

Aus dem Institut für experimentelle und klinische
Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Dominiak

Expression der Kinin-Rezeptoren und Stickstoffmonoxid-Synthase-
Isoformen in der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-
Achse bei Typ 1- und Typ 2-Diabetes Ratten:
Mögliche Beteiligung an der Pathogenese des Diabetes?

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– **Aus der Medizinischen Fakultät** –

vorgelegt von
Eva Stark
aus Braunschweig

Lübeck 2005

1. Berichtstatter:

Prof. Dr. med. Peter Dominiak

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt, Lübeck den

gez.

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>Seitenzahl</i>
1	INHALTSVERZEICHNIS	II
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
3	EINLEITUNG	1
3.1	Das Kallikrein-Kinin-System (KKS).....	2
3.2	Das Stickstoffmonoxid-System	4
3.3	Die Glukosetransporter (GLUT)-Isoformen.....	6
3.4	Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse	7
3.5	Hypothese und Fragestellung.....	8
4	MATERIAL UND METHODEN	11
4.1	Material.....	11
4.2	Methoden	11
4.2.1	Tiermodelle	11
4.2.1.1	Typ 1-Diabetes Ratten	11
4.2.1.2	Typ 2-Diabetes Ratten	12
4.2.2	Experimentelle Protokolle.....	13
4.2.3	Bestimmung von peripheren Plasmaspiegeln	14
4.2.4	Gewebeentnahme für die mRNA- und Protein-Bestimmung	14
4.2.5	Gewebevorbereitung für die Polymerasekettenreaktion mit der Reversen Transkriptase (RT-PCR)	16
4.2.6	Durchführung der RT-PCR.....	16
4.2.7	Gewebevorbereitung für die Proteinanalyse mittels Western Blot- Verfahrens.....	18
4.2.7.1	Homogenisation der Gewebe	18
4.2.7.2	Gesamtproteinbestimmung	18
4.2.8	Western Blot-Analyse.....	18
4.2.8.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	18
4.2.8.2	Protein-Transfer und Immunodetektion	19
4.2.9	Statistische Auswertung	20
5	ERGEBNISSE	21
5.1	TYP-1 Diabetes	21
5.1.1	Periphere Parameter der Typ 1-Diabetes Ratten.....	21

5.1.2	Bestimmung der Genexpression der Kinin-B ₁ - und B ₂ -Rezeptoren auf transkriptionaler Ebene in Geweben der HHN-Achse von STZ-D Ratten.....	23
5.1.3	Bestimmung der Proteinmenge der Kinin-B ₁ - und B ₂ -Rezeptoren in Geweben der HHN-Achse von STZ-D Ratten.....	26
5.1.4	Bestimmung der Genexpression auf transkriptionaler Ebene der NOS-Isoenzyme in Geweben der HHN-Achse von STZ-D Ratten.....	28
5.1.5	Bestimmung der Proteinmenge der NOS-Isoformen in Geweben der HHN-Achse von STZ-D Ratten.....	31
5.2	Typ 2-Diabetes.....	33
5.2.1	Periphere Parameter der Typ 2-Diabetes Ratten.....	33
5.2.2	Bestimmung der Genexpression von B ₁ - und B ₂ -Rezeptoren auf transkriptionaler Ebene in Geweben der HHN-Achse.....	34
5.2.3	Bestimmung der Genexpression der NOS-Isoformen auf transkriptionaler Ebene in Geweben der HHN-Achse.....	37
5.3	Bestimmung der Genexpression der GLUT-Isoformen auf transkriptionaler Ebene im Hypothalamus.....	41
5.3.1	Bestimmung der Genexpression der GLUT-Isoformen auf transkriptionaler Ebene im Hypothalamus von ZDF-Ratten.....	43
6	DISKUSSION.....	45
6.1	Der Typ 1-Diabetes.....	45
6.1.1	Das Körpergewicht ist in den STZ-D Ratten reduziert.....	45
6.1.2	Die Nebennierenrindenhormone sind im STZ-D Rattenmodell erhöht ...	46
6.1.3	Die gewebespezifische Funktion der Kinin-Rezeptoren im STZ-D Rattenmodell.....	46
6.1.4	Die neuronale NOS-Isoform in der HHN-Achse wird Insulin-abhängig reguliert.....	50
6.2	Der Typ 2-Diabetes.....	55
6.2.1	Die hypophysäre B ₂ -Rezeptor-Expression ist im Typ 2-Diabetes-Tiermodell signifikant gesteigert.....	56
6.2.2	Änderungen der eNOS in ZDF- und Obese-Ratten.....	57
6.3	Der Glukose-Transporter.....	59
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	63

8	LITERATURVERZEICHNIS	65
9	ANHANG	75
9.1	Materialverzeichnis.....	75
9.1.1	Alphabetische Auflistung der verwendeten Puffer.....	75
9.1.2	Antikörper.....	76
9.1.3	Chemikalien und Lösungen.....	76
9.1.4	Gele	77
9.1.5	Kommerzielle Nachweisverfahren (Sets)	77
9.1.6	Marker	77
9.1.7	Optimierung der PCR für die Kinin-Rezeptoren, die NOS-und GLUT-Isoformen	78
9.1.8	PCR-Ansatz	79
9.1.9	Primer	79
9.1.10	Restriktionsenzyme.....	80
9.1.11	Software.....	80
9.1.12	PCR-Gel-Bilder	81
9.2	Veröffentlichung und Posterpräsentationen.....	85
9.2.1	Veröffentlichung	85
9.3	Danksagung	86
9.4	Lebenslauf.....	87

2 **Abkürzungsverzeichnis**

In der folgenden Liste sind die Abkürzungen von häufig wiederkehrenden Begriffen alphabetisch dargestellt:

ACE.....	Angiotensin-Konversions-Enzym (Angiotensin-<i>Converting-Enzyme</i>)
ACh.....	Azetylcholin
ACTH.....	Adrenokortikotropes Hormon (Adrenocorticotropic <i>Hormone</i>)
ATP.....	Adenosintriphosphat
BE.....	Blutentnahme
BHS.....	Bluthirnschranke
BK.....	Bradykinin
bp.....	Basenpaare
CaM.....	Calmodulin
cDNA.....	komplementäre DNA (complementary DNA)
cGMP.....	zyklo-GMP (cycloGuanisinomonophosphat)
CRH.....	Kortikoliberin (Corticotropin-<i>Releasing-Hormon</i>)
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleinacid)
DTT.....	Dithiothreitol
EDTA.....	Ethylenediaminetetraessigsäure
eNOS.....	endotheliale NOS
GLUT.....	Glukose-Transporter
HHN-Achse ...	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HMWK.....	hochmolekulares Kininogen (High-Molecular-<i>Weight-Kininogen</i>)
i.c.v.....	intrazerebroventrikulär (intracerebroventrikular)
i.v.....	intravenös
i.m.	intramuskulär
IL.....	Interleukin
IFN.....	Interferon
iNOS.....	induzierbare NOS
i.p.	intraperitoneal
IP ₃	Inositoltriphosphat
i.v.....	intravenös
kDa.....	Kilodalton
KD.....	Kallidin
KG.....	Körpergewicht
KKS.....	Kallikrein-Kinin-System

LMWK	niedermolekulares Kininogen (<i>Low-Molecular-Weight-Kininogen</i>)
L-NMMA	N^G -monoethyl-L-arginin
mRNA.....	Boten RNA (<i>messenger RNA</i>)
NEP	N eutrale E ndopeptidase
NF-κB	Transkriptionsfaktor (<i>Nuclear Factor</i>)-κB
Nm.....	Nanometer
NMDA.....	N -Methyl- D opamin- A spartat
nNOS	n euronale NOS
NO	Stickstoffmonoxid (<i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (<i>Nitric Oxide Synthase</i>)
NPY	Neuropeptid Y
Obese-Ratte ..	fettleibige Zucker-Ratte (<i>Zucker-fatty-rat</i> ; Typ 2b-Diabetes)
RNA.....	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleinacid</i>)
RNAase.....	Ribonuklease
RT	R eserve T ranskriptase
SD-Ratte.....	S prague- D awley-Ratte
SDS	S odium- D odecylsulphat
STZ-D Ratte ..	S treptozotocin inuzierte D iabetes Ratte
TEMED.....	N,N,N,N- T etramethylethylenediamin
T-Kinin.....	Gewebe-Kinin (<i>Tissue-Kinin</i>)
TNF	T umornekrosefaktor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organisation</i>)
ZDF-Ratte.....	Zucker-Ratte (<i>Zucker diabetic fatty rat</i> ; Typ 2-Diabetes)
ZNS	Z entrales N ervensystem

3 **Einleitung**

Der Diabetes mellitus ist eine Volkskrankheit geworden. Moderne Lebens- und Ernährungsweisen bei gleichzeitiger Einschränkung der körperlichen Aktivität haben zu einem Anstieg von Stoffwechselstörungen geführt. So liegt in Deutschland die Prävalenz für Diabetes mellitus derzeit bei ca. 5%. Laut Voraussage der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird die Zahl der Erkrankten bis zum Jahr 2025 in den Industrienationen um ca. 45% steigen und könne bereits im Jahr 2010 zu den häufigsten Todesursachen zählen.

Diabetes mellitus ist ein Sammelbegriff für eine ätiologisch heterogene Gruppe von Störungen des Intermediärstoffwechsels, insbesondere des Kohlenhydrat-haushaltes. Es werden zwei Haupttypen unterschieden: der Typ 1 oder *Insulin-abhängige* Diabetes, dem meist ein Autoimmunerkrankung mit absolutem Insulinmangel zugrunde liegt und der Typ 2 oder *Insulin-unabhängige* Diabetes. Letzterer ist durch eine pathologische β -Zell-Funktion auf den Stimulus Glukose charakterisiert, die mit einer herabgesetzten Insulinwirkung an den Zielgeweben und einer gesteigerten hepatischen Glukoseproduktion trotz bestehender Hyperglykämie einhergeht.

Über metabolische oder Diabetes-bedingte Veränderungen wie Angiopathie und Neuropathie werden auch andere Organe beeinflusst. Häufig tritt der Diabetes mellitus gemeinsam mit Funktionsstörungen weiterer endokriner Organe auf, u.a. der Hypophyse und Nebenniere. Auch das Zentrale Nervensystem (ZNS), das als übergeordnetes Zentrum den Energiehaushalt des Körpers reguliert, ist beeinträchtigt. Verschiedene Untersuchungen postulieren eine veränderte Signalübertragung im Gehirn diabetisch Erkrankter. Zu den beteiligten Botenstoffen gehören unter anderen Bradykinin (BK) und Zytokine. Durch unterschiedliche Stimuli werden sie aus Geweben freigesetzt oder im Blut bzw. Gewebe aus Vorläufersubstanzen neu gebildet. Intrazellulär induzieren sie spezifische Antworten über zelluläre Zweit-Botenstoffe (*second messenger*) und eine veränderte Genexpression.

Stickstoffmonoxid (*Nitric Oxide*, NO) ist ein universeller second messenger, der zusammen mit Kininen im Rahmen von Entzündungsprozessen vermehrt gebildet wird und an der Modulation verschiedener Regulationssysteme und der Immunreaktion maßgeblich beteiligt ist. Für beide Mediatoren wurden zahlreiche Untersuchungen zur Pathogenese und Pathophysiologie des Diabetes und

Erkrankungen des Energiestoffwechsels in peripheren Geweben durchgeführt. Die vorliegende Studie soll einen Beitrag zum Verständnis der Expression von Kinin-Rezeptoren und NO-Synthasen, sowie deren Einfluss auf das Zusammenspiel neuronaler Botenstoffe und die Pathophysiologie der diabetischen Erkrankung an einem Tiermodell leisten.

3.1 Das Kallikrein-Kinin-System (KKS)

Kinine sind Oligopeptide und gehören zu den potentesten Gewebshormonen mit einer weiten Spanne von biologischen Aktionen. Am besten ist ihre Wirkung in peripheren Geweben untersucht, aber man weiß, dass ihnen eine nicht unbedeutende Rolle als Neuromodulator und Neurotransmitter zukommt. Vertreter der Kinine sind BK, Kallidin (KD), T-Kinin (Tissue-Kinin) und ihre aktiven Metaboliten, *des-Arg⁹-BK* und *des-Arg¹⁰-KD*. Die Verfügbarkeit dieser biologisch aktiven Peptide wird im Wesentlichen durch die spezifische Freisetzung aus den jeweiligen Vorstufen im Plasma, bzw. Gewebe und dem gezielten Abbau zu inaktiven Endstufen kontrolliert. Kallikrein spaltet im Blutplasma aus dem inaktiven Vorläufer, dem hochmolekularen Kininogen (HMWK), BK ab. Im Gewebe entsteht hingegen aus dem niedermolekularen Kininogen (LMWK) das KD. Beide Substanzen werden schnell durch Peptidasen inaktiviert, wodurch die Wirkung der Kinine lokal begrenzt bleibt (*siehe Abbildung 1*).

Die BK-Wirkungen werden über zwei G-Protein gekoppelte Rezeptortypen vermittelt (McEachern *et al.*, 1991; Ni *et al.*, 1998; Jones *et al.*, 1999). Der B₁-Rezeptor kommt in den meisten Geweben von gesunden Lebewesen nicht vor (Hall, 1992). Bakterielle Endotoxine und Zytokine, die infolge von Entzündungen, Infektionen und anderen Noxen gebildet werden, steigern die Expression des B₁-Rezeptors (Marceau, 1995, 1997; Marceau *et al.*, 1998). Ein synergistischer Effekt konnte für den B₁-Rezeptor-Agonisten *des-Arg⁹-BK* gezeigt werden, der im Rahmen von Krankheitsprozessen durch ein Überwiegen der Kininase I-Funktion vermehrt gebildet wird.

Der B₂-Rezeptor ist konstitutiv auf der Zelloberfläche von unterschiedlichen Geweben exprimiert. Er wird durch seine endogenen Agonisten BK und KD und zusätzlich direkt durch Kallikrein und andere Proteasen aktiviert (Hecquet *et al.*, 2000). Beobachtungen an verschiedenen Tiermodellen lassen vermuten, dass der B₂-Rezeptor an der akuten Phase von Entzündungen beteiligt ist, wohingegen der

B₁-Rezeptor bei chronischen Krankheitsverläufen, wie Diabetes mellitus, an Bedeutung gewinnt (Hall, 1992; Davis und Perkins, 1994; Zuccollo *et al.*, 1996).

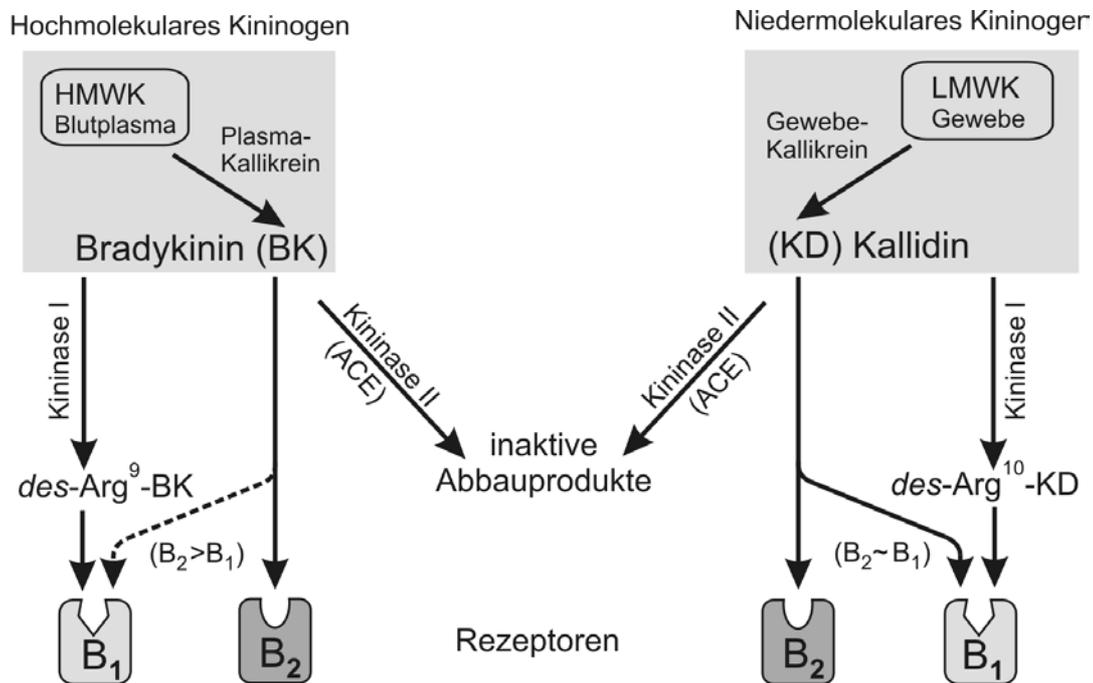


Abbildung 1:

Synthese-, Funktions- und Abbaueg der Kinine

Abkürzungen: HMWK, Hochmolekulares Kininogen; LMWK, Niedermolekulares Kininogen; BK, Bradykinin; KD, Kallidin

Der Mechanismus der Signalübertragung von Kinin-Rezeptoren ist am besten für den B₂-Rezeptor charakterisiert. Ein B₂-Rezeptor-aktiviertes G-Protein stimuliert die Phospholipase C, durch die aus Membranlipiden Inositoltrisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol entstehen. Die durch IP₃ vermehrte Calcium (Ca²⁺)-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol ist der erste Schritt für die Aktivierung der endothelialen und neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (*nitric-oxide-synthase*, NOS) mit Bildung des intrazellulären Botenstoffes NO. Diese Abhängigkeit erklärt die Verbindung zwischen dem KKS und NO-zyklo-Guanisinomonomophosphat (cGMP)-System, das weiter unten beschrieben ist.

Klinische Bedeutung besitzt BK ganz offensichtlich im Rahmen von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, der Inflammation und Schmerzentstehung (Privitera *et al.*, 1994; Lindsay *et al.*, 1997; Couto *et al.*, 1998; Qadri *et al.*, 1999b). Außerdem besitzt das KKS zahlreiche metabolische Funktionen, deren Relevanz für mögliche therapeutische Ansätze bei Erkrankungen des Energiestoffwechsels noch nicht

eindeutig ist. Zum einen gelangen Glukose und Insulin durch die BK-induzierte Vasodilatation schneller an ihren Wirkungsort, zum anderen zeigten Damas *et al.* (1999) eine reduzierte Insulinsensitivität in KKS-defizienten Ratten. Die Bedeutung der Kinine als Neurotransmitter und Neuromodulator im ZNS findet immer mehr Interesse und ist Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion (de Sousa Buck *et al.*, 2002). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien weisen darauf hin, dass BK die Sekretion von Hypophysenhormonen moduliert. Intrazerebroventrikulär (i.c.v.)-appliziertes BK führt zu einer Steigerung des Adrenokortikotropen Hormons (ACTH) und folglich zu einer Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HHN)-Achse (Guillaume-Gentil *et al.*, 1990; Madeddu *et al.*, 1992; Malendowicz *et al.*, 1996). Dies lässt vermuten, dass BK die Funktion eines „Releasing-Hormons“ oder Modulators im Hypophysenvorderlappen besitzt und hierdurch als möglicher zentraler Mediator in der Stressachse fungiert.

3.2 Das Stickstoffmonoxid-System

NO ist das kleinste endogen gebildete bioaktive Molekül und wurde im Jahre 1992 aufgrund seiner enormen biologischen und pathologischen Bedeutungen von der Zeitschrift Science zum „Molekül des Jahres“ deklariert. NO wird infolge Rezeptoraktivierung durch BK, Azetylcholin (ACh) u.v.m. oder mechanischer Stimulation (Schubspannung des strömenden Blutes) aus L-Arginin unter Katalyse der NOS synthetisiert. Dabei wird ein Guanidin-Stickstoff des Arginins zu NO oxidiert und freigesetzt, so dass als Spaltprodukt die Aminosäure Zitrullin entsteht (Abbildung 2).

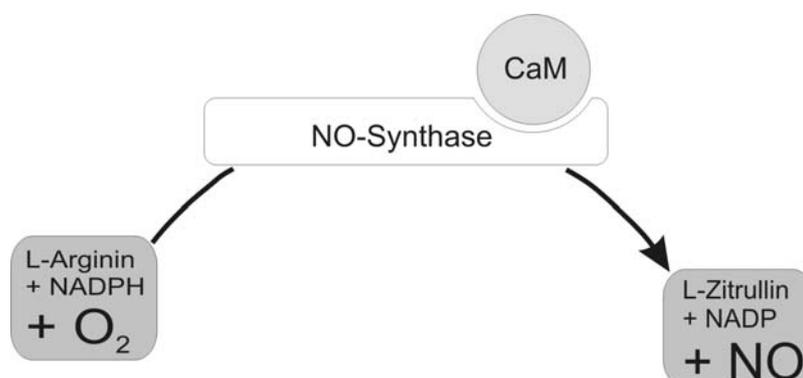


Abbildung 2: Syntheseweg von NO

Abkürzungen: NO, Stickstoffmonoxid, NADPH, Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-phosphat; CaM, Calmodulin

Es existieren drei Isoformen der NOS: die neuronale NOS (nNOS), endotheliale NOS (eNOS) und induzierbare NOS (iNOS) (Forstermann *et al.*, 1993). Die nNOS und eNOS sind unter physiologischen Bedingungen konstitutiv vorhanden, ihre Präfixe geben die Gewebe ihrer Erstbeschreibung wieder. Sie produzieren relativ kleine Mengen an NO. Ihre Aktivität ist abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der reversiblen Bindung des Kofaktors Calmodulin (CaM). Demnach fungieren Ca^{2+} -mobilisierende Agonisten, wie BK, ACh oder Glutamat, als permissive Substanzen in Bezug auf die Bildung von NO. Die dritte Form, die induzierbare NOS, produziert weit größere Mengen an NO. Sie hat CaM als prosthetische Gruppe gebunden und ist somit Ca^{2+} -unabhängig. Zytokine, Lipopolysaccharide aus Bakterienzellwänden, Viren und andere Noxen stimulieren intrazelluläre Signalwege und regulieren hierdurch die Transkription der iNOS (Nathan und Xie, 1994).

NO wirkt nach seiner Bildung entweder autokrin auf dieselbe Zelle oder gelangt durch Diffusion in den Intrazellularraum benachbarter Zellen. In relativ geringen NO-Konzentrationen, steht die direkte Aktivierung der zytoplasmatischen Guanylatzyklase im Vordergrund: cGMP entsteht und greift anschließend als ubiquitärer Signalüberträgerstoff in den Zellhaushalt ein. Höhere Konzentrationen von NO, wie sie durch iNOS entstehen, bewirken über Transkriptionsfaktoren und die Modulation der zellulären Genexpression tiefgreifende und langfristige Veränderungen (z.B. die Fähigkeit der Zelle, Stress und Krankheit entgegenzuwirken). Ort, Zeit, Menge, umgebendes Redox-Potential und Vorhandensein von potentiellen Zielmolekülen nehmen Einfluss auf das weite Feld der NO-Wirkung, die zellprotektiv, regulatorisch oder auch zytotoxisch ausfallen kann. Nicht umsonst bezeichneten Stevens *et al.* (1997) NO als „*two edged sword*“ (zweischneidiges Schwert).

Im ZNS wird NO nach Aktivierung des ionotropen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors durch nNOS in der oben erwähnten Reaktion gebildet. Nach Diffusion in umliegende Neuronen stimuliert NO die Guanylatzyklase, wodurch je nach intrazellulärer Ausstattung mit cGMP-Zielmolekülen die neuronale Erregbarkeit verstärkt oder abgeschwächt wird. Als wichtiger Botenstoff im ZNS nimmt NO

Einfluss auf die Synaptogenese, Gedächtnisbildung, Schmerzverarbeitung und Kontrolle des Blutdruckes (Garthwaite, 1991; Snyder und Bredt, 1992). Aktuelle Untersuchungen postulieren, dass NO die Aktivität der HHN-Achse moduliert und die Nahrungsaufnahme und das Trinkverhalten bestimmen (Brann *et al.*, 1997; Riedel, 2000; Seo und Rivier, 2001). Die höchsten Spiegel der neuronalen NOS-Isoform wurden im Hypothalamus lokalisiert, also in Gebieten der Nervenzellkörper von verschiedenen neuroendokrinen Regelkreisen (Prevot *et al.*, 2000). Die Nervenzellkörper besitzen Projektionen sowohl zum Hirnstamm und Rückenmark als auch in die *Media Eminencia*. Dies lässt Mechanismen vermuten, über die NO in autonomer Regulation Einfluss auf die neuroendokrine Hypothalamo-Hypophysen-Einheit und auf den Sympathikus ausüben könnte. Beide Systeme sind an der Stressbewältigung beteiligt und führen im Idealfall zu einer adäquaten Antwort auf den belastenden Faktor (Shanks *et al.*, 1998; McCann *et al.*, 2000; O'Connor *et al.*, 2000; Mizock, 2001).

Der eNOS kommt eine wichtige Bedeutung bei der Regulation des basalen und reaktiven vaskulären Widerstandes und des zerebralen Blutflusses zu. Hierbei wird der zerebrale Blutfluss der regionalen Stoffwechselaktivität angepasst. Durch die Hemmung von Plättchen- und Leukozytenaggregation werden die Flusseigenschaften zusätzlich verbessert (Michel, 1999; Prevot *et al.*, 2000).

Die Expression von iNOS scheint eine wichtige Aufgabe bei der Abwehr von bakteriellen, parasitären und eventuell karzinogenen Krankheiten zu übernehmen. Möglicherweise spielt sie auch im Rahmen von Entwicklungs- und Wachstumsprozessen und Zelldifferenzierung eine Rolle (Kim und Yoon, 1998; Heneka und Feinstein, 2001). Für die durch iNOS produzierten NO-Mengen konnten abhängig von den umgebenden Faktoren sowohl protektive als neurotoxische Eigenschaften aufgezeigt werden. So wird NO im Zusammenhang mit akuten und chronischen oder autoimmunen Entzündungen des ZNS, Epilepsie, Demenz, permanentem Stress und anderen Pathologien diskutiert (Olivenza *et al.*, 2000).

3.3 Die Glukosetransporter (GLUT)-Isoformen

Dem ZNS kommt in Bezug auf den Energiestoffwechsel eine besondere Stellung zu. Glukose stellt die wichtigste Energiequelle für das Gehirn der Säugetiere dar, und die kontinuierliche Zufuhr dieses Energieträgers ist essentiell für die Aufrechterhaltung der zerebralen Funktionen (Brant *et al.*, 1993). Die Aufnahme von

Glukose in die Zelle wird von einer Familie strukturverwandter Membranproteine gewährleistet, die als Glukosetransporter (GLUTs) bezeichnet werden. Viele Autoren beschreiben ein gewebespezifisches Muster der GLUT-Ausstattung. So konnten die GLUT 1, 3 und 5 in den meisten Anteilen des ZNS nachgewiesen werden. GLUT 1 ist der wichtigste Transporter entlang der Bluthirnschranke (BHS) (Pardridge *et al.*, 1993; Shepherd und Kahn, 1999). Er übernimmt die erste Stufe des Glukosetransports aus dem Blut in das Gehirn und bildet gleichzeitig den limitierenden Faktor bei Substratmangel. Die Rolle von GLUT 3 besteht in der Glukoseaufnahme in die Neuronen und Gliazellen. Noch ist wenig über GLUT 5 bekannt, er wurde weitverbreitet in Mikrogliazellen gefunden und ist an einem Symport von Glukose mit Na^+ -Ionen beteiligt. Alle hier genannten Transporter funktionieren Insulin-unabhängig. In diese Gruppe gehört auch GLUT 2. Er ermöglicht in der Leber einen bidirektionalen Glukosetransport: einerseits die Glukoseaufnahme mit simultaner Hemmung der hepatischen Glukoneogenese, andererseits die Glukoseabgabe bei stimulierter Glukoseproduktion. Nur GLUT 4 steht unter der Kontrolle von Insulin.

Zusammen gewährleisten sie die genaue Kontrolle des Glukosetransportes und damit die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase unter verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen. Damit sind jedoch gleichzeitig mögliche Defekte, die zur Ausbildung einer Hyperglykämie führen, denkbar. So gilt die Dysfunktion des GLUT 4 als eine der Ursachen für die Entstehung des Typ-2-Diabetes im peripheren Gewebe (Palitzsch, 2000). Bei Patienten mit Typ 1-Diabetes wurden zytotoxische T-Lymphozyten nachgewiesen, die sich gegen den für β -Zellen spezifischen GLUT 2 richten (Pozzilli, 1998). Zusätzlich zeigen einige Studien an Typ 1-Diabetesmodellen reduzierte GLUT-Aktivitäten entlang der BHS (Pardridge *et al.*, 1990; Mooradian *et al.*, 1993). Als Ausdruck für die elementare Stellung der zellulären Glukoseaufnahme im ZNS wurde in der vorliegenden Studie die mRNA-Expression der Glukose-Transporter 1-5 an verschiedenen Diabetesmodellen untersucht.

3.4 Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse

Eine wichtige Hirnregion für die Erhaltung der Homöostase des Organismus ist der Hypothalamus. Über komplexe neuroendokrine Verbindungen, spinale Reflexe und vegetative Regulationen integriert er vegetative, endokrine und somato-

motorische Funktionen des Körpers und ist für ihre adäquate Einstellung sowohl unter Stressanforderungen als auch Basalbedingungen verantwortlich. Emotionale und mentale Belastungen, sowie Krankheiten bedrohen diese hypothalamische Koordination und machen eine Anpassung an die Stressoren nötig. Zentraler Effektor bei der Reaktion auf veränderte Bedingungen allgemein sind Kortikoliberin (*Corticotropin-Releasing-Hormon*; CRH) und Vasopressin (= Adiuretin) mit konsekutiver Stimulation der HHN-Achse. Die Biosynthese von CRH und Vasopressin im Hypothalamus unterliegt neben stimulierenden Stressoren und negativen Feedbacksignalen einem biologischen tageszeitabhängigen Rhythmus. Interessant ist, dass CRH und Vasopressin in identischen Zellen des Hypothalamus synthetisiert werden können. Ein Überwiegen von CRH entspricht der Regulation unter Basalbedingungen wie auch akutem Stress, während Vasopressin eine wichtige Bedeutung in der chronischen Stressantwort zuteil wird. CRH und Vasopressin fördern im Hypophysenvorderlappen die Freisetzung von adrenokortikotropem Hormon (ACTH), welches seinerseits in der Nebennierenrinde die Bildung und Sekretion von Kortikosteroiden bestimmt. Letztere bewirken über die Modulation der Genexpression die Anpassung des Stoffwechsels, Kreislaufes, Immunsystems usw. an die veränderten äußeren oder inneren Bedingungen. Ein autoregulatorischer Rückkopplungsmechanismus (*negatives Feedback*) verhindert über zirkulierende Glukokortikoide eine andauernde Stimulation der HHN-Achse, bzw. ermöglicht eine feinabgestimmte Regelung.

