäten von Markerenzymen der renalen Bürstensaummembranfraktionen einer ausführlichen Versuchsserie (Glucosetransportstudien) zusammengestellt. Die im Vergleich zur ausführlichen Serie (Tabelle 1) jetzt durchgeführten Versuche hatten eine niedrigere n-Zahl, die es nicht erlaubte, die 28-Tage-diabetischen Tiere entsprechend dem Gewichtsverlust statistisch abgesichert in drei Gruppen einzuteilen. Alle jetzt durchgeführten Einzelversuche lagen jedoch mit den unter Standardbedingungen (Substratsättigung) gemessenen spezifischen Aktivitäten der alkalischen Phosphatase, neutralen  $\alpha$ -Glucosidase und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sowohl für das Nierenrindenhomogenat als auch für die Bürstensaummembranfraktion und damit auch für die Anreicherungsfaktoren im Streubereich der Ergebnisse für die ausführliche Versuchsserie (Tabelle 1). Im Detail enthält die Tabelle 1 für die Leitenzyme alkalische Phosphatase, neutrale  $\alpha$ -Glucosidase und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase die spezifischen Aktivitäten im Nierenrindenhomogenat und in der Bürstensaummembranfraktion einschließlich enzymatischer Anreicherungsfaktoren. Die 28-Tage-diabetischen Tiere wurden entsprechend ihrem Gewichtsverlust unterteilt in drei Gruppen (Gewichtsverlust: 15%, 30% und  $\geq 40\%$ ).

Die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase stieg im Homogenat und in der Vesikelpräparation für 4-Tage- und 28-Tage-diabetische Tiere relativ zu den korrespondierenden Kontrolltieren. Je stärker der Gewichtsverlust bei den 28-Tage-diabetischen Tieren ausfiel, um so höher war der Anstieg der spezifischen enzymatischen Aktivität.

Das zweite Leitenzym der Bürstensaummembran, die neutrale  $\alpha$ -Glucosidase, zeigte ein gegensinniges Verhalten. Die neutrale  $\alpha$ -Glucosidase zeigte eine Abnahme der spezifischen Aktivität im Homogenat und in der Vesikelpräparation relativ zu den korrespondierenden Kontrolltieren. Das Leitenzym der basolateralen Zellmembran, die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, zeigte keine signifikanten Änderungen.

### 3.1.2. Tabelle Leitenzyme und ihre Anreicherungsfaktoren

#### **Tabelle 1**

#### **Spezifische Aktivität von Markerenzymen in renalen Bürstensaummembranvesikeln von Kontroll- und diabetischen Ratten , 4 und 28 Tage nach Injektion von Streptozotocin.**

Spezifische Aktivitäten ( $\bar{x} \pm SD$ ) von Leitenzymen der Nierenrindenhomogenate und der Bürstensaummembranfraktionen in  $\mu\text{mol/mg protein/min}$ . Die Werte in Klammern repräsentieren die Anzahl der Vesikelpräparationen. Neun Tiere wurden für jede Vesikelpräparation verwendet. Die 4-Wochen-diabetischen Ratten wurden in drei Gruppen eingeteilt entsprechend ihrem Gewichtsverlust verglichen mit unbehandelten Tieren unter identischen Haltebedingungen. Die Gewichtsverluste entsprachen 40%, 30% und 15%. \*\* ( $p < 0.01$ ) verglichen mit Werten der korrespondierenden Kontrolltiere. <sup>a</sup> Ein geringer aber statistisch signifikanter ( $p < 0.01$ ) Anstieg der bürstensaumspezifischen Aktivität der alkalischen Phosphatase in Kontrollratten wurde nach 28 Tagen unter den gegebenen Haltebedingungen gefunden.

	4 Tage		28 Tage				
	Körper- gewicht (g):	Kontrolle (264 ± 22)	Diabetes (244 ± 18)	Kontrolle (312 ± 13)	Diabetes (-40%) (183 ± 10)	Diabetes (-30%) (221 ± 6)	Diabetes (-15%) (258 ± 13)
Alkalische Phosphatase	Homogenat	1.59 ± 0.21	1.97 ± 0.21 **	1.75 ± 0.26 <sup>a</sup>	4.18 ± 0.49 **	3.34 ± 0.28 **	2.44 ± 0.27 **
	Bürstensaum	15.6 ± 2.0	18.7 ± 2.2 **	17.9 ± 2.4 <sup>a</sup>	40.1 ± 5.0 **	31.4 ± 1.9 **	22.7 ± 2.9 **
	Anreicherung	9.8 ± 13 (43)	9.5 ± 1.0 (26)	10.2 ± 1.5 (9)	9.6 ± 1.1 (7)	9.4 ± 0.8 (10)	9.3 ± 1.0 (10)
Neutrale $\alpha$ -Glucosidase	Homogenat	0.098 ± 0.012	0.082 ± 0.007 **	0.109 ± 0.007	0.027 ± 0.003 **	0.035 ± 0.002 **	0.055 ± 0.006 **
	Bürstensaum	1.25 ± 0.14	1.01 ± 0.18 **	1.38 ± 0.18	0.33 ± 0.03 **	0.45 ± 0.07 **	0.69 ± 0.12 **
	Anreicherung	12.8 ± 1.4 (43)	12.3 ± 1.1 (26)	12.6 ± 0.8 (9)	12.4 ± 1.5 (7)	12.7 ± 0.7 (10)	12.5 ± 1.2 (10)
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Homogenat	0.162 ± 0.090	0.170 ± 0.149	0.140 ± 0.088	0.145 ± 0.043	0.143 ± 0.046	0.144 ± 0.081
	Bürstensaum	0.118 ± 0.034	0.129 ± 0.081	0.141 ± 0.038	0.136 ± 0.056	0.140 ± 0.039	0.122 ± 0.047
	Anreicherung	0.73 ± 0.40 (21)	0.76 ± 0.66 (18)	1.01 ± 0.62 (9)	0.94 ± 0.28 (4)	0.98 ± 0.31 (7)	0.85 ± 0.47 (4)

Tab. 1

## 3.2. Alkalische Phosphatase

### 3.2.1. Kinetik der alkalischen Phosphatase

Die substratabhängigen spezifischen Aktivitäten der alkalischen Phosphatase in renalen kortikalen Bürstensaummembranfraktionen wurden grafisch dargestellt für 4-Tage-Kontrollratten (Abb. 1), 4-Tage-diabetische Ratten (Abb. 2), 28-Tage-Kontrollratten (Abb. 3) und 28-Tage-diabetische Ratten (Abb. 4 A und B). Die Abbildungen 1-3 zeigen jeweils für ein Einzelexperiment und für die insgesamt durchgeführten Experimente die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung. In die Abbildung 4 wurde zusätzlich ein weiterer Einzelversuch aufgenommen. Die Einzelversuche zeigten in ihrer Kurvenanpassung jeweils eine wesentlich geringere Irrtumswahrscheinlichkeit ( $1 - r^2$ ) als die gemeinsame Auswertung aller Versuche (siehe  $r^2$  -Werte in den Abbildungen). Hierzu trug generell die Fehlerbreite der Proteinbestimmung bei, die in die Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten eingeht. Dies führte dazu, daß die Variationsbreite der Einzelversuche bezüglich der errechneten kinetischen Konstanten für  $V_{\max}$  höher war als für  $K_m$  (Tabelle 2). Für die 4-Wochen-diabetischen Tiere trat ein zusätzliches Problem auf. Wegen der geringen Anzahl der Ratten konnten die Tiere nicht entsprechend des Gewichtsverlustes in Untergruppen aufgeteilt werden. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase unter der Bedingung der Substratsättigung mit zunehmendem Gewichtsverlust zunehmend ansteigt (Blank et al. 1985). Um die Bedeutung des Gewichtsverlustes der Tiere für die substratabhängigen spezifischen Aktivitäten der alkalischen Phosphatase zu dokumentieren, wurden in die Abbildung 4 zwei Einzelversuche aufgenommen. Die Abbildung 4A zeigt den Versuch mit dem höchsten  $V_{\max}$ -Wert der alkalischen Phosphatase (etwa 40% Gewichtsverlust) und den Versuch mit dem niedrigsten  $V_{\max}$ -Wert (etwa 15% Gewichtsverlust). Die Abbildung 4B zeigt die insgesamt durchgeführten Experimente. Die hier getätigten Aussagen über die alkalische Phosphatase haben auch für die Markerenzyme neutrale

$\alpha$ -Glucosidase und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase Gültigkeit. Die kinetischen Daten sind in Tabelle 2 enthalten.

### 3.2.2. Abbildungen alkalische Phosphatase

#### Abbildung 1

##### **Substratabhängige spezifische Aktivitäten der alkalischen Phosphatase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 4-Tage-Kontrollratten.**

Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für ein Einzelexperiment und, im Einsatz, für die insgesamt durchgeführten Experimente ( $n = 7$ ). Eingezeichnet ist die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich. Der Vorhersagebereich gibt an, in welchem Intervall eine neue Beobachtung mit 95% Wahrscheinlichkeit zu erwarten ist.

## Alkaline Phosphatase: 4d Control

 $r^2=0.9996$  DF Adj  $r^2=0.9991$  FitStdErr=1.117e-07 Fstat=6814

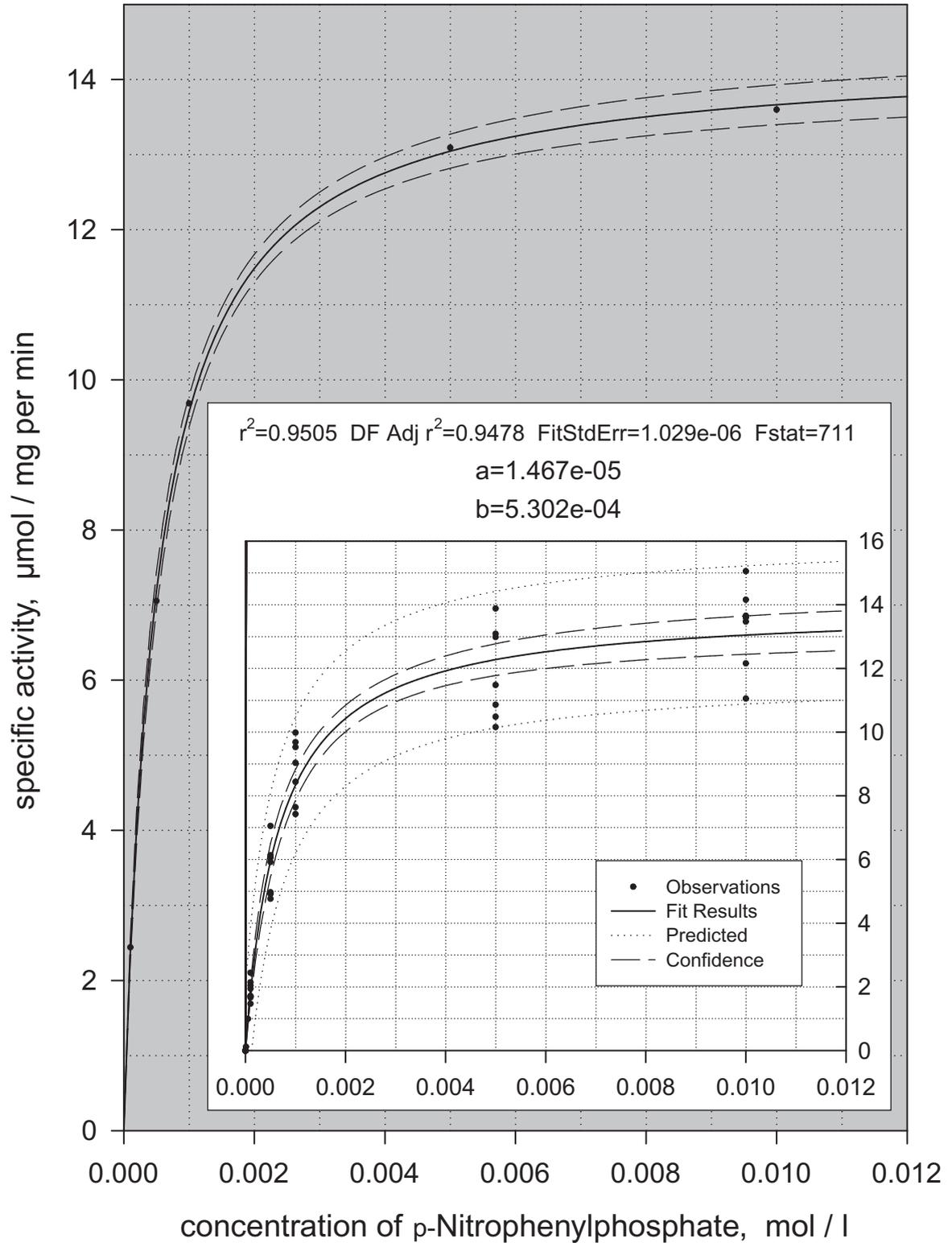
 $a=1.434e-05$ 
 $b=4.982e-04$ 


Abb. 1

**Abbildung 2****Substratabhängige spezifische Aktivitäten der alkalischen Phosphatase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 4-Tage-diabetischen Ratten.**

Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für ein Einzelexperiment und, im Einsatz, für die insgesamt durchgeführten Experimente ( $n = 16$ ). Eingezeichnet ist die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich.