3.5 Hypothese und Fragestellung

Unter langanhaltenden, chronischen Bedingungen kann Stress von einer adaptiven Reaktion zu einer Belastung mit schädigender Wirkung auf viele Körperfunktionen wie z.B. das Immunsystem werden (Strausbaugh *et al.*, 1999). Charakteristisch für eine langandauernde Stressreaktion mit einer chronischen HHN-Achsen-Überaktivität sind unangemessen hohe Glukokortikoidspiegel, wie sie auch bei Patienten mit Diabetes nachgewiesen wurden (Dallman *et al.*, 1993; Dinan *et al.*, 1994). Für beide Diabetes-Typen sind Veränderungen von Hypothalamus-Transmittern und der Genexpression von Neuropeptiden bewiesen (Guillaume-Gentil *et al.*, 1990). Der Beitrag des peripheren KKS und NO-Systems

in Bezug auf den Glukosemetabolismus, die Entstehung und Entwicklung diabetischer Symptome und assoziierter Krankheiten ist bereits vor Jahren entdeckt worden. Es mehren sich jedoch Hinweise, dass BK und NO auch im ZNS eine entscheidende Rolle als Neuromediator mit unterschiedlichen zerebralen Funktionen wahrnehmen. Besonderes Augenmerk gehört hier der HHN-Achse, die an der Regulation neuronaler, endokriner und metabolischer Funktionen des Körpers beteiligt ist. Immunhistochemische Studien konnten ein weitverteiltes Vorkommen der konstitutiven Anteile des KKS und NO-Systems nachweisen und lassen einen größeren Einfluss auf die HHN-Achse vermuten als zuvor angenommen (Chen *et al.*, 2000).

Unsere Hypothese war, dass das KKS und NO-System in diabetischen Versuchstieren Veränderungen aufweisen, die im Zusammenspiel mit dem Kohlenstoffmetabolismus und der Energiehomöostase eine wichtige Rolle als Auslöser und sekundäre Erscheinung bestimmter Symptome spielen. Bislang liegen lediglich begrenzt Daten zu Besonderheiten dieser Systeme im ZNS von Versuchstieren vor, und die Ergebnisse sind teilweise widersprüchlich. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch Anwendung der Polymerasekettenreaktion (*Polymerase-Chain-Reaction*, PCR) mit der Reversen Transkriptase (RT-PCR)- und des Western Blot-Verfahrens grundlegende Daten zur Verteilung von Kinin-Rezeptoren und NOS-Isoformen auf allen drei Ebenen der HHN-Achse in drei unterschiedlichen Diabetesmodellen zu untersuchen und mögliche Auswirkungen oder Ursachen eines gestörten Glukosehaushalt aufzudecken. Es wurden Tiermodelle des Typ 1- und Typ 2-Diabetes sowie ein Tiermodell mit einer Glukosetoleranzstörung im Rahmen eines Metabolischen Syndroms verwendet. Zur Charakterisierung des jeweiligen Energie- und Hormonstatus der unterschiedlichen Tiermodelle wurden die Konzentrationen von Glukose, Insulin, Leptin und zusätzlich die Hormone der HHN-Achse (ACTH, Kortikosteron und Aldosteron) im Plasma bestimmt.

Zusammenfassend wurden folgende Fragen überprüft:

- 1. Wie verhält sich die Expression von Kinin-Rezeptoren und NOS-Isoformen in den Organen der HHN-Achse in unterschiedlichen Diabetesmodellen?*
- 2. Hat Hyperglykämie oder Hypoinsulinämie einen Einfluss auf die Expression und Synthese von Kinin-Rezeptoren und NOS-Isoformen?*
- 3. Beeinflusst Insulin-Ersatztherapie die Expression von Kinin-Rezeptoren und NOS-Isoformen?*
- 4. Welche Veränderungen zeigt die Expression von GLUT 1-5 auf Transkriptionsebene im Typ 1-, bzw. Typ 2-Diabetesmodell. Beeinflusst die Insulinersatztherapie Auswirkungen auf die Expression?*

4 Material und Methoden

4.1 Material

Zur besseren Übersicht werden die Bezugsquellen der Chemikalien und Zusammensetzungen der Lösungen separat im Anhang unter 9.1 aufgeführt.

4.2 Methoden

4.2.1 Tiermodelle

Alle durchgeführten Experimente wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki und den Richtlinien über die Haltung und den Einsatz von Labortieren durchgeführt. Die Studie wurde durch das Ministerium für Umwelt, Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein genehmigt und ist am Uniklinikum Schleswig-Holstein unter der Tierversuchsprotokollnummer 9/y/01 registriert.

Allen Ratten wurde eine Eingewöhnungsphase von einer Woche zur Akklimatisierung an die Bedingungen des Tierstalls ermöglicht. Die Tiere wurden einzeln pro Käfig bei freiem Zugang zu Wasser und Futter (tAltromin R10, Standardqualität) gehalten. In dem klimatisierten Tierstall herrschte eine konstante Temperatur von 24°C und ein künstlicher 12 Std.-Tag/Nacht-Rhythmus.

4.2.1.1 Typ 1-Diabetes Ratten

Als Typ 1-Diabetes-Äquivalent wurde der Ratten-Stamm Sprague-Dawley (SD, Charles River, Sulzfeld, Deutschland, 280-300 g Körpergewicht (KG)) mit Streptozotocin (STZ; Sigma, München, Deutschland) behandelt. STZ ist ein Antibiotikum, welche von *Streptomyces acromogenes* gebildet wird, das selektiv auf β -Inselzellen des Pankreas wirkt und einen chemisch-toxischen Diabetes induziert (O'Donnell *et al.*, 1988). Das STZ-Modell ist das meist angewandte Modell, um kardiovaskuläre und neuropathische Komplikationen des Typ 1-Diabetes zu untersuchen. 10 SD-Ratten erhielten einmalig eine auf das Körpergewicht bezogene Dosis STZ von 65 mg/kg KG. Gelöst in 0,05 M Natrium-Zitrat-Puffer (pH 4,5) wurde die Menge intraperitoneal (i.p.) injiziert. Innerhalb von 24 Std. entwickelten die Tiere einen hyperglykämischen Zustand (*siehe Abbildung 4*). Die Kontrollgruppe (n=10) erhielt zur gleichen Zeit eine entsprechende Menge reinen 0,05 M Natrium-Zitrat-Puffers (Vehikel). Aufgrund der

geringen Stabilität wurden die Lösungen unmittelbar vor Gebrauch in abgedunkelten Gefäßen angesetzt. Für die Dauer des Versuches wurde im 24 Std.-Intervall die Trinkmenge der Ratten und jeden zweiten Tag das Körpergewicht protokolliert. Erhöhte Blutzuckerspiegel sowie erhöhte Trinkmengen bei geringer oder fehlender KG-Zunahme wurden als Bestätigung eines induzierten Typ 1-Diabetes bewertet. Am 17.Tag nach der Injektion wurden die Tiere durch eine i.p. Gabe Pentobarbital-Natrium (60 mg/kg KG) betäubt und anschließend dekaptiert. Das Blut wurde zur Bestimmung der Plasmaspiegel von Glukose, Insulin und Leptin asserviert und die Organe isoliert. In einer zweiten unabhängigen Versuchsreihe wurden identische Experimente zur Gewinnung von Gewebe für Proteinanalysen im Western-Blot-Verfahren durchgeführt.

Eine Gruppe von STZ-D Ratten (n=10) wurde unter Insulin-Behandlung gehalten. Ab dem zweiten Tag der oben beschriebenen STZ-Injektion wurde den Tieren täglich zwischen 17.00 und 18.00 Uhr 20-22 IU Insulin intramuskulär (i.m.) substituiert (Humaninsulin-Basal-NPH 40, Lilly GmbH, Gießen, Deutschland). (Serino *et al.*, 1998). Zuvor wurde jeweils die aktuelle Glukose-konzentration im Plasma bestimmt. Für eine ungehinderte Blutentnahme wurde diesen Ratten 2-3 Tage vor Versuchsbeginn ein Arteria-Femoralis-Katheter gelegt. Bei der Implantation des Arteria-Femoralis-Katheters wurde gemäß der Beschreibung von Qadri (1999a) und Bäurle (Bäurle, Doktorarbeit 2002) erfahren. Der Katheter wurde nach jeder Blutentnahme mit 0,5 ml NaCl gespült. Am 14. Tag nach der Injektion wurden die Tiere wie oben beschrieben betäubt und dekaptiert. Noch am selben Tag wurde Blut asserviert und die Gewebeentnahme durchgeführt.

4.2.1.2 Typ 2-Diabetes Ratten

a) ZDF-Ratten:

10 Wochen alte *Zucker diabetic fatty* (ZDF)-Ratten (ZDF/Gmi-fa/fa) von Genetic Models Inc. (Indiana, IN, USA) dienten als Modell des Typ 2-Diabetes. Diese Ratten werden 4 Wochen speziell energiereich ernährt (Purina 5008, Purina Mills) und entwickeln daraufhin spontan eine Form des Insulin-unabhängigen Diabetes (NIDDM). Nach vier Wochen zeichnen sie sich durch Hyperglykämie (Plasma-Glukosespiegel >500 mg/dl), Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und Hyperlipidämie aus. Als entsprechende Kontrolltiere wurden ZDF-Kontrollratten

(ZDF/Gmi-fa/+) verwendet. Diese bleiben unter der speziell energiereichen Nahrung euglykämisch (Plasma-Glukose 150 mg/dl).

b) Obese-Ratten

12 bis 13 Wochen alte männliche, genetisch fettleibige Zucker-Ratten (*genetically obese Zucker-rats; (fa/fa)*, Obese-Ratten) ähneln dem menschlichen übergewichtigen Typ 2-Diabetes. Dem Stoffwechselleiden der Obese-Ratte liegt eine Aminosäure-Mutation in der extrazellulären Domäne des Leptin-Rezeptors mit autosomal-rezessivem Erbgang zugrunde. Hauptsymptom ist die Fettleibigkeit mit übermäßiger Nahrungsaufnahme. Außerdem bestehen eine Glukoseintoleranz mit Hyperinsulinämie und Insulinresistenz sowie eine Überaktivität der HHN-Achse. Verglichen wurden die Tiere mit den entsprechenden schmalen Kontrolltieren (*lean-littermate, fa/+ oder +/+*). Beide Versuchstiergruppen wurden aus Harlan (London, Großbritannien) bezogen.

4.2.2 Experimentelle Protokolle

Typ 1-Diabetes

	SD (Kontrolle)	STZ-D	STZ-D + Insulin
Tag: -2	Bestimmung des KGs, Legen eines Arteria-Femoralis-Katheters		
Tag: -1	Blutentnahme (BE, 100 µl) zur Blutzucker (BZ)-Bestimmung, anschließend Spülen mit 100 µl 0,9%iger NaCl-Lösung		
Tag: 0	i.p. Vehikel-Injektion (Natrium-Citrat-Puffer)	i.p. STZ-Injektion (65 mg/kg KG)	i.p. STZ-Injektion (65 mg/kg KG)
Tag: 1-13	tägliche Messung von BZ, Trinkmenge und KG		entsprechende Insulin-Substitution (i.m.)
Tag: 14	Narkose mit Pentobarbital (60 mg/kg KG); BE zur Bestimmung von Plasma-Glukose,-Insulin,-Leptin,-ACTH, -Kortikosteroid und -Aldosteron; Dekapitierung: Entnahme von Gehirn, Hypophyse und Nebenniere		

Typ 2-Diabetes

a) ZDF-Ratten:

	ZDF-Kontrolle (ZDF/Gmi-fa/+)	ZDF (ZDF/Gmi-fa/fa)
Tag: -1	Bestimmung des KGs	
Tag: -1-28	Fütterung mit speziell energiereicher Nahrung	
Tag: 29	Narkotisierung mit Pentobarbital (60 mg/kg KG); BE zur Bestimmung von Plasma-Glukose, -Insulin und -Leptin; Dekapitierung: Entnahme von Gehirn, Hypophyse und Nebenniere	

b) Obese-Ratten:

	Lean (Kontrolle, fa/+ oder +/+)	Obese (fa/fa)
Tag: -1	Bestimmung des KGs	
Tag: -2 -7	Akklimationierung an Bedingungen des Tierstalls	
Tag: 8	Narkotisierung mit Pentobarbital (60 mg/kg KG); BE zur Bestimmung von Plasma-Glukose, -Insulin und -Leptin; Dekapitierung: Entnahme von Gehirn, Hypophyse und Nebenniere	

4.2.3 Bestimmung von peripheren Plasmaspiegeln

Die Messung des Plasmaspiegel für Glukose wurden mittels eines automatischen „Glukometer Elite XL“ (Bayer, Leverkusen, Deutschland) durchgeführt. Die Insulin- und Leptin-Spiegel wurden aus dem asservierten Plasma nach konventionellen Bedingungen im enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) ermittelt (Linco, Missouri USA und ICN Biochemicals GmbH, Deutschland). Zusätzlich wurden die Plasmaspiegel für ACTH, Kortikosteroid und Aldosteron mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt.

4.2.4 Gewebeentnahme für die mRNA- und Protein-Bestimmung

Die Präparation des Gehirns erfolgte nach einer von Palkovits und Brownstein (1992) vorgestellten Anleitung. Der Schädelknochen wurde entfernt, das Gehirn

entnommen und auf die Dorsalseite gelagert. In dieser Position wurden zwei vertikale Koronarschnitte durchgeführt: einer durch den Körper des Chiasma opticum, tangential zu den Tubercula olfactorii, und ein zweiter direkt hinter dem Infundibulum. Die entstandene koronare Gehirnscheibe wurde mit der rostralen Fläche nach oben gelegt. Mit einem Schnitt entlang der perihypothalamischen Sulci und einem Horizontalschnitt unmittelbar unterhalb der Commissura anterior konnte der Hypothalamus als Block entnommen werden (*Abbildung 3*). Dieser beinhaltet fast alle großen hypothalamischen Kerngebiete: Nucleus (Ncl.) paraventricularis, supraopticus, suprachiasmaticus, periventricularis, anterior, arcuatus und einen Teil des lateralen und posterioren Hypothalamus. Die Hypophyse wurde als Ganzes vorsichtig aus der Sella turcica gelöst. Zur Präparation der Nebennieren wurde der Bauchraum eröffnet, die Nebenniere entnommen und von perirenalem Fettgewebe befreit. Alle Gewebe wurden unverzüglich in -30°C kaltem Isopentan schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zum Tage der Aufarbeitung gelagert.

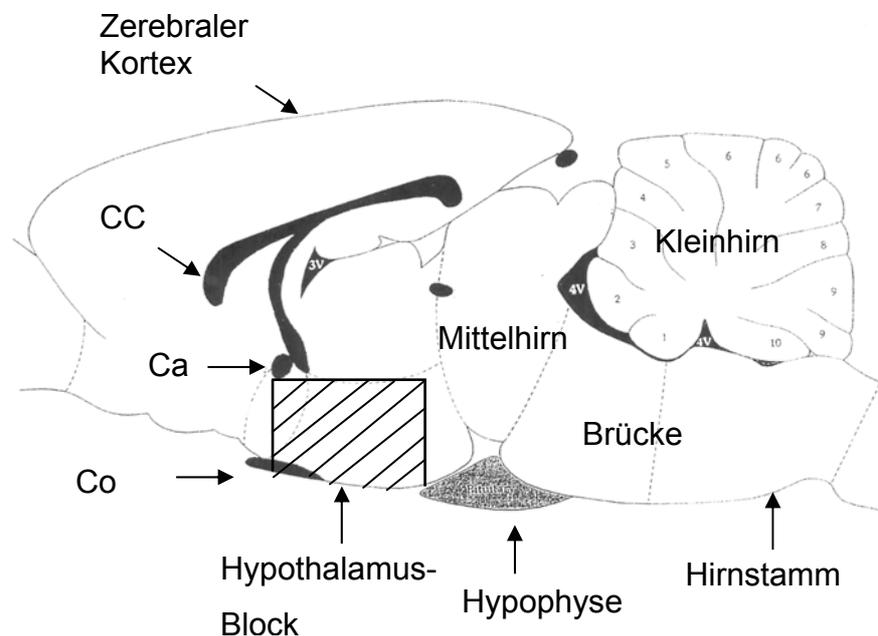


Abbildung 3:

Schematische Darstellung des Rattenhirns im sagittal-medianen Schnitt. Abkürzungen: Ca, Commissura anterior, CC, Korpus callosum; Co, Chiasma opticum (nach Qadri et al. 2003)

4.2.5 Gewebepreparation für die Polymerasekettenreaktion mit der Reversen Transkriptase (RT-PCR)

Die tiefgefrorenen Gewebe wurden mit Hilfe eines Homogenisators (Ultra-Turrax®, IKA Analysetechnik GmbH, Staufen, Deutschland) für die RNA-Isolierung vorbereitet. Alle Gewebe wurden 45-60 Sek. lang in einem Guanidiniisothiocyanat- und 14,5 M β -Mercaptoethanol-haltigen Lyse-Puffer (RLT-Puffer®; Qiagen-RNeasy® Mini Kit) aufgeschlossen und homogenisiert. Die Gesamt-RNA der homogenisierten Gewebe wurde unter Verwendung des kommerziellen RNeasy® Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) in Anlehnung an die Herstellerangaben in dem dazugehörigen Handbuch aufbereitet. Dabei wird die Gesamt-RNA in Anwesenheit von chaotropen Substanzen in sogenannten Spin-Columns an Silikagel-Partikel gebunden, gereinigt, mit DNAase 1 behandelt und schließlich mit RNAase-freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration des erhaltenen Eluats wurde photometrisch (BIO-RAD, Smart Spec™ 3000, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) gemessen. Gleichzeitig wurde die Reinheit der Extrakte durch Bestimmung des A260/A280-Quotienten geprüft. Dabei entspricht die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in reinem Wasser einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Die bestimmten A260/A280-Quotienten lagen im Gültigkeitsbereich bei $1,9 \pm 0,1$.

4.2.6 Durchführung der RT-PCR

Die extrahierte RNA wurde unter Verwendung einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) aus dem Avian Myeloblastosis Virus (AMV) in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) überschrieben (Promega Corp RT-Kit, Mannheim, Deutschland). Zum Ausschluss von möglichen Kontaminationen durch genomische DNA wurden matrizenfreie Ansätze, bzw. Kontrollen ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Mit Hilfe der von Mullis *et al.* (1986) entwickelten PCR wurde die aus der RT-Reaktion resultierende cDNA qualitativ auf das Vorhandensein von BK-Rezeptor- und NOS-DNA-Fragmenten untersucht und selektiv vervielfältigt. Als interner Standard diente β -Aktin.

Die zur Vervielfältigung der DNA-Fragmente benötigten Primer wurden mit Hilfe der Primer3 Software von S. Rozen und H.J. Skaletsky ausgewählt (<http://www->

genome.wi.mit.edu/genome-software/other/primer3.html). Hierbei wurde auf eine einheitliche Länge von 20 bp mit einem ausgeglichenen Verhältnis von Purin- zu Pyrimidinbasen und ähnliche Hybridisierungstemperaturen geachtet. Alle Primer wurden von Life Technologies GmbH (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Eine tabellarische Übersicht der Primersequenzen befindet sich im Anhang unter 9.1.11. Die Reaktionsbedingungen einschließlich des Temperaturprofils, der Anzahl der Zyklen und der MgCl₂-Konzentrationen wurden für jedes Primerpaar gesondert experimentell optimiert (siehe *Tabelle 6 und 7* im Anhang unter 9.1.8).

Die Amplifikationsreaktion im Temperatur-Gradient-Thermoblock (Biotron GmbH Göttingen, Deutschland) gliederte sich in folgende Schritte:

- Schritt 1: initiale Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA) bei 95°C für 1 Min.
- Schritt 2: Primer-Bindung bei einer Primer-spezifischen Temperatur für 1 Min.
- Schritt 3: Synthese des DNA-Abschnittes mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase und unter Anwesenheit aller vier Nukleotide bei 72°C für 30 sec

In einer anschließenden Gelelektrophorese wurde das Gemisch aus 12,5 µl des PCR-Endprodukts mit 2,5 µl Ladebuffer in einem 2,0%-igen Agarosegel aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden mit Ethidiumbromid gefärbt und durch UV-Transillumination im Gel sichtbar gemacht und zur Dokumentation photographiert. Als Größenstandard diente eine 100-Basenpaar (bp)-DNA-Leiter der Firma Gibco. Die Bandenstärke wurde unter Verwendung der ScanImage-Software quantitativ ausgewertet und zur jeweiligen Bandenstärke der Referenz (β-Aktin) in Relation gesetzt. Somit werden in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse als „Relative Intensitäten“ zu β-Aktin angegeben. Unter 9.1.10 sind die PCR-Gel-Bilder dieser Arbeit einzeln abgebildet.

Anhand von Restriktionsanalysen wurde die Spezifität der PCR-Reaktion überprüft. Über eine interne Schnittstelle der zuvor amplifizierten DNA-Sequenz lieferten sie zwei DNA-Fragmente (*Abbildung 6*).

4.2.7 Gewebepvorbereitung für die Proteinanalyse mittels Western Blot-Verfahrens

4.2.7.1 Homogenisation der Gewebe

Für das Western Blot-Verfahren wurde das zu untersuchende Gewebe im Verhältnis von 1:5 mit Extraktionspuffer in einem 2 ml Glashomogenisator für 60 Sek. lysiert. Anschließend wurde das Homogenisat 10 Min. bei 4°C und 10000×g (Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde mit im Natrium-Dodecylsulphat (SDS)-Probenpuffer (4-fach) und 0,1 mM β-Mercaptoethanol gemischt und bei 98°C für 10 Min. auf einem Heizblock denaturiert. Danach wurden die Proben für 30 Min. mit 14000×g bei 4°C zentrifugiert und die Lipidphase verworfen. Die so gewonnenen Proteinextrakte wurden portioniert und bei -80°C gelagert.

4.2.7.2 Gesamtproteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung des Gesamt-Eiweißgehaltes der Proteinextrakte wurde nach dem Protokoll von Lowry *et al.* (1951) durchgeführt. Proteine bilden mit einer alkalischen Cu²⁺-Reagenz eine Verbindung, welche in der Lage ist die Folin-Reagenz zu reduzieren. Die durch Reduktion der Folin-Reagenz resultierende Blaufärbung wurde bei einer Wellenlänge von 750 nm mit dem UV-Spektrometer bestimmt. Parallel dazu wurde eine Verdünnungsreihe aus einer Rinderalbumin-Stammlösung (1 mg/ml) zur Ermittlung der Eichkurve hergestellt (20 µg/ml bis 200 µg/ml) und deren Extinktionswerte in Doppelbestimmungen gemessen. Anhand dieser Eichreihe ließ sich der Eiweißgehalt der Extrakte unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnen.

4.2.8 Western Blot-Analyse

4.2.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das auf Towbin *et al.* (1979) zurückgehende Verfahren erlaubt die Identifizierung und Quantifizierung bestimmter Protein-Antigene in komplexen Gemischen. Zur Auftrennung des zu untersuchenden Proteingemisches wurde zunächst eine denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli und seinen

Mitarbeitern (1970) durchgeführt. Das 2-Komponenten-Gel, bestehend aus einem 7,5%igen Sammelgel und einem 5%igen Trenngel, diente der optimalen Auftrennung der Proteinsuspension. Die Pufferzusammensetzung zur Herstellung von 7,5%igen SDS-Gelen befindet sich im Anhang auf Seite 76. Die Elektrophorese wurde mit konstanter Spannung von 200V für 30 Min. durchgeführt. Unter diesen Bedingungen erfolgt die Auftrennung der SDS-Protein-Komplexe näherungsweise nach ihrem Molekulargewicht. Durch den Einsatz eines Markers (Protein-Molekular-Weight-Marker) mit standardisierten Proteinbanden konnte die erfolgreiche Auftrennung der Proben im SDS-Polyacrylamidgel visualisiert und gleichzeitig die molekulare Masse der Proteine kalkuliert werden.

4.2.8.2 Protein-Transfer und Immunodetektion

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry-Verfahren (Blotapparatur von Amersham Pharmacia, San Francisco, USA) auf eine Nitrocellulose-Membran (5 × 8 cm) elektrotransferiert (3h, 50V, 50mA, 2,5W) und somit immobilisiert.

Zur Reduktion von unspezifischen Antikörper (AK)-Bindungen wurden zunächst potentiell irrelevante Bindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran mit fettfreier Trockenmilch (5%) geblockt. Anschließend folgte die immunologische Detektion der immobilisierten Proteinbanden. Für jeden eingesetzte primären AK (anti-B₂-Rezeptor, -nNOS, -iNOS) wurde die optimale Konzentration bestimmt. Nach viermaligem Waschen mit PBS und 0,1% Tween wurden die Membranen mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundär-AK in optimaler Verdünnung inkubiert. Im Einzelnen sind die Verdünnungen der eingesetzten Primär- und Sekundär-AK der *Tabelle 6 und 7* im Anhang auf Seite 75 zu entnehmen. Überschüssiger AK wurde in vier 10-minütigen Waschschritten mit PBS-Tween-Puffer entfernt.

Der Nachweis der spezifischen AK-Bindung erfolgte mit Hilfe des "Enhanced Chemiluminescence"-Kits von Amersham (ECL Western blotting detection reagents). Zur Detektion des entstandenen Lumineszenzsignales wurde ein Röntgenfilm für 1 bis 5 Min. belichtet und entwickelt. Die Dichte-Auswertung der Blot-Banden erfolgte über das Programm Scion Image (Scion Imaging Software, Scion Corporation, Maryland, USA) am Computer.

Die Western Blot-Analysen wurden nur für diejenigen Gewebe durchgeführt, bei denen ein signifikanter Unterschied der jeweiligen mRNA-Expression zwischen STZ-D Ratten und Kontrollratten aufgefallen war. Daher sind in dieser Arbeit Untersuchungen zur Protein-Expression des B₁-Rezeptors und der eNOS nicht aufgeführt.

4.2.9 Statistische Auswertung

In allen Versuchen wurden aus den Einzelwerten die arithmetischen Mittelwerte gebildet. Diese sind mit den entsprechenden mittleren Fehlern (SE; Standardfehler) sowie dem Stichprobenumfang in Graphiken und Tabellen angegeben. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mittels Varianzanalyse und nachfolgendem t-Test nach Student für unverbundene Stichproben geprüft. Wenn die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% verworfen werden konnte, wurden diese als statistisch signifikant betrachtet.

Statistische Berechnungen und die graphische Darstellung der Daten erfolgten unter Zuhilfenahme des Programms GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

5 Ergebnisse

5.1 TYP-1 Diabetes

5.1.1 Periphere Parameter der Typ 1-Diabetes Ratten

Alle Ratten starteten in dem Versuch mit einem ähnlichen Gewicht (265 ± 15 g). Bei den Typ 1-Diabetes Tieren konnte im Verlauf eine signifikant geringer ausfallende Zunahme des Körpergewichtes beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit einem Endgewicht von 347 ± 5 g wurde für die STZ-D Ratten nach 17 Tagen ein durchschnittliches Körpergewicht von 297 ± 7 g gemessen. Es lag damit um 14,2% unter dem der Kontrollgruppe. Auch unter Insulin-Behandlung wurde das mittlere Gewicht der Kontrollgruppe von den STZ-D Ratten nicht wieder erreicht. Als weiterer Parameter wurde die tägliche Trinkmenge dokumentiert. Innerhalb der ersten Woche der Beobachtungsphase stieg der tägliche Flüssigkeitsbedarf in den Typ 1-Diabetes Ratten von durchschnittlich 38 ± 2 ml auf 172 ± 11 ml. Zum Versuchsende war die tägliche Trinkmenge der Versuchsgruppe gegenüber der Wasseraufnahme der Kontrollratten auf über 400% signifikant erhöht (199 ± 14 ml vs. 39 ± 2 ml Kontrolle, $***p < 0,0001$).

Für jede Gruppe wurden im Plasma die Konzentrationen für Glukose, Insulin und Leptin bestimmt. Wie erwartet lag in der Kontrollgruppe die Glukose-Plasmakonzentration aller Versuchstiere im Normbereich. Die Typ 1-Diabetes-Ratten hingegen entwickelten bereits 24 Std. nach der STZ-Injektion pathologisch erhöhte Glukose-Plasmaspiegel von über 350 mg/dl (*Abbildung 4*).

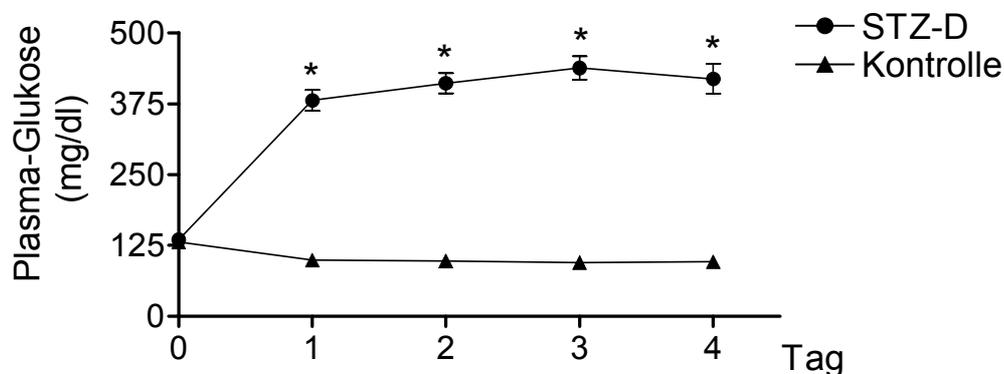


Abbildung 4:

Verlauf der Plasma-Glukose-Spiegel in STZ-D und Kontrollratten nach der einmaligen STZ-, bzw. Vehikel-Injektion. Die Messwerte sind als Mittelwert \pm SE vs. Kontrolle dargestellt (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle).

Zum Versuchsende war die Glukose-Konzentration im Plasma von STZ-D Ratten konstant auf den 3-fachen Wert der Kontrollratten angehoben (462 ± 14 mg/dl vs. 157 ± 5 mg/dl Kontrolle, $*p < 0,05$). Unter der durchgeführten Insulin-Ersatztherapie konnte diese Abweichung auf euglykämische Normalwerte korrigiert werden. Die Insulin- und Leptin-Plasmaspiegel von STZ-D Ratten fielen signifikant geringer als in den entsprechenden Kontrolltieren aus. Alle Daten der erhobenen Parameter sind im Detail in der *Tabelle 1* dargestellt.

Parameter	Kontrolle n = 10	STZ-D n = 10	STZ-D+Insulin n = 9
Körpergewicht (g)	347 ± 5	$297 \pm 7^*$	$294 \pm 4^*$
Trinkmenge (ml/d)	39 ± 2	$199 \pm 14^{***}$	$46 \pm 2\ddagger$
Plasma-Glukose (mg/dl)	157 ± 5	$462 \pm 14^{***}$	$170 \pm 6\ddagger$
Plasma-Insulin (μ g/l)	$2,5 \pm 0,4$	$0,3 \pm 0,2^{***}$	$2,2 \pm 0,5\ddagger$
Plasma-Leptin (μ g/l)	$4,2 \pm 0,5$	$0,5 \pm 0,0^{***}$	$2,5 \pm 0,8\ddagger$

Tabelle 1:

Körpergewicht, tägliche Trinkmenge, Plasma-Spiegel für Glukose, Insulin und Leptin in STZ-induzierten Diabetes Ratten und entsprechenden Kontrollratten.

*Die Messwerte sind als Mittelwert \pm SE dargestellt ($*p < 0,05$ und $***p < 0,001$ vs. Kontrolle, $\ddagger < 0,001$ vs. STZ-D).*

Parallel dazu wurden am letzten Versuchstag in den drei Rattengruppen die Hormonspiegel der HHN-Achse (ACTH, Kortikosteron und Aldosteron) ermittelt. Bezüglich des Plasma-ACTH-Spiegels ließen sich in den einzelnen Versuchsgruppen keine Veränderungen nachweisen. Die Hormone der Nebennierenrinde – Kortikosteroid und Aldosteron – zeigten hingegen in den STZ-D Ratten gegenüber den Kontrolltieren einen signifikanten Anstieg, der unter Insulinersatz auf Normalwerte berichtigt werden konnte (*Abbildung 5*).

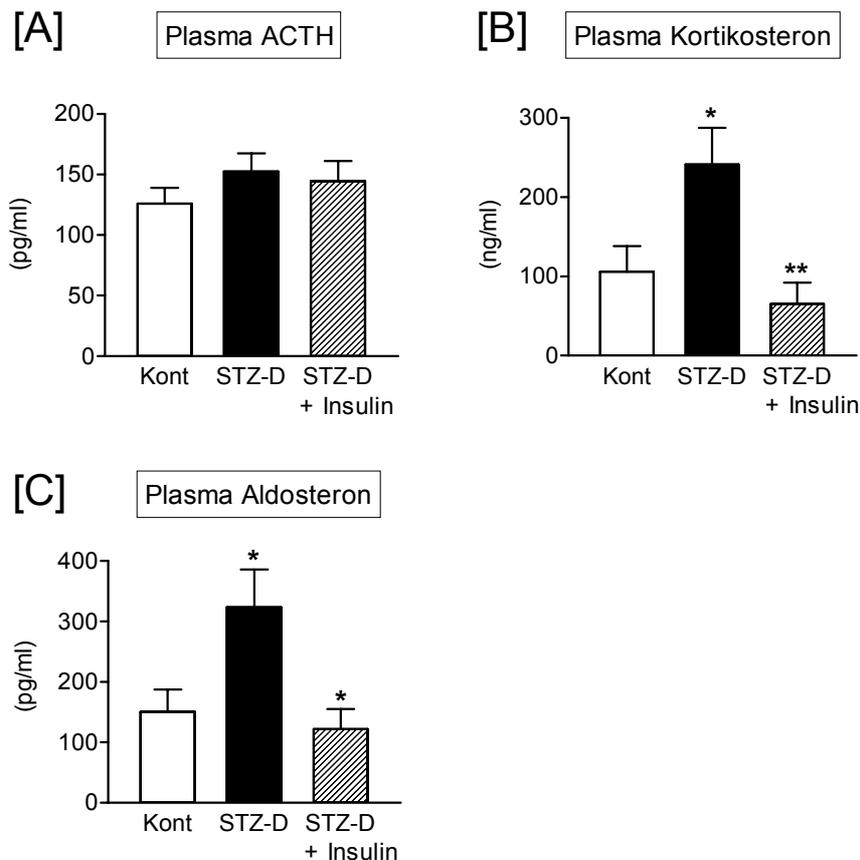


Abbildung 5:

Plasmaspiegel der Hormone der HHN-Achse in STZ-D- und Kontrollratten. Dargestellt sind die Konzentrationen für ACTH [A], Kortikosteroid [B] und Aldosteron [C] im Plasma. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle; $n = 8-10$ Ratten je Versuchsgruppe).

Abkürzungen: STZ-D, Streptozotocin-induzierte Diabetes Ratte; Kont, Kontrolle

5.1.2 Bestimmung der Genexpression der Kinin-B₁- und B₂-Rezeptoren auf transkriptionaler Ebene in Geweben der HHN-Achse von STZ-D Ratten

Mittels des RT-PCR-Verfahren wurde in den Organen der HHN-Achse der mRNA-Gehalt für die Kinin-B₁- und B₂-Rezeptoren bestimmt. Parallel wurde bei jeder Erstanalyse einmalig die Spezifität der PCR-Reaktion anhand von Restriktionsanalysen für die verwendeten Primer überprüft (Abbildung 6).

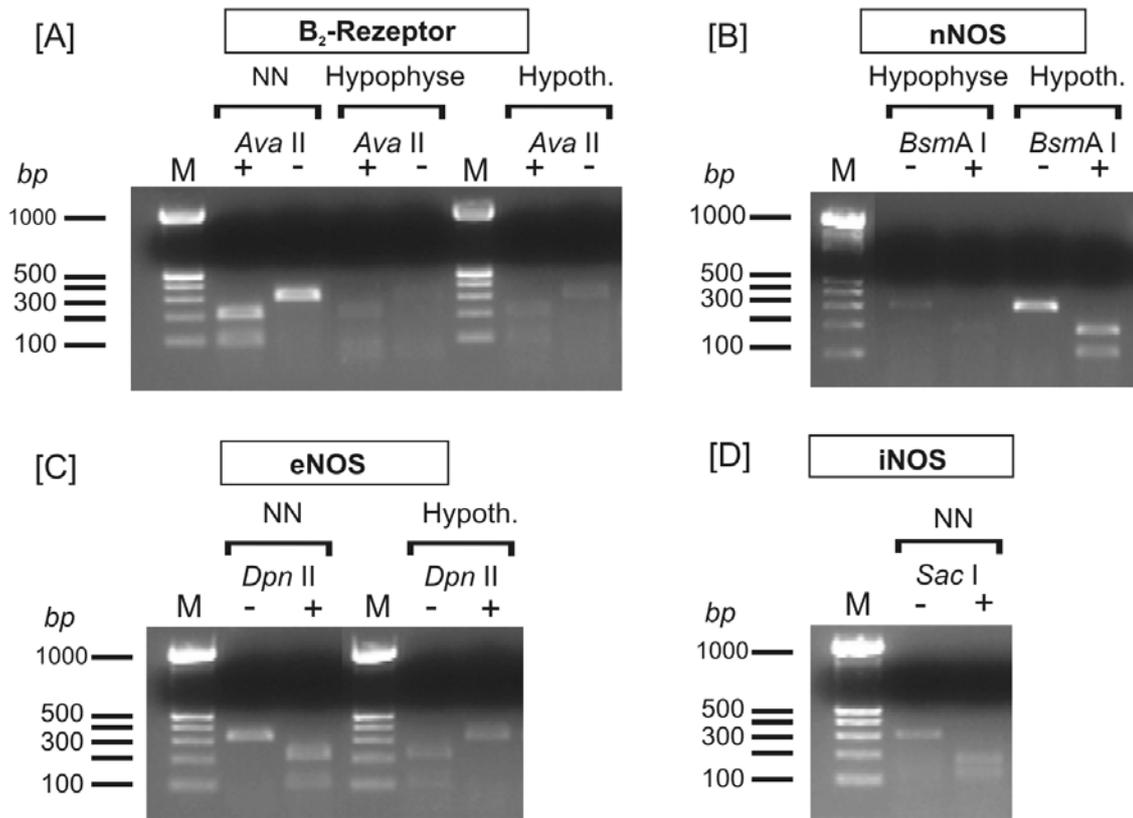


Abbildung 6:

Ergebnis der Restriktionsverdauung mit *Ava II*, *BsmA I*, *Dpn II* und *Sac I* für die amplifizierten PCR-Produkte des B_2 -Rezeptors [A], der nNOS [B], eNOS [C] und iNOS [D]. Dargestellt ist jeweils ein Spurenpaar; (+) repräsentiert das Inkubationsgemisch mit und (-) das Gemisch ohne Enzymzusatz.

Abkürzungen: bp, Basenpaare; Hypoth., Hypothalamus; M, DNA-Standard; NN, Nebenniere

Alle erhobenen Werte wurden auf die in den jeweiligen Geweben vorhandene β -Aktinmenge bezogen und ausgewertet. Die zugehörigen Rohdaten aller Experimente sind in Form von PCR-Gel-Bildern der Übersicht halber gänzlich im Anhang auf Seite 80 abgebildet. Dies gilt auch für die RT-PCR-Versuche zur Expression der NO-Synthase an Typ 1-Diabetes Ratten (Seite 81) sowie die entsprechenden Untersuchungen an Typ-2 Diabetes Tieren (Seite 82-83).

Weder im Hypothalamus noch in der Hypophyse ließen sich Transkripte des B_1 -Rezeptors nachweisen. Nur in der Nebenniere konnte B_1 -Rezeptor-mRNA detektiert werden (Abbildung 7 A). Diesbezüglich zeigten sich zwischen den erkrankten und gesunden Ratten keine Unterschiede ($0,38 \pm 0,03$ vs. $0,36 \pm 0,02$ Kontrolle).

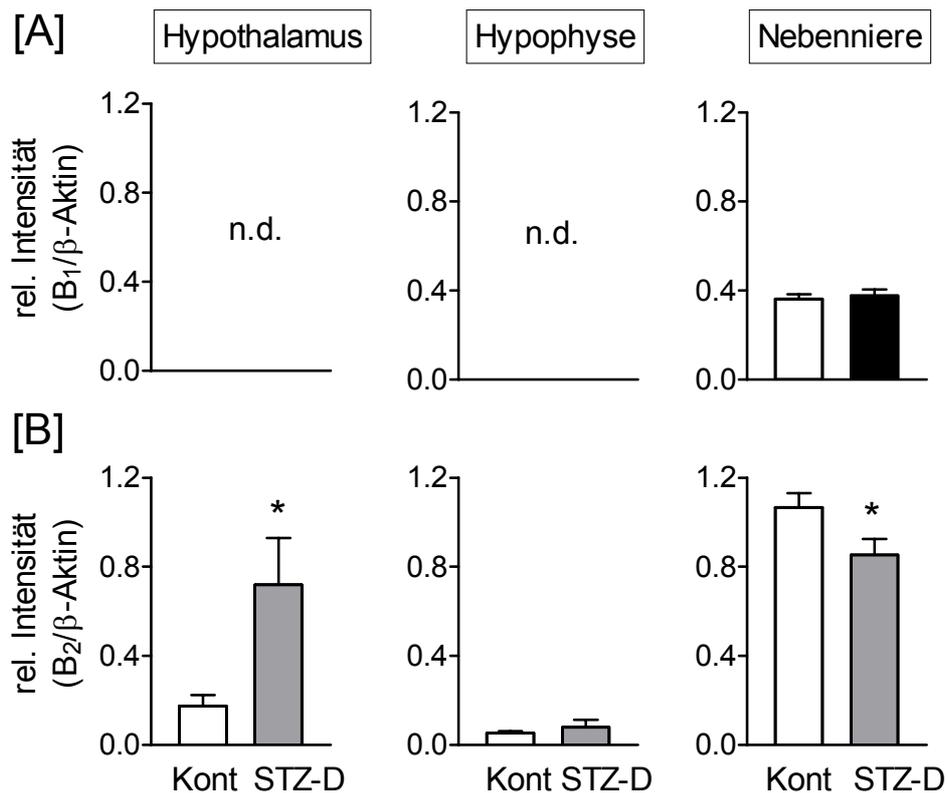


Abbildung 7:

Bestimmung der Kinin-Rezeptor-mRNA-Menge in der HHN-Achse von STZ-D- und Kontrollratten. Dargestellt ist die „relative Intensität“ der B₁- [A] und B₂-Rezeptor-mRNA-Menge [B] im Verhältnis zu β-Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SE angegeben (**p*<0,05 vs. Kontrolle; *n*=10 Ratten je Versuchsgruppe).

Abkürzungen: n.d., nicht detektierbar; STZ-D, Streptozotocin-induzierte Diabetes Ratte; Kont, Kontrolle

Hingegen konnte auf allen drei Ebenen der HHN-Achse mRNA des B₂-Rezeptors nachgewiesen werden (Abbildung 7 B). Von den untersuchten Organen war die höchste Genexpression in der Nebenniere lokalisiert. Hier bewirkte die STZ-Injektion in den Tieren eine signifikant schwächer ausgeprägte Expression des B₂-Rezeptorgens (0,85±0,07 vs. 1,07±0,07 Kontrolle). In der Hypophyse wurde nur in sehr geringem Maße B₂-mRNA exprimiert und zwischen den Versuchstiergruppen war kein Unterschied festzustellen (0,05±0,02 vs. 0,05±0,01 Kontrolle). Im Hypothalamus dagegen fanden sich wieder merkliche Differenzen des Gehaltes an der B₂-Rezeptor-mRNA in den STZ-D Ratten gegenüber den Kontrolltieren. Die gemessenen B₂-Transkripte der Typ 1-Diabetes-Tiere übertrafen den Wert der Kontrollratten um ein 3-faches (0,615±0,153 vs. 0,174±0,05 Kontrolle, ***p*<0,01).

Zur Analyse des Einflusses einer Insulin-Behandlung auf die Genexpression der Kinin-Rezeptoren in STZ-D Ratten wurde die mRNA in allen Geweben bestimmt, in denen vorher ein signifikanter Unterschied zwischen STZ-D Ratten und Kontrollratten nachgewiesen worden war. Sowohl im Hypothalamus als auch in der Nebenniere bewirkte die Insulin-Behandlung in den STZ-D Ratten keine signifikante Veränderung des mRNA-Gehaltes und eine Korrektur auf Werte der Kontrollratten blieb aus (Abbildung 8).

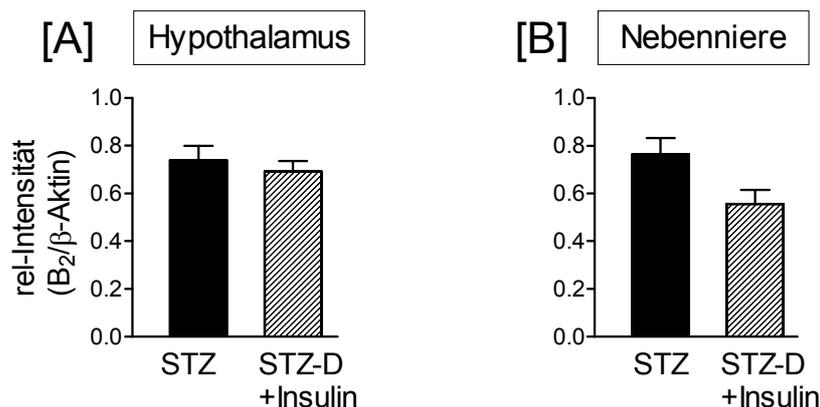


Abbildung 8:

Einfluss der Insulin-Ersatztherapie in STZ-D Ratten auf die Menge der B₂-mRNA im Vergleich zu nicht-behandelten STZ-D Ratten. Dargestellt ist im Hypothalamus [A] und der Nebenniere [B] die „relative Intensität“ der B₂-Rezeptor-mRNA-Menge im Verhältnis zu β-Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SE angegeben (n=8-10 Ratten je Versuchsgruppe).

Abkürzungen: STZ-D, Streptozotocin-induzierte Diabetes Ratte; Kont, Kontrolle

5.1.3 Bestimmung der Proteinmenge der Kinin-B₁- und B₂-Rezeptoren in Geweben der HHN-Achse von STZ-D Ratten

Um den Einfluss der erhobenen Daten auf die jeweilige Proteinexpression zu prüfen, wurden für Gewebe, bei denen ein deutlicher Unterschied der B₂-Rezeptor-mRNA zwischen STZ-D Ratten und Kontrollratten aufgefallen war, Western Blot-Analysen angeschlossen. Als Positivkontrolle diente ein kommerzieller Hypophysenextrakt.

Gemäß den PCR-Ergebnissen wurde die Proteinmenge für den B₂-Rezeptor im Hypothalamus und in der Nebenniere bestimmt. Im Hypothalamus fiel der gemessene B₂-Proteingehalt in den STZ-D Ratten signifikant niedriger aus als in

den entsprechenden Kontrollratten (relative Bandenintensität: $118,3 \pm 19,92$ vs. $236,67 \pm 20,83$ Kontrolle, $**p < 0,01$). Hingegen war die mRNA-Menge in den STZ-D Ratten in umgekehrter Relation detektiert worden war. In der Nebenniere von STZ-D Ratten zeigte sich ebenfalls ein deutlich geringer ausgeprägter Proteingehalt des B_2 -Rezeptors im Vergleich zu den Kontrolltieren ($278,83 \pm 11,85$ vs. $206,83 \pm 21,85$ Kontrolle, $*p < 0,05$). Die Abnahme des B_2 -Rezeptor-Proteins in den STZ-D Ratten zeigte sich hier gleichsinnig mit dem Ergebnis auf mRNA-Ebene (Abbildung 9).

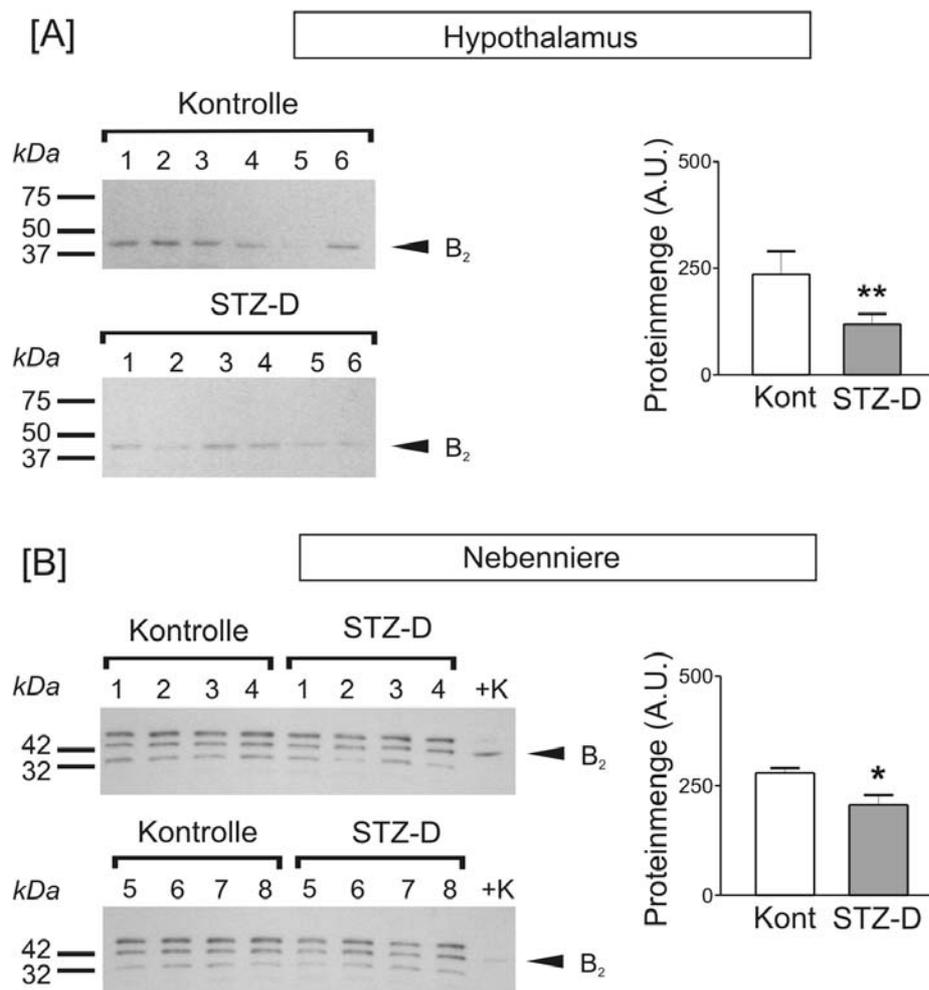


Abbildung 9:

Western Blot-Analyse zum Nachweis des B_2 -Rezeptor-Proteingehaltes im Hypothalamus [A] und der Nebenniere [B] von STZ-D- und Kontrolltieren. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n=8-10$ Ratten je Versuchsgruppe). Die linke Seite zeigt die Original-Slots, die rechte Seite die graphische Darstellung.

Abkürzungen: A.U., arbitrary unit; kDa, Kilodalton; +K, Positivkontrolle (Hypophysenextrakt); STZ-D, Streptozotocin-induzierte Diabetes Ratte

5.1.4 Bestimmung der Genexpression auf transkriptionaler Ebene der NOS-Isoenzyme in Geweben der HHN-Achse von STZ-D Ratten

Analog dem Vorgehen zur Bestimmung der Genexpression der Kinin-Rezeptoren wurde auch bei der Untersuchung der drei NOS-Isoformen (nNOS, eNOS und iNOS) das RT-PCR-Verfahren eingesetzt. Der mRNA-Gehalt der einzelnen Isoformen fiel sehr unterschiedlich hoch aus und zudem zeigte sich ein ausgeprägt gewebespezifisches Erscheinungsmuster. Auf allen Ebenen der HHN-Achse fiel der Gehalt an nNOS-mRNA-Transkripten am höchsten aus, während die iNOS-mRNA am geringsten exprimiert war.

Im Hypothalamus von STZ-D Ratten sowie nicht-diabetischen Kontrollratten konnte der höchste nNOS-mRNA-Gehalt überhaupt im Rahmen dieser Untersuchungen nachgewiesen werden. Die einmalige STZ-Injektion führte hier zu einem signifikanten Anstieg der nNOS-Transkripte ($1,8 \pm 0,11$ vs. $1,4 \pm 0,09$ Kontrolle, $*p < 0,05$). Auch in der Nebennieren der STZ-D Ratten übertraf der Gehalt an nNOS-mRNA den der Kontrolltiere ($0,27 \pm 0,07$ vs. $0,07 \pm 0,01$ Kontrolle, $*p < 0,05$). In der Hypophyse hingegen ließ sich zwischen den beiden Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied bezüglich der nNOS-Expression feststellen ($0,27 \pm 0,03$ vs. $0,36 \pm 0,05$ Kontrolle) (*Abbildung 10 A*).

Die Messung zur eNOS-Genexpression lieferten innerhalb der HHN-Achse keine signifikanten Veränderungen zwischen den STZ-D- und Kontrollratten. Der Gesamtgehalt an eNOS-Transkripten war im Hypothalamus und der Nebenniere ähnlich stark ausgeprägt und fiel damit ungefähr dreifach höher als in der Hypophyse aus (*Abbildung 10 B*).

Eine gewisse Menge an iNOS-Transkripten konnte in allen Geweben der HHN-Achse nachgewiesen werden. Im Hypothalamus und in der Hypophyse fiel der relative mRNA-Gehalt im Vergleich zu Werten aus der Nebenniere gering aus. Weder im Hypothalamus noch in der Hypophyse war für die induzierbare Isoform ein Unterschied zwischen den beiden Versuchstiergruppen fassbar. Nur in der Nebenniere der STZ-D Ratten zeigte sich ein signifikant niedrigerer iNOS-mRNA-Gehalt als in den Kontrolltieren ($0,22 \pm 0,04$ vs. $0,47 \pm 0,06$ Kontrolle, $*p < 0,05$) (*Abbildung 10 C*).

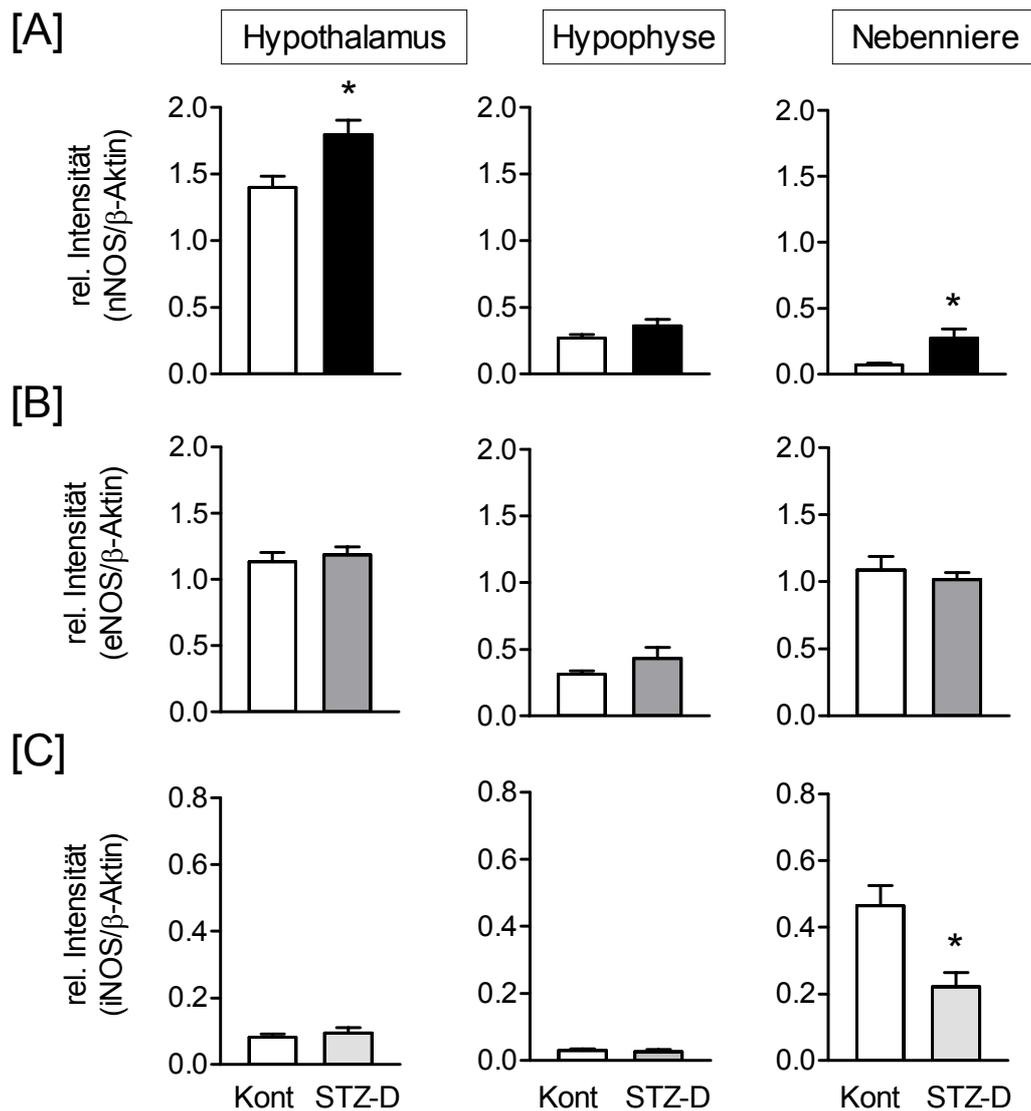


Abbildung 10:

Bestimmung der mRNA-Menge der NOS-Isoformen in der HHN-Achse von STZ-D- und Kontrollratten. Dargestellt ist die „relative Intensität“ der nNOS- [A], eNOS- [B] und iNOS- [C] mRNA-Menge im Verhältnis zu β -Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle; $n = 10$ Ratten je Versuchsgruppe)

Abkürzungen: STZ-D, Streptozotocin-induzierte Diabetes Ratte; Kont, Kontrolle

Auch für die NOS-Isoformen wurde der Einfluss einer Insulin-Behandlung in denjenigen Geweben bestimmt, wo zuvor im RT-PCR-Verfahren ein signifikanter Unterschied an NOS-mRNA-Transkripten zwischen STZ-D- und Kontrollratten gefunden worden war. Der gemessene mRNA-Gehalt war im Vergleich zu den unbehandelten STZ-D Ratten in den Insulin-substituierten STZ-D Ratten signifikant erniedrigt ($0,94 \pm 0,03$ vs. $1,14 \pm 0,05$ STZ, $*p < 0,05$). Auch in der

Nebenniere bewirkte die tägliche Insulin-Substitution bei den STZ-D Ratten eine Korrektur der nNOS-mRNA-Genexpression entsprechend den Werten in gesunden Kontrolltieren. So verringerte sich der nNOS-Gehalt unter der Insulin-Behandlung von $0,27 \pm 0,05$ auf $0,06 \pm 0,01$ ($*p < 0,05$) (Abbildung 11 A).

In Bezug auf die iNOS-Transkripte bewirkte die tägliche Insulin-Behandlung einen signifikanten Anstieg der mRNA-Mengen und damit ebenso eine Korrektur in Richtung der Werte der gesunden Kontrolltiere ($0,19 \pm 0,03$ vs. $0,11 \pm 0,01$ STZ, $*p < 0,05$) (Abbildung 11 B).

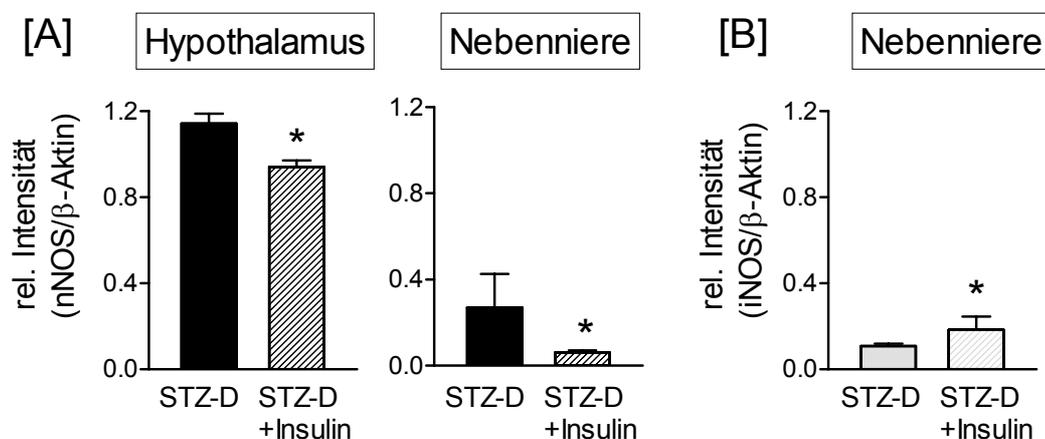


Abbildung 11:

Einfluss der Insulin-Ersatztherapie in STZ-D Ratten auf die Menge der NOS-mRNA im Vergleich zu nicht-behandelten STZ-D Ratten. Dargestellt sind im Hypothalamus und der Nebenniere die „relative Intensität“ der nNOS- [A] und iNOS-mRNA-Menge [B]. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($*p < 0,05$ vs. Kontrolle; $n = 8-10$ Ratten je Versuchsgruppe)

Abkürzungen: STZ-D, Streptozotocin-induzierte Diabetes Ratte

5.1.5 Bestimmung der Proteinmenge der NOS-Isoformen in Geweben der HHN-Achse von STZ-D Ratten

Auch für die Isoformen der NOS wurden Western Blot-Analysen angeschlossen. In Gewebeextrakten aus dem Hypothalamus und der Nebenniere wurde jeweils die Proteinmenge für nNOS und iNOS bestimmt, nachdem zuvor ein signifikanter Unterschied bezüglich der mRNA-Expression aufgefallen war. Während im Hypothalamus von STZ-D Ratten ein deutlicher Anstieg der nNOS-mRNA-Transkripte nachgewiesen worden war, bewirkte die STZ-Injektion auf Proteinebene einen signifikanten Abfall ($484,60 \pm 89,50$ vs. $380,00 \pm 50,18$ STZ-D) (Abbildung 12A). In der Nebenniere hingegen zeigte sich ähnlich den Ergebnissen auf transkriptionaler Ebene ein fünffacher Anstieg des Proteingehaltes gegenüber der Kontrollratten ($69,00 \pm 23,18$ vs. $351,67 \pm 81,92$ STZ-D, $*p < 0,05$) (Abbildung 12B).