## Alkaline Phosphatase: 4d Diabetes

 $r^2=0.9989$  DF Adj  $r^2=0.9978$  FitStdErr=2.396e-07 Fstat=2667

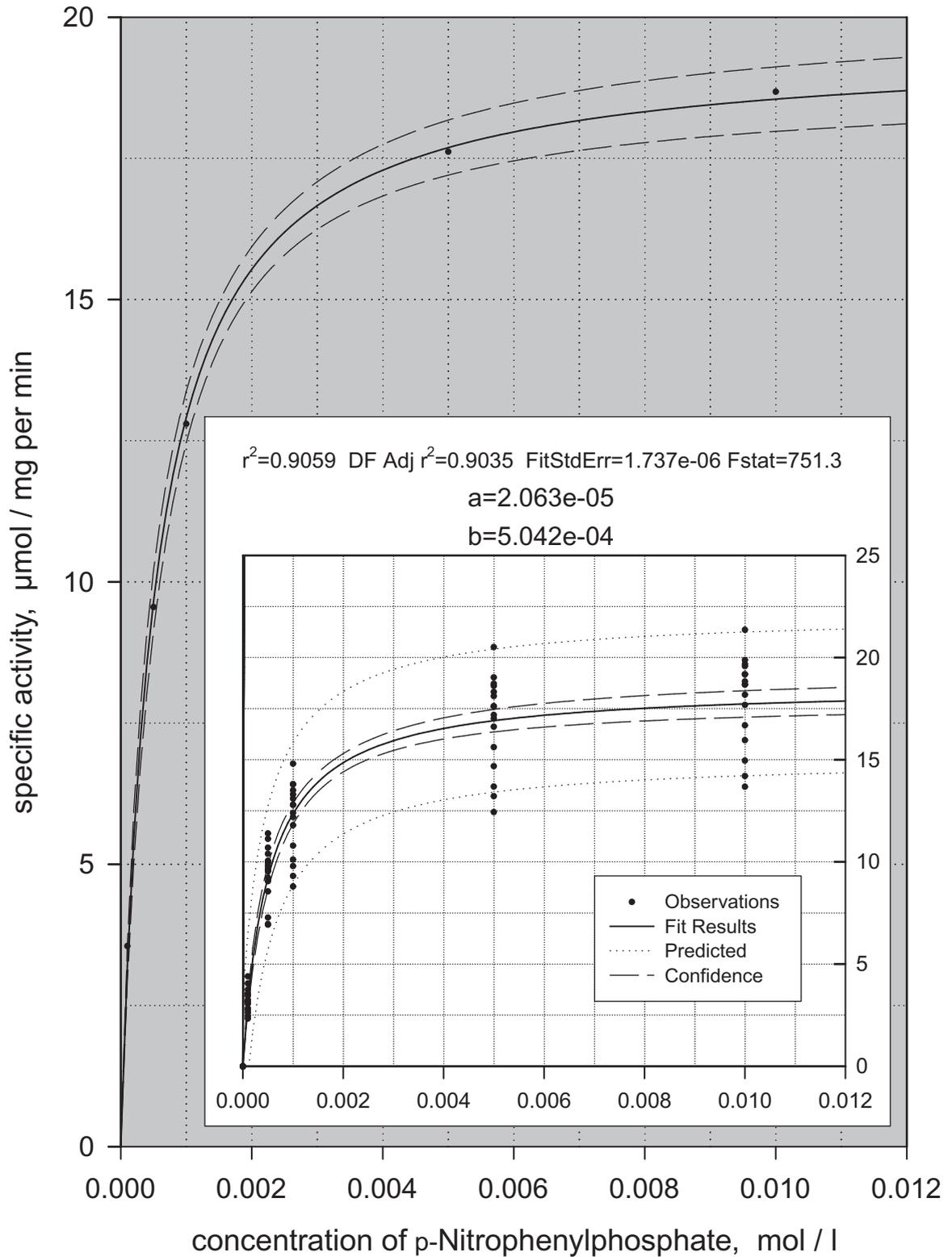
 $a=1.949e-05$ 
 $b=5.098e-04$ 


Abb. 2

**Abbildung 3**

**Substratabhängige spezifische Aktivitäten der alkalischen Phosphatase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 28-Tage-Kontrollratten.**

Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für ein Einzelexperiment und, im Einsatz, für die insgesamt durchgeführten Experimente ( $n = 5$ ). Eingezeichnet ist die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich.

### Alkaline Phosphatase: 4w Control

$r^2=0.9962$  DF Adj  $r^2=0.9925$  FitStdErr= $4.359e-07$  Fstat=794.9

$a=1.839e-05$

$b=5.221e-04$

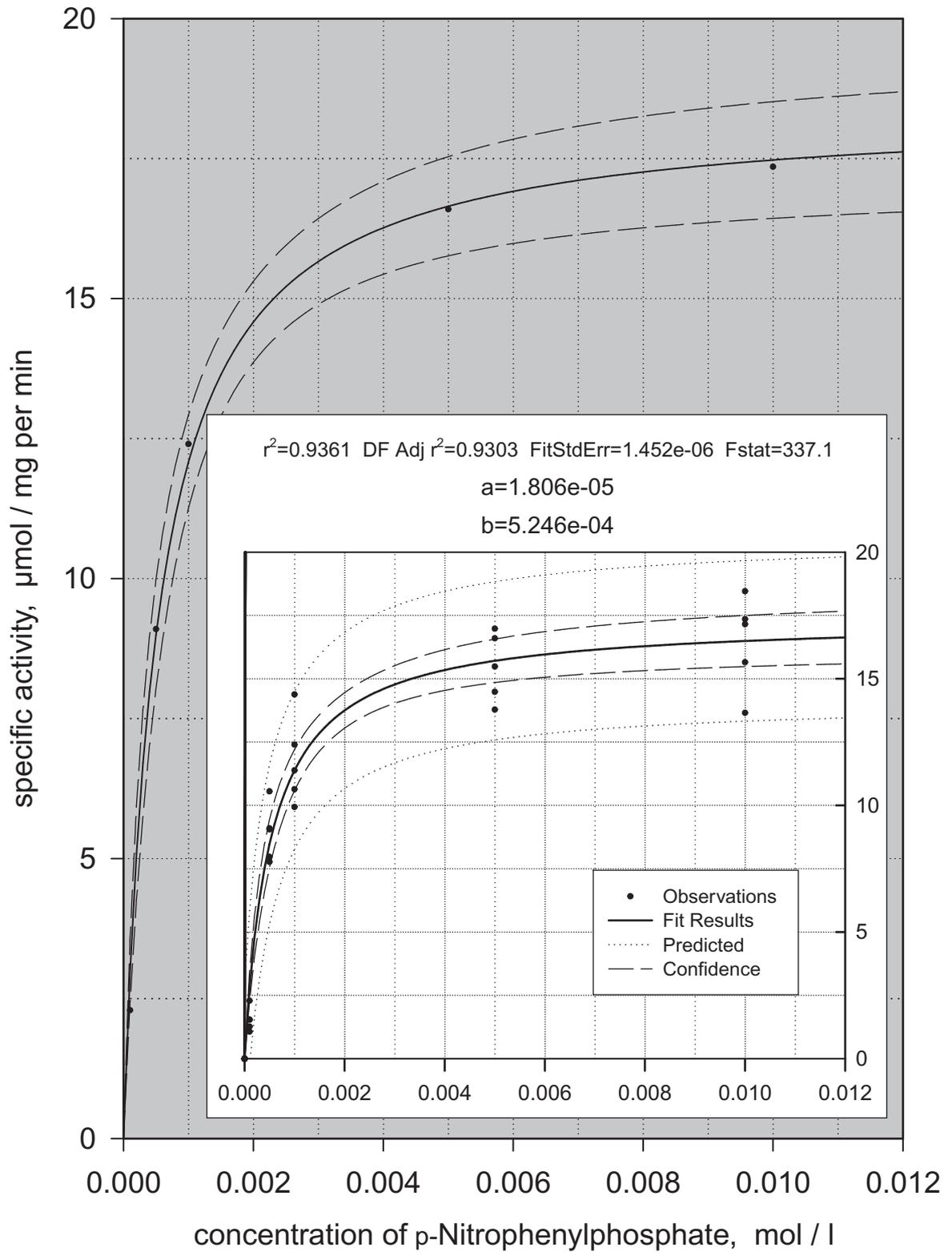


Abb. 3

**Abbildung 4A und 4B****Substratabhängige spezifische Aktivitäten der alkalischen Phosphatase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 28-Tage-diabetischen Ratten.**

Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für zwei Einzelexperimente in Abb. 4A und, in Abb. 4B, für die insgesamt durchgeführten Experimente ( $n = 21$ ). Eingezeichnet ist jeweils die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich.