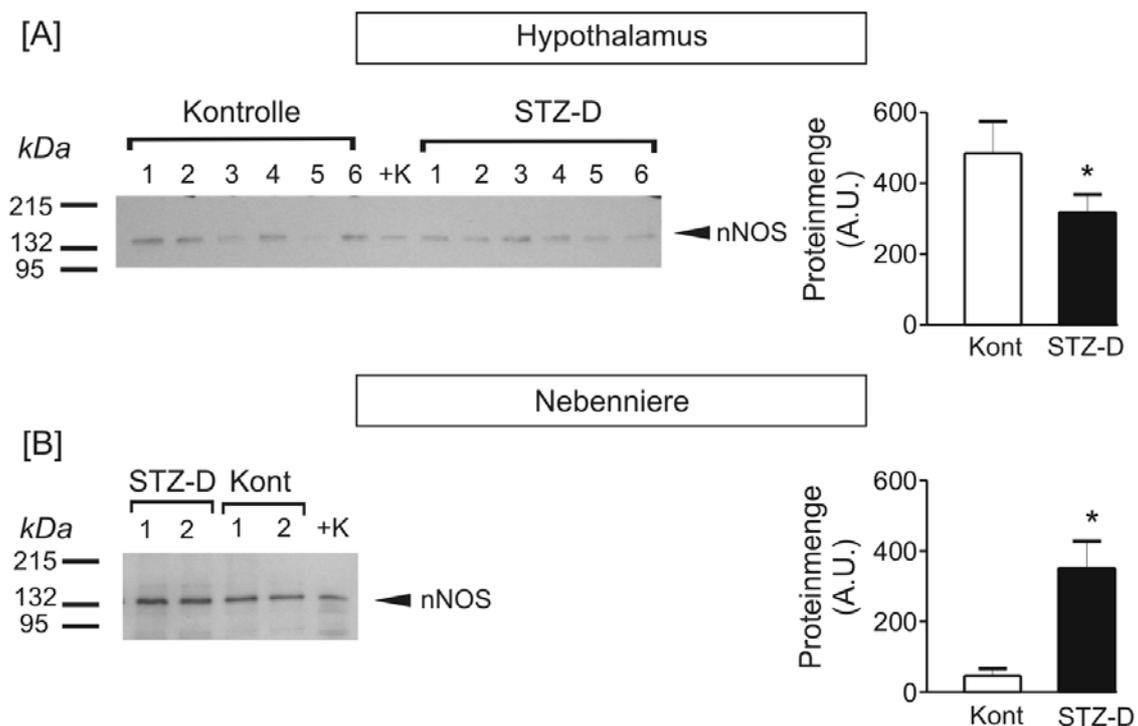


Abbildung 12:

Western Blot-Analyse zum Nachweis des nNOS-Proteingehaltes im Hypothalamus [A] und der Nebenniere [B] von STZ-D Ratten und Kontrolltieren. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n=8-10$ Ratten je Versuchsgruppe). Die linke Seite zeigt die Original-Slots und die rechte Seite die graphische Darstellung.

Abkürzungen: A.U., arbitrary unit; kDa, Kilodalton; Kont, Kontrolle; +K, Positivkontrolle (Hypophysenextrakt); STZ-D, Streptozotocin-induzierte Diabetes Ratte

Ein hochsignifikanter Unterschied konnte auch zwischen den beiden Tiergruppen in Bezug auf den iNOS-Proteingehalt in der Nebenniere nachgewiesen werden. Hier war die Proteinexpression in den STZ-D Ratten deutlich gesteigert ($355,20 \pm 74,37$ vs. $193,00 \pm 223,26$ Kontrolle, $***p < 0,001$) (Abbildung 13), obwohl die mRNA-Menge von iNOS in STZ-D Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren verringert war (siehe auch Abbildung 10 auf S.29).

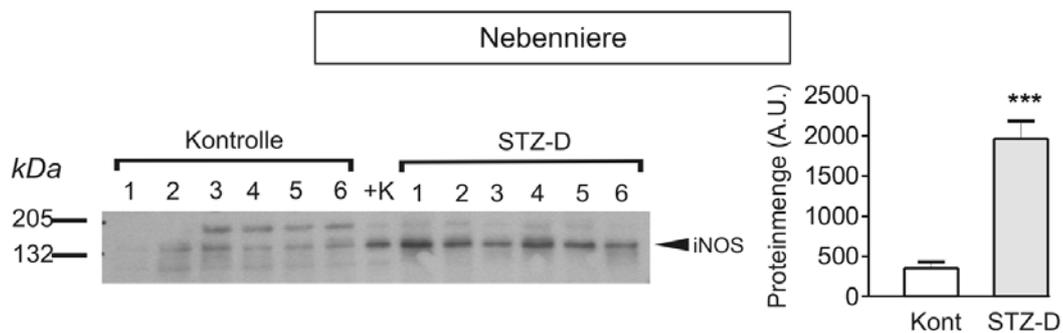


Abbildung 13:

Western Blot-Untersuchungen zum Nachweis des Proteingehaltes der induzierbaren NO-Synthase in der Nebenniere von STZ-D Ratten und Kontrolltieren. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n=8-10$ Ratten je Versuchsgruppe). Die linke Seite zeigt die Original-Slots und die rechte Seite die graphische Darstellung.

Abkürzungen: A.U., arbitrary unit; kDa, Kilodalton; Kont, Kontrolle; +K, Positivkontrolle (Hypophysenextrakt); STZ-D, Streptozotocin-induzierte Diabetes Ratte

5.2 Typ 2-Diabetes

5.2.1 Periphere Parameter der Typ 2-Diabetes Ratten

Entsprechend den Messungen in den STZ-D Ratten wurden auch in den ZDF- und Obese-Ratten periphere Parameter erhoben, um die jeweilige Energie- und Stoffwechsellage zu charakterisieren. Alle Daten wurden am Tag der Gewebeentnahme bestimmt. Das Körpergewicht der ZDF-Ratten war dem der entsprechenden Kontrollratten ähnlich. Signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen wurden anhand der Plasma-Spiegel für Glukose, Insulin und Leptin ersichtlich. Alle drei Parameter waren in den ZDF-Ratten übermäßig erhöht und passen zu den erwarteten Befunden eines an Typ-2 Diabetes-Erkrankten.

Bei den fettleibigen Ratten lag das Körpergewicht deutlich über dem der entsprechenden Kontrollratten (502 ± 16 g vs. 338 ± 10 g Kontrolle, $**p < 0,01$). Die Plasmaspiegel für Glukose zeigten in beiden Tiergruppen euglykämische Werte, dagegen waren die absoluten Werte der Plasma-Spiegel für Insulin und Leptin in den fettleibigen Ratten signifikant erhöht. Alle Werte für die peripheren Parameter sind im Detail in *Tabelle 2* auf der nachfolgenden Seite dargestellt.

Parameter	ZDF-Kontrolle (Gmi-fa/+) n=10	ZDF Typ 2-Diabetes (Gmi-fa/fa) n=10	lean (Kontrolle) (fa/?) n=10	Obese (fettleibig) (fa/fa) n=10
Körpergewicht (g)	366 ± 5	371 ± 13	338 ± 10	$502 \pm 16^{**}$
Plasmaglukose (mg/dl)	155 ± 3	$495 \pm 34^{**}$	143 ± 2	157 ± 5
Plasmainsulin (μ g/l)	$2,4 \pm 0,1$	$5,4 \pm 1,2^{**}$	$2,2 \pm 0,2$	$14,7 \pm 1,2^{***}$
Plasmaleptin (μ g/l)	$4,6 \pm 0,3$	$18,3 \pm 3,0^{**}$	$4,06 \pm 0,7$	$87,5 \pm 3,5^{**}$

Tabelle 2:

*Körpergewicht, Plasma-Spiegel für Glukose, Insulin und Leptin in ZDF-Ratten, Obese-Ratten und entsprechenden Kontrollratten, die Messwerte sind als Mittelwert \pm SE dargestellt ($**p < 0,01$ und $***p < 0,001$ vs. entsprechende Kontrolle).*

5.2.2 Bestimmung der Genexpression von B₁- und B₂-Rezeptoren auf transkriptionaler Ebene in Geweben der HHN-Achse

a) ZDF-Ratten

Analog zum Vorgehen in den Typ 1-Diabetes Ratten wurde in diesem Teil verfahren. Während in der Hypophyse Gehalt an B₁-Rezeptor-mRNA unter der Nachweisgrenze lag, ließ sich sowohl im Hypothalamus als auch in der Nebenniere eine geringe Menge an mRNA für B₁-Rezeptoren detektieren (*Abbildung 14 A*). In beiden Geweben zeigten die ZDF- gegenüber den Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die jeweilige B₁-Rezeptor-Transkriptmenge (Hypothalamus: $0,52 \pm 0,11$ vs. $0,28 \pm 0,08$ Kontrolle und Nebenniere: $0,14 \pm 0,01$ vs. $0,16 \pm 0,01$ Kontrolle).

B₂-Rezeptor-Transkripte konnten in allen Geweben der HHN-Achse nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich fiel der gemessene mRNA-Gehalt im Hypothalamus am höchsten aus. Hier lag die B₂-Rezeptorgenexpression in den ZDF-Ratten noch deutlich über der der entsprechenden Kontrollratten ($1,17 \pm 0,04$ vs. $1,04 \pm 0,04$ Kontrolle). In der Hypophyse war die mRNA-Menge in den ZDF-Ratten ebenfalls gesteigert, fiel aber insgesamt geringer aus ($0,42 \pm 0,01$ vs. $0,28 \pm 0,01$ Kontrolle). Nur in der Nebenniere ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden Versuchstiergruppen dokumentieren (*Abbildung 14 B*).

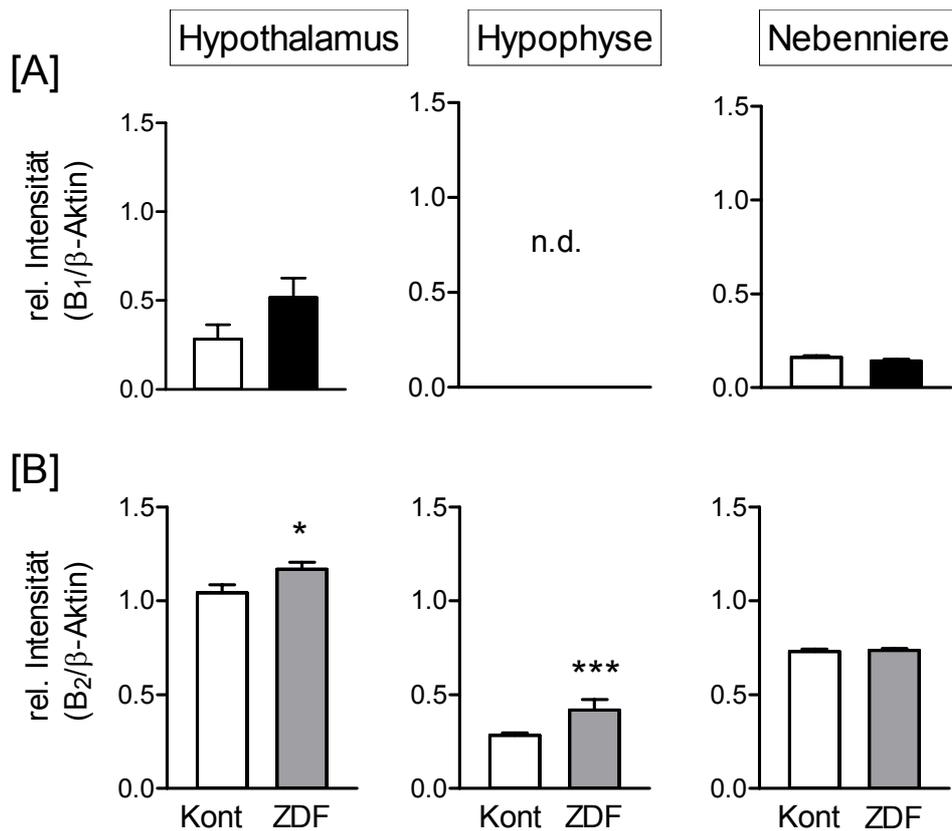


Abbildung 14:

Bestimmung der Kinin-Rezeptor-mRNA-Menge in der HHN-Achse von ZDF- und Kontrollratten. Dargestellt ist die „relative Intensität“ der B₁- [A] und B₂-Rezeptor-mRNA-Menge [B] im Verhältnis zu β-Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SE angegeben (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n = 10$ Ratten je Versuchsgruppe). Abkürzungen: Kont, Kontrolle; n.d., nicht detektierbar; ZDF, Zucker diabetic fatty-rat

b) Obese-Ratten

In den fettleibigen Ratten konnte wie in den ZDF-Ratten nur im Hypothalamus und in der Nebenniere überhaupt eine niedrige B₁-Rezeptor mRNA-Menge gefunden werden. In der Hypophyse ließen sich durch das von uns angewandte Verfahren keine B₁-Transkripte nachweisen (Abbildung 15 A). Ebenso blieb ein signifikanter Unterschied zwischen den fettleibigen Ratten und den entsprechenden Kontrollratten aus (Hypothalamus: $0,03 \pm 0,01$ vs. $0,04 \pm 0,01$ Kontrolle und Nebenniere: $0,26 \pm 0,02$ vs. $0,35 \pm 0,05$ Kontrolle). Auf allen Ebenen der HHN-Achse ließ sich hingegen B₂-Rezeptor-mRNA detektieren. Die Expression des B₂-Rezeptors war in der Nebenniere am höchsten ($1,08 \pm 0,04$ vs. $1,22 \pm 0,07$ Kontrolle), etwas geringer im Hypothalamus ($0,61 \pm 0,02$ vs. $0,58 \pm 0,01$ Kontrolle) und am niedrigsten

in der Hypophyse ($0,1 \pm 0,03$ vs. $0,03 \pm 0,02$ Kontrolle, $*p < 0,05$). In der Hypophyse konnte außerdem ein merklicher Anstieg der B_2 -Transkripte in den fettleibigen Ratten gefunden werden, während sich im Hypothalamus und der Nebenniere zwischen den Versuchstiergruppen keine Unterschiede zeigten (Abbildung 15 B).

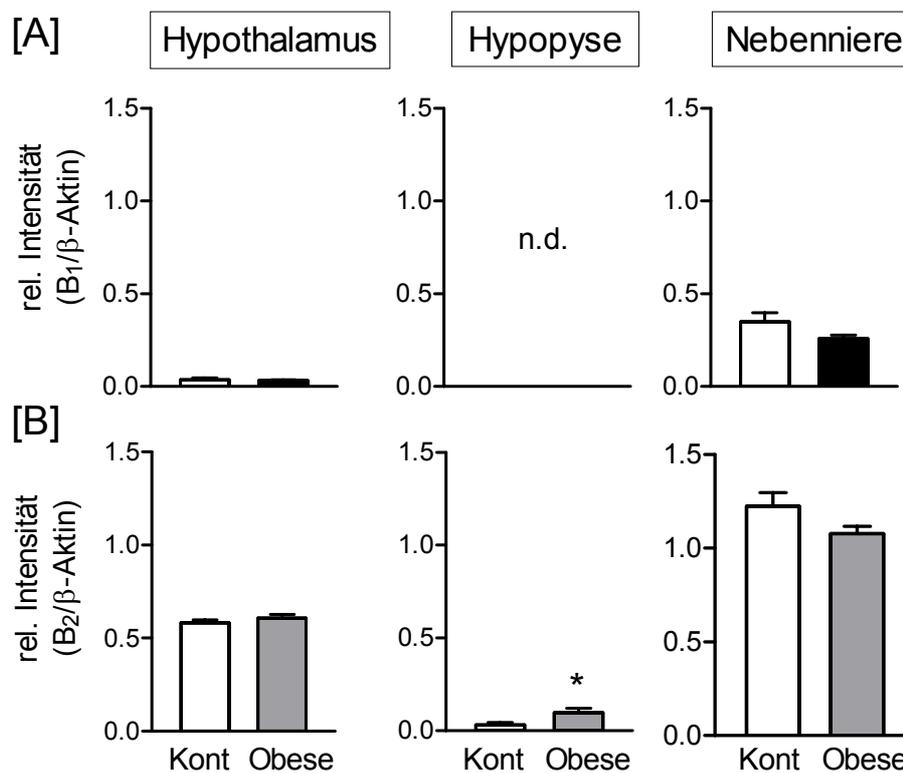


Abbildung 15:

Bestimmung der BK-Rezeptor-mRNA-Menge in der HHN-Achse von Obese- und Kontrollratten. Dargestellt ist die „relative Intensität“ der B_1 - [A] und B_2 -Rezeptor-mRNA-Menge [B] im Verhältnis zu β -Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($*p < 0,05$ vs. Kontrolle; $n=10$ Ratten je Versuchsgruppe).

Abkürzungen: Kont, Kontrolle; n.d., nicht detektierbar; Obese, fettleibige Typ 2-Diabetes-Ratte

5.2.3 Bestimmung der Genexpression der NOS-Isoformen auf transkriptionaler Ebene in Geweben der HHN-Achse

a) ZDF-Ratten:

Ähnlich den Ergebnissen in den STZ-D Ratten und den Kontrollratten war der nNOS-mRNA-Gehalt im Vergleich zu beiden anderen Isoformen am höchsten ausgeprägt, am niedrigsten fiel die iNOS-Transkriptmenge aus. Von allen Organen der HHN-Achse wiederum war die höchste nNOS-mRNA-Menge im Hypothalamus lokalisiert. Hier zeigte sich außerdem ein deutlicher Unterschied zwischen den gesunden und den an Diabetes erkrankten Ratten (*Abbildung 16 A*). Die Menge an nNOS-Transkripten lag in den ZDF-Ratten signifikant unter den Werten der Kontrolltiere ($1,3 \pm 0,05$ vs. $1,56 \pm 0,09$ Kontrolle, $*p < 0,05$). Ansonsten war für nNOS auf transkriptionaler Ebene weder in der Hypophyse noch der Nebenniere ein Unterschied zwischen den Versuchstiergruppen ersichtlich (Hypophyse: $1,29 \pm 0,03$ vs. $1,3 \pm 0,03$ Kontrolle und Nebenniere: $0,5 \pm 0,05$ vs. $0,49 \pm 0,04$ Kontrolle).

Die *Abbildung 16 B* zeigt den Hypothalamus auch für die eNOS als Ort mit dem höchsten mRNA-Gehalt. Hier waren die eNOS-Transkripte in den ZDF-Ratten gegenüber den Kontrollratten signifikant erhöht ($1,66 \pm 0,1$ vs. $1,41 \pm 0,09$ Kontrolle, $*p < 0,05$). In der Hypophyse ließ sich ebenfalls eine deutlich gesteigerte Genexpression in den ZDF-Ratten dokumentieren ($0,55 \pm 0,02$ vs. $0,37 \pm 0,02$ Kontrolle, $*p < 0,01$). In der Nebenniere dagegen fiel die Menge an eNOS-Transkripten in beiden Versuchstiergruppen ähnlich aus ($0,69 \pm 0,04$ vs. $0,67 \pm 0,03$ Kontrolle).

Parallel zum Expressionsmuster der bereits genannten NO-Isoformen war der iNOS-mRNA-Gehalt im Hypothalamus am höchsten ausgeprägt. Es zeigte sich jedoch kein merklicher Unterschiede zwischen den ZDF- und entsprechenden Kontrollratten ($0,32 \pm 0,05$ vs. $0,39 \pm 0,04$ Kontrolle). Auch in der Nebenniere war die Genexpression in den beiden Versuchsgruppen gleich ($0,16 \pm 0,02$ vs. $0,15 \pm 0,01$ Kontrolle), nur für die Hypophyse konnte eine signifikante Reduktion der iNOS-Transkripte gemessen werden ($0,07 \pm 0,02$ vs. $0,13 \pm 0,02$ Kontrolle, $*p < 0,05$) (*Abbildung 16 C*).

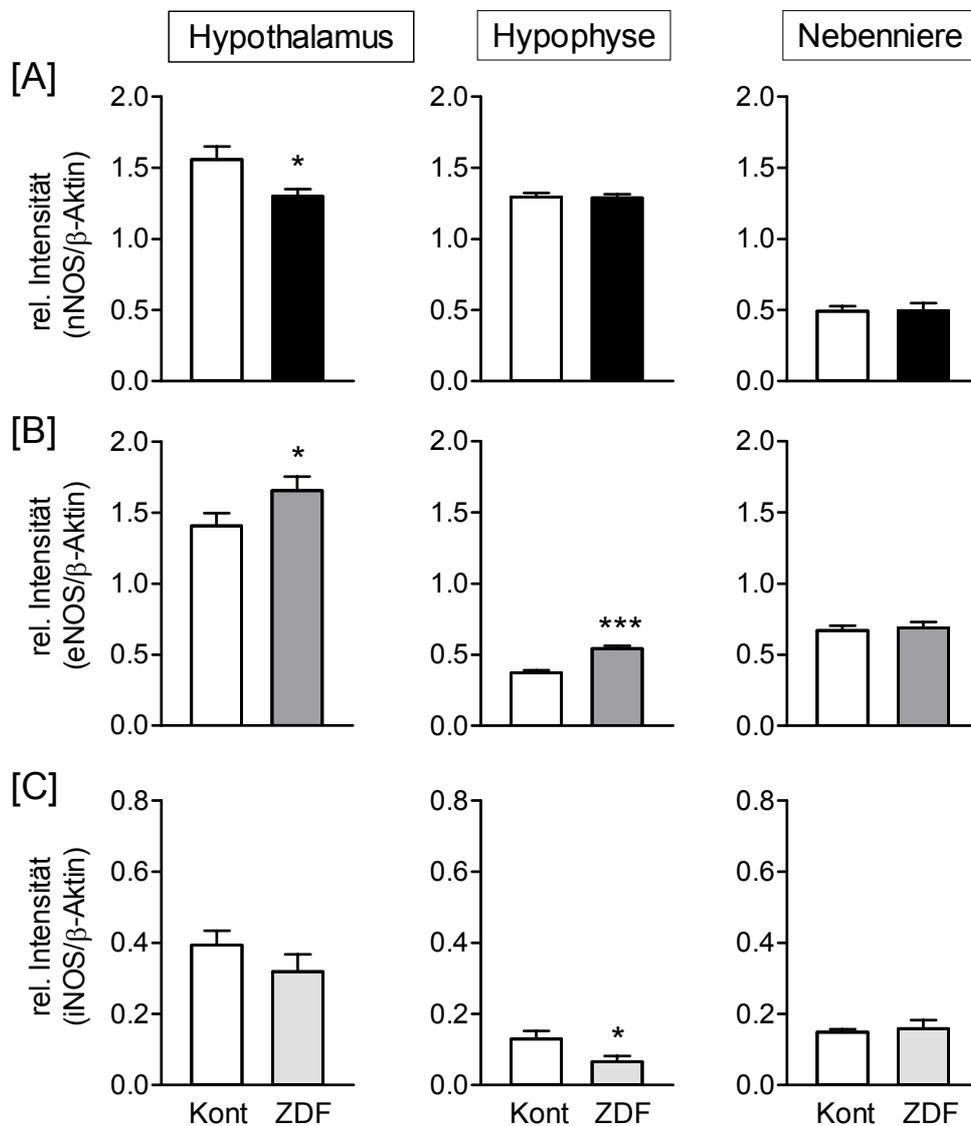


Abbildung 16:

Bestimmung der NOS-mRNA-Mengen in der HHN-Achse von ZDF- und Kontrollratten. Dargestellt ist die „relative Intensität“ der nNOS- [A], eNOS- [B] und iNOS- [C] mRNA-Menge im Verhältnis zu β -Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n = 10$ Ratten je Gruppe).
Abkürzungen: ZDF, Zucker diabetic fatty-rat; Kont, Kontrolle

b) Obese-Ratten:

In den fettleibigen Ratten wurde auf allen Ebenen der HHN-Achse nNOS-mRNA näherungsweise zu gleichen Anteilen gebildet. Weder im Hypothalamus ($0,65 \pm 0,02$ vs. $0,65 \pm 0,05$ Kontrolle) noch für die Hypophyse ($0,66 \pm 0,05$ vs. $0,65 \pm 0,04$ Kontrolle) wie auch für die Nebenniere ($0,56 \pm 0,13$ vs. $0,76 \pm 0,07$ Kontrolle) konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchstiergruppen aufgedeckt werden (*Abbildung 17 A*).

Die Menge an eNOS-Transkripten war im Hypothalamus und der Nebenniere am höchsten (*Abbildung 17 B*). Bezüglich des mRNA-Gehaltes zwischen den fettleibigen und entsprechenden Kontrollratten bestand in keinem der Gewebe eine Ungleichheit (Hypothalamus: $1,19 \pm 0,06$ vs. $1,13 \pm 0,07$ Kontrolle und Nebenniere: $1,0 \pm 0,03$ vs. $1,10 \pm 0,06$ Kontrolle). In der Hypophyse dagegen zeigten die fettleibigen Ratten gegenüber den Kontrollratten eine signifikant erhöhte eNOS-Genexpression ($0,87 \pm 0,14$ vs. $0,58 \pm 0,06$ Kontrolle, $*p < 0,05$).

Innerhalb der HHN-Achse wurde in der Nebenniere der höchste iNOS-mRNA-Gehalt gemessen, am geringsten fiel er im Hypothalamus aus (*Abbildung 17 C*). Eine offensichtliche Abweichung zwischen den Versuchstieren ließ sich nur für die Hypophyse zeigen. Hier lagen die Werte der fettleibigen Ratten sehr deutlich über denen der Kontrollratten ($0,25 \pm 0,06$ vs. $0,1 \pm 0,05$ Kontrollratten, $***p < 0,001$).

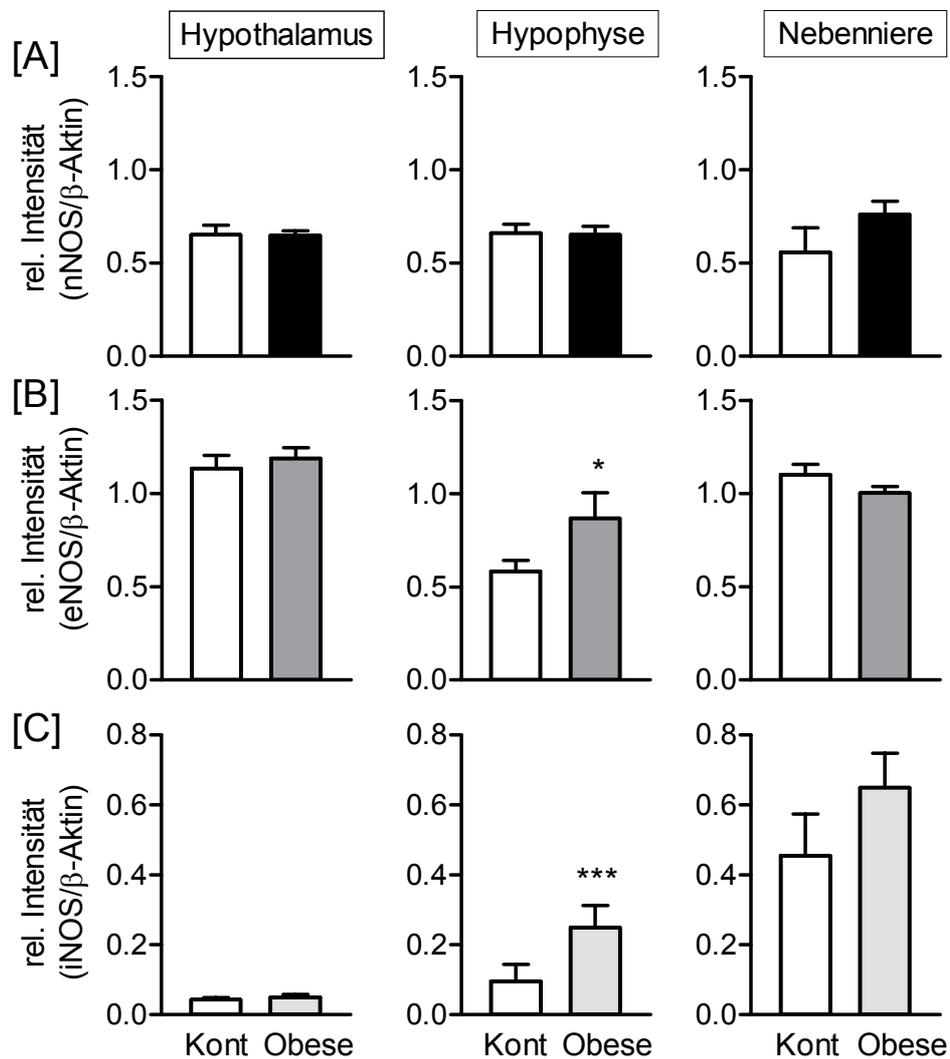


Abbildung 17:

Bestimmung der NOS-mRNA-Mengen in der HHN-Achse von Obese und Kontrollratten. Dargestellt ist die „relative Intensität“ der nNOS- [A], eNOS- [B] und iNOS- [C] mRNA-Menge im Verhältnis zu β -Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle; $n = 10$ Ratten je Gruppe).

Abkürzungen: Obese, fettleibige Typ 2-Diabetes-Ratte; Kont, Kontrolle

5.3 Bestimmung der Genexpression der GLUT-Isoformen auf transkriptionaler Ebene im Hypothalamus

a) STZ-D Ratten

In der *Abbildung 18* ist der mRNA-Gehalt für die GLUT-Isoformen 1-5 im Hypothalamus dargestellt. Die höchsten Mengen an Transporter-mRNA wurden für die GLUT 1, GLUT 2 und GLUT 3 gemessen. Der Gehalt an GLUT 1-mRNA war in den STZ-D Ratten hoch signifikant gegenüber den Kontrollratten gesteigert ($2,13 \pm 0,14$ vs. $1,37 \pm 0,11$ Kontrolle, $***p < 0,001$). Ein ähnlich starker Anstieg der mRNA-Transkripte ließ sich in den STZ-D Ratten in Bezug auf GLUT 3 finden ($2,49 \pm 0,12$ vs. $1,53 \pm 0,07$ Kontrolle, $***p < 0,001$). Signifikant war auch der Unterschied für GLUT 2 zwischen den Versuchstiergruppen ($1,21 \pm 0,11$ vs. $0,74 \pm 0,12$ Kontrolle, $*p < 0,05$). Für GLUT 4 und 5 fielen keine Abweichungen zwischen den erkrankten und gesunden Ratten auf.

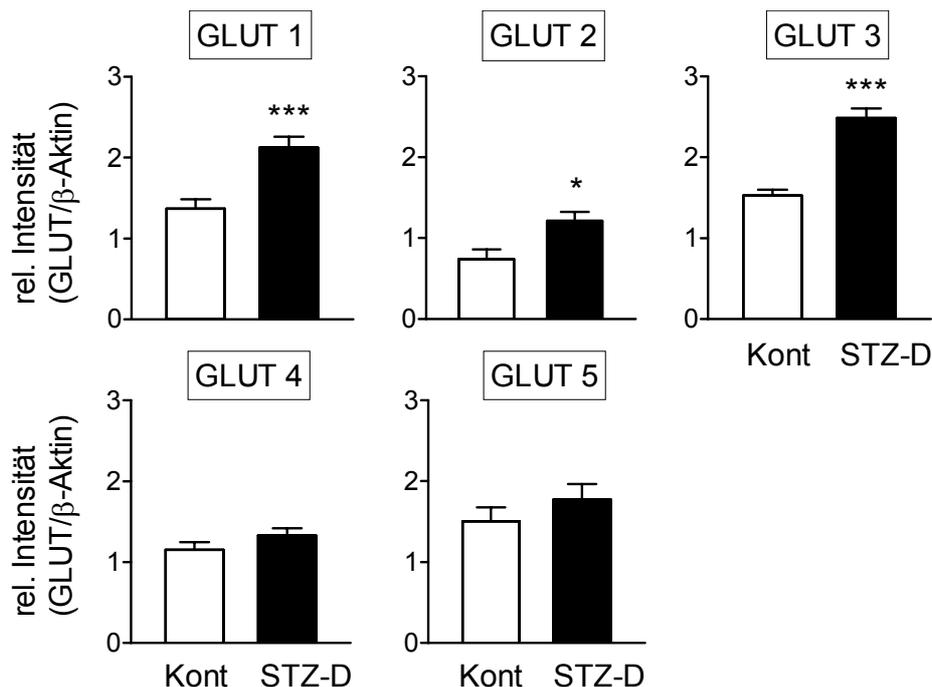


Abbildung 18:

*Bestimmung der GLUT-mRNA-Mengen im Hypothalamus von STZ-D und Kontrolltieren. Dargestellt ist die „relative Intensität“ der GLUT 1 bis 5 im Verhältnis zu β -Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($*p < 0,05$; $***p < 0,001$ vs. Kontrolle, $n=10$ Ratten je Versuchsgruppe).*

Abkürzungen STZ-D, Streptozotocin-induzierte Diabetes Ratte; Kont, Kontrolle; GLUT, Glukose-Transporter

Zur Analyse des Einflusses einer Insulin-Behandlung wurde die mRNA von GLUT-Isoformen im Hypothalamus bestimmt, wo signifikante Unterschiede zwischen STZ-D Ratten und den Kontrollratten aufgefallen waren. Während die Insulin-Behandlung auf den Gehalt an GLUT 2-mRNA keinerlei Effekt zeigte, konnte die Genexpression für GLUT 1 und GLUT 3 unter Therapie korrigiert werden. Sowohl für GLUT 1 ($0,67 \pm 0,05$ vs. $0,95 \pm 0,07$ STZ, $**p < 0,01$) als auch für GLUT 3 ($0,92 \pm 0,08$ vs. $1,08 \pm 0,06$ STZ, $*p < 0,05$) sanken die Werte auf die Höhe der Kontrollratten (Abbildung 19).

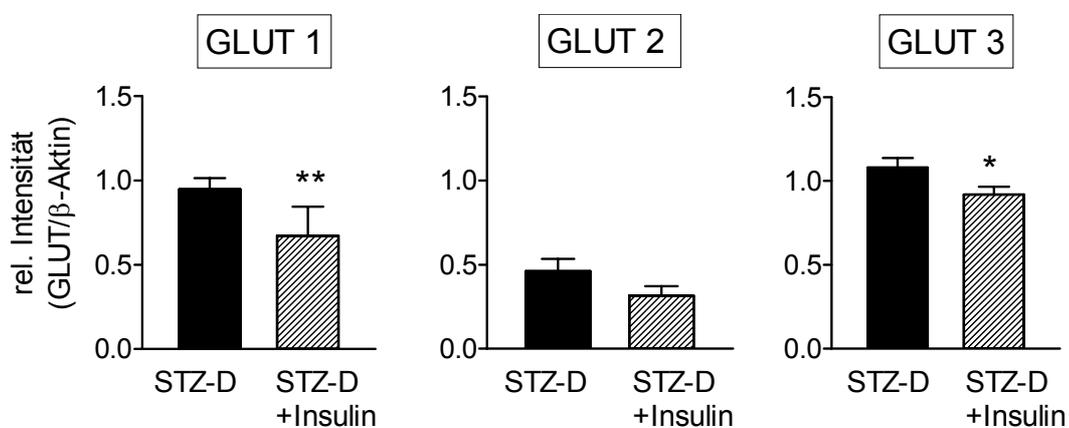


Abbildung 19:

*Einfluss der Insulin-Ersatztherapie im Hypothalamus von STZ-D Ratten auf die GLUT-mRNA-Mengen im Vergleich zu nicht-behandelten STZ-D Ratten. Dargestellt ist die „relative Intensität“ der GLUT 1, GLUT 2 und GLUT 3- mRNA-Menge im Verhältnis zu β -Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$ vs. Kontrolle, $n=8-10$ Ratten je Gruppe).*

Abkürzungen: STZ-D, Streptozotocin-induzierte Diabetes Ratte; GLUT, Glukose-Transporter

5.3.1 Bestimmung der Genexpression der GLUT-Isoformen auf transkriptionaler Ebene im Hypothalamus von ZDF-Ratten

Für alle GLUT-Isoformen konnte im Hypothalamus von ZDF-Ratten und entsprechenden Kontrollratten mRNA detektiert werden. Der jeweilige Gehalt an mRNA-Transkripten war für die verschiedenen GLUT-Isoformen ähnlich ausgeprägt. Es ließ sich zwischen den Versuchstiergruppen für keine der untersuchten GLUT-Isoformen ein signifikanter Unterschied finden (*Abbildung 20*).

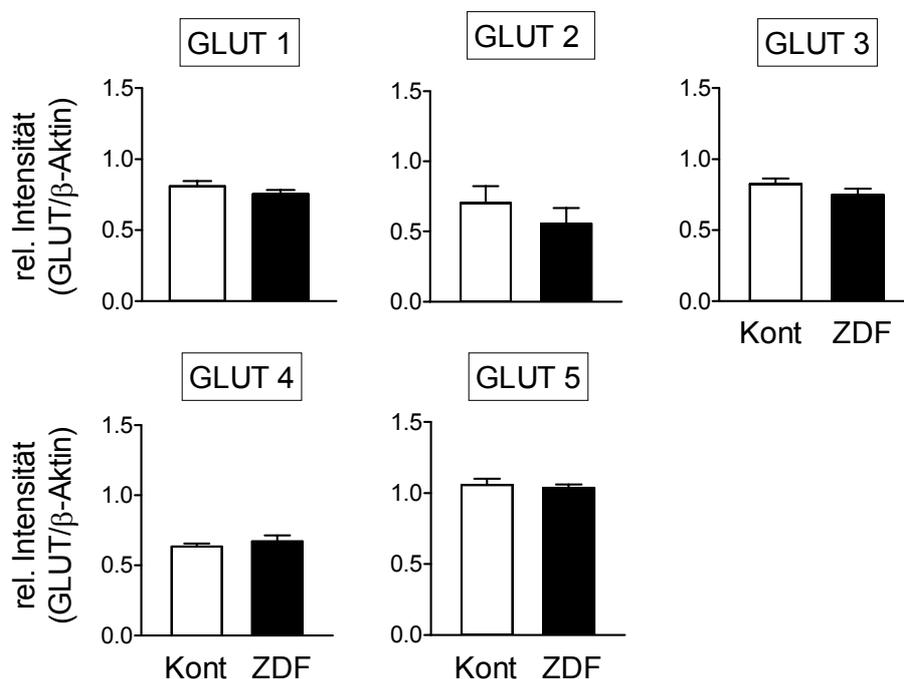


Abbildung 20:

Bestimmung der mRNA-Menge der GLUT-Isoformen im Hypothalamus von ZDF- und Kontrollratten. Dargestellt ist die „relative Intensität“ der GLUT 1 bis 5 im Verhältnis zu β -Aktin. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SE angegeben ($n=10$ Ratten je Versuchsgruppe).

Abkürzungen: ZDF, Zucker diabetic fatty rat; Kont, Kontrolle; GLUT, Glukose-Transporter

Die Ergebnisse auf einen Blick:

1. *Das Körpergewicht ist in den STZ-D Ratten reduziert. Die eingeleitete Insulin-Ersatztherapie bewirkt eine Korrektur der Plasma-Glukose-Spiegel, das Körpergewicht bleibt jedoch erniedrigt.*
2. *Der Gehalt an B₁-Rezeptor-mRNA in der HHN-Achse ist in allen drei Tier-Modellen in der Versuchs- und Kontrollgruppe ähnlich hoch.*
3. *Die Genexpression des B₂-Rezeptors ist im STZ-Modell und in den ZDF-Ratten erhöht und zeigt eine Insulin-unabhängige Regulation.*
4. *In den STZ-D Ratten ist die Expression von nNOS-mRNA im Hypothalamus und der Nebenniere Insulin-abhängig reguliert. In beiden Geweben bewirkt die eingeleitete Insulin-Ersatztherapie eine Korrektur in Richtung der Werte gesunder Kontrolltiere.*
5. *Für die ZDF- und Obese-Ratten fällt in Bezug auf das NO-System eine gesteigerte Expression der eNOS-mRNA auf. In den Tieren des Typ 1-Diabetes sind dagegen keine signifikanten Unterschiede messbar.*
6. *In den STZ-D Ratten ist die Expression von iNOS-mRNA in der Nebenniere Insulin-abhängig reguliert. Die eingeleitete Insulin-Ersatztherapie bewirkt eine Korrektur in Richtung der Werte gesunder Kontrolltiere.*
7. *Auf transkriptionaler Ebene ist die Genexpression für GLUT 1-3 im Hypothalamus der STZ-D Ratten merklich gesteigert, in den ZDF-Ratten fällt die mRNA-Menge in der Versuchs- und Kontrollgruppe ähnlich aus.*

6 *Diskussion*

6.1 Der Typ 1-Diabetes

6.1.1 Das Körpergewicht ist in den STZ-D Ratten reduziert

Wie erwartet zeigten die STZ-D Ratten nach der STZ-Applikation charakteristische Symptome des Diabetes mellitus. Es imponierten ein gesteigertes Durstempfinden mit vermehrter Flüssigkeitsaufnahme, Ausscheidung eines vergrößerten Harnvolumens sowie Leistungsschwäche. Die Glukose-Plasmaspiegel waren diabetestypisch erhöht, und die minimal nachweisbare Insulin-Konzentration im Plasma lässt sich als Bestätigung der erfolgreichen STZ-Injektion mit selektiver Zerstörung der β -Inselzellen des Pankreas deuten. Trotz verstärkter Nahrungsaufnahme gewannen die STZ-D Ratten im Vergleich zu den Kontrollratten weniger an Körpergewicht. Die in der zweiten STZ-D Gruppe eingeleitete Insulin-Ersatztherapie vermochte zwar den Glukose-Plasmaspiegel zu korrigieren, trotzdem blieben die Tiere untergewichtig. Es ist fraglich, welcher Mechanismus für das Ausbleiben einer normalen Gewichtszunahme verantwortlich ist, zumal der Auslöser, der Insulinmangel, artifiziell behoben wurde. Andere Gruppen hatten nach Insulinersatz in einem ähnlichen Versuchsmodell eine teilweise, bzw. vollständige Korrektur des Körpergewichts beobachten können (Serino *et al.*, 1998; Havel *et al.*, 2000; Hidaka *et al.*, 2001; Barber *et al.*, 2003). Die Insulinart, Applikationsweise und -dosis und die Dauer der Therapie scheinen eine bedeutende Rolle zu spielen, andererseits darf nicht übersehen werden, dass neben Glukose und Insulin weitere Parameter wie körpereigene Peptide, Monoamine und Hormone in einem komplexen Netzwerk die Nahrungsaufnahme und den damit verbundenen Energiestatus bestimmen. Oberstes Integrationsorgan für alle humoralen und neuronalen Signalwege zur Regulierung des Körpergewichts ist der Hypothalamus (Yarkov *et al.*, 2001). Zu den appetitsteigernden Substanzen gehören u.a. das Neuropeptid Y (NPY) und die Katecholamine. Allgemein hemmend auf das Essverhalten wirkt Leptin. Es meldet als peripheres Hormon des Fettgewebes den Zustand der Energiereserven des Körpers an das ZNS und nutzt dabei NPY als sekundäres Signalmolekül. STZ-D Ratten zeigen ein Überwiegen derjenigen Faktoren, die eine Nahrungsaufnahme fördern (Sipols *et al.*, 1995; Havel *et al.*, 2000). Die Gruppe um Hidaka (2001) bemerkte ebenfalls, dass Insulin nicht alleinig den Energiehaushalt der STZ-D Ratte kontrolliert. So

übe Insulin den Autoren zufolge nur indirekt Einfluss auf die Regulation der Neuropeptide im Hypothalamus aus, denn die mRNA-Mengen von NPY verhielt sich in entsprechenden Versuchen Insulin-unabhängig und ermöglichte auch nach exogener Leptingabe nur eine teilweise Korrektur des Körpergewichts. Nichtsdestotrotz identifizierten mehrere Arbeitsgruppen Leptin als Hauptmodulator der mit dem STZ-Modell assoziierten Hyperphagie. In einer jüngeren Studie vermochte die alleinige i.c.v. Leptin-Applikation die Glukose-Plasmaspiegel ausgeglichen zu halten (Hidaka *et al.*, 2002; Sindelar *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte in den STZ-D Ratten ein erniedrigter Leptin-Spiegel nachgewiesen werden, der unter Insulin-Ersatztherapie auf Werte der gesunden Kontrollratten anstieg. Dies legt nahe, dass Leptin an der Regulation des Essverhaltens maßgeblich beteiligt ist.

6.1.2 Die Nebennierenrindenhormone sind im STZ-D Rattenmodell erhöht

Die zusätzlich bestimmten Hormone der HHN-Achse unterstützen die vielseitig propagierte Überfunktion des Regulationssystems unter Bedingungen eines Insulin-abhängigen Diabetes (Scribner *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 2001). Die Nebennierenrinden-Hormone Kortikosteron und Aldosteron waren beide in den STZ-D Ratten signifikant erhöht und sanken unter Insulin-Ersatztherapie auf Normalwerte ab. Dies deutet darauf hin, dass die veränderte Aktivität der HHN-Achse zumindest teilweise der chronischen Hyperglykämie und Hypoinsulinämie zuzuschreiben ist. Während in anderen Studien auch erhöhte ACTH-Spiegel in STZ-D Ratten gemessen worden sind (Chan *et al.*, 2001) konnte in der vorliegenden Arbeit kein Unterschied zwischen STZ-D- und Kontrollratten festgestellt werden.

6.1.3 Die gewebespezifische Funktion der Kinin-Rezeptoren im STZ-D Rattenmodell

Das KKS leistet neben hämodynamischen, inflammatorischen und antinozizeptiven Funktionen einen wichtigen Beitrag zum Glukosemetabolismus. Zahlreiche Interaktionen mit peripheren Stoffwechselwegen sind bekannt. Zusätzlich mehren sich Hinweise, Kinine können als Releasingfaktor oder Modulator des vorderen Hypophyselappens fungieren und möglicherweise ein zentraler Botenstoff der

HHN-Achse sein (Couture, 2000). Im Rahmen vieler Krankheiten ist die Beteiligung von BK —als Hauptmediator der Kinine mit seiner Wirkung über den B₂-Rezeptor— und die reaktive Induktion des B₁-Rezeptors beschrieben worden (Marceau *et al.*, 1983; Kaplan *et al.*, 1998; Marceau *et al.*, 1998; Tschope *et al.*, 2000; Cloutier *et al.*, 2002; Qadri *et al.*, 2002). Verschiedene Autorengruppen postulieren auch die Intervention des B₁-Rezeptors in der Pathogenese des STZ-induzierten Diabetes. Zuccollo *et al.* (1996 und 1999) konnten zeigen, dass die Gabe eines B₁-Rezeptor-Antagonisten die Hyperglykämie und Nierenfunktion im Mäusetiermodell auf Normalwerte berichtigte. Ein B₂-Antagonist oder ACE-Hemmer korrigierte in entsprechenden Versuchen nur die diabetische Proteinurie.

Bislang sind erst wenige Daten verfügbar, die Vorkommen und Funktionen des B₁-Rezeptors im ZNS beschreiben. Cloutier und Couture (2000) zeigten im Rückenmark von STZ-D Ratten die Induktion und *de novo* Expression von B₁-Rezeptoren mit Auswirkungen auf das autonome Nervensystem und die Blutdruckregulation. Gemäß den Ergebnissen an peripheren Geweben zur Genexpression auf mRNA-Ebene aber auch auf Proteinebene erwarteten wir in unseren Experimenten maßgeblich für die induzierbare Komponente des KKS (B₁-Rezeptor) höhere mRNA-Mengen für die STZ-D Ratten (Pheng *et al.*, 1997; Mage *et al.*, 2002). Überraschenderweise wurde diese Annahme für den B₁-Rezeptor auf keiner Ebene der HHN-Achse bestätigt. Der B₁-Rezeptor ließ sich lediglich in der Nebenniere detektieren, dort fehlten jedoch signifikante Abweichungen zwischen erkrankten und gesunden Tieren. Letzteres lässt vermuten, dass der B₁-Rezeptor trotz der chronischen Erkrankung und einem verändertem Zytokinmuster kaum an der Regulation der HHN-Achsenaktivität bei Diabetes mellitus beteiligt sind (Qadri *et al.*, 2004).

Die in der Literatur beschriebene Präsenz eines KKS in der hypothalamo-hypophysären Einheit lässt einen generellen Einfluss von Kinine auf die Regulation der neuroendokrinen Regelkreise dennoch möglich erscheinen. Madeddu *et al.* (1992) stellten nach einer i.c.v. Injektion von BK in Ratten einen Anstieg des hypophysär gebildeten ACTH fest und unterstützten damit diese Hypothese. Miskowiak *et al.* (1999) demonstrierten in Kaninchen nach einer exogenen BK-Gabe eine reduzierte Aktivität der Nebennierenrinde, die jedoch ohne Einfluss auf die hypophysäre ACTH-Freisetzung blieb. Dies mag bedeuten, das auch

endogenes BK zumindest unter basalen Bedingungen keine eindeutige Rolle in der HHN-Achsenregulation spielt. Effekte durch BK unter Stress und entzündlichen Erkrankungen können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Im Hypothalamus von STZ-D Ratten konnten wir einen erhöhten Gehalt von B₂-Rezeptor-mRNA nachweisen. Dieser Anstieg mag ein aktiviertes zentrales KKS reflektieren und letztendlich unter pathophysiologischen Bedingungen des Diabetes vielleicht sogar die abnorme Aktivität der HHN-Achse bedingen (Qadri *et al.*, 2004). Es ist gesichert, dass BK über B₂-Rezeptoren im Zellkulturmodell die Biosynthese und Sekretion von Katecholaminen aus chromaffinen und PC12 Zellen der Nebenniere stimuliert (Dendorfer und Dominiak, 1995; Dendorfer *et al.*, 1996). Für den B₂-Rezeptor sind bereits mRNA- und Proteinmengen in der Medulla der Nebenniere dokumentiert (Qadri *et al.*, 2003b). Diese Arbeit ergänzt entsprechende Daten für die B₁-Rezeptor-Genexpression. Erst kürzlich wurde über einen Katecholaminabfall in STZ-D Ratten – zwei Wochen nach der Injektion – berichtet (Chan *et al.*, 2001; Morrison *et al.*, 2001). Wilke und Hillard (1994) hatten außerdem an perfundierten Nebennieren von STZ-D Ratten eine Reduktion der ACh-abhängigen Katecholamin-Freisetzung zeigen können. Ob die in dieser Studie signifikant niedriger ausfallende B₂-mRNA-Menge in STZ-D Ratten an der veränderten Biosynthese und Sekretion beteiligt ist, bleibt Spekulation. Es existieren bislang zu wenige Studien, um die pathophysiologische Rolle des zentralen B₂-Rezeptors bei Diabetes-Erkrankungen beurteilen zu können.

Erwähnenswert ist das Vorhandensein von zerebralen Transportern, die Insulin eine Penetration der Bluthirnschranke ermöglichen, weshalb eine periphere Insulin-Applikation durchaus Effekte im ZNS erzielt. Chan *et al.* (2002) konnten in ihren Experimenten veranschaulichen, dass die Insulin-Substitution in STZ-D Ratten die HHN-Achsenaktivität gegenüber Stressoren auf ein Niveau der Kontrolltiere korrigierte. Auf die B₂-Rezeptor-Genexpression des Hypothalamus und der Nebenniere nahm die Insulin-Ersatztherapie jedoch keinen messbaren Einfluss. Das mag andeuten, dass keiner der Hauptparameter des Typ 1-Diabetes, die Hyperglykämie oder der Insulinmangel, an der Hochregulation des B₂-Rezeptors beteiligt sind und andere Faktoren als Ursache für die veränderte Expression sowie die Überaktivität der HHN-Achse vermutet werden müssen.

Periphere Organe wie das Fettgewebe sowie die Skelett- und Herzmuskulatur, zählen zu jenen Geweben deren Glukoseaufnahme Insulin-abhängig reguliert ist. Duka *et al.* (2001) stellten in Versuchen mit B₂-Rezeptor-Knockout-Mäusen fest, dass eine Insulininfusion bei den Wildtyp-Mäusen genau in diesen Geweben einen deutlichen Anstieg des B₂-Rezeptors und der Insulinsensitivität bewirkt. Glukose stellt zwar den wichtigsten Energielieferanten für das Gehirn dar, ihre Zufuhr wird jedoch Insulin-unabhängig den Energiebedürfnissen angepasst. Dieser Umstand könnte erklären, warum ein reaktiver Anstieg der B₂-Rezeptor-Genexpression nach der Insulin-Substitution im ZNS ausbleibt. Andererseits ist die Aussage über einen Effekt der Insulin-Ersatztherapie in STZ-D Ratten schwierig. Denn obwohl die STZ-D Ratte das gemeinhin meist genutzte Tiermodell für den Typ 1-Diabetes darstellt, ist ihr Überleben im Gegensatz zum echten Typ 1-Diabetes-Patienten nicht streng Insulin-abhängig. Somit sind Erwartungen aufgrund von praktischen Erfahrungen aus dem Tiermodell nicht direkt auf Diabetes-Patienten übertragbar (Lindsay *et al.*, 1997).

Zur eingehenderen Untersuchung der Expression von Kinin-Rezeptoren im ZNS wurde die Western Blot-Analyse für diejenigen Gewebe angeschlossen, wo vorher durch das RT-PCR-Verfahren signifikante Differenzen zwischen STZ-D- und Kontrollratten aufgefallen waren. Im Hypothalamus konnten wir entgegen den mRNA-Daten eine signifikant niedrigere Proteinmenge von B₂-Rezeptoren aufdecken. Diese Diskrepanz lässt die Existenz einer posttranskriptionalen Regulation der B₂-Rezeptor-Expression vermuten. Der geringere Gehalt an B₂-Rezeptoren im Hypothalamus und der Nebenniere machen eine erniedrigte Dichte von BK-Rezeptoren auf der Zelloberfläche und folglich einen weniger bedeutsamen Einfluss des B₂-Rezeptor-abhängigen Signalweges wahrscheinlich. Die in den Nebennieren aufgefallene geringere Proteinmenge war hier konform zu den Veränderungen der mRNA-Mengen des B₂-Rezeptors. Einige Autoren postulieren, der B₂-Rezeptor sei in der frühen Phase von Entzündungen vorherrschend, und durch autoregulatorische Mechanismen und Desensitivierung werde er in der späten Phase durch den B₁-Rezeptor abgelöst (Campos und Calixto, 1995; Phagoo *et al.*, 1999). Dass das B₁- und B₂-Rezeptorverhältnis eine kritische Rolle bezüglich des Fortdauerns einer Erkrankung einnimmt, wird da-

durch gestützt, dass die Gabe eines selektiven B₁-Rezeptorantagonisten verschiedene Entzündungszeichen (wie einen Leukozytenanstieg) unterdrückte (Ahluwalia und Perretti, 1996; Vianna und Calixto, 1998). Allerdings wird diese kompensatorische, bzw. reziproke Regulation der beiden B₂-Rezeptoren in der Literatur nicht einheitlich beschrieben (Marceau *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit konnte nur die Inhibition der B₂-Rezeptor-Expression auf transkriptionaler Ebene bestätigt werden. Der bestehende Widerspruch zwischen bereits publizierten Daten mag teilweise durch den Zeitpunkt der Gewebeentnahme begründet sein. Literaturangaben zufolge wird der B₁-Rezeptor erst zwischen dem 14. und 21.Tag voll exprimiert und die späte Phase der Entzündung konsekutiv eingeleitet (Blais *et al.*, 2000). Damit wäre unser zeitliches Vorgehen grenzwertig. Auch die Applikationsweise und -dosis von STZ, die anschließende Einstellung des Diabetes, bzw. unterschiedliche Ausprägung der Hyperglykämie und das Alter der Tiere mögen den Ausgang der Experimente bestimmen. Alternativ zum postulierten Kinin-Rezeptorverhältnis wurde im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen die Hemmung der Kininase II beschrieben. Dies entspricht einer vermehrten Produktion von *des*-Arg-BK, dem Hauptagonisten des B₁-Rezeptors (Couture *et al.*, 2001). Folglich kann auch ohne gesteigerte B₁-Rezeptorexpression eine überdurchschnittliche Aktivierung des B₁-Rezeptors angenommen werden, bzw. die gleiche Menge an B₂-Rezeptor-mRNA in der Nebenniere von STZ-D und Kontrollratten bedeutet nicht unmittelbar ein gleiches Maß an Aktivierung. Diese Umstände machen die Bewertung der RT-PCR-Daten komplex und bedürfen weiterer Abklärung.

6.1.4 Die neuronale NOS-Isoform in der HHN-Achse wird Insulin-abhängig reguliert

NO spielt eine herausragende Rolle in der Regulation vieler Organsysteme und seine Aufgabe als Neurotransmitter und Botenstoff in der neuroendokrinen Achse wird zunehmend deutlich (McCann *et al.*, 2000). Rivier (1998) benennt sowohl verstärkende als auch hemmende Wirkungen von NO auf die HHN-Achse und sieht das Vorliegen eines immunen oder nicht immunogenen Stressors als Weichenstellung für die jeweilige Wirkung. Riedel (2000) erklärt die zwei Möglichkeiten in Abhängigkeit vom umgebenden Redoxpotential. Diabetes-bedingte Veränderungen in Bezug auf die Funktion und Menge bestimmter Neuropeptide

und die mögliche Beteiligung des NO-Systems hierbei sind vielfach beschrieben worden. Ähnlich den Ergebnissen von Prevot und seinen Mitarbeitern war in der vorliegenden Studie unter allen Geweben der HHN-Achse die höchste Menge an nNOS-mRNA im Hypothalamus lokalisiert. Die STZ-D Ratten zeigten zudem einen signifikant höheren mRNA-Gehalt als die Kontrolltiere. Dieser Befund unterstützt die Hypothese, dass NO unter basalen Bedingungen sowie unter Stress eine wichtige Bedeutung zuteil wird (Prevot *et al.*, 2000). Zahlreiche Studien belegen die Relevanz des NO-Systems beim Trink- und Essverhalten und versuchen Diabetes-assoziierte Störungen und Symptome, wie Hyperphagie, Polydipsie und Gewichtsverlust zu erklären. So konnte die Gabe eines NOS-Inhibitors die NPY-vermittelte Nahrungsaufnahme in Mäusen verringern (Chen *et al.*, 2000). Umgekehrt hatten die Gruppen um Morley (1999) und Hidaka (2001) in ihren Untersuchungen einen hemmenden Einfluss von Leptin und einen fördernden Effekt durch NPY und CRH auf die nNOS-Genexpression feststellen können. Der NPY-Spiegel wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, jedoch war der Leptin-Plasmaspiegel zwei Wochen nach der STZ-Applikation signifikant reduziert. Morris und Pavia (2004) wiesen erst kürzlich eine vermehrte NPY-Freisetzung aus dem Hypothalamus von STZ-D Ratten nach. In den STZ-D Ratten könnte daher der minimale Leptinspiegel gemeinsam mit dem erhöhten NPY- und CRH-Spiegel für die gesteigerte nNOS-Genexpression verantwortlich sein.

Während die Insulin-Ersatztherapie auf die Genexpression der Kinin-Rezeptoren im Hypothalamus keinerlei Auswirkung zeigte, impliziert die Korrektur der NOS-mRNA-Genexpression auf die Höhe von Kontrollratten nach Insulinsubstitution, dass Insulin ein wichtiger Regulator der NOS-Genexpression in der HHN-Achse von Ratten ist. Dieser Befund geht im Einklang mit den Ergebnissen der Gruppe um Chan (2001 und 2002). Hier konnte die Insulin-Behandlung in den STZ-D Ratten unter Berichtigung der Plasma-Kortikosteroid- und ACTH-Spiegel die HHN-Achsenaktivität auf ein Normalmaß senken.

NO ist außerdem in die Synthese und Freisetzung von Vasopressin involviert. Vasopressin spielt eine wichtige Rolle als Neurotransmitter und Hormon in der Regulation des Nahrungsverhaltens, der Glukose-Plasmakonzentration und bei chronischem Stress (Shanks *et al.*, 1998; Yarkov *et al.*, 2001). Vokes *et al.* (1987) konnten zeigen, dass der Plasmaspiegel von Vasopressin in Patienten mit

unkontrolliertem Insulin-abhängigen Diabetes erhöht ist. Osmotische Stimuli, wie Dehydratation oder das Trinken von hypertoner Flüssigkeit führen zu einem gemeinsamen Anstieg der nNOS-Genexpression und der Vasopressin-Synthese in Kerngebieten des Hypothalamus, sowie zur anschließenden Freisetzung aus dem Hypophysenhinterlappen in das Gefäßsystem (Ueta *et al.*, 1995; O'Shea und Gundlach, 1996). Ähnliche Veränderungen beobachteten Serino *et al.* (1998) an STZ-D Ratten und bewerteten dies als Reaktion auf die diabetische Stoffwechsellage mit gestörtem Flüssigkeitshaushalt. In den Versuchstieren vermochte die Insulin-Ersatztherapie die nNOS-Genexpression auf das Niveau der Kontrollratten korrigieren. Gleiches trifft für die mRNA-Mengen in der vorliegenden Studie zu, was die Insulin-Abhängigkeit der nNOS-Expression im Hypothalamus von Ratten nahelegt.

Einige Autoren vermuten, ein feinabgestimmtes System zwischen IL-1 und NO habe maßgeblichem Einfluss auf die HHN-Achsenaktivität (Satta *et al.*, 1998; Riedel, 2000). Riedel beschreibt, die Aktivierung des NMDA-Rezeptors durch jegliche Art von Stress —psychologisch, infektiös (eingeschlossen IL-1) oder traumatisch—, bewirke in den Neuronen des Hypothalamus über die nNOS eine gleichzeitige Freisetzung von CRH, Vasopressin und NO. So könne NO in einer Art *Feedback-Regulation* auf den NMDA-Rezeptor und dessen Modulation die Überaktivierung der HHN-Achse mit konsequenter Herabregulierung von CRH und NO bewirken. Dieser beschriebene Signalweg kann aus bereits publizierten Daten zumindest in Bezug auf Vasopressin bestätigt werden (Yasin *et al.*, 1993; Grossman *et al.*, 1997). Die Auswirkung auf CRH bleibt weiter unklar. Auch *in vivo* Studien unterstützen den inhibitorischen Effekt von NO auf die HHN-Achsenaktivität, nachdem die i.v. Gabe von IL-1 über eine Hemmung der nNOS in einer erhöhten ACTH-Freisetzung resultierte (Satta *et al.*, 1998; McCann *et al.*, 2000). Die vorliegenden Daten zeigen eine vermehrte nNOS-Genexpression neben einer im Western Blot-Verfahren nachgewiesenen verminderten nNOS-Proteinmenge. Dieser Umstand bietet einen Erklärungsversuch für die HHN-Achsen-Überaktivität bei Typ 1-Diabetes-Patienten: Es wäre denkbar, dass die in den STZ-D Ratten begrenzt ausfallende NO-Produktion nicht ausreicht, den NMDA-Rezeptor - folglich die nNOS - und letztendlich auch die HHN-Achsenaktivität vor einer Überstimulation zu bewahren.