## Alkaline Phosphatase: 4w Diabetes

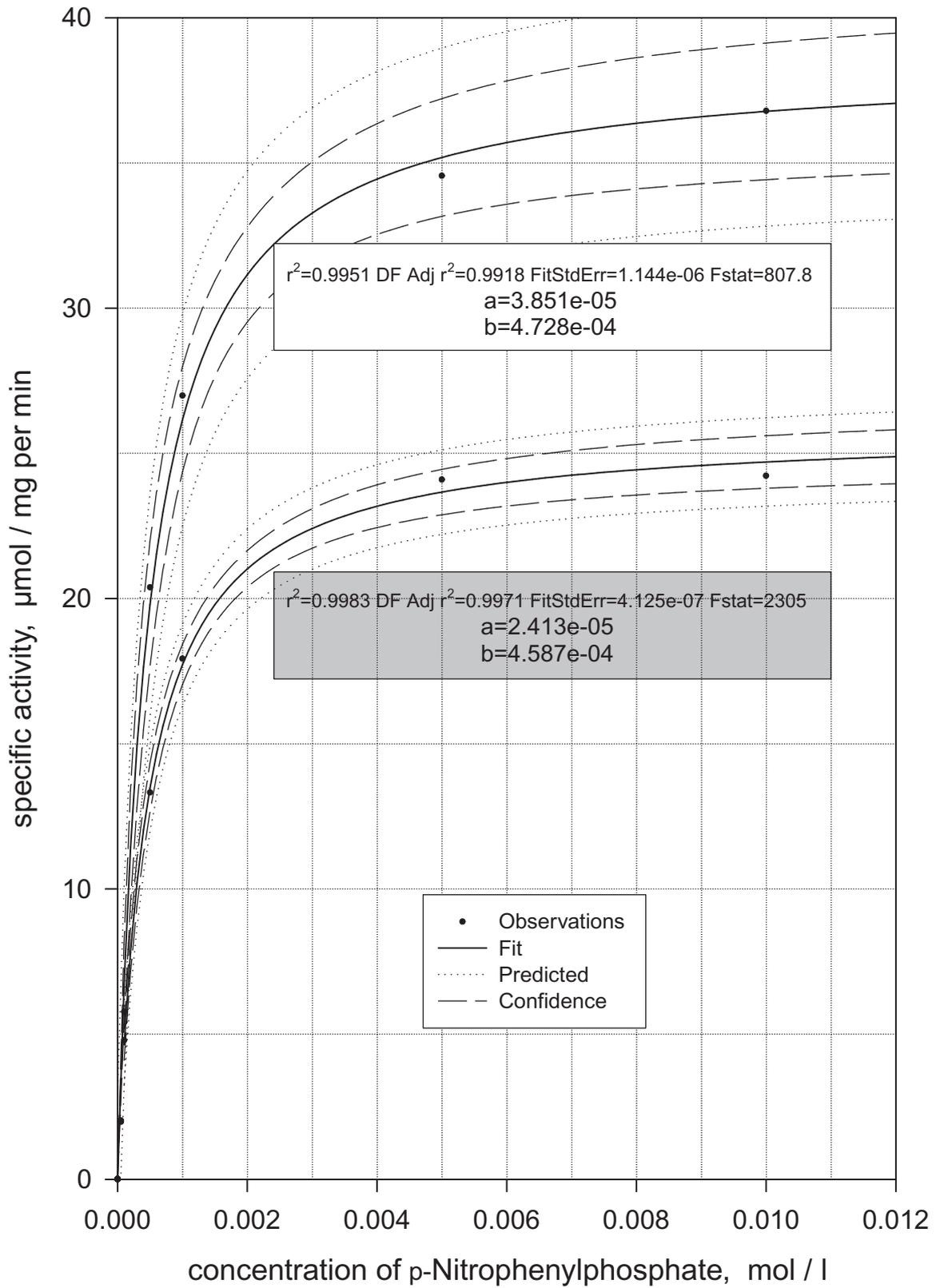


Abb. 4A

## Alkaline Phosphatase: 4w Diabetes

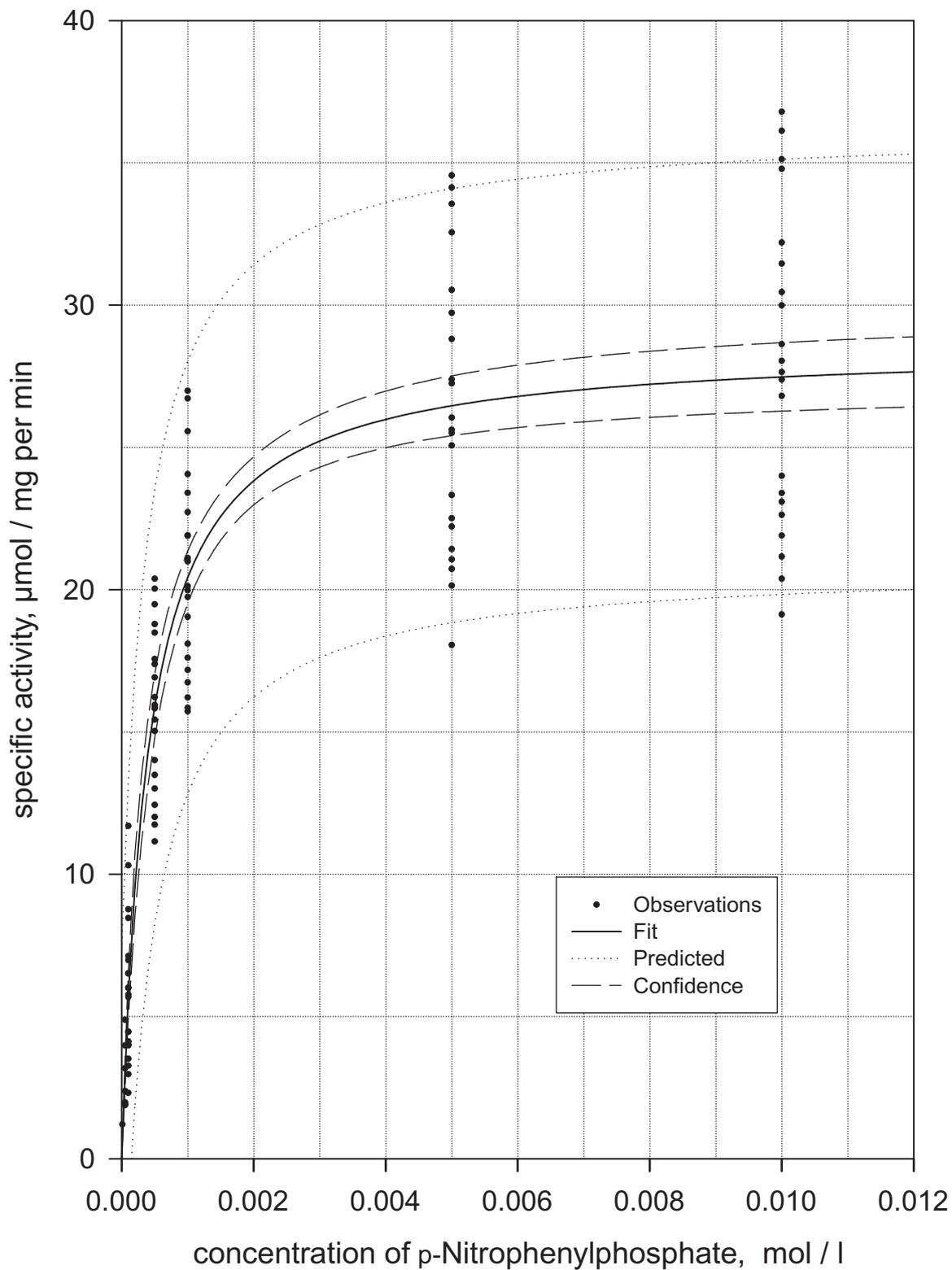
 $r^2=0.8420$  DF Adj  $r^2=0.8392$  FitStdErr=3.811e-06 Fstat=591.7 $a=2.857e-05$  $b=4.488e-04$ 

Abb. 4B

### 3.3. Neutrale $\alpha$ -Glucosidase

#### 3.3.1. Kinetik der neutralen $\alpha$ -Glucosidase

Die substratabhängigen spezifischen Aktivitäten der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase in renalen kortikalen Bürstensaummembranfraktionen wurden grafisch dargestellt für 4-Tage-Kontrollratten (Abb. 5), 4-Tage-diabetische Ratten (Abb. 6), 28-Tage-Kontrollratten (Abb. 7) und 28-Tage-diabetische Ratten (Abb. 8). Die Abbildungen 5-8 zeigen jeweils für ein Einzelexperiment und für die insgesamt durchgeführten Experimente die errechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung. Auffallend ist, daß bei den 4-Tage-diabetischen Ratten (Abb. 6) in zwei von fünfzehn Versuchen die spezifischen Aktivitäten etwas höher lagen. Interessanterweise war die Glucosetransportkapazität bei 2-Tage-diabetischen Ratten stärker angestiegen als bei 4-Tage-diabetischen Ratten relativ zu korrespondierenden Kontrollratten (Blank et al. 1989), während die Veränderung der spezifischen Aktivität der Leitenzyme vom zweiten zum vierten Tag nach Streptozotocininjektion zunahm. Anscheinend ändert sich die D-Glucosetransportkinetik, zeitlich gesehen, schneller als die Kinetik der Leitenzyme. Die erwähnten höheren spezifischen Aktivitäten in zwei von fünfzehn Experimenten (Abb. 6) könnten eine verzögert einsetzende Veränderung der Leitenzymkinetik repräsentieren.

### 3.3.2. Abbildungen neutrale $\alpha$ -Glucosidase

#### **Abbildung 5**

#### **Substratabhängige spezifische Aktivitäten der neutralen $\alpha$ -Glucosidase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 4-Tage-Kontrollratten.**

Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für ein Einzelexperiment und, im Einsatz, für die insgesamt durchgeführten Experimente ( $n = 7$ ). Eingezeichnet ist die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich.

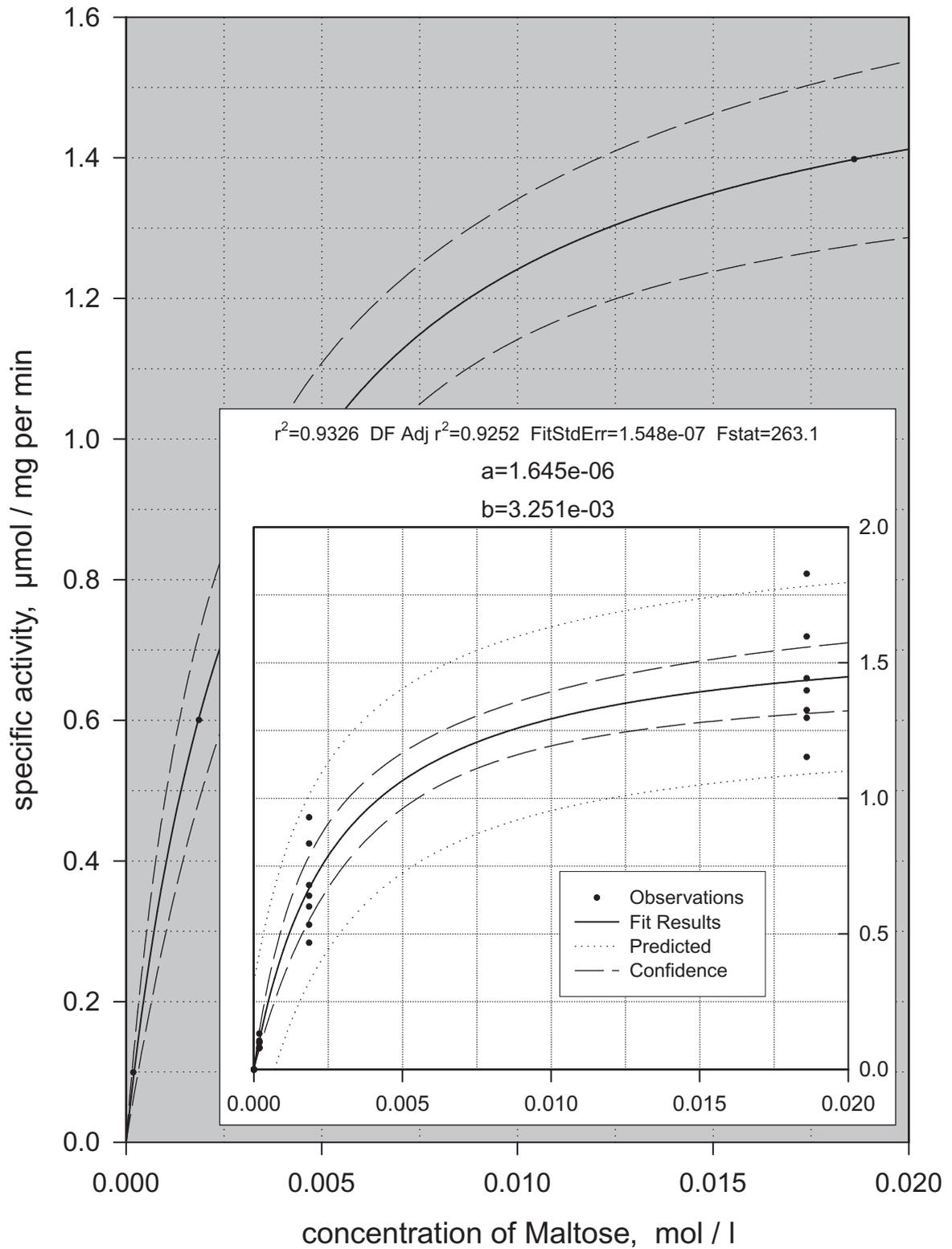
$\alpha$ -Glucosidase: 4d Control $r^2=0.9999$  DF Adj  $r^2=0.9998$  FitStdErr=9.619e-09 Fstat=9279 $a=1.638e-06$  $b=3.191e-03$ 

Abb. 5

**Abbildung 6**

**Substratabhängige spezifische Aktivitäten der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 4-Tage-diabetischen Ratten.**

Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für ein Einzelexperiment und, im Einsatz, für die insgesamt durchgeführten Experimente ( $n = 15$ ). Eingezeichnet ist die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich.

$\alpha$ -Glucosidase, 4d Diabetes
 $r^2=0.9999$  DF Adj  $r^2=0.9998$  FitStdErr=1.863e-09 Fstat=1.177e+04

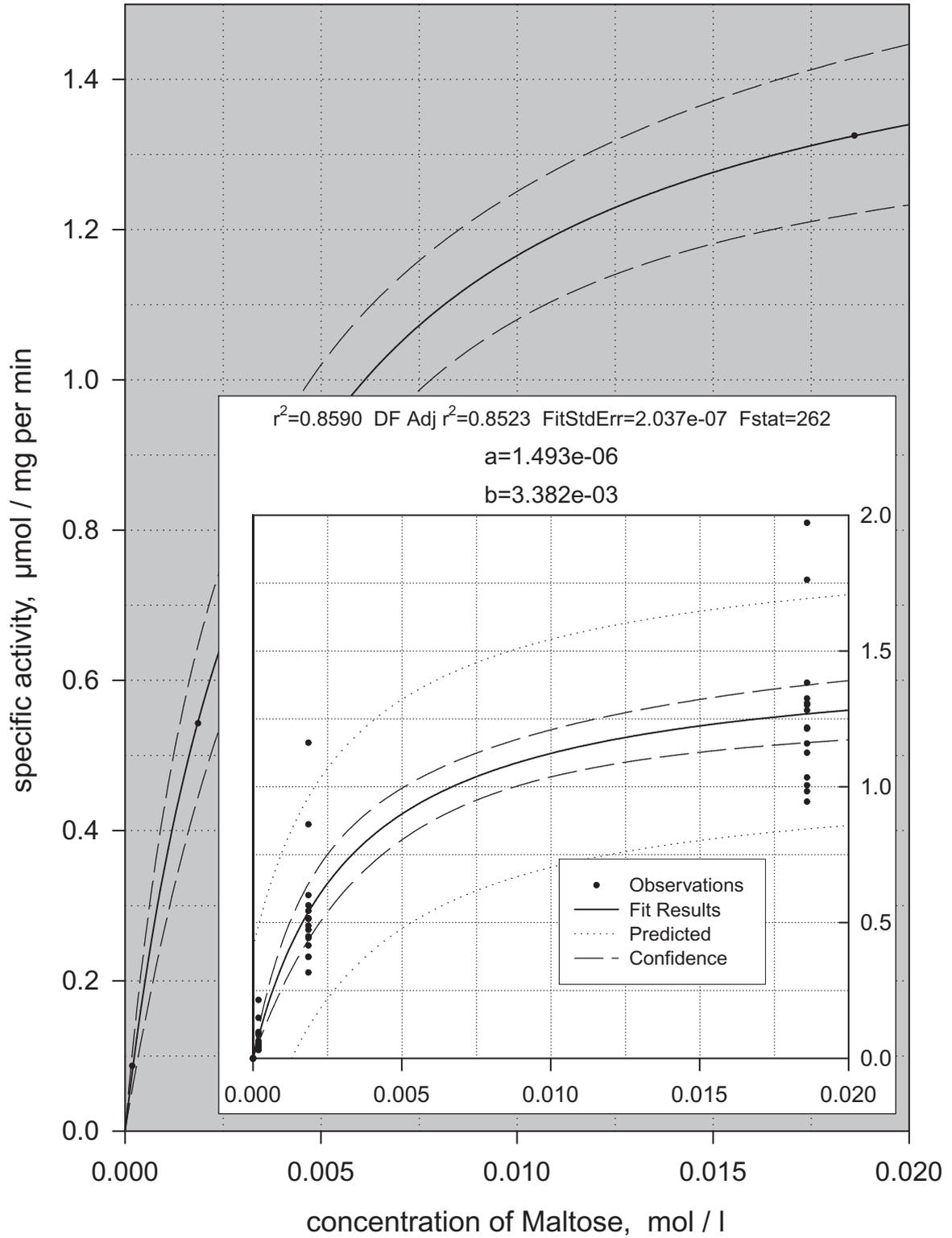
 $a=1.576e-06$ 
 $b=3.520e-03$ 


Abb. 6

**Abbildung 7**

**Substratabhängige spezifische Aktivitäten der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 28-Tage-Kontrollratten.**

Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für ein Einzelexperiment und, im Einsatz, für die insgesamt durchgeführten Experimente ( $n = 5$ ). Eingezeichnet ist die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich.

$\alpha$ -Glucosidase: 4w Control
 $r^2=0.9999$  DF Adj  $r^2=0.9998$  FitStdErr=9.83e-09 Fstat=8211

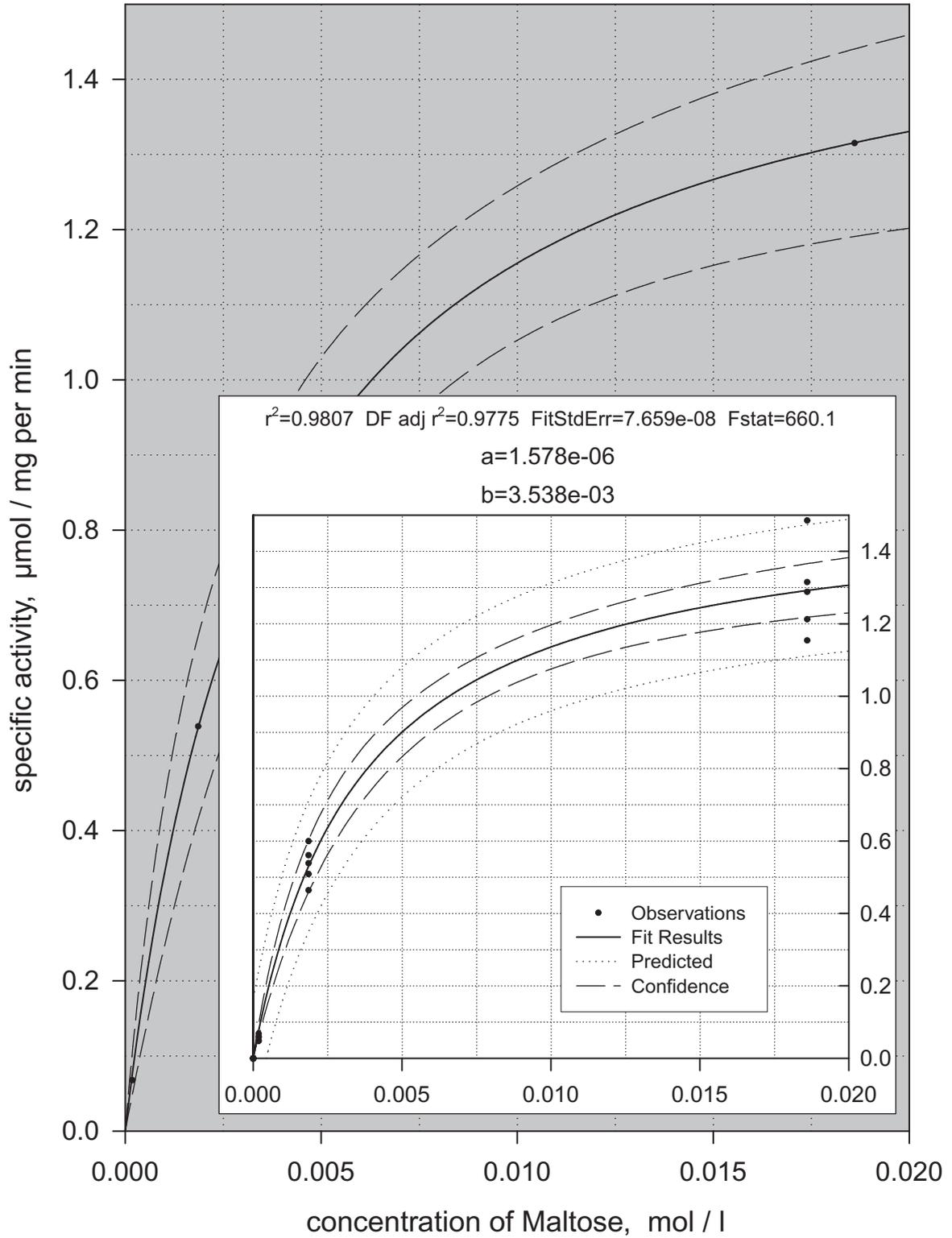
 $a=1.569e-06$ 
 $b=3.578e-03$ 


Abb. 7

**Abbildung 8**

**Substratabhängige spezifische Aktivitäten der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 28-Tage-diabetischen Ratten.**

Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für ein Einzelexperiment und, im Einsatz, für die insgesamt durchgeführten Experimente (n = 19). Eingezeichnet ist die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich.

$\alpha$ -Glucosidase: 4w Diabetes
 $r^2=0.9999$  DF Adj  $r^2=0.9997$  FitStdErr=6.729e-09 Fstat=7868

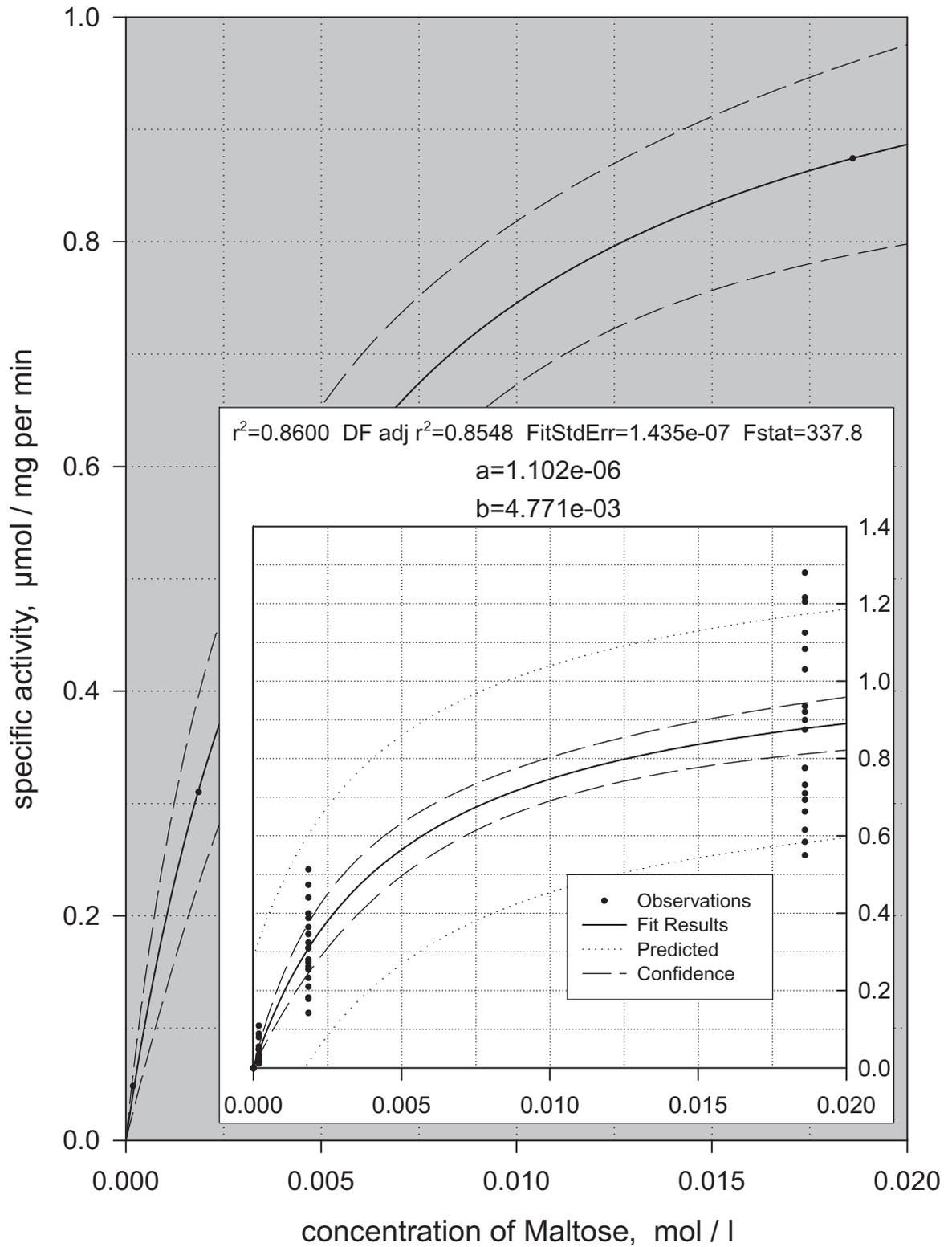
 $a=1.094e-06$ 
 $b=4.673e-03$ 


Abb. 8

### **3.4. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase**

#### **3.4.1. Kinetik der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase**

Die substratabhängigen spezifischen Aktivitäten der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in renalen kortikalen Bürstensaummembranfraktionen wurden grafisch dargestellt für 4-Tage-Kontrollratten (Abb. 9), 4-Tage-diabetische Ratten (Abb. 10), 28-Tage-Kontrollratten (Abb. 11) und 28-Tage-diabetische Ratten (Abb. 12). Die Abbildungen 9-12 zeigen jeweils für ein Einzelexperiment und für die insgesamt durchgeführten Experimente die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung.