Verschiedene Autorengruppen verweisen auf ein adrenales NO-System mit Einfluss auf die Steroidbiosynthese. Cymeryng *et al.* (1998) konnten für verschiedene NO-Donatoren einen signifikanten Abfall der basalen und ACTH-induzierten Kortikosteroid-Produktion in der Zona fasciculata von Ratten nachweisen. In unseren Experimenten zeigte sich die nNOS-mRNA-Menge in der Nebenniere von STZ-D Ratten signifikant erhöht. In gleicher Weise verhielt sich die Proteinexpression der nNOS. Es ist schwierig, anhand dieser Daten eine definitive Aussage über die final produzierte NO-Menge und Auswirkung zu machen, zumal alle NOS-Isoformen betrachtet werden müssten. Sowohl die adrenale nNOS als auch die iNOS reagierten auf die eingeleitete Insulin-Ersatztherapie mit einer Korrektur der veränderten Genexpression in STZ-D Ratten. Betrachtet man parallel dazu die Hormonspiegel von Kortikosteron und Aldosteron im Plasma bekräftigen unsere Daten den stimulierenden Einfluss eines unkontrollierten Diabetes auf die Nebenniere. Gewichtet man die Erkrankung Diabetes mellitus als einen dauernden Stressor, so sind unsere Ergebnisse mit denen von Kishimoto *et al.* vereinbar (Kishimoto *et al.*, 1996). In einer Studie an gestressten Ratten konnten die Autoren auf allen Ebenen der HHN-Achse einen signifikant vermehrten mRNA-Gehalt der neuronalen NOS-Isoform nachweisen. Lediglich in der Hypophyse weichen die hier erhobenen Daten von diesem Expressionsmuster ab.

Kardiovaskuläre Komplikationen sind immer noch der Hauptgrund für eine erhöhte Morbidität und Mortalität unter Diabetes-Patienten. Hypothesen für ihre Entstehung sind zahlreich vorhanden. Ob nur veränderte eNOS-Aktivitäten mit einer unzureichenden Wirkung von NO auf die kleinen Gefäße oder anormale oxidative Stoffwechselforgänge mit einem überschnellen Abbau von NO durch glykolytierte Endprodukte eine Rolle spielen, bleibt zu klären (Pieper und Dondlinger, 1997; Kobayashi *et al.*, 2000; Brodsky *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit verhielt sich die eNOS-Genexpression in der HHN-Achse gänzlich unabhängig von beiden Hauptparametern des Insulin-abhängigen Diabetes. Weder der Insulinmangel noch die Hyperglykämie bewirkten signifikante Abweichung zwischen gesunden und erkrankten Tieren. Ein ähnliches Ergebnis erzielte die Autorengruppe Mancusi *et al.* (1996) in ihren *in vitro* Studien. Dort verfehlte die Langzeitexposition von

humanen Endothelzellen gegenüber verschiedenen Glukose-Konzentrationen die Änderung auf mRNA- sowie auf Proteinebene der eNOS-Isoform.

Es ist bekannt, dass die iNOS-Isoform an der Ätiologie und Pathogenese vieler Krankheitssymptome und -folgen des Typ 1-Diabetes beteiligt ist. Bereits die autoimmunbedingte Inselzellzerstörung beginnt mit der Generierung zahlreicher Zytokine durch Makrophagen und bewirkt über nukleäre Transkriptionsfaktoren die Stimulation der iNOS-Genexpression in β -Zellen mit anschließendem Inselzelluntergang (Eizirik *et al.*, 1996; Flodstrom *et al.*, 1996). In allen Organen der HHN-Achse gelang der Nachweis von geringen Mengen an iNOS-mRNA. Dieser Befund mag zumindest in den Kontrollratten den nicht-stimulierten Zustand widerspiegeln. Die STZ-D Ratten zeigten in der Nebenniere einen signifikant niedrigeren iNOS-mRNA-Gehalt. Grund hierfür könnte der Hyperkortisolismus sein, wie er bei Typ 1-Diabetes vorliegt. Er stellt einen starken Inhibitor der iNOS-Isoform dar und eine Rückkopplung auf die Genexpression ist denkbar (Szabo *et al.*, 1994). Tseng *et al.* (1997) fanden in den Makrophagen diabetischer Tiere ebenfalls erniedrigte iNOS-mRNA-Mengen. Stevens *et al.* (1997) konnten in Makrophagen einen immunmodulatorischen Effekt durch Insulin auf die iNOS nachweisen. Im Einklang dazu stehen die vorliegenden Ergebnisse: Nach kontinuierlicher Insulin-Ersatztherapie konnte die iNOS-Genexpression auch in der Nebenniere von Versuchstieren auf eine Höhe von gesunden Ratten wiederhergestellt werden. Ein sinkender Plasma-Kortikosteroid-Spiegel parallel zu einem Insulin-vermittelten Glukoseabfall scheint die Menge an iNOS-Transkripten zu steigern. Alternativ dazu wird ein Hyperglykämie-inuzierter Abfall der iNOS-Genexpression in der Literatur beschrieben und als Folge einer Proteinkinase C-Aktivierung bewertet (Muniyappa *et al.*, 1998). Man weiß, dass die NO-Produktion durch iNOS wichtig für den ungestörten Wundheilungsprozess ist. So ist eine Beteiligung der verminderten iNOS-Genexpression bei der schlechten Wundheilung diabetischer Patienten vorstellbar (Yamasaki *et al.*, 1998). Andere Autorengruppen konnten unter Diabetes einen Anstieg der iNOS-Genexpression nachweisen. Olivenza *et al.* (2000) nannten den Zustand von chronischem Stress als Grund für die Hochregulation der iNOS-Expression im Kortex von Ratten. Die Bedingungen einer chronischen Erkrankung und des andauernden Stresses treffen für unser Tiermodell zu. Eine Steigerung für iNOS ließ sich jedoch nur auf Proteinebene

vermerken. Szabo *et al.* (1994) vermuteten einen potentiellen Mechanismus innerhalb der HHN-Achse, über den Insulin die NO-Produktion zu senken vermag, denn — wie oben erwähnt — wirkt Kortikosteroid als Inhibitor von iNOS. Von der Annahme, iNOS sei im Rahmen von Entzündungen stimuliert, nehmen auch andere Studien Abstand. Yu *et al* (1999 und 2000). zeigten in ihren Studien an STZ-D Ratten sowohl im zerebralen Kortex als auch in der dorsalen Medulla eine verminderte iNOS-Aktivität und geringere Proteinmengen. Im Versuch, die verschiedenen und teilweise widersprüchlichen Ergebnisse zu erklären, ist wichtig zu bedenken, dass die Bedeutung des NO-Systems ganz beachtlich in den unterschiedlichen Geweben variiert. Zusätzlich bestimmt stets die aktuelle Redoxumgebung am Wirkort die finale Funktion von NO. Es existiert folglich keine uniforme Antwort auf Stress oder Krankheit mit einheitlicher Hoch- und Herabregulation auf mRNA- und Proteinebene. Vielmehr besitzt jede Art von Stress seine bestimmte, eigene und individuelle „neurochemische Identität“ (Jessop, 1999). Hierbei kann eine fehlgesteuerte HHN-Achsenaktivität seine Ursachen im Überwiegen von stimulierenden Faktoren oder dem Verlust an tonisch inhibierenden Faktoren haben.

6.2 Der Typ 2-Diabetes

Dieselben Parameter wurden für ZDF- und Obese-Ratten, zwei Tiermodelle des Typ 2-Diabetes untersucht. Für den Insulin-unabhängigen Diabetes ist ebenfalls eine gesteigerte HHN-Achsenaktivität beschrieben worden. Es ist jedoch unklar, ob diese Fehlregulation mittelbar durch die Erkrankung verursacht ist, oder gar Auslöser bestimmter Diabetes-Charakteristika sein kann. Dies hieße, dass die Ätiologie des Insulin-unabhängigen Diabetes letztendlich in gestörten zentralnervösen Regulationsvorgängen zu suchen ist. Diese Hypothese wird durch ein Modell untermauert, in dem nach Läsionen im ventromedialen Anteil des Hypothalamus von Versuchstieren hormonelle und metabolische Fehlsteuerungen auftraten, die dem Typ 2-Diabetes vergleichbar waren. Kennzeichen des Typ 2-Diabetes ist immer die Hyperinsulinämie bei fehlender Hypoglykämie. Letztere ist sicherlich der peripheren Insulinresistenz zuzuschreiben, andererseits könnte die nachgewiesene HHN-Achsen-Überaktivität notwendig sein, das Eintreten hypoglykämischer Zustände zu verhindern. Es werden auch andere Gründe für die

übermäßige HHN-Achsenaktivität diskutiert. Sone und Osamura (2001) entdeckten in ihren Versuchen an fettleibigen Mäusen einen hemmenden Effekt von Leptin auf die ACTH-Sekretion. Dieser entfällt aufgrund des Rezeptordefektes in den Obese-Ratten und soll Ursache für die enorm hohen ACTH-Spiegel sein.

Die in dieser Studie bestimmten Parameter im Plasma wie auch das Körpergewicht entsprechen bereits publizierten Angaben in der Literatur (Kim *et al.*, 2000). Die ZDF-Ratten zeigten ein ähnliches Gewicht wie ihre Kontrollratten. Der Hormonstatus war jedoch durch deutlich erhöhte Werte für Insulin, Glukose und Leptin gekennzeichnet. Die positive Korrelation von Insulinresistenz und Leptinkonzentration in den ZDF-Ratten entsteht sekundär. Chronisch abnormal hohe Insulin-Konzentrationen bewirken eine gesteigerte Expression der *ob*-Gen-mRNA mit daraus resultierender Hyperleptinämie (Carantoni *et al.*, 1998). Die Obese-Ratten lagen aufgrund des genetisch beeinträchtigten Energiehaushaltes mit ihrem Gewicht enorm über dem entsprechender Kontrollratten. Auf hormoneller Basis präsentieren sie eine Glukoseintoleranz mit Hyperinsulinämie und – leptinämie.

6.2.1 Die hypophysäre B₂-Rezeptor-Expression ist im Typ 2-Diabetes-Tiermodell signifikant gesteigert

In peripheren Geweben wurde vielfach ein positiver Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des B₂-Rezeptors und der Insulin-abhängigen Glukoseaufnahme anhand von *in vitro* und *in vivo* Studien belegt (Miyata *et al.*, 1998; Duka *et al.*, 2001; Shiuchi *et al.*, 2002). Das KKS fungiert somit als Gegenspieler der bekannten Insulinresistenz. Einige Gruppen beobachteten tatsächlich verminderte BK-Plasmaspiegel an Diabetespatienten (Mayfield *et al.*, 1985; Jaffa *et al.*, 1987). Den ZDF- und Obese-Ratten fehlen im Vergleich zu den STZ-D Ratten Stimuli einer chronischen Entzündung. So bestätigte sich unsere Erwartung, ähnliche und nur geringe mRNA-Mengen des B₁-Rezeptors in Versuchs- und Kontrollratten vorzufinden. Eine Induktion der B₁-Rezeptors-Expression durch Zytokine, einen gestörten Glukosehaushalt oder veränderten Hormonstatus blieb aus. Weder in den ZDF- noch Obese-Ratten ließen sich in der Hypophyse B₁-Rezeptor-Transkripte detektieren. Eine essentielle Funktion scheint daher unwahrscheinlich.

Hypophysäres ACTH ist in Obese-Ratten erhöht und soll zum Teil die bestehende Insulinresistenz verursachen (Kim *et al.*, 2000). In den Obese-Ratten fiel wie in den ZDF-Ratten eine signifikant gesteigerte Genexpression des B₂-Rezeptors in der Hypophyse auf. Über eine Verbindung zur modifizierten HHN-Achsenaktivität lässt sich spekulieren. Vereinbar mit früher publizierten Arbeiten dokumentierten wir im Hypothalamus der ZDF-Ratten eine erhöhte B₂-Rezeptors-Expression gegenüber den entsprechenden Kontrollratten (Madeddu *et al.*, 1992). In diesem Punkt differierte das Expressionsmuster für den B₂-Rezeptor innerhalb der HHN-Achse zwischen den ZDF- und Obese-Ratten. Anders als die ZDF-Tiere zeigten die Obese-Ratten hier eine ähnliche Genexpression wie entsprechende Kontrollratten. Gewisse Unterschiede im hormonellen Status und Energiestoffwechsel, wie die extreme Hyperglykämie der ZDF-Ratten gegenüber einer Glukoseintoleranz der Obese-Ratten, könnten die Ursache hierfür sein. Im Gegensatz zum Typ 1-Diabetes haben unsere Versuche auf der Ebene der Nebenniere keine veränderte B₂-Genexpression erbracht. Folglich müssen weitere in der Regulation des KKS betrachtet werden.

6.2.2 Änderungen der eNOS in ZDF- und Obese-Ratten

Duplain *et al.* (2001) verfolgten an eNOS „-/- Knockout-Mäusen“ die Entwicklung von Insulinresistenz, Bluthochdruck und Hyperlipidämie, die typischen Facetten des Typ 2-Diabetes. Daraufhin diskutierten Hayden und Tyagi (2003) unterschiedliche Defekte innerhalb der eNOS-abhängigen NO-Produktion und postulierten Genpolymorphismen, die gemeinsam mit bestimmten Umweltfaktoren zu defekten Signalwegen im Endothel mit Atherosklerose und schließlich zur Manifestation des Typ 2-Diabetes führen. Die Gruppe um Shankar (1998) entwarf ein neues Modell in Bezug auf die Beteiligung von ZNS-Mechanismen an der peripheren Insulinresistenz und beeinträchtigten Insulin-Sekretion im Typ 2-Diabetes. Nach Applikation eines allgemein anerkannten NOS-Inhibitors in den Hirnventrikel von SD-Ratten entwickelten die Tiere die typischen Typ 2-Diabetes-Charakteristika. Ob Fehlsteuerungen im NO-System und Stress-induzierte Dysfunktionen der HHN-Achse einander beeinflussen oder bedingen, muss noch untersucht werden (Riedel, 2000; Rosmond, 2003). Ein Zusammenwirken zwischen HHN-Achsen-Überaktivität mit konsekutivem Hyperkortisolismus und viszeraler Adipositas bei der Manifestation des Typ 2-Diabetes konnte bereits hergestellt werden.

In den Versuchen zum Typ 2-Diabetes standen überraschenderweise auf hypothalamo-hypophysärer Ebene merkliche Veränderungen für die eNOS-Isoform im Vordergrund, während in den STZ-D Ratten auf keiner Ebene der HHN-Achse Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren zu beobachten waren. In beiden Typ 2-Diabetesmodellen war die eNOS-Genexpression gegenüber den entsprechenden Kontrollratten signifikant gesteigert. Studien zur eNOS-abhängigen NO-Produktion in experimentellen Modellen des Insulin-unabhängigen Diabetes sind in relativ geringer Anzahl vorhanden und werden kontrovers diskutiert. Ihre Ergebnisse reichen von einer erhöhten eNOS-Aktivität trotz beeinträchtiger Gefäßdilatation über eine geringere Verfügbarkeit von Arginin, dem primären Substrat für weitere NO-Formation, bis hin zu einer reduzierten NO-Bioaktivität und vermehrten Destruktion durch freie Sauerstoffradikale (Pieper und Peltier, 1995; De Vriese *et al.*, 2000). Diese Varianz führten Pieper *et al.* (1998) auf gewebsspezifische Effekte zurück, die durch die jeweiligen Glukose-Plasmakonzentration und Expositionsdauer. Die NOS-Aktivität wird durch vaskulären Scherstress und als Antwort auf eine Vielfalt von Rezeptorliganden, z.B. BK, stimuliert. So scheint die Frage berechtigt, ob der von uns gemessene Anstieg in der Menge der B₂-Rezeptor-mRNA innerhalb der hypothalamo-hypophysären Einheit auf einen ebenfalls erhöhten BK-Plasmaspiegel hinweist und somit die Ligandenstimulation einen wichtigen Faktor für die eNOS-Expression darstellt. Lediglich die ZDF-Ratten zeigten im Hypothalamus Abweichungen in der NOS-Genexpression. Die nNOS-mRNA-Menge fiel in den Versuchstieren merklich niedriger aus. Denkbar ist, dass durch eine final geringere NO-Produktion Hemmmechanismen auf Neuropeptide, die die Nahrungsaufnahme fördern, entfallen und so eine Hyperphagie mit seinen Folgen resultiert. Eine i.c.v. Gabe von NPY konnte die Ausbildung aller Symptome der Obese-Ratten bewirken (Zarjevski *et al.*, 1993). Dieser Fund verdeutlicht abermals die Bedeutung zentralnervöser Signalwege und lässt vermuten, dass die Ätiologie der adipösen Insulinresistenz hier gesucht werden muss. In fettleibigen Mäusen und Ratten gelang mehrfach der Nachweis einer beeinträchtigten Glukoseutilisation im Gehirn (McCall, 1992; Vannucci *et al.*, 1997). Dieser Umstand könnte der Grund für adaptive Veränderungen sein, die mit erhöhten NPY- und CRH-Spiegeln im Hypothalamus einhergehen, um die Energieversorgung zu steigern (Sipols *et al.*, 1995; Havel *et al.*, 2000). Außerdem kommt es infolge der eingeschränkten Glukoseutilisation zur

vermehrten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die eine lokale Entzündung hervorrufen könnten (Zarjevski *et al.*, 1993; Jeanrenaud, 1994). Die Induktion der iNOS-Isoform in der Hypophyse der Obese-Ratten könnte ein Ausdruck dieser inadäquaten Energieversorgung mit vermehrter Zytokinproduktion sein. Umgekehrt gibt es Studien, die zeigen, dass eine erhöhte NO-Produktion Funktionen von NPY moduliert und eine unangemessene Nahrungsaufnahme verantwortet. Auch die Gabe eines NOS-Inhibitors vermochte in den Obese-Ratten die NPY-vermittelte Hyperphagie zu mindern (Squadrito *et al.*, 1993; Lambert *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2000). In den ZDF-Ratten war die induzierbare Komponente der NOS-Isoformen mengenmäßig erniedrigt. Ähnlich den Veränderungen in den STZ-D Ratten könnte dies Folge der Suppression durch den enorm hohen Kortikosteroid-Plasmaspiegel sein.

Der Beitrag von Fehlsteuerungen des zentralen NO-Systems in der Entwicklung des Typ 2-Diabetes ist offensichtlich, jedoch durchflechten sich zahlreiche Regulationssysteme und erschweren so eindeutige Aussagen über Ursache oder sekundäre Veränderungen. In den beiden hier verwandten Tiermodellen (ZDF- und Obese-Ratten) scheint ein Zusammenspiel aus Umwelt- und genetischen Faktoren an der Entstehung des Typ 2-Diabetes beteiligt zu sein. Die Interaktionsmöglichkeiten zwischen Glukosemetabolismus und übergeordneten Regulationsmechanismen ist am ehesten im ZNS gegeben. Hier befindet sich das integrative Zentrum, das auf Umwelteinflüsse und andere Veränderungen reagiert. Daher sollte die Suche nach zentralen Modulatoren, bzw. Auslösern von Folgesymptomen fortgesetzt werden.

6.3 Der Glukose-Transporter

Die Isoform GLUT 1 ist in der Zellmembran nahezu aller Körperzellen vorhanden und ist für die basale Nährstoffversorgung aller Gewebe verantwortlich. Im ZNS wird der Glukose-Transport über die BHS ausschließlich durch GLUT 1 kontrolliert. Diese Sonderstellung wird als Ursache einiger Spätkomplikationen des Diabetes diskutiert (Pardridge *et al.*, 1993; Kumagai, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte im Hypothalamus von STZ-D Ratten ein erhöhter GLUT 1-mRNA-Gehalt nachgewiesen werden. Ähnlich wie in den Studien der Arbeitsgruppe um Lutz (1993) bewirkte die eingeleitete Insulinersatztherapie eine Korrektur der

mRNA-Expression auf Normalwerte. Dies weist auf eine stoffwechselabhängige Regulation hin, die möglicherweise über den Leptin-Spiegel gesteuert wird. In den ZDF-Ratten konnten trotz erhöhter Plasma-Glukose- und Insulin-Spiegel keine signifikanten Veränderungen gezeigt werden

Der GLUT 2 scheint eine wichtige Komponente des Glukose-Rezeptions-Systems zu sein. Seine geringe Affinität zu Glukose ermöglicht für die jeweilige Zelle eine proportionale Glukose-Aufnahme bis hin zu den höchsten physiologischen Blut-Glukose-Konzentrationen. In β -Zellen des Pankreas wird hierdurch die Detektion der aktuellen Glukosekonzentration und die jeweils adäquate Sekretion von Insulin gewährleistet. Im Hypothalamus wird über den gleichen Prozess die Modulation des Essverhaltens sowie des neuroendokrinen und des autonomen Systems angenommen (Thorens, 2001; Roncero *et al.*, 2004). Gerade beim Typ 2-Diabetes soll diese Fähigkeit des Glukose-Sensors beeinträchtigt sein. GLUT 2 ist auch an der hepatischen Glukoseproduktion beteiligt. In der vorliegenden Arbeit war die Menge an GLUT 2-mRNA im Hypothalamus der STZ-D Ratten signifikant erhöht, was eine Reaktion auf die Hyperglykämie oder Hypoinsulinämie vermuten lässt. Die Insulin-Ersatztherapie bewirkte jedoch keine Änderung der GLUT 2-Expression. Es muss angenommen werden, dass an der Ausprägung des diabetischen Phänotyps neben dem reinen Insulinmangel beim Typ 1-Diabetes weitere, insulinunabhängige Pathomechanismen vorkommen. So gibt es Hinweise auf eine pathologische immunmodulatorische Regulation, welche nicht allein durch die symptomatische Insulinersatztherapie korrigiert werden kann (Pozzilli, 1998). Die Daten der ZDF-Ratten könnten diese Aussage bestätigen: Weder der erhöhte Glukose- noch Insulinspiegel sind an der veränderten Genexpression für GLUT 2 maßgeblich beteiligt. Hier konnte zwischen den ZDF- und Kontrollratten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Der neben GLUT 1 im Gehirn mengenmäßig vorherrschende Glukosetransporter ist GLUT 3. Er bindet Glukose mit hoher Aktivität und sichert eine maximale Glukose-Transportrate über den gesamten Bereich möglicher Blut-Glukose-Konzentrationen. Reagan *et al.* (1999) konnten im Hippokampus von STZ-D Ratten einen signifikanten Anstieg der GLUT 3-Transkripte nachweisen. In gleicher Weise verhielt sich die Genexpression im Hypothalamus. Für die Transporter 1 und 3 konnten wir in den STZ-D Ratten einen Anstieg der Genexpression beobachten. Die vorliegenden Ergebnisse stimmen mit früher

publizierten Daten überein und reflektieren entweder eine gesteigerte Transkriptionsrate oder eine Stabilisierung der GLUT-mRNA. Lutz und Pardridge (1993) entdeckten ebenfalls erhöhte mRNA-Mengen des GLUT 1s in der BHS von STZ-D Ratten. Parallel dazu konnte die in der entsprechenden Studie eingeleitete Insulin-Ersatztherapie ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit die Genexpression auf das Niveau der Kontrollratten senken. Die Hochregulation von GLUT 3 im Hypophysenhinterlappen von Ratten wurde bereits in zwei *in vivo* Experimenten unter Bedingungen der stimulierten HHN-Achsenaktivität durch STZ induzierten Diabetes und Wasserentzug gefunden (Maher *et al.*, 1993; Maher und Simpson, 1994). Hier resultierte unter Insulin-Substitution ebenfalls ein Rückgang der Genexpression auf Werte von Kontrollratten. Andere Diabetes-Studien liefern zum Vorkommen zentraler GLUTs teilweise widersprüchliche Daten, was auf eine streng gewebespezifische Regelung innerhalb des ZNS hindeutet. Wahrscheinlich ermöglicht gerade diese unterschiedliche Expression verschiedener GLUT-Moleküle in den unterschiedlichen Geweben und die Verteilung spezifischer Transporter auf bestimmten Zellen die präzise Kontrolle des Glukose-Transportes.

Die Isoform GLUT 4 ist der einzige Insulin-abhängig agierende Glukose-transporter. Er ist typisch für das Muskel- und Fettgewebe. Der Transporter wurde auch in ZNS-Strukturen, wie Hypothalamus, Kleinhirn, Ventrikelsystem und endothelialen Zellen der BHS nachgewiesen (Brant *et al.*, 1993; Vannucci *et al.*, 1998). Der Hypothalamus nimmt im ZNS nicht nur aufgrund seiner zahlreichen Funktionen und Integration in viele Regelkreise eine Sonderstellung wahr. Er ist gegenüber zirkulierenden Insulin- und Glukose-Spiegeln direkt empfindlich (Livingstone *et al.*, 1995). Livingstone vermutet hierin die Fähigkeit des Hypothalamus begründet, direkt auf erhöhte Glukosespiegel und veränderte Stoffwechsellagen zu reagieren. Außerdem bietet dieser Umstand einen Mechanismus, über den Insulin Einfluss auf endokrine und neuronale Vorgänge besitzt und die gesamte Glukosehomöostase des Körpers regulieren kann. Unsere Experimente konnten jedoch in den hypoinsulinären Ratten keine Gehaltänderung der GLUT 4-mRNA detektieren und verfehlten damit den Nachweis einer regelbaren Glukoseaufnahme in die Zellen des Hypothalamus.

Der GLUT 5 zählt zu den konstitutiv exprimierten Glukosetransportern in der Zellmembran. Weder für den Typ 1- noch für den Typ 2-Daibetes konnten

signifikante Veränderungen zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren nachgewiesen werden, was eine stoffwechselunabhängige Regulation vermuten lässt.

Die Glukosetransporter werden im Zusammenhang mit akuten und chronischen Störungen der Glukosehomöostase diskutiert. Insgesamt zeichnet sich noch kein klares Bild ab und zur Klärung ihrer Relevanz in Hinblick auf den zerebralen Energiestoffwechsel bedarf es weiterer Untersuchungen.

Schlussfolgerung:

Die vorliegende Arbeit zeigt sowohl für das KKS als auch das NO-System eine Gewebe-spezifisch ausgeprägte Regulation der Genexpression. Die vorliegenden Daten aus RT-PCR- und Western Blot-Analysen lassen lediglich deskriptive Aussagen über das Zusammenspiel zwischen dem KKS und NO-System und eine mögliche funktionelle Relevanz derselben auf die HHN-Achse in diabetischen Ratten zu. Unter den Kinin-Rezeptoren zeigte nur die Genexpression für den B₂-Rezeptor signifikante Veränderungen zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren. Der Anstieg der B₂-Rezeptor-mRNA im Hypothalamus und der Hypophyse der Typ 1-Diabetes-Ratten mag ein Hinweis für die erhöhte Anfälligkeit gegenüber inneren und äußeren Stressoren sein. In Bezug auf das NO-System fallen besonders für die endotheliale Isoform bedeutende Unterschiede im Rahmen des Typ 2-Diabetes auf. Die eNOS ist möglicherweise an der Manifestation des Insulin-unabhängigen Diabetes beteiligt. Der deutliche Anstieg der nNOS-mRNA im Hypothalamus der Typ 1-Diabetes Ratten könnte die Krankheits-assoziierte Hyperphagie bedingen. Der signifikant erniedrigte iNOS-mRNA-Gehalt in der Nebenniere von STZ-D Ratten ist möglicherweise durch den Hyperkortisolismus bedingt, der einen starken Inhibitor der iNOS-Isoform darstellt. In sich anschließenden pathophysiologischen Untersuchungen bleibt der Beitrag des zentralen und peripheren KKS und NO-Systems zu klären.

7 Zusammenfassung

Der Diabetes mellitus ist neben Glukoseregulationsstörungen auch durch Hyperphagie, Polydipsie und Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HHN)-Achse gekennzeichnet. Durch welche Mechanismen diese Effekte erzielt werden, ist unklar. In peripheren Organen ist ein Beitrag des Kallikrein-Kinin-Systems (KKS) und Stickstoff (NO)-Systems in der Entstehung einiger Symptome oder Spätfolgen des Diabetes gesichert.

Die vorliegende Arbeit untersuchte anhand von vier verschiedenen Rattenmodellen das Zusammenspiel zwischen dem KKS und NO-System und der HHN-Achsenaktivität unter diabetischer Stoffwechsellage. Mittels der RT-PCR- und Western Blot-Analyse wurden die mRNA- und Proteinmengen der Kinin-Rezeptoren, NOS-Isoformen und ergänzend die Genexpression der Glukose-Transporter bestimmt. Dabei wurden die Ergebnisse der unterschiedlichen Diabetesmodelle verglichen. Zusätzlich protokollierten wir Hormonveränderungen im Plasma der Versuchstiere.

Obwohl alle ausgewählten Ratten die Symptome eines chronischen Krankheitsverlaufs aufwiesen, zeigte der induzierbare B₁-Rezeptor weder in den Typ 1- noch Typ 2-Diabetes Ratten signifikante Veränderungen und scheint daher eine untergeordnete Rolle innerhalb der HHN-Achse zu spielen. Der B₂-Rezeptor hingegen ist in seiner Regulation den Diabetestypen unterworfen. Die gesteigerte Genexpression im Hypothalamus mag die erhöhte Empfindsamkeit gegenüber jeglicher Art von pathophysiologischen Stressoren widerspiegeln. An der vermehrten B₂-Genexpression von STZ-D Ratten sind vermutlich andere Faktoren als die Hypoinsulinämie oder Hyperglykämie beteiligt, da die eingeleitete Insulin-Ersatztherapie im Hypothalamus sowie der Nebenniere keine Korrektur auf Normalwerte bewirkte.

Die NOS-Isoformen zeigten ein jeweils Diabetestyp-spezifisches Muster. Die gesteigerte nNOS-Genexpression in den STZ-D Ratten erwies sich als Insulin-abhängig. Gleichzeitig verringerte Proteinmengen erschweren jedoch eine eindeutige Interpretation. Ähnliches gilt für die iNOS: Auch hier verhielten sich mRNA-Gehalt und Proteinmenge entgegengesetzt. In Bezug auf den Proteingehalt konnten keinerlei Differenzen zwischen erkrankten und gesunden Tieren aufdeckt werden, wie es vielseitig bei chronischen Krankheiten berichtet wurde. Interessanterweise konnten in den Typ 2-Diabetesmodellen signifikante Veränderungen für die eNOS nachgewiesen werden. Einige Autoren vermuten hierin sogar einen möglichen Auslöser oder zumindest wichtigen Beitrag zum Insulin-unabhängigen Diabetes.

Insgesamt reflektieren die vorliegenden Daten ein streng gewebespezifisches Vorkommen der Kinin-Rezeptoren und NOS-Isoformen. Die Beteiligung des KKS an Veränderungen der HHN-Achsenaktivität unter diabetischen Bedingungen ist aufgrund der hier vorgestellten Daten eher unwahrscheinlich. Vielmehr untermauern die Diabetes-abhängigen Regulationsstörungen innerhalb des zentralen NO-Systems die wichtige Rolle von NO an Pathogenese und Verlauf diabetischer Erkrankungen.