### 3.4.2. Abbildungen der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

#### Abbildung 9

#### **Substratabhängige spezifische Aktivitäten der $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 4-Tage-Kontrollratten.**

Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für ein Einzelexperiment und, im Einsatz, für die insgesamt durchgeführten Experimente ( $n = 8$ ). Eingezeichnet ist die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich.

### Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: 4d Control

$r^2=0.9944$  DF Adj  $r^2=0.9833$  FitStdErr=2.345e-09 Fstat=356.9

$a=-1.233e-07$

$b=3.0863e-04$

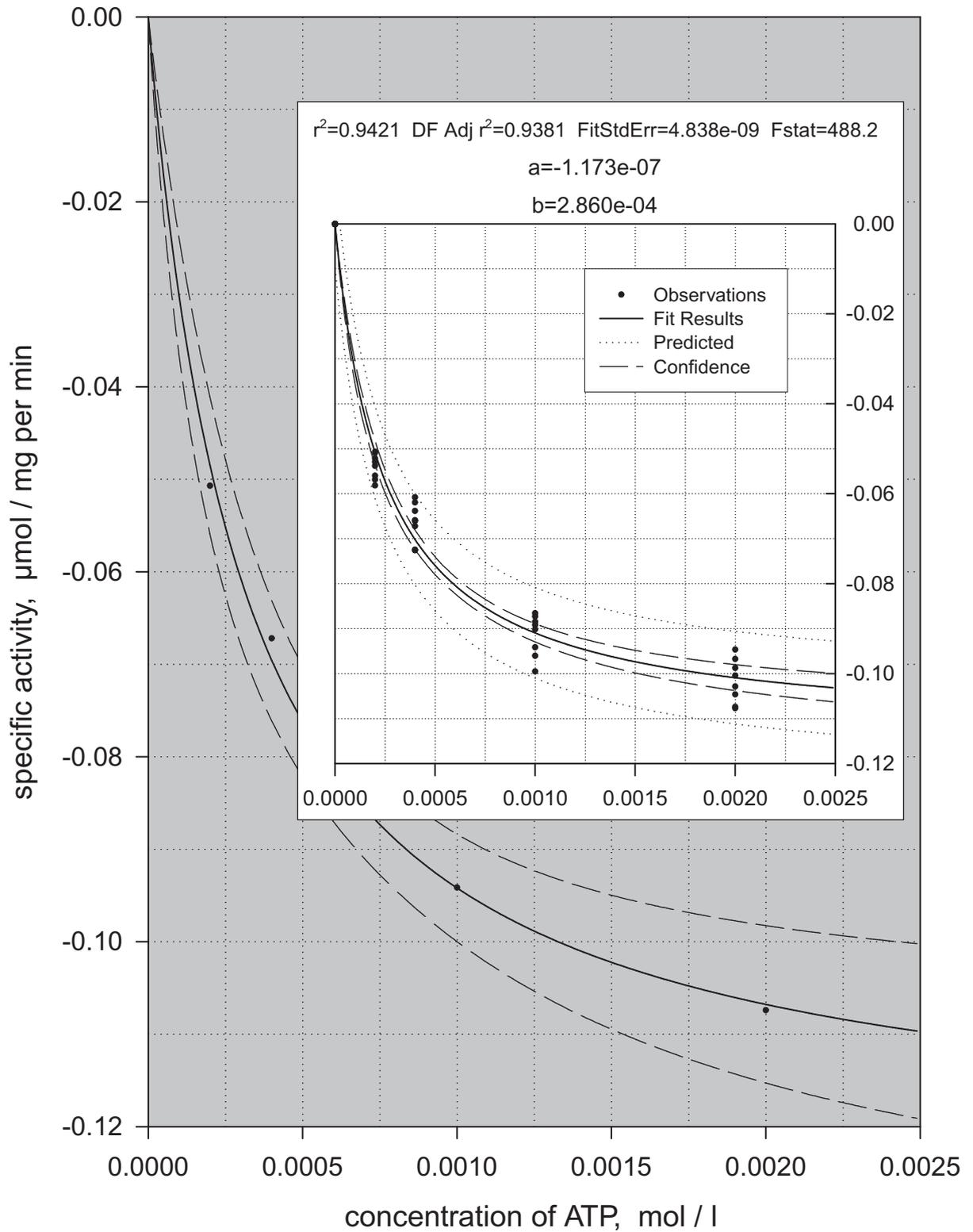


Abb. 9

**Abbildung 10****Substratabhängige spezifische Aktivitäten der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 4-Tage-diabetischen Ratten.**

Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für ein Einzelexperiment und, im Einsatz, für die insgesamt durchgeführten Experimente ( $n = 14$ ). Eingezeichnet ist die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich.

### Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: 4d Diabetes

$r^2=0.9925$  DF Adj  $r^2=0.9776$  FitStdErr=2.701e-09 Fstat=266.2

$a=-1.240e-07$

$b=2.989e-04$

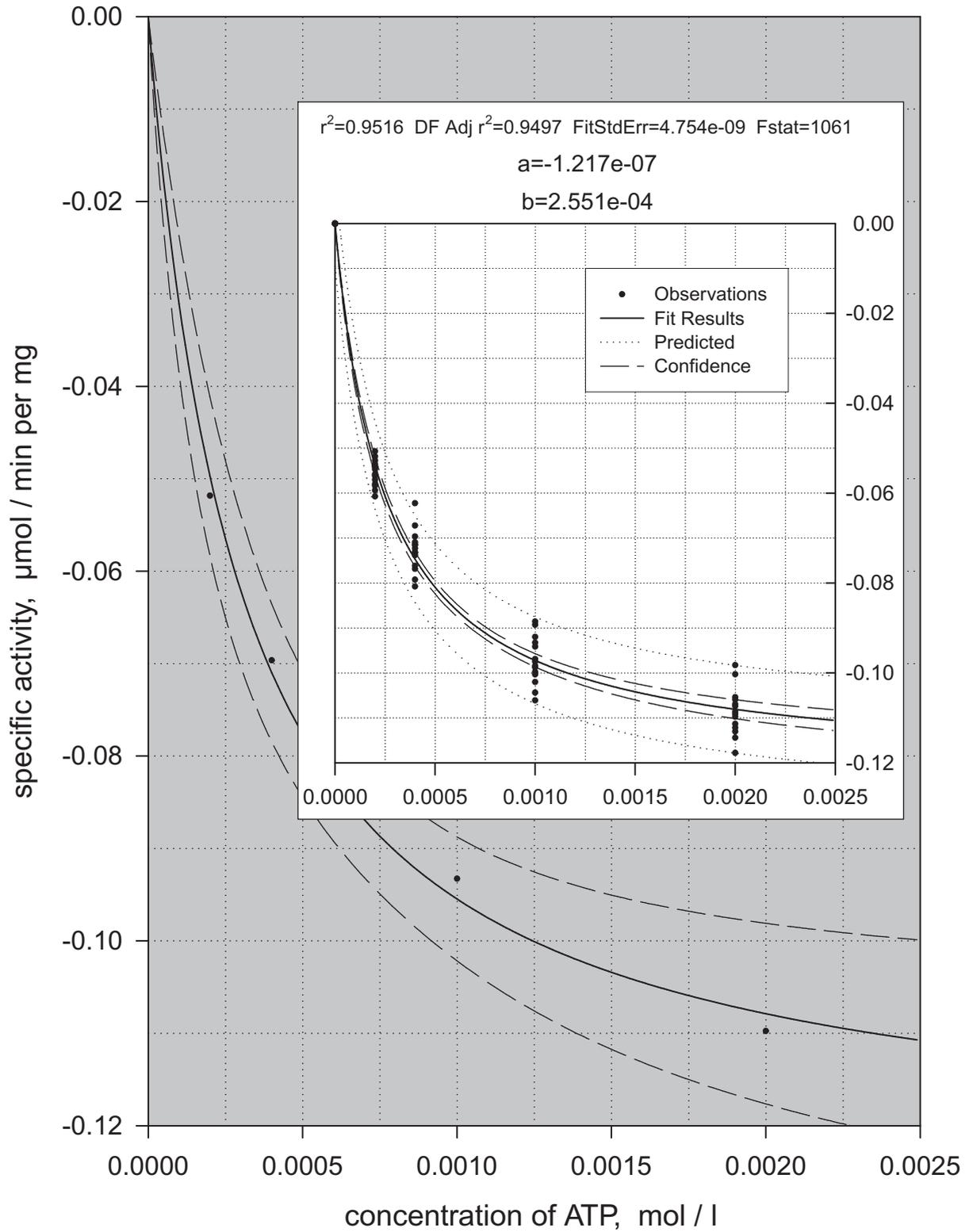


Abb. 10

**Abbildung 11****Substratabhängige spezifische Aktivitäten der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 28-Tage-Kontrollratten.**

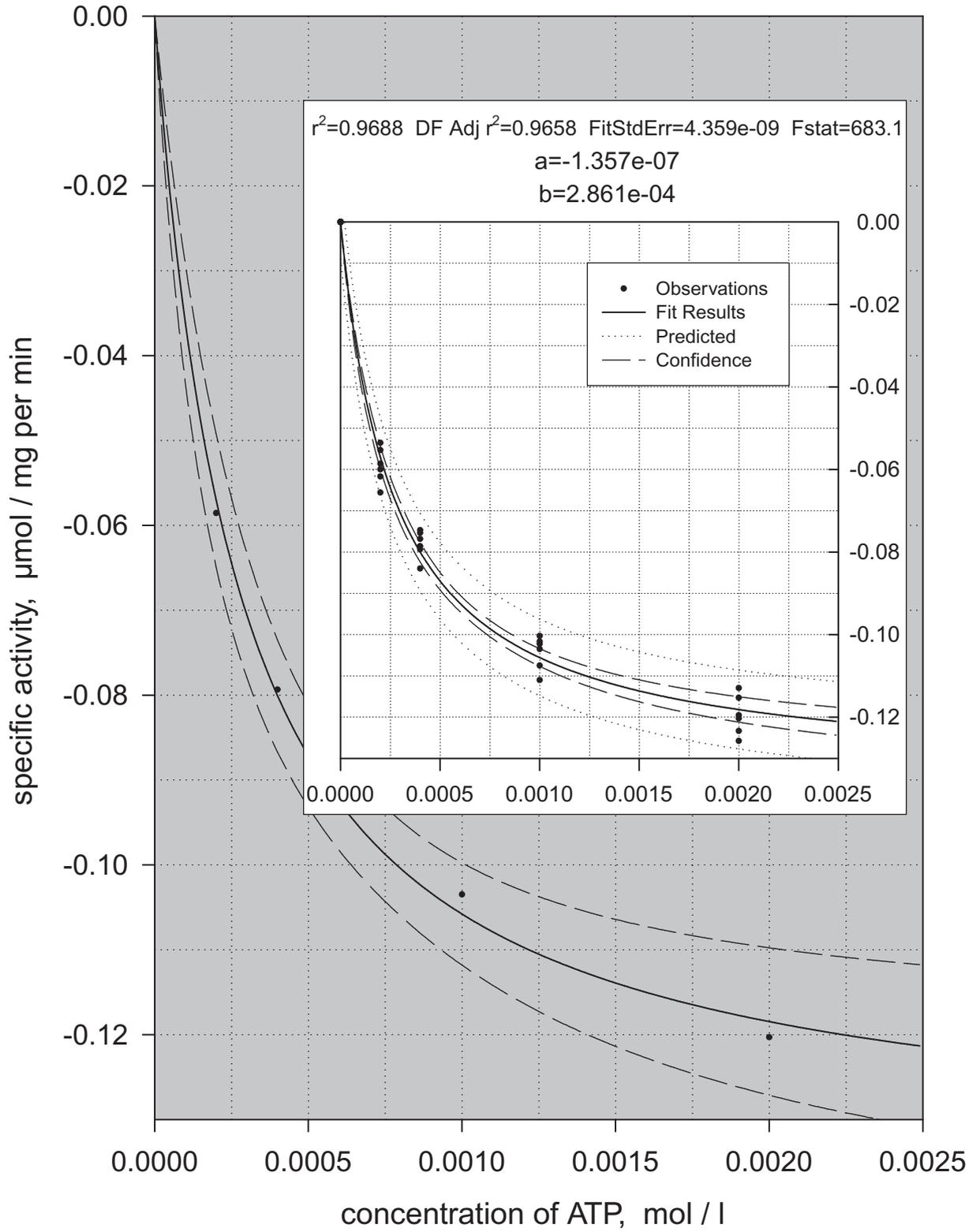
Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für ein Einzelexperiment und, im Einsatz, für die insgesamt durchgeführten Experimente (n = 6). Eingezeichnet ist die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich.

### Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: 4w Control

$r^2=0.9947$  DF Adj  $r^2=0.9840$  FitStdErr=2.42e-09 Fstat=373.9

$a=-1.346e-07$

$b=2.723e-04$



**Abbildung 12****Substratabhängige spezifische Aktivitäten der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 28-Tage-diabetischen Ratten.**

Die computererrechnete Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten Gleichung wurde dargestellt für ein Einzelexperiment und, im Einsatz, für die insgesamt durchgeführten Experimente ( $n = 18$ ). Eingezeichnet ist die Mittelwertskurve mit dem 95% Vertrauensbereich und dem 95% Vorhersagebereich.

### Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: 4w Diabetes

$r^2=0.9883$  DF Adj  $r^2=0.9650$  FitStdErr=2.456e-09 Fstat=169.5

$a=-9.703e-08$

$b=2.201e-04$

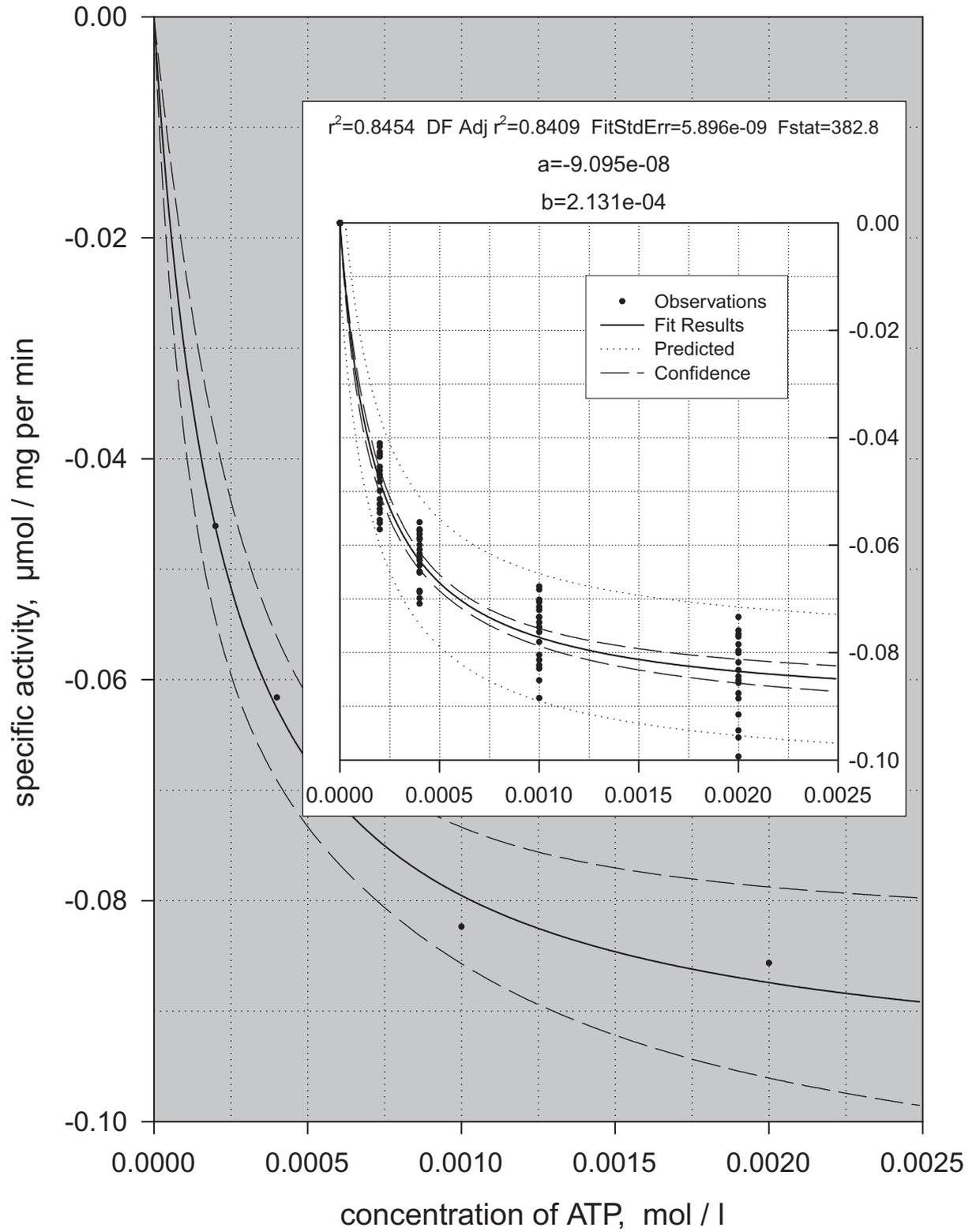


Abb. 12

### **3.5. Zusammenstellung der enzymkinetischen Daten von Bürstensaummembranfraktionen akut und chronisch diabetischer Ratten**

#### **3.5.1. Kinetik der Enzyme alkalische Phosphatase, neutrale $\alpha$ -Glucosidase und $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase**

Die Kinetik der Leitenzyme in renalen kortikalen Bürstensaummembranvesikeln von 4- und 28-Tage-diabetischen Ratten und entsprechenden Kontrollratten wurde in Tabelle 2 zusammengestellt. Bei der alkalischen Phosphatase nahm  $V_{\max}$  in 4- bzw. 28-Tage-diabetischen Ratten, relativ zur Kontrolle, um 40.1% bzw. zwischen 33.1% und 112.7% zu, während  $K_m$  numerisch etwas abnahm.

Bei der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase nahm  $V_{\max}$  in 4- bzw. 28-Tage-diabetischen Ratten, relativ zur Kontrolle, um 9.7% bzw. zwischen 55.7% und 11.4% ab, während  $K_m$  numerisch etwas zunahm.

Bei der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zeigten sich keine signifikanten Änderungen der Werte von  $V_{\max}$  und  $K_m$  bei 4-Tage-diabetischen Ratten gegenüber den entsprechenden Kontrollratten. Bei den 28-Tage-diabetischen Ratten wurde eine Abnahme von  $K_m$  zwischen 27.6% und 20.7% und eine Abnahme von  $V_{\max}$  zwischen 37.5% und 18.4% für die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase relativ zu den Kontrollratten gefunden.

### 3.5.2. Tabelle enzymkinetische Daten

#### Tabelle 2

#### **Kinetik der Markerenzyme in renalen kortikalen Bürstensaummembranfraktionen von Kontroll- und diabetischen Ratten, 4 und 28 Tage nach Injektion von Streptozotocin.**

Anscheinende  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte ( $x \pm SD$ ) der Markerenzyme alkalische Phosphatase, neutrale  $\alpha$ -Glucosidase und  $Na^+/K^+$ -ATPase wurden erhalten durch Kurvenanpassung der Meßwerte an die Michaelis-Menten-Gleichung. Die einzelnen Enzymmeßwerte und die Kurvenanpassungen für die 4-Tage-Kontrollratten, 4-Tage-diabetische Ratten, 28-Tage-Kontrollratten und 28-Tage-diabetische Ratten sind in den Abbildungen 1-12 enthalten.  $K_m$  wurde in mol/l und  $V_{max}$  in mol/mg Protein pro min angegeben. n = Anzahl der Vesikelpräparationen. Die 28-Tage-diabetischen Ratten verloren zwischen 15 und 40% an Gewicht. Für diese Versuche wurden die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte als Schwankungsbereich mit dem jeweils höchsten SD-Wert (in Klammern) angegeben. \*\*\* ( $p < 0.001$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) und \* ( $p < 0.05$ ) verglichen mit Werten der korrespondierenden Kontrollratten.

**Alkalische Phosphatase**

	<b>n</b>	<b>K<sub>m</sub> [*10<sup>4</sup>]</b>	<b>V<sub>max</sub> [*10<sup>6</sup>]</b>	<b>rel. Änderung (V<sub>max</sub>)</b>
4d Kontrolle	7	5.3 ± 1.2	14.7 ± 0.8	
4d DM	16	5.0 ± 1.5	***20.6 ± 1.2	40.1%
4w Kontrolle	5	5.2 ± 1.7	18.1 ± 1.5	
4w DM (-15 bis -40%)	21	4.5-4.9 [2.8]	***24.1-38.5 [5.8]	33.1% to 112.7%

**Neutrale α-Glucosidase**

	<b>n</b>	<b>K<sub>m</sub> [*10<sup>3</sup>]</b>	<b>V<sub>max</sub> [*10<sup>6</sup>]</b>	<b>rel. Änderung (V<sub>max</sub>)</b>
4d Kontrolle	7	3.3 ± 0.9	1.65 ± 0.09	
4d DM	15	3.4 ± 1.1	**1.49 ± 0.13	-9.7%
4w Kontrolle	5	3.5 ± 1.1	1.58 ± 0.19	
4w DM (-15 bis -40%)	19	4.4-4.9 [1.7]	*0.7-1.4 [0.45]	-55.7% to -11.4%

**Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase**

	<b>n</b>	<b>K<sub>m</sub> [*10<sup>4</sup>]</b>	<b>V<sub>max</sub> [*10<sup>6</sup>]</b>	<b>rel. Änderung (V<sub>max</sub>)</b>
4d Kontrolle	8	2.9 ± 0.4	0.117 ± 0.019	
4d DM	14	2.6 ± 0.6	0.122 ± 0.009	4.3%
4w Kontrolle	6	2.9 ± 0.5	0.136 ± 0.018	
4w DM (-15 bis -40%)	18	*2.3-2.1 [0.7]	*0.085-0.111 [0.044]	-37.5% to -18.4%

Tab. 2

#### 4. DISKUSSION

Der Beginn des Diabetes beim Menschen (Ditzel u. Junker 1972, Mogensen et al. 1981) und Versuchstier (Wald u. Popovtzer 1984, Wald et al. 1986, Ku et al. 1986, Khadouri et al. 1987) ist charakterisiert durch Anstieg der Glucosekonzentration im Plasma, Abnahme des Körpergewichts, Vergrößerung der Niere, des renalen Plasmaflusses, der GFR und damit der filtrierte Menge an Glucose und Natrium, sowie der resorbierten und ausgeschiedenen Mengen an Glucose und Natrium. Durch das Auftreten der osmotischen Diurese steigt das Harnzeitvolumen. Strukturelle Untersuchungen belegen eine Zunahme der Größe der Glomeruli (Osterby u. Gundersen 1975, Seyer-Hansen 1980) und Länge der proximalen und distalen Tubuli (Rasch 1979).

Die renale Glucoseresorption findet im proximalen Tubulus durch zwei hintereinandergeschaltete Zellmembranen statt. Die Bürstensaummembran enthält  $\text{Na}^+$ /Glucose-Symporter, während die basolaterale Zellmembran Glucoseuniporter mit hohem  $K_t$ -Wert enthält. Die treibende Kraft für den luminalen natriumgekoppelten Glucoseeintritt in proximale Tubuluszellen, das elektrochemische Potential, wird von der Funktion der basolateral gelegenen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aufrechterhalten.