8 Literaturverzeichnis

1. Ahluwalia, A. und Perretti, M. (1996). Involvement of bradykinin B₁ receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 β in vivo in the mouse. *J Immunol* **156**: 269-74.
2. Barber, M., Kasturi, B. S., Austin, M. E., Patel, K. P., MohanKumar, S. M. und MohanKumar, P. S. (2003). Diabetes-induced neuroendocrine changes in rats: role of brain monoamines, insulin and leptin. *Brain Res* **964**: 128-35.
3. Baurle, L. (2002). Beteiligung von zentraln Bradykinin B₂ Rezeptoren an der Aktivierung des sympathischen Nervensystems (in vivo) der Ratte. *Doktorarbeit aus dem Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie der medizinischen Universität zu Lübeck*.
4. Biessels, G. J., Kappelle, A. C., Bravenboer, B., Erkelens, D. W. und Gispen, W. H. (1994). Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia* **37**: 643-50.
5. Blais, C., Jr., Marceau, F., Rouleau, J. L. und Adam, A. (2000). The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides* **21**: 1903-40.
6. Brann, D. W., Bhat, G. K., Lamar, C. A. und Mahesh, V. B. (1997). Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* **65**: 385-95.
7. Brant, A. M., Jess, T. J., Milligan, G., Brown, C. M. und Gould, G. W. (1993). Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 1297-302.
8. Brodsky, S. V., Morrishow, A. M., Dharia, N., Gross, S. S. und Goligorsky, M. S. (2001). Glucose scavenging of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* **280**: F480-6.
9. Campos, M. M. und Calixto, J. B. (1995). Involvement of B₁ and B₂ receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br J Pharmacol* **114**: 1005-13.
10. Carantoni, M., Abbasi, F., Warmerdam, F., Klebanov, M., Wang, P. W., Chen, Y. D., Azhar, S. und Reaven, G. M. (1998). Relationship between insulin resistance and partially oxidized LDL particles in healthy, nondiabetic volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**: 762-7.
11. Chan, O., Chan, S., Inouye, K., Shum, K., Matthews, S. G. und Vranic, M. (2002a). Diabetes impairs hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) responses to hypoglycemia, and insulin treatment normalizes HPA but not epinephrine responses. *Diabetes* **51**: 1681-9.
12. Chan, O., Chan, S., Inouye, K., Vranic, M. und Matthews, S. G. (2001). Molecular regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in streptozotocin-induced diabetes: effects of insulin treatment. *Endocrinology* **142**: 4872-9.
13. Chan, O., Inouye, K., Vranic, M. und Matthews, S. G. (2002b). Hyperactivation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in streptozotocin-diabetes is associated with reduced stress responsiveness and decreased pituitary and adrenal sensitivity. *Endocrinology* **143**: 1761-8.
14. Chen, E. Y., Emerich, D. F., Bartus, R. T. und Kordower, J. H. (2000). B₂ bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* **427**: 1-18.

15. **Cloutier, F. und Couture, R.** (2000). Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B₁ and B₂ receptor agonists in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol* **130**: 375-85.
16. **Cloutier, F., de Sousa Buck, H., Ongali, B. und Couture, R.** (2002). Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B₂ receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **135**: 1641-54.
17. **Couto, L. B., Correa, F. M. und Pela, I. R.** (1998). Brain sites involved in the antinociceptive effect of bradykinin in rats. *Br J Pharmacol* **125**: 1578-84.
18. **Couture, R., Harrisson, M., Vianna, R. M. und Cloutier, F.** (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* **429**: 161-76.
19. **Couture, R., Lindsey, C.J.,** (2000). Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions.
20. **Cymering, C. B., Dada, L. A. und Podesta, E. J.** (1998). Effect of nitric oxide on rat adrenal zona fasciculata steroidogenesis. *J Endocrinol* **158**: 197-203.
21. **Dallman, M. F., Strack, A. M., Akana, S. F., Bradbury, M. J., Hanson, E. S., Scribner, K. A. und Smith, M.** (1993). Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Front Neuroendocrinol* **14**: 303-47.
22. **Damas, J., Bourdon, V. und Lefebvre, P. J.** (1999). Insulin sensitivity, clearance and release in kininogen-deficient rats. *Exp Physiol* **84**: 549-57.
23. **Davis, A. J. und Perkins, M. N.** (1994). The involvement of bradykinin B₁ and B₂ receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat. *Br J Pharmacol* **113**: 63-8.
24. **de Sousa Buck, H., Ongali, B., Thibault, G., Lindsey, C. J. und Couture, R.** (2002). Autoradiographic detection of kinin receptors in the human medulla of control, hypertensive, and diabetic donors. *Can J Physiol Pharmacol* **80**: 249-57.
25. **De Vriese, A. S., Van de Voorde, J., Blom, H. J., Vanhoutte, P. M., Verbeke, M. und Lameire, N. H.** (2000). The impaired renal vasodilator response attributed to endothelium-derived hyperpolarizing factor in streptozotocin-induced diabetic rats is restored by 5-methyltetrahydrofolate. *Diabetologia* **43**: 1116-25.
26. **Dendorfer, A. und Dominiak, P.** (1995). Characterization of bradykinin receptors mediating catecholamine release in PC12 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **351**: 274-81.
27. **Dendorfer, A., Hauser, W., Falias, D. und Dominiak, P.** (1996). Bradykinin increases catecholamine release via B₂ receptors. *Pflugers Arch* **432**: R99-106.
28. **Dinan, T. G., Thakore, J. und O'Keane, V.** (1994). Lowering cortisol enhances growth hormone response to growth hormone releasing hormone in healthy subjects. *Acta Physiol Scand* **151**: 413-6.
29. **Duka, I., Shenouda, S., Johns, C., Kintsurashvili, E., Gavras, I. und Gavras, H.** (2001). Role of the B₂ receptor of bradykinin in insulin sensitivity. *Hypertension* **38**: 1355-60.
30. **Duplain, H., Burcelin, R., Sartori, C., Cook, S., Egli, M., Lepori, M., Vollenweider, P., Pedrazzini, T., Nicod, P., Thorens, B. und Scherrer, U.** (2001). Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* **104**: 342-5.

31. Eizirik, D. L., Delaney, C. A., Green, M. H., Cunningham, J. M., Thorpe, J. R., Pipeleers, D. G., Hellerstrom, C. und Green, I. C. (1996). Nitric oxide donors decrease the function and survival of human pancreatic islets. *Mol Cell Endocrinol* **118**: 71-83.
32. Flodstrom, M., Welsh, N. und Eizirik, D. L. (1996). Cytokines activate the nuclear factor κ B (NF- κ B) and induce nitric oxide production in human pancreatic islets. *FEBS Lett* **385**: 4-6.
33. Forstermann, U., Nakane, M., Tracey, W. R. und Pollock, J. S. (1993). Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J* **14 Suppl I**: 10-5.
34. Garthwaite, J. (1991). Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* **14**: 60-7.
35. Grossman, A., Costa, A., Forsling, M. L., Jacobs, R., Kostoglou-Athanassiou, I., Nappi, G., Navarra, P. und Satta, M. A. (1997). Gaseous neurotransmitters in the hypothalamus. The roles of nitric oxide and carbon monoxide in neuroendocrinology. *Horm Metab Res* **29**: 477-82.
36. Guillaume-Gentil, C., Rohner-Jeanrenaud, F., Abramo, F., Bestetti, G. E., Rossi, G. L. und Jeanrenaud, B. (1990). Abnormal regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the genetically obese fa/fa rat. *Endocrinology* **126**: 1873-9.
37. Hall, J. M. (1992). Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol Ther* **56**: 131-90.
38. Havel, P. J., Hahn, T. M., Sindelar, D. K., Baskin, D. G., Dallman, M. F., Weigle, D. S. und Schwartz, M. W. (2000). Effects of streptozotocin-induced diabetes and insulin treatment on the hypothalamic melanocortin system and muscle uncoupling protein 3 expression in rats. *Diabetes* **49**: 244-52.
39. Hayden, M. R. und Tyagi, S. C. (2003). Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atheroscleropathy) with hyperglycemia a late manifestation? The role of NOS, NO, and redox stress. *Cardiovasc Diabetol* **2**: 2.
40. Hecquet, C., Tan, F., Marcic, B. M. und Erdos, E. G. (2000). Human bradykinin B₂ receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. *Mol Pharmacol* **58**: 828-36.
41. Heneka, M. T. und Feinstein, D. L. (2001). Expression and function of inducible nitric oxide synthase in neurons. *J Neuroimmunol* **114**: 8-18.
42. Hidaka, S., Yoshimatsu, H., Kondou, S., Oka, K., Tsuruta, Y., Sakino, H., Itateyama, E., Noguchi, H., Himeno, K., Okamoto, K., Teshima, Y., Okeda, T. und Sakata, T. (2001). Hypoleptinemia, but not hypoinsulinemia, induces hyperphagia in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Neurochem* **77**: 993-1000.
43. Hidaka, S., Yoshimatsu, H., Kondou, S., Tsuruta, Y., Oka, K., Noguchi, H., Okamoto, K., Sakino, H., Teshima, Y., Okeda, T. und Sakata, T. (2002). Chronic central leptin infusion restores hyperglycemia independent of food intake and insulin level in streptozotocin-induced diabetic rats. *Faseb J* **16**: 509-18.
44. Jaffa, A. A., Miller, D. H., Bailey, G. S., Chao, J., Margolius, H. S. und Mayfield, R. K. (1987). Abnormal regulation of renal kallikrein in experimental diabetes. Effects of insulin on prokallikrein synthesis and activation. *J Clin Invest* **80**: 1651-9.
45. Jeanrenaud, B. (1994). Central nervous system and peripheral abnormalities: clues to the understanding of obesity and NIDDM. *Diabetologia* **37 Suppl 2**: S170-8.

46. **Jessop, D. S.** (1999). Stimulatory and inhibitory regulators of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **13**: 491-501.
47. **Jones, C., Phillips, E., Davis, C., Arbuckle, J., Yaqoob, M., Burgess, G. M., Docherty, R. J., Webb, M., Bevan, S. J. und McIntyre, P.** (1999). Molecular characterisation of cloned bradykinin B₁ receptors from rat and human. *Eur J Pharmacol* **374**: 423-33.
48. **Kaplan, A. P., Joseph, K., Shibayama, Y., Nakazawa, Y., Ghebrehiwet, B., Reddigari, S. und Silverberg, M.** (1998). Bradykinin formation. Plasma and tissue pathways and cellular interactions. *Clin Rev Allergy Immunol* **16**: 403-29.
49. **Kim, E. M., O'Hare, E., Grace, M. K., Welch, C. C., Billington, C. J. und Levine, A. S.** (2000). ARC POMC mRNA and PVN α -MSH are lower in obese relative to lean zucker rats. *Brain Res* **862**: 11-6.
50. **Kim, J. J. und Yoon, K. S.** (1998). Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Trends Neurosci* **21**: 505-9.
51. **Kishimoto, J., Tsuchiya, T., Emson, P. C. und Nakayama, Y.** (1996). Immobilization-induced stress activates neuronal nitric oxide synthase (nNOS) mRNA and protein in hypothalamic-pituitary-adrenal axis in rats. *Brain Res* **720**: 159-71.
52. **Kobayashi, T., Matsumoto, T. und Kamata, K.** (2000). Mechanisms underlying the chronic pravastatin treatment-induced improvement in the impaired endothelium-dependent aortic relaxation seen in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* **131**: 231-8.
53. **Kumagai, A. K.** (1999). Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* **15**: 261-73.
54. **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5.
55. **Lambert, P. D., Wilding, J. P., Turton, M. D., Ghatei, M. A. und Bloom, S. R.** (1994). Effect of food deprivation and streptozotocin-induced diabetes on hypothalamic neuropeptide Y release as measured by a radioimmunoassay-linked microdialysis procedure. *Brain Res* **656**: 135-40.
56. **Lindsay, R. M., Peet, R. S., Wilkie, G. S., Rossiter, S. P., Smith, W., Baird, J. D. und Williams, B. C.** (1997). In vivo and in vitro evidence of altered nitric oxide metabolism in the spontaneously diabetic, insulin-dependent BB/Edinburgh rat. *Br J Pharmacol* **120**: 1-6.
57. **Livingstone, C., Lyall, H. und Gould, G. W.** (1995). Hypothalamic GLUT 4 expression: a glucose- and insulin-sensing mechanism? *Mol Cell Endocrinol* **107**: 67-70.
58. **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-75.
59. **Lutz, A. J. und Pardridge, W. M.** (1993). Insulin therapy normalizes GLUT1 glucose transporter mRNA but not immunoreactive transporter protein in streptozocin-diabetic rats. *Metabolism* **42**: 939-44.
60. **Madeddu, P., Anania, V., Alagna, S., Troffa, C., Parpaglia, P. P., Tonolo, G., Demontis, M. P., Varoni, M. V., Fattaccio, C. und Glorioso, N.** (1992). Role of brain kallikrein-kinin system in regulation of adrenocorticotropin release. *Am J Physiol* **262**: E312-8.

61. Mage, M., Pecher, C., Neau, E., Cellier, E., Dos Reiss, M. L., Schanstra, J. P., Couture, R., Bascands, J. L. und Girolami, J. P. (2002). Induction of B₁ receptors in streptozotocin diabetic rats: possible involvement in the control of hyperglycemia-induced glomerular Erk 1 and 2 phosphorylation. *Can J Physiol Pharmacol* **80**: 328-33.
62. Maher, F. und Simpson, I. A. (1994). Modulation of expression of glucose transporters GLUT3 and GLUT1 by potassium and N-methyl-D-aspartate in cultured cerebellar granule neurons. *Mol Cell Neurosci* **5**: 369-75.
63. Maher, F., Simpson, I. A. und Vannucci, S. J. (1993). Alterations in brain glucose transporter proteins, GLUT1 and GLUT3, in streptozotocin diabetic rats. *Adv Exp Med Biol* **331**: 9-12.
64. Malendowicz, L. K., Macchi, C., Nussdorfer, G. G. und Markowska, A. (1996). Effects of the prolonged administration of bradykinin on the rat pituitary-adrenocortical axis. *Histol Histopathol* **11**: 641-5.
65. Mancusi, G., Hutter, C., Baumgartner-Parzer, S., Schmidt, K., Schutz, W. und Sexl, V. (1996). High-glucose incubation of human umbilical-vein endothelial cells does not alter expression and function either of G-protein alpha-subunits or of endothelial NO synthase. *Biochem J* **315 (Pt 1)**: 281-7.
66. Marceau, F. (1995). Kinin B₁ receptors: a review. *Immunopharmacology* **30**: 1-26.
67. Marceau, F. (1997). Is there a role for bradykinin in the therapeutic and side effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors? *Can J Cardiol* **13**: 187-94.
68. Marceau, F., Hess, J. F. und Bachvarov, D. R. (1998). The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol Rev* **50**: 357-86.
69. Marceau, F., Larrivee, J. F., Bouthillier, J., Bachvarova, M., Houle, S. und Bachvarov, D. R. (1999). Effect of endogenous kinins, prostanoids, and NO on kinin B₁ and B₂ receptor expression in the rabbit. *Am J Physiol* **277**: R1568-78.
70. Marceau, F., Lussier, A., Regoli, D. und Giroud, J. P. (1983). Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation. *Gen Pharmacol* **14**: 209-29.
71. Mayfield, R. K., Margolius, H. S., Shimojo, N., Miller, D. H., Squires, J. und Namm, D. H. (1985). Renal kallikrein in human and experimental diabetes mellitus. *Horm Metab Res Suppl* **15**: 31-7.
72. McCall, A. L. (1992). The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* **41**: 557-70.
73. McCann, S. M., Antunes-Rodrigues, J., Franci, C. R., Anselmo-Franci, J. A., Karanth, S. und Rettori, V. (2000). Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. *Braz J Med Biol Res* **33**: 1121-31.
74. McEachern, A. E., Shelton, E. R., Bhakta, S., Obernolte, R., Bach, C., Zuppan, P., Fujisaki, J., Aldrich, R. W. und Jarnagin, K. (1991). Expression cloning of a rat B₂ bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7724-8.
75. Michel, T. (1999). Targeting and translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Braz J Med Biol Res* **32**: 1361-6.
76. Miskowiak, B., Rebuffat, P., Nussdorfer, G. G. und Malendowicz, L. K. (1999). Bradykinin and pituitary-adrenocortical function in the rabbit: in vitro and in vivo studies. *Endocr Res* **25**: 139-51.

77. Miyata, T., Taguchi, T., Uehara, M., Isami, S., Kishikawa, H., Kaneko, K., Araki, E. und Shichiri, M. (1998). Bradykinin potentiates insulin-stimulated glucose uptake and enhances insulin signal through the bradykinin B₂ receptor in dog skeletal muscle and rat L6 myoblasts. *Eur J Endocrinol* **138**: 344-52.
78. Mizock, B. A. (2001). Alterations in fuel metabolism in critical illness: hyperglycaemia. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism* **15**: 533-51.
79. Mooradian, A. D. (1988). Diabetic complications of the central nervous system. *Endocr Rev* **9**: 346-56.
80. Mooradian, A. D., Grabau, G. und Uko-eninn, A. (1993). In situ quantitative estimates of the age-related and diabetes-related changes in cerebral endothelial barrier antigen. *Brain Res* **609**: 41-4.
81. Morley, J. E., Alshaher, M. M., Farr, S. A., Flood, J. F. und Kumar, V. B. (1999). Leptin and neuropeptide Y (NPY) modulate nitric oxide synthase: further evidence for a role of nitric oxide in feeding. *Peptides* **20**: 595-600.
82. Morris, M. J. und Pavia, J. M. (2004). Increased endogenous noradrenaline and neuropeptide Y release from the hypothalamus of streptozotocin diabetic rats. *Brain Res* **1006**: 100-6.
83. Morrison, J. F., Howarth, F. C. und Sheen, R. (2001). Catecholamines in the heart and adrenal gland of the STZ-diabetic rat. *Arch Physiol Biochem* **109**: 206-8.
84. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**: 263-73.
85. Muniyappa, R., Srinivas, P. R., Ram, J. L., Walsh, M. F. und Sowers, J. R. (1998). Calcium and protein kinase C mediate high-glucose-induced inhibition of inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **31**: 289-95.
86. Nathan, C. und Xie, Q. W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* **78**: 915-8.
87. Ni, A., Chai, K. X., Chao, L. und Chao, J. (1998). Molecular cloning and expression of rat bradykinin B₁ receptor. *Biochim Biophys Acta* **1442**: 177-85.
88. O'Connor, T. M., O'Halloran, D. J. und Shanahan, F. (2000). The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *Qjm* **93**: 323-33.
89. O'Donnell, M. P., Kasiske, B. L. und Keane, W. F. (1988). Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. *Faseb J* **2**: 2339-47.
90. Olivenza, R., Moro, M. A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Fernandez, A. P., Rodrigo, J., Bosca, L. und Leza, J. C. (2000). Chronic stress induces the expression of inducible nitric oxide synthase in rat brain cortex. *J Neurochem* **74**: 785-91.
91. O'Shea, R. D. und Gundlach, A. L. (1996). Food or water deprivation modulate nitric oxide synthase (NOS) activity and gene expression in rat hypothalamic neurones: correlation with neurosecretory activity? *J Neuroendocrinol* **8**: 417-25.
92. Palitzsch, B. (2000). Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2. Berlin, Springer.
93. Palkovits, M., Brownstein, M.J. (1992). Maps & Guide to Microdissection of the Rat Brain, McGraw-Hill.

94. **Pardridge, W. M., Boado, R. J. und Farrell, C. R.** (1990). Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem* **265**: 18035-40.
95. **Pardridge, W. M., Buciak, J. L., Kang, Y. S. und Boado, R. J.** (1993). Protamine-mediated transport of albumin into brain and other organs of the rat. Binding and endocytosis of protamine-albumin complex by microvascular endothelium. *J Clin Invest* **92**: 2224-9.
96. **Phagoo, S. B., Poole, S. und Leeb-Lundberg, L. M.** (1999). Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 β shift the repertoire of receptor subtypes from B₂ to B₁ in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol* **56**: 325-33.
97. **Pheng, L. H., Nguyen-Le, X. K., Nsa Allogho, S., Gobeil, F. und Regoli, D.** (1997). Kinin receptors in the diabetic mouse. *Can J Physiol Pharmacol* **75**: 609-11.
98. **Pieper, G. M.** (1998). Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: protective role of arginine on endothelial dysfunction. *Hypertension* **31**: 1047-60.
99. **Pieper, G. M. und Dondlinger, L.** (1997). Glucose elevations alter bradykinin-stimulated intracellular calcium accumulation in cultured endothelial cells. *Cardiovasc Res* **34**: 169-78.
100. **Pieper, G. M. und Peltier, B. A.** (1995). Amelioration by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in diabetic endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol* **25**: 397-403.
101. **Piroli, G. G., Grillo, C. A., Charron, M. J., McEwen, B. S. und Reagan, L. P.** (2004). Biphasic effects of stress upon GLUT8 glucose transporter expression and trafficking in the diabetic rat hippocampus. *Brain Res* **1006**: 28-35.
102. **Pozzilli, P.** (1998). Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus 1998. *Diabetes Metab Rev* **14**: 69-84.
103. **Prevot, V., Bouret, S., Stefano, G. B. und Beauvillain, J.** (2000). Median eminence nitric oxide signaling. *Brain Res Brain Res Rev* **34**: 27-41.
104. **Privitera, P. J., Thibodeaux, H. und Yates, P.** (1994). Rostral ventrolateral medulla as a site for the central hypertensive action of kinins. *Hypertension* **23**: 52-8.
105. **Qadri, F., Arens, T., Schwarz, E. C., Hauser, W., Dendorfer, A. und Dominiak, P.** (2003a). Brain nitric oxide synthase activity in spontaneously hypertensive rats during the development of hypertension. *J Hypertens* **21**: 1687-94.
106. **Qadri, F., Baurle, L., Hauser, W., Rascher, W. und Dominiak, P.** (1999a). Centrally bradykinin B₂-receptor-induced hypertensive and positive chronotropic effects are mediated via activation of the sympathetic nervous system. *J Hypertens* **17**: 1265-71.
107. **Qadri, F., Carretero, O. A. und Scicli, A. G.** (1999b). Centrally produced neuronal nitric oxide in the control of baroreceptor reflex sensitivity and blood pressure in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* **81**: 279-85.
108. **Qadri, F., Hauser, W., Jhren, O. und Dominiak, P.** (2002). Kinin B₁ and B₂ receptor mRNA expression in the hypothalamus of spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* **80**: 258-63.
109. **Qadri, F., Schwartz, E. C., Hauser, W., Jhren, O., Muller-Esterl, W. und Dominiak, P.** (2003b). Kinin B₂ receptor localization and expression in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis of spontaneously hypertensive rats. *Int Immunopharmacol* **3**: 285-92.

110. Qadri, F., Stark, E., Hauser, W., Jöhren, O., Dendorfer, A. und Dominiak, P. (2004). Expression of kinin receptor mRNA in the HPA axis of type 1 and type 2 diabetic rats. *Int Immunopharmacol* **4**: 571-6.
111. Reagan, L. P., Magarinos, A. M., Lucas, L. R., van Bueren, A., McCall, A. L. und McEwen, B. S. (1999). Regulation of GLUT3 glucose transporter in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Am J Physiol* **276**: E879-86.
112. Riedel, W. (2000). Role of nitric oxide in the control of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Z Rheumatol* **59 Suppl 2**: II/36-42.
113. Rivier, C. (1998). Role of nitric oxide and carbon monoxide in modulating the ACTH response to immune and nonimmune signals. *Neuroimmunomodulation* **5**: 203-13.
114. Roncero, I., Alvarez, E., Chowen, J. A., Sanz, C., Rabano, A., Vazquez, P. und Blazquez, E. (2004). Expression of glucose transporter isoform GLUT2 and glucokinase genes in human brain. *J Neurochem* **88**: 1203-10.
115. Rosmond, R. (2003). Stress induced disturbances of the HPA axis: a pathway to Type 2 diabetes? *Med Sci Monit* **9**: RA35-9.
116. Satta, M. A., Jacobs, R. A., Kaltsas, G. A. und Grossman, A. B. (1998). Endotoxin induces interleukin-1 β and nitric oxide synthase mRNA in rat hypothalamus and pituitary. *Neuroendocrinology* **67**: 109-16.
117. Scribner, K. A., Akana, S. F., Walker, C. D. und Dallman, M. F. (1993). Streptozotocin-diabetic rats exhibit facilitated adrenocorticotropin responses to acute stress, but normal sensitivity to feedback by corticosteroids. *Endocrinology* **133**: 2667-74.
118. Seo, D. O. und Rivier, C. (2001). Microinfusion of a nitric oxide donor in discrete brain regions activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* **13**: 925-33.
119. Serino, R., Ueta, Y., Tokunaga, M., Hara, Y., Nomura, M., Kabashima, N., Shibuya, I., Hattori, Y. und Yamashita, H. (1998). Upregulation of hypothalamic nitric oxide synthase gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* **41**: 640-8.
120. Shankar, R., Zhu, J. S., Ladd, B., Henry, D., Shen, H. Q. und Baron, A. D. (1998). Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. *J Clin Invest* **102**: 1403-12.
121. Shanks, N., Harbuz, M. S., Jessop, D. S., Perks, P., Moore, P. M. und Lightman, S. L. (1998). Inflammatory disease as chronic stress. *Ann N Y Acad Sci* **840**: 599-607.
122. Shepherd, P. R. und Kahn, B. B. (1999). Glucose transporters and insulin action - implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* **341**: 248-57.
123. Shiuchi, T., Cui, T. X., Wu, L., Nakagami, H., Takeda-Matsubara, Y., Iwai, M. und Horiuchi, M. (2002). ACE inhibitor improves insulin resistance in diabetic mouse via bradykinin and NO. *Hypertension* **40**: 329-34.
124. Sindelar, D. K., Mystkowski, P., Marsh, D. J., Palmiter, R. D. und Schwartz, M. W. (2002). Attenuation of diabetic hyperphagia in neuropeptide Y-deficient mice. *Diabetes* **51**: 778-83.
125. Sipols, A. J., Baskin, D. G. und Schwartz, M. W. (1995). Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* **44**: 147-51.

126. Snyder, S. H. und Bredt, D. S. (1992). Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* **266**: 68-71, 4-7.
127. Sone, M. und Osamura, R. Y. (2001). Leptin and the pituitary. *Pituitary* **4**: 15-23.
128. Squadrito, F., Calapai, G., Cucinotta, D., Altavilla, D., Zingarelli, B., Ioculano, M., Urna, G., Sardella, A., Campo, G. M. und Caputi, A. P. (1993). Anorectic activity of NG-nitro-L-arginine, an inhibitor of brain nitric oxide synthase, in obese Zucker rats. *Eur J Pharmacol* **230**: 125-8.
129. Stevens, R. B., Sutherland, D. E., Ansite, J. D., Saxena, M., Rossini, T. J., Levay-Young, B. K., Hering, B. J. und Mills, C. D. (1997). Insulin down-regulates the inducible nitric oxide synthase pathway: nitric oxide as cause and effect of diabetes? *J Immunol* **159**: 5329-35.
130. Strausbaugh, H. J., Dallman, M. F. und Levine, J. D. (1999). Repeated, but not acute, stress suppresses inflammatory plasma extravasation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14629-34.
131. Szabo, C., Thiemermann, C., Wu, C. C., Perretti, M. und Vane, J. R. (1994). Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 271-5.
132. Thorens, B. (2001). GLUT2 in pancreatic and extra-pancreatic gluco-detection (review). *Mol Membr Biol* **18**: 265-73.
133. Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 4350-4.
134. Tschöpe, C., Heringer-Walther, S., Koch, M., Spillmann, F., Wendorf, M., Hauke, D., Bader, M., Schultheiss, H. P. und Walther, T. (2000). Myocardial bradykinin B₂-receptor expression at different time points after induction of myocardial infarction. *J Hypertens* **18**: 223-8.
135. Tseng, C. C., Hattori, Y., Kasai, K., Nakanishi, N. und Shimoda, S. (1997). Decreased production of nitric oxide by LPS-treated J774 macrophages in high-glucose medium. *Life Sci* **60**: PL99-106.
136. Ueta, Y., Levy, A., Chowdrey, H. S. und Lightman, S. L. (1995). Water deprivation in the rat induces nitric oxide synthase (NOS) gene expression in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Neurosci Res* **23**: 317-9.
137. Vannucci, S. J., Gibbs, E. M. und Simpson, I. A. (1997). Glucose utilization and glucose transporter proteins GLUT1 and GLUT3 in brains of diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol* **272**: E267-74.
138. Vannucci, S. J., Koehler-Stec, E. M., Li, K., Reynolds, T. H., Clark, R. und Simpson, I. A. (1998). GLUT4 glucose transporter expression in rodent brain: effect of diabetes. *Brain Res* **797**: 1-11.
139. Vianna, R. M. und Calixto, J. B. (1998). Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg⁹-BK in mouse pleurisy. *Br J Pharmacol* **123**: 281-91.
140. Vokes, T. P., Aycinena, P. R. und Robertson, G. L. (1987). Effect of insulin on osmoregulation of vasopressin. *Am J Physiol* **252**: E538-48.

- 141. Wilke, R. A. und Hillard, C. J.** (1994). Decreased adrenal medullary catecholamine release in spontaneously diabetic BB-Wistar rats. Role of hypoglycemia. *Diabetes* **43**: 724-9.
- 142. Yamasaki, K., Edington, H. D., McClosky, C., Tzeng, E., Lizonova, A., Kovesdi, I., Steed, D. L. und Billiar, T. R.** (1998). Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* **101**: 967-71.
- 143. Yarkov, A., Montero, S., Lemus, M., Roces de Alvarez-Buylla, E. und Alvarez-Buylla, R.** (2001). Arginine-vasopressin in nucleus of the tractus solitarius induces hyperglycemia and brain glucose retention. *Brain Res* **902**: 212-22.
- 144. Yasin, S., Costa, A., Trainer, P., Windle, R., Forsling, M. L. und Grossman, A.** (1993). Nitric oxide modulates the release of vasopressin from rat hypothalamic explants. *Endocrinology* **133**: 1466-9.
- 145. Yu, W. J., Juang, S. W., Chin, W. T., Chi, T. C., Chang, C. J. und Cheng, J. T.** (2000). Insulin restores neuronal nitric oxide synthase expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* **68**: 625-34.
- 146. Yu, W. J., Juang, S. W., Chin, W. T., Chi, T. C., Wu, T. J. und Cheng, J. T.** (1999). Decrease of nitric oxide synthase in the cerebrocortex of streptozotocin-induced diabetic rats. *Neurosci Lett* **272**: 99-102.
- 147. Zarjevski, N., Cusin, I., Vettor, R., Rohner-Jeanrenaud, F. und Jeanrenaud, B.** (1993). Chronic intracerebroventricular neuropeptide-Y administration to normal rats mimics hormonal and metabolic changes of obesity. *Endocrinology* **133**: 1753-8.
- 148. Zuccollo, A., Navarro, M. und Catanzaro, O.** (1996). Effects of B₁ and B₂ kinin receptor antagonists in diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* **74**: 586-9.
- 149. Zuccollo, A., Navarro, M., Frontera, M., Cueva, F., Carattino, M. und Catanzaro, O. L.** (1999). The involvement of kallikrein-kinin system in diabetes type 1 (insulinitis). *Immunopharmacology* **45**: 69-74.