Um bei den komplexen renalen Veränderungen im Diabetes definierte Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden für die vorangehenden Glucosetransportstudien und die jetzigen vorliegenden enzymatischen Studien vesikuläre Bürstensaummembranfraktionen isoliert. Verwendet wurden nicht-insulinpflichtige diabetische Ratten, 4 und 28 Tage nach Streptozotocininjektion und entsprechende Kontrollratten.

Vier Tage nach Streptozotocininjektion waren die anscheinenden Transportkonstanten  $K_t$  und  $V_{\max}$  des renalen natriumgekoppelten Glucosetransportes

zweifach höher als normal. Achtundzwanzig Tage nach Streptozotocininjektion waren die Transportkonstanten ebenfalls zweifach höher, sofern die diabetischen Tiere ihr Körpergewicht hielten. Allerdings verloren die schwerkranken, ketoacidotischen Tiere ihre erhöhte Glucosetransportkapazität, während der  $K_t$ -Wert weiter anstieg. Die Erklärung unserer Arbeitsgruppe für die gefundene erhöhte renale Glucosetransportkapazität in dem frühen diabetischen Zustand (Blank et al. 1985, 1989) ist die Präsenz einer größeren Anzahl von Transportstellen in der Bürstensaummembran, jedoch haben sie eine geringere Affinität für Glucose. Membranen der kachectischen, 4-Wochen-diabetischen Ratten verlieren funktionierende Transporter. Die progressiv abnehmende Affinität für Glucose kann Beeinträchtigungen der Bindungsstelle (Glykosilierung) oder des/der Transportproteins(e) reflektieren, möglicherweise in einer veränderten Lipiddomäne, welche ebenfalls die Mobilität beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurden die kinetischen Parameter der Bürstensaumleitenzyme alkalische Phosphatase und neutrale  $\alpha$ -Glucosidase sowie des Leitenzyms der basolateralen Zellmembran, der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, bestimmt. Änderungen der maximalen Umsatzrate ( $V_{\max}$ ) der Leitenzyme zeigen in erster Linie, daß sich die Anzahl der Enzymproteine in der Membran geändert hat, während Änderungen der Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_m$ ) von membranassoziierten Enzymproteinen für Strukturänderungen der Enzyme und/oder der umgebenden Membranbestandteile sprechen. Der  $V_{\max}$ -Wert der alkalischen Phosphatase war im 4-Tage- und 28-Tage-Diabetes erhöht, während der  $V_{\max}$ -Wert der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase erniedrigt war. Die Abweichungen der  $K_m$ -Werte waren für beide Enzyme nicht signifikant.

Die mit der Dauer des Diabetes und der Stärke der Körpergewichtsabnahme zunehmenden Enzymveränderungen relativ zu korrespondierenden Kontrollratten reflektieren aktuelle Beeinträchtigungen im renalen Bürstensaummembranaufbau und

keine Unterschiede in der Reinheit der Membranfraktionen. Für diese Aussage sprechen folgende Befunde:

- 1.) Die spezifischen Aktivitäten der Bürstensaummarkerenzyme alkalische Phosphatase und neutrale  $\alpha$ -Glucosidase ändern sich in entgegengesetzter Richtung.
- 2.) Die Anreicherungsfaktoren in der Vesikelfraktion relativ zum Ausgangshomogenat bleiben konstant bei etwa 9.5 und 12.5 von Kontroll- und diabetischen Ratten.
- 3.) Die anscheinende Kontamination der renalen Bürstensaummembranfraktion mit basolateralen Membranen, bestimmt als die spezifische Aktivität des Markerenzymes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, bleibt niedrig und konstant sowohl in Kontroll- als auch in diabetischen Tieren.
- 4.) Alle Vesikelpräparationen von Kontroll- und diabetischen Tieren zeigten das gleiche intravesikuläre Volumen (Blank et al. 1985).
- 5.) Die Aufnahmerate von L-Glucose in Bürstensaummembranvesikel von Kontroll- und diabetischen Ratten war niedrig und konstant, was gegen eine erhöhte passive Durchlässigkeit der Vesikel diabetischer Tiere spricht (Blank et al. 1985).

Zusätzlich zu den progressiven Änderungen der kinetischen Parameter der Bürstensaumleitenzyme und des natriumgekoppelten Glucosetransportes sprechen auch Änderungen der Aktivierungsenergien, der Ein- und Ausstromkonstanten sowie der membrangebundenen Mengen an Glucose und Phlorizin (Blank et al. 1998, 1999) in diabetischen Ratten für starke Modifikationen im Aufbau der luminalen Zellmembran renaler proximaler Tubuluszellen. Unterstützt wird diese Aussage durch Dünndarmbefunde nach chemisch-induziertem Diabetes. Die erhöhte enterale Glucosetransportrate (Csaky u. Fischer 1981) geht parallel mit starken Veränderungen der Bürstensaummembran in der Protein-Lipidzusammensetzung (Pathak et al. 1981), der Lipidzusammensetzung und Lipidfluidität (Brasitus u. Dudeja 1985) sowie im Glykoproteingehalt (Jacobs 1981).

Die diabetes-induzierte progressive Abnahme des  $V_{\max}$ -Wertes der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase in der Bürstensaummembranfraktion bedeutet aller Wahrscheinlichkeit nach einen zunehmenden Verlust an Enzymproteinen der membrangebundenen neutralen  $\alpha$ -Glucosidase. So konnte gezeigt werden, daß in Ratten mit streptozotocin-induziertem Diabetes die spezifische Aktivität der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase in der Niere abnimmt, während sie im Urin zunimmt (Juretic et al. 1984). Auch die neuere Literatur (Murakami u. Ikeda 1998, Sharma u. Sivakami 1998) belegt eine Abnahme der spezifischen Aktivität der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase in der Niere, während die Aktivität der Disaccharidasen, einschließlich der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase (neutrale Maltase) im Dünndarm, zunimmt. Nach Tsuji et al. (1985) ist jedoch für die intestinale höhere maximale Glucosetransportrate im Diabetes nicht die höhere Glucoseproduktion durch Disaccharidasen entscheidend, sondern die erhöhte Aktivität des Glucosetransportsystems. Die erhöhte Aktivität der enteralen Disaccharidasen scheint typisch für den Diabetes zu sein, da sie unabhängig von der enteralen Nahrungszufuhr ist (Schedl et al. 1983)

Der Anstieg des  $V_{\max}$ -Wertes der alkalischen Phosphatase spricht dafür, daß die im Inneren der Bürstensaummembran gelegenen Enzymproteine der alkalischen Phosphatase relativ zu anderen Membranproteinen durch die Membranveränderungen angereichert werden. Alternativ könnte auch die Anzahl der Enzymproteine zunehmen durch erhöhte Synthese oder durch verringerten Abbau. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist beim experimentellen Diabetes auch im Dünndarm erhöht (Nakabou et al. 1985, Brasitus u. Dudeja 1985).

Zusätzlich zur Kinetik der Leitenzyme der renalen Bürstensaummembran wurde in der Bürstensaummembranfraktion auch die Kinetik der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, als Leitenzym der basolateralen Membran, bestimmt. Die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase repräsentiert die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Pumpe, die im frühen diabetischen Zustand mit erhöhter Glucose- und Natriumresorption die erhöhte Natriumresorption im proximalen Tubulus durch die basolaterale Membran ermöglicht. Im frühen

diabetischen Zustand steigt die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der Niere (Ku u. Meezan 1984, Rasch 1986), allerdings nicht nur im Nierencortex sondern auch im Nierenmark (Wald u. Popovtzer 1984, Ku et al. 1986). Insulin, bzw. das fehlende Insulin im diabetischen Zustand, scheint keinen direkten Effekt auf die Aktivitätskontrolle der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zu haben (Ku et al. 1987).

Streptozotocin wurde von anderen Arbeitsgruppen mit dem Ziel verabreicht, ein Modell für eine hyperfiltrierende Niere zu erhalten. Bereits 24 Stunden nach Streptozotocingabe steigt die Blutzuckerkonzentration, die Glucoseausscheidung (osmotische Diurese), die Natriumausscheidung, die Aldosteronkonzentration im Plasma sowie die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im proximalen Tubulus und Sammelrohr signifikant an (Wald u. Popovtzer 1984, Wald et al. 1986). Trotz einer durch erhöhte Glucosefiltration bedingten erhöhten Glucose- und Natriumresorption im proximalen Tubulus mit Anstieg der Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im proximalen Tubulus, kommt es zu einer erhöhten Natriumausscheidung, die als Folge der osmotischen Diurese durch erhöhte Glucoseausscheidung interpretiert wird (Wald u. Popovtzer 1984, Wald et al. 1986). Die erhöhte Natriumausscheidung bedingt eine erhöhte Aldosteronkonzentration im Plasma, die die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im Sammelrohr stimuliert. Die erhöhte proximale Volumenresorption (Glucose, Natrium und damit Wasser) erhöht den glomerulo-tubulären Druckgradienten, was möglicherweise ursächlich zu einer erhöhten GFR führt (Ditzel u. Junker 1972). Die GFR-Erhöhung erfolgt nach vier, die Gewichtszunahme nach sieben Tagen, so daß der Aktivitätsanstieg der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im proximalen Tubulus und auch im Sammelrohr zeitlich eindeutig vor dem GFR-Anstieg und vor der renalen Hypertrophie liegt. Parallel mit dem GFR-Anstieg steigt die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im dicken Teil der aufsteigenden medullären Henle-Schleife. Khadouri et al. (1987) haben ähnliche Befunde erhoben. Im Dienste der Homöostase des Natriumhaushaltes erfolgt somit nach Streptozotocingabe nur in bestimmten Tubulusabschnitten – zu unterschiedlichen Zeiten und unterschiedlich reguliert – eine Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Beide Arbeitsgruppen (Wald et al. 1986, Khadouri

et al. 1987) stimmen in der Annahme überein, daß die Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im proximalen Tubulus ursächlich durch die erhöhte Glucoseresorption bedingt ist. Auf tubulärer Ebene wurde die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nur in den ersten acht Tagen nach Streptozotocingabe gemessen (Wald et al. 1986, Khadouri et al. 1987). Im proximalen Tubulus als Ort des erhöhten natriumgekoppelten Glucosetransportes erhöht sich die spezifische Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase einen Tag nach Streptozotocingabe. Am zweiten Tag fällt die Aktivität ab, sie bleibt jedoch vom zweiten bis achten Tag auf einem geringeren Niveau erhöht. Die vorliegende Charakterisierung der in der renalen Bürstensaummembranfraktion vorhandenen basolateralen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ist mit den tubulären Befunden gut vereinbar. Zwar sind vier Tage nach Streptozotocingabe die kinetischen Konstanten der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase relativ zur Kontrolle nicht signifikant unterschiedlich, numerisch hat die Affinität und der  $V_{\max}$ -Wert, d.h. die Anzahl der  $\text{Na}^+$ -Pumpstellen, jedoch zugenommen.

Vier Wochen nach Streptozotocingabe ist im Nierencortex die maximale Kapazität der niedrig-affinen Ouabain Bindungsstellen relativ zur Kontrolle unverändert (Ver et al. 1995), während die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase leicht erhöht ist (Ku et al. 1986). Etwa acht Wochen nach Streptozotocingabe wird die spezifische Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase leicht erhöht (Ku et al. 1986, Chen 1992), unverändert (Levy et al. 1986) und erniedrigt (Raccach et al. 1994) gefunden. Diese divergierenden Befunde reflektieren sicherlich den mehr oder weniger stark beeinträchtigten Zustand der Tiere unter den jeweiligen Versuchsbedingungen. In der vorliegenden Arbeit sind die kinetischen Parameter der Enzyme 28 Tage nach Streptozotocingabe um so stärker verändert je höher die Gewichtsabnahme relativ zur Kontrolle ist. Für die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase erhöht sich die Affinität bzw. erniedrigt sich der  $V_{\max}$ -Wert. Offensichtlich nimmt die Anzahl der  $\text{Na}^+$ -Pumpstellen in der basolateralen Membran der proximalen Tubuluszellen bei den schwerkranken diabetischen Ratten leicht ab.

Die vorliegenden kinetischen Parameter der Leitenzyme neutrale  $\alpha$ -Glucosidase, alkalische Phosphatase und  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase sprechen für mit Dauer des Diabetes progressiv zunehmenden Modifikationen im Aufbau nicht nur der luminalen sondern auch der basolateralen Zellmembran proximaler Tubuluszellen. Im 4-Tage-Diabetes ist in der Bürstensaummembran die maximale Glucosetransportrate zweifach erhöht, während die spezifische Aktivität der basolateralen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase numerisch erhöht ist. Mit der Dauer des Diabetes nehmen beide  $V_{\max}$ -Werte ab. Im 28-Tage-Diabetes sind die enzymatischen und Transportänderungen um so ausgeprägter, je stärker die Tiere an Gewicht verlieren. Mit anderen Worten, die Gewichtsabnahme der diabetischen Ratten relativ zu korrespondierenden Kontrollratten gibt Auskunft über das Ausmaß von Veränderungen enzymatischer Umsatzraten bzw. transmembranöser Transportleistungen und reflektiert damit Zellmembranveränderungen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Glucose wird in der Niere von proximalen Tubuluszellen resorbiert, wobei in der luminalen Zellmembran, der sogenannten Bürstensaummembran, das natriumgekoppelte Glucosetransportsystem lokalisiert ist. Bürstensaummembranvesikel von diabetischen Ratten zeigen erhöhte Glucosetransportkapazität und Leitenzymänderungen relativ zu Kontrollratten. In der vorliegenden Arbeit sollten die Änderungen der alkalischen Phosphatase und der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase, als Leitenzyme der Bürstensaummembran und die der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, als Leitenzym der basolateralen Zellmembran, näher charakterisiert werden. Der nicht-insulinpflichtige Diabetes wurde durch einmalige Injektion von Streptozotocin erzeugt. Bei der alkalischen Phosphatase nahm  $V_{\max}$  in 4- bzw. 28-Tage-diabetischen Ratten, relativ zur Kontrolle, um 40.1% bzw. zwischen 33.1% und 112.7% zu, während  $K_m$  numerisch etwas abnahm. Bei der neutralen  $\alpha$ -Glucosidase nahm  $V_{\max}$  in 4- bzw. 28-Tage-diabetischen Ratten, relativ zur Kontrolle, um 9.7% bzw. zwischen 55.7% und 11.4% ab, während  $K_m$  numerisch etwas zunahm. Bei der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase zeigten sich keine signifikanten Änderungen der kinetischen Parameter 4 Tage nach Streptozotocininjektion. Bei den 28-Tage-diabetischen Ratten nahm  $K_m$  zwischen 27.6% und 20.7% und  $V_{\max}$  zwischen 37.5% und 18.4% ab. 28-Tage-diabetische Ratten nahmen unterschiedlich stark an Gewicht ab. Je höher die Körpergewichtsabnahme, um so schwerer war die Erkrankung und um so ausgeprägter waren die Änderungen der kinetischen Parameter. Die mit der Dauer und der Schwere des Diabetes zunehmenden Änderungen in den kinetischen Konstanten der untersuchten Leitenzyme sprechen für progressive, starke Modifikationen im Aufbau der luminalen und basolateralen Zellmembran renaler proximaler Tubuluszellen diabetischer Ratten.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

Biber J, Stieger B, Haase W and Murer H (1981) A high yield preparation for rat kidney brush border membranes. Different behavior of lysosomal markers. *Biochim Biophys Acta* 647: 169-176

Blank ME, Bode F, Huland E, Diedrich DF and Baumann K (1985) Kinetic studies of D-glucose transport in renal brush-border membrane vesicles of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochim Biophys Acta* 844: 314-319

Blank ME, Bode F, Baumann K and Diedrich DF (1989) Computer analysis reveals changes in renal Na<sup>+</sup>-glucose cotransporter in diabetic rats. *Am J Physiol* 257: C385-C396

Blank ME, Dammann D, Diedrich DF and Baumann K (1998) Temperature dependence of D-glucose transport in renal brush-border membrane vesicles (BBMV) of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pfügers Arch Suppl* 435: R215 (abstract)

Blank ME, Dammann D, Diedrich DF and Baumann K (1999) Phlorizin binding and effect of phlorizin and phloretin on the temperature dependence of D-glucose transport in renal brush-border membrane vesicles (BBMV) of streptozotocin-induced diabetic rats. *Pfügers Arch Suppl* 437: P38-39 (abstract)

Brasitus TA and Dudeja PK (1985) Correction of abnormal lipid fluidity and composition of rat ileal microvillus membranes in chronic streptozotocin-induced

diabetes by insulin therapy.

J Biol Chem 260: 12405-12409

Chen CC (1992) Differentiation of renal Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in control and streptozotocin-induced diabetic mice by G-protein acting toxins and phorbol esters.

Eur J Pharmacol 225: 275-279

Csaky TZ and Fischer E (1981) Intestinal sugar transport in experimental diabetes.

Diabetes 30: 568-574

Ditzel J and Junker K (1972) Abnormal glomerular filtration rate, renal plasma flow and renal protein excretion in recent and short-term diabetics.

Brit Med J 2: 13-19

Heller M and Hanahan DJ (1972) Erythrocyte membrane-bound enzymes: ATPase, phosphatase and adenylate kinase in human, bovine and porcine erythrocytes.

Biochim Biophys Acta 255: 239-250

Jacobs LR (1981) Alterations in labeling of cell-surface glycoproteins from normal and diabetic rat intestinal microvillous membranes.

Biochim Biophys Acta 649: 155-161

Juretic D, Lipovac K, Hadzija M and Slijepcevic M (1984) Effect of the degree of hyperglycemia on the catalytic activities of glycosidases in kidney and urine of diabetic rats.

J Clin Chem Clin Biochem 22: 21-27

Khadouri C, Bartlet-Bas C and Doucet A (1987) Mechanism of increased tubular Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase during streptozotocin-induced diabetes.

Pflügers Arch 409: 296-301

Ku DD and Meezan E (1984) Increased renal tubular sodium pump and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in streptozotocin-diabetic rats.

J Pharmacol Exp Ther 229: 664-670

Ku DD, Sellers BM and Meezan E (1986) Development of renal hypertrophy and increased renal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in streptozotocin-diabetic rats.

Endocrinology 119: 672-679

Ku DD, Roberts RB, Sellers BM and Meezan E (1987) Regression of renal hypertrophy and elevated renal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity after insulin treatment in streptozotocin-diabetic rats.

Endocrinology 120: 2166-2173

Levy J, Avioli LV, Roberts ML and Gavin JR III. (1986)  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in kidney basolateral membranes of non insulin dependent diabetic rats.

Biochem Biophys Res Commun 139: 1313-1319

Mogensen CE, Steffes MW, Deckert T and Christiansen JS (1981) Functional and morphological renal manifestations in diabetes mellitus.

Diabetologia 21: 89-93

Murakami I and Ikeda T (1998) Effect of diabetes and hyperglycemia on disaccharidase activities in the rat.

Scand J Gastroenterol 33: 1069-1073

Nakabou Y, Ikeuchi K, Minami H and Hagihira H (1985) Changes in brush-border enzyme activities of intestinal epithelial cells isolated from the villus-crypt axis during the early phase of alloxan diabetes in rats.

Experientia 41: 482-484

Osterby R and Gundersen HJG (1975) Glomerular size and structure in diabetes mellitus. I. Early abnormalities.  
Diabetologia 11: 225-229

Pape W, Kochmann R, Kochmann G, Blank ME and Baumann K (1983) Excretion of neutral  $\alpha$ -glucosidase, determined with a continuous assay, and of acid  $\alpha$ -glucosidase in the urine of human reference subjects.  
J Clin Chem Clin Biochem 21: 511-517

Pathak RM, Ansari S and Mahmood A (1981) Changes in chemical composition of intestinal brush border membrane in alloxan induced chronic diabetes.  
Indian J Exp Biol 19: 503-505

Racchah D, Lamotte-Jannot MF, Issautier T and Vague P (1994) Effect of experimental diabetes on  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in red blood cells, peripheral nerve and kidney.  
Diabete Metab 20: 271-274

Rasch R (1979) Prevention of diabetic glomerulopathy in streptozotocin diabetic rats by insulin treatment: Kidney size and glomerular volume.  
Diabetologia 16: 125-128

Rasch R (1986) Kidney  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity in streptozotocin-diabetic rats.  
Scand J Clin Lab Invest 46: 59-62

Schacterle GR and Pollack RL (1973) Simplified method for the quantitative assay of amounts of protein in biologic material.  
Anal Biochem 51: 654-655

Schedl HP, Al-Jurf AS and Wilson HD (1983) Elevated intestinal disaccharidase activity in streptozotocin-diabetic rat is independent of enteral feeding.  
Diabetes 32: 265-270

Seyer-Hansen K (1980) Renal hypertrophy in experimental diabetes. A morphometric study.  
Diabetologia 18: 501-505

Sharma SD and Sivakami S (1998) Responses of intestinal and renal  $\alpha$ -glucosidases to alloxan- and streptozotocin-induced diabetes: A comparative study.  
Biochem Mol Biol Int 44: 647-656

Tsuji Y, Yamada K, Hosoya N and Moriuchi S (1985) Changes of sugar-evoked transmural potential differences in intestine of rats with streptozotocin-induced diabetes.  
J Nutr Sci Vitaminol Tokyo 31: 317-326

Ver A, Szanto I, Csermely P, Kalff K, Vegh E, Banyasz T, Marcsek Z, Kovacs T and Somogyi J (1995) Effect of streptozotocin-induced diabetes on kidney  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.  
Acta Physiol Hung 83: 323-332

Wald H and Popovtzer MM (1984) The effect of streptozotocin-induced diabetes mellitus on urinary excretion of sodium and renal  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity.  
Pflügers Arch 401: 97-100

Wald H, Scherzer P and Popovtzer MM (1986) Enhanced renal tubular ouabain-sensitive ATPase in streptozotocin diabetes mellitus.  
Am J Physiol 251: F164-F170

Witt W (1979) Veränderungen des Phospholipidmusters von Erythrozytenmembranen durch Phospholipase D: Untersuchungen mit Fluoreszenz- und Spinsonden und Aktivitätsbestimmungen membrangebundener ATPase.

Universität Hamburg, Thesis

## 7. LEBENSLAUF

Name:	Helene Renz	
Anschrift:	Franzosenheide 25a 22457 Hamburg	
Geburtsdatum:	9. Dezember 1959	
Geburtsort:	Kirowsk	
Familienstand:	verheiratet, zwei Kinder	
Schulbildung:	1966-1976	Oberschule in Kirowsk Abschluß Allgemeine Hochschulreife
Studienvorbereitung:	1976-1977	Labortätigkeit, Zuckerfabrik in Kirowsk
	1977-1978	Physiotherapeutische Tätigkeit, 1. Staatliches Krankenhaus in Novosibirsk
	1978	Pflegetätigkeit, Krankenhaus Kirowsk
Studium:	1978-1979	Medizinische Hochschule in Semipalatinsk
	1980	Immatrikulation an der Universität Hamburg, Fachbereich Medizin
	1984	Physikum
	1985	1. Staatsexamen
	1988	2. Staatsexamen
	1989	3. Staatsexamen
Praktisches Jahr:	1988-1989	Anästhesiologie, Marienkrankenhaus Innere Medizin, AK Eilbek Chirurgie, AK Eilbek
Ärztin im Praktikum:	1991-1992	Medizinisch-Geriatriische Klinik, Albertinen Diakoniewerk e.V.
	1992	Approbation
Assistenzärztin:	1994-1996	Anästhesiologie, Krankenhaus Elim
	1996-	Intensiv-Medizin, Albertinen Diakoniewerk e.V.

## **8. DANKSAGUNG**

Für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas und die Verfügungstellung der Arbeitsmöglichkeiten zur Ausführung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Versuche danke ich Herrn Prof. Dr. med. Karl Baumann.

Mein Dank gilt insbesondere auch Herrn Dr. Michael Blank für die Einarbeitung in die in dieser Arbeit verwendeten Methoden und für seine organisatorische Unterstützung bei der Durchführung der Versuche sowie der Betreuung bei der rechnergestützten Auswertung.