9 Anhang

9.1 Materialverzeichnis

9.1.1 Alphabetische Auflistung der verwendeten Puffer

Blockpuffer 5% (w/v):

5 g Milchpulver ad 100 ml Waschpuffer

Elektrophorese-Puffer:

25 mM Tris-HCl

0,5 M Glyzin

SDS (0,1%), ad 3 l A.d.

Homogenisatiospuffer (Western Blot):

50 mM Tris-HCl, pH 7,4

0,1 mM EDTA

150 mM NaCl

Triton-X (1%)

0,1 μ M Aprotinin

β -Mercaptoethanol (0,1%)

0,1 mM PMSF (*pentamethylsulfonyl fluoride*) , ad 100 ml Aqua dest.

Ladepuffer:

Xylen-Cyanol (2,5%)

Glyzerin in DEPC-Wasser (30%)

RT-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 9,0

50 mM KCl

0,1% Triton X-100

Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris-HCl; pH 6,8 mit HCl einstellen ad 50 ml A.d.

SDS-PAGE-Puffer:

100 mM Tris-HCl, pH 6,8

SDS (4%)

Glyzerin (20%)

200 mM DTT (*Dithiothreitol*)

Bromphenolblau (0,2%), ad 10 ml A.d.

Trenngelpuffer 1,5 M pH 8,8:

36,3 g Tris-HCl, ad 150 ml A.d.; pH 8,8 mit HCl einstellen ad 200 ml A.d.

Towbin-Blot-Puffer:

50 mM Tris-HCl

0,2 M Glyzin

SDS (0,037%)

ad 0,8 l A.d., pH 8,2–8,4

MeOH (20%)

Waschpuffer PBS-Tween (0,1%)Na₂HPO₄ 23 gNaH₂PO₄ 5,92 g

NaCl 11,68 g

ad 2 l A.d., pH 7,5 + 2 ml Tween-20

9.1.2 Antikörper

Primär-Antikörper:

Tabelle 3: Auflistung und Angaben zu den verwendeten 1.AK beim Western Blot-Verfahren mit der jeweiligen Verdünnung, dem Molekular-Gewicht des final ausgefällten Ag-AK-AK-Komplexes und dem Hersteller

Ziel-Antigen	kDa	1.-AK	Verdünnung	Hersteller
B ₂	42	Kaninchen-Anti-B ₂	1:5000	Werner-Müller Esterl
		Maus-Anti-B ₂	1:5000	BD Transduction Laboratories, Lexington
nNOS	155	Kaninchen-Anti-nNOS	1:3000	
iNOS	130	Kaninchen-Anti-iNOS	1:300	

Abkürzungen: AK, Antikörper; kDa, KiloDalton

Sekundär-Antikörper:

Tabelle 4: Auflistung und Angaben zu den verwendeten 2.AK beim Western Blot-Verfahren mit der jeweiligen Verdünnung und dem Hersteller

1.-AK	2.-AK	Verdünnung	Hersteller
Anti-B ₂	Anti-Kaninchen	1:5000	Dako
	Anti-Maus	1:5000	Dako
Anti-nNOS	Anti-Kaninchen	1:3000	Dako
Anti-iNOS	Anti-Kaninchen	1:300	Dako

Abkürzungen: AK, Antikörper; kDa, KiloDalton

9.1.3 Chemikalien und Lösungen

Enhanced-Chemiluminescence (ECL)-System, Amersham Life Science,
Braunschweig, Deutschland

Humaninsulin-Basal-NPH 40,	Lilly GmbH, Gießen, Deutschland
Streptozotocin (STZ)	Sigma, München, Deutschland
DyNAzyme™ II DNA Polymerase	Biometra, Finnzymes OY, FIN, Espoo
Entwickler	Sigma, München, Deutschland
Fixierer	Sigma, München, Deutschland

9.1.4 Gele

Agarosegel (2%) zum Nachweis der PCR-Produkte

TAE-Puffer (1-fach)	150 ml
Agarose	3 g
Ethidiumbromid	3 µl

7,5%iges SDS-Gel:

Tabelle 5: Angaben zur Herstellung eines 7,5%igen SDS-Geles

	Sammelgel (ml)	Trenngel (ml)
Aqua dest.	3,05	4,85
Tris-Puffer, 1,5 M, pH 8,8	---	2,5
Tri-Puffer, 0,5 M, pH 6,8	1,25	---
SDS	50	100
Acrylamid	0,67	2,5
APS	25	50
TEMED	10	5

Abkürzungen: APS, Ammoniumpersulfat; SDS, Sodium-Dodecylsulfat; TEMED, Tetramethylethylendiamin

9.1.5 Kommerzielle Nachweisverfahren (Sets)

ELISA Kit	Linco, Missouri USA
RNeasy® Mini Kits	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Promega-Corp-RT-Kits	Mannheim, Deutschland
Rnase free Dnase Set (50)	Qiagen

9.1.6 Marker

DNA-Marker für PCR:

Bromphenolblau (0,1%)
Xylen-Cyanol (0,1%)
SDS (0,1%)
25 mM EDTA in Glyzerin, pH 8,0

DNA-Längenstandard XIV, 100-BasenpaarleiterRoche Molecular Biochemicals,
Mannheim, Deutschland**Protein-Standard für Western Blot:**

Precision Protein Standards

BIO-RAD, Californien, USA;

Regenbogenmarker, Kaleidoscope, Prot.Standards

BIO-RAD, Californien, USA

9.1.7 Optimierung der PCR für die Kinin-Rezeptoren, die NOS-und GLUT-Isoformen

PCR-Angaben (a):

Tabelle 6: Auflistung der experimentell optimierten $MgCl_2$ -Konzentration, des Temperaturprofils und der Zyklusanzahl für die Primerpaare des B_1 - und B_2 -Rezeptors sowie β -Aktin

Gewebe	Bedingungen	B_1 -Rezeptor	B_2 -Rezeptor	β -Aktin
Hypothalamus	$MgCl_2$ (mM)	1,0	1,0	1,0
	Temperatur ($^{\circ}C$)	56	62	56
	Zyklusanzahl	32	28	28
Hypophyse	$MgCl_2$ (mM)	1,0	1,0	1,0
	Temperatur ($^{\circ}C$)	56	62	56
	Zyklusanzahl	31	31	28
Nebenniere	$MgCl_2$ (mM)	1,0	1,0	1,0
	Temperatur ($^{\circ}C$)	56	62	56
	Zyklusanzahl	31	30	28

PCR-Angaben (b):

Tabelle 7: Auflistung der experimentell optimierten $MgCl_2$ -Konzentration, des Temperaturprofils und der Zyklusanzahl für die Primerpaare von nNOS, eNOS und iNOS

Gewebe	Bedingungen	nNOS	eNOS	iNOS
Hypothalamus	$MgCl_2$ (mM)	1,5	1,5	1,0
	Temperatur ($^{\circ}C$)	62	58	56
	Zyklusanzahl	32	25	30
Hypophyse	$MgCl_2$ (mM)	1,5	1,5	1,0
	Temperatur ($^{\circ}C$)	62	58	56
	Zyklusanzahl	29	27	31
Nebenniere	$MgCl_2$ (mM)	1,5	1,5	1,0
	Temperatur ($^{\circ}C$)	62	58	56
	Zyklusanzahl	27	25	27

PCR-Angaben (c):

Tabelle 8: Auflistung der experimentell optimierten MgCl₂-Konzentration, des Temperaturprofils und der Zyklenanzahl für die Primerpaare von GLUT 1 – GLUT 5

Gewebe	Bedingungen	GLUT 1	GLUT 2	GLUT 3	GLUT 4	GLUT 5
Hypothalamus	MgCl ₂ (mM)	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0
	Temperatur(°C)	57	60	57	56	56
	Zyklenanzahl	24	34	27	29	29

9.1.8 PCR-Ansatz

0,5 µM sense und antisense-Primer

0,2 mM dNTP (*desoxynucleosidtriphosphat*)-Mix

1,0 – 1,5 mM MgCl₂

RT-Puffer

1,2 U DNA-Polymerase (Taq?)

3 µl unverdünnte cDNA für die Bestimmung des BK-Rezeptoren- und NOS-Isoenzym-Gehaltes oder 1:100 verdünnte cDNA für die Bestimmung des β-Aktin-Gehaltes, das Gemisch wurde mit Nuklease-freiem Wasser bis zu einem Endvolumen von jeweils 30 µl aufgefüllt

9.1.9 Primer

Sense- und Antisense-Primer:

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Primerpaare mit Angabe der Sense- und Antisense-Nukleotidfolge, der resultierenden PCR-Produktlänge und der zugehörigen Gen-Datenbank-Zugangs-Nr.

Zielgen	Primer		Pro- dukt	Datenbank- Zugangs-Nr.
	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')	(bp)	
β-Aktin	GTGGGTATGGGTCAGAAGGA	AGCGCGTAACCCCTCATAGAT	380	NM031144 ^a
B ₁	GCATCCCCACATTCCTTCTA	AAGAAGTGGTAAGGGCACCA	301	AJ132230 ^b
B ₂	CTTGGGTGAGCTCAGTGTC	TAGGGGCAGACATTTGAAGG	299	M59967 ^c
nNOS	TAGACTCACCCCGTCCTTTG	CCAGGTGCACGATGTCATAC	296	U67309 ^d
eNOS	TGGCAGCCCTAAGACCTATG	CGCTCCTGCAAAGAAAACT	306	AJ011116 ^e
iNOS	CAGAGGACCCAGAGACAAGC	TGCTGGAACATTTCTGATGC	300	D14051 ^f
GLUT 1	TGCAGTTCGGCTATAACACC	ACACCTCCCCACATACATG	292	M20653.1 ^g
GLUT 2	CCTGCTGGGTCAGAACATTT	CCTCATGCGAAACTGCTACA	301	L28126.1 ^h
GLUT 3	TCTCTGGGATCAATGCTGTG	CAGGGCCAATCTCAAAGAAG	302	U17978.1 ⁱ
GLUT 4	GCAGGAGGTGAAACCCAGTA	GGGTAAGAGGAAGGCAGGAC	296	D28561.1 ^j
GLUT 5	GAAAAGCAACGACGTCCAAT	GTCGAGAGGATTGCAGGAAG	299	D13871.1 ^k

Abkürzungen: bp, Basenpaare; ^aNudel et al. 1983; ^bJones et al. 1999; ^cMcEachern et al. 1991; ^dMagee et al. 1996; ^eSeidel et al. 1998; ^fNunokawa et al. 1993; ^gKayano et al. 1988; ^hAun et al. 1995; ⁱKrishnan et al. 1995; ^jKasahara et al. 1997; ^kInukai et al. 1993

9.1.10 Restriktionsenzyme

Tabelle 10: Auflistung der verwandten Restriktionsenzyme mit Angabe des Zielgenes und der jeweils produzierten Spaltfragmente

Restriktionsenzym	Ziel	Spaltfragmente (bp)		Hersteller
BsmA I	nNOS	195	101	BioLabs, New England
Dpn II	eNOS	208	98	BioLabs, New England
Sac I	iNOS	180	120	BioLabs, New England
Ava II	B ₁	219	82	BioLabs, New England
Ava II	B ₂	204	95	BioLabs, New England

Abkürzungen: bp, Basenpaare

9.1.11 Software

PCR-Auswertung über NIH Image für Windows (Scion Co), welches auf dem NIH Programm basiert (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>)

Primer:

<http://www-genome.wi.mit.edu/genome-software/other/primer3.html>

Restriktionsanalyse:

<http://webminer.ucsf.edu/cgi-bin/mkjavascript>

9.1.12 PCR-Gel-Bilder

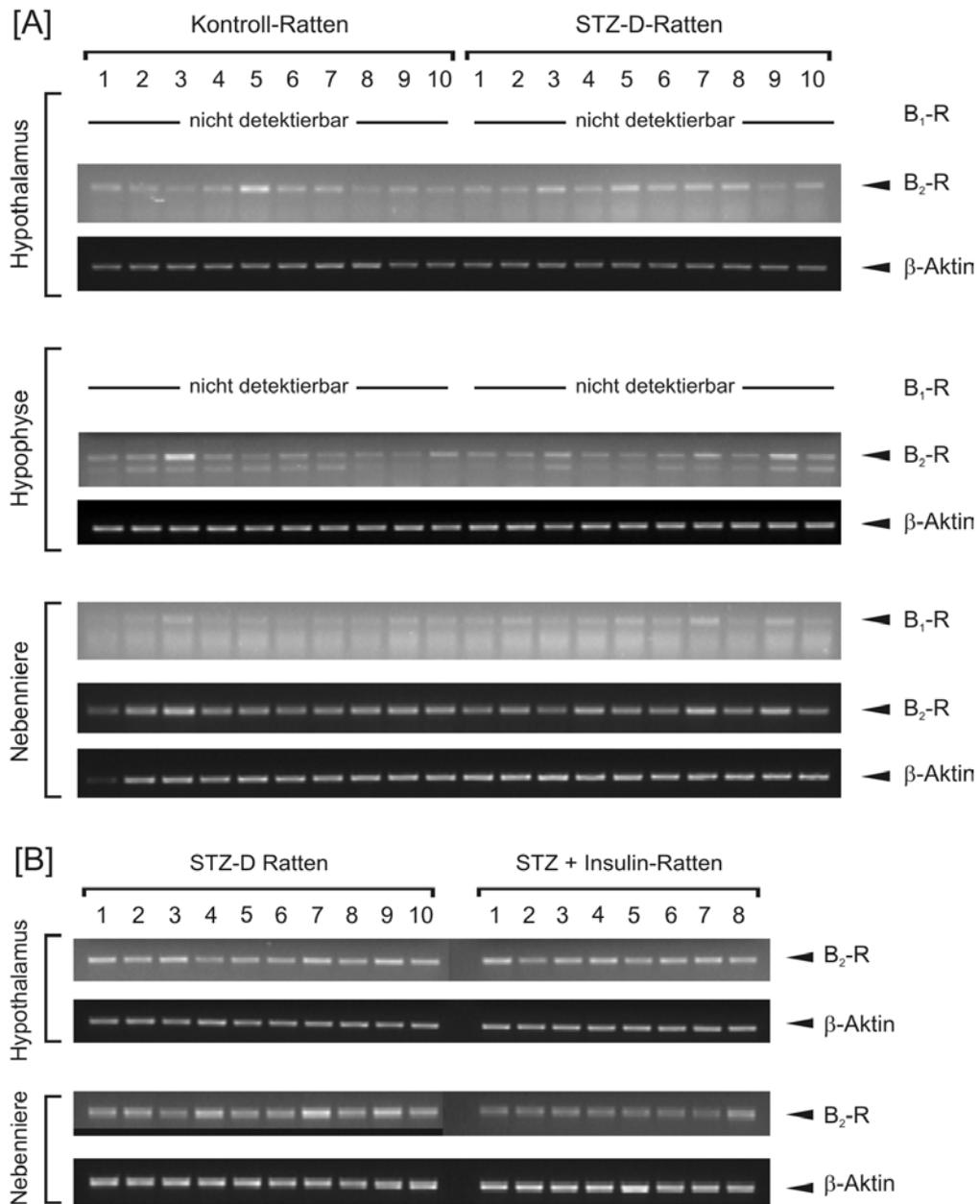


Abbildung 22:
 PCR-Gel-Bilder für den B₁- und B₂-Rezeptor in der HHN-Achse von STZ-D und Kontroll-Ratten [A] und das Ergebnis des B₂-Rezeptors im Hypothalamus und der Nebenniere von STZ-D Ratten nach durchgeführter Insulin-Substitution [B], dargestellt im Vergleich zu β-Aktin; n=8-10 Ratten je Versuchsgruppe

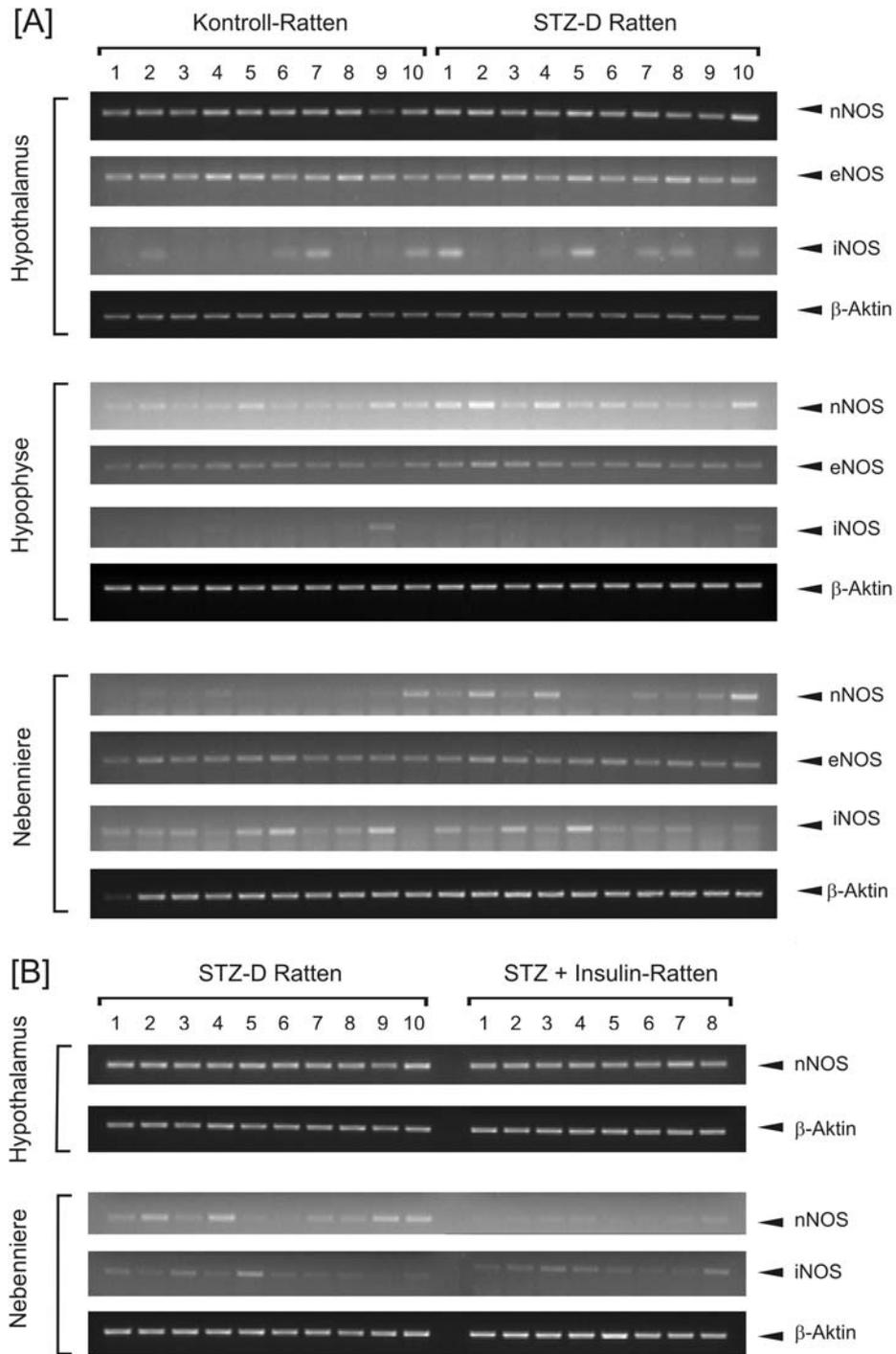


Abbildung 23:
 PCR-Gel-Bilder für nNOS, eNOS und iNOS in der HHN-Achse von STZ-D und Kontroll-Ratten [A] und das Ergebnis für nNOS und iNOS im Hypothalamus und der Nebenniere von STZ-D Ratten nach durchgeführter Insulin-Substitution [B], dargestellt im Vergleich zu beta-Aktin; n=8-10 Ratten je Versuchsgruppe

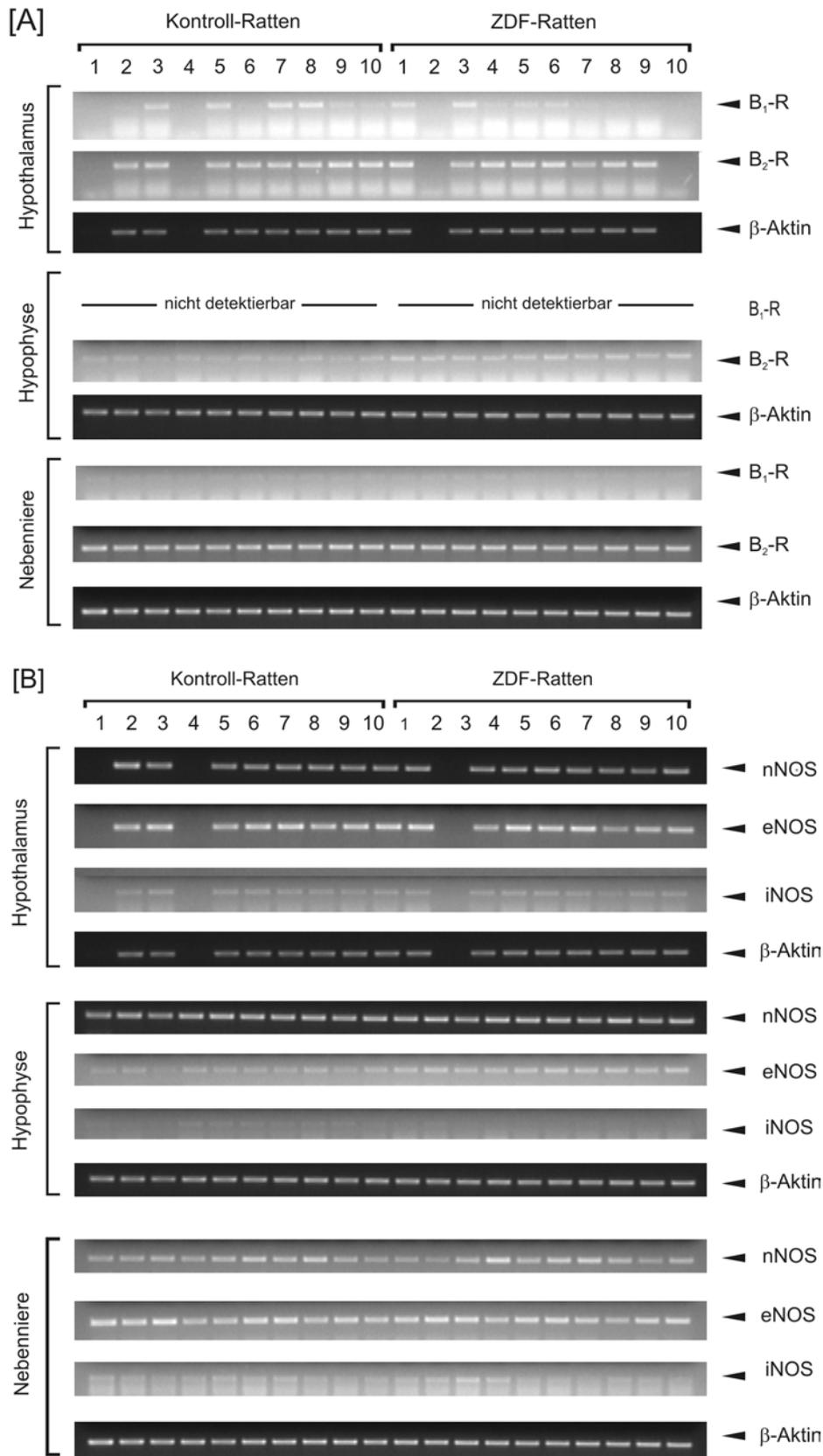


Abbildung 24:
 PCR-Gel-Bilder für den B₁- und B₂-Rezeptor [A] und NOS-Isoformen [B] in der HHN-Achse von ZDF- und entsprechenden Kontroll-Ratten, dargestellt im Vergleich zu β-Aktin n=8-10 Ratten je Versuchsgruppe

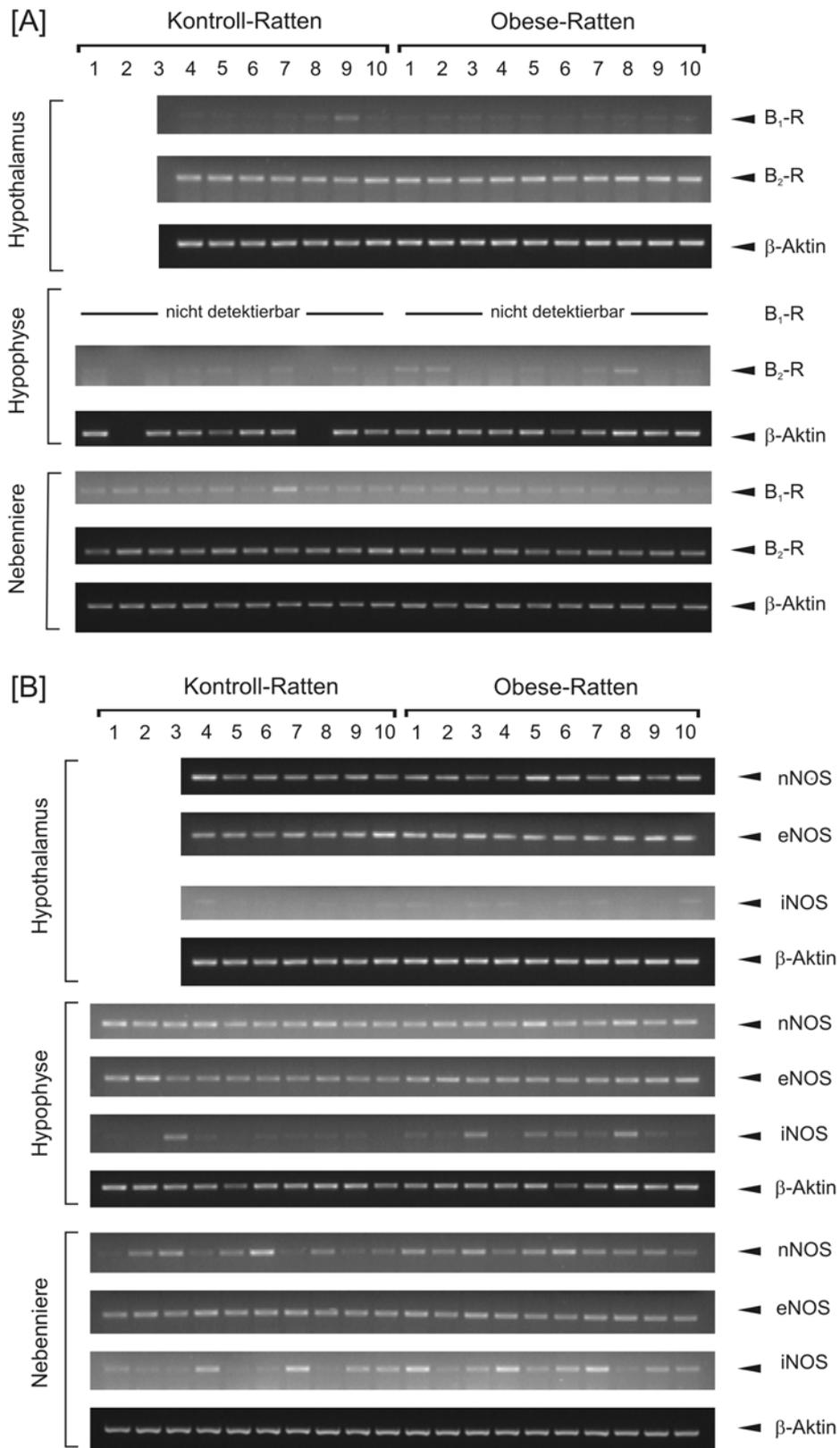


Abbildung 25:

PCR-Gel-Bilder für den B_1 - und B_2 -Rezeptor [A] und NOS-Isoformen [B] in der HHN-Achse von Obese- und entsprechenden Kontroll-Ratten, dargestellt im Vergleich zu β -Aktin, $n=8-10$ Ratten je Versuchsgruppe

9.2 Veröffentlichung und Posterpräsentationen

9.2.1 Veröffentlichung

Qadri, F.; Stark, E.; Häuser, W.; Jöhren, O.; Dendorfer, A.; Dominiak, P. (2004). Expression of kinin receptor mRNA in the HPA axis of type 1 and type 2 diabetic rats. *International Immunopharmacology* 4: 571-576.

Qadri, F.; Stark, E.; Häuser, W.; Dendorfer, A.; Jöhren, O.; Heidbreder, M.; Dominiak, P. (2004). Differential Expression of Nitric Oxide Synthase Isoforms in the brain, Pituitary and Adrenal Glands of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Eingereicht bei Diabetologia*

9.3 Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. med. Peter Dominiak für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme in das Institut und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

In besonderem Maße gilt mein Dank Frau Dr. Fatimunnisa Qadri, die mich für die Erarbeitung des von ihr vorgestellten Themas motivierte, mir das Erlernen von Methoden des wissenschaftlichen Arbeitens ermöglichte und mir stets mit wertvollen Ratschlägen und konstruktiver Kritik zur Seite stand.

Allen Mitarbeitern des pharmakologischen Forschungs- und Routinelabors, insbesondere Frau Christine Eichholz und Frau Cornelia Magnussen, möchte ich an dieser Stelle für Ihre hilfsbereite und kollegiale Unterstützung in allen Belangen der Laborarbeit und die nette Atmosphäre im Labor danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, Gregor und Anna-Elisabeth Stark, und all meinen Freunden bedanken für ihre zuverlässige und geduldige Begleitung und Unterstützung während meines Studiums und der Arbeit an dieser Promotion.

9.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stark, Eva
Geburtsdatum und -ort: 01.01.1978 in Braunschweig

Schulische und universitäre Ausbildung

07/97 Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Gymnasium „*Gaußschule*“ in Braunschweig; Abitur in den Prüfungsfächern Mathematik, Biologie, Geographie und Musik
10/97 Immatrikulation im Fach Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
11/04 Ärztliche Prüfung (Note: 1,83)

Klinische Tätigkeit als Medizinstudent im Praktischen Jahr (PJ)

06 – 07/03 **Klinik für Innere Medizin**, UKL Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Abteilung für Kardiologie (Direktor: Prof. Dr. med. Schunkert), sowie
Pulmologie und Infektiologie (Direktor: Prof. Dr. med. Zabel)
08 – 11/03 **Department of General Surgery**, Northern General Hospital, Sheffield University, GB
Nierenzentrum („Sheffield Kidney Institute“; Mr. A. Raftery, M.D)
12/03 – 03/04 **Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe**, Ostholstein-Klinik, Eutin;
(Direktor: Prof. Dr. med. Austermann)
03 - 05/04 **Klinik für Innere Medizin**, UKL Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Abteilung für Nephrologie (Direktor: Prof. Dr. med. Fehm)

Klinische Tätigkeit als Famulus

03/00 *Abdominalchirurgie*, Städtisches Klinikum Braunschweig
02/01 *Herzchirurgie*, Uniklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
03/01 *Kardiologie*, Uniklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
08/01 *Anästhesie*, Marienstift Braunschweig
08/02 *Gynäkologie & Geburtshilfe*, Royal Sussex County Hospital, Brighton

Dissertation

Seit 10/00 Mitarbeit in der Arbeitsgruppe Dr. Fatimunnisa Qadri am Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck im Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie

Klinische Tätigkeit

Seit 01/05 Assistenzärztin in der Abteilung für Innere Medizin am Spital Waldshut
(Direktor: Dr. med. H. Jenss)