Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie

Direktor (komm.) Herr Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Andreas Guse

Fettsäuremuster von Lipoproteinen beim Menschen vor und nach einer oralen Fettbelastung und die Abhängigkeit von der Insulinresistenz

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Christiane Brauns

aus Mannheim

Hamburg 2013

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:

29.11.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. J. Heeren

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

PD Dr. J. Aberle

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

PD Dr. M. Merkel

Inhalt

ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG 5

1. EINLEITUNG 6

1.1 Insulinresistenz und Metabolisches Syndrom 6

1.1.1 Metabolisches Syndrom 6

1.1.2 Insulinresistenz und HOMA-IR 8

1.1.3 IGT, IFG, Typ 2 Diabetes mellitus 9

1.1.4 Adipositas und BMI 10

1.1.5 Diabetische Dyslipidämie 12

1.2. Lipide 13

1.2.1 Triglyceride 14

1.2.2 Cholesterin und Cholesterinester 14

1.2.3 Phospholipide 15

1.3 Lipoproteine 15

1.3.1 Aufbau 15

1.3.2 Lipoproteinmetabolismus 17

1.4 Fettsäuren 18

1.4.1 Nomenklatur und Klassifizierung 18

1.4.2 Synthesewege der Fettsäuren 21

1.4.3 Fettsäure Veränderungen im Metabolischen Syndrom 22

2. MATERIAL UND METHODEN 24

2.1 FPLC- Fast Protein Liquid Chromatographie 24

2.1.1 FPLC- Methode 24

2.2 Cholesterinbestimmung 26

2.2.1 Cholesterinbestimmung- Methode 26

2.3 Pooling 27

2.3.1 Pooling- Methode 27

2.4. Gefriertrocknen (Lyophilisation) 29

2.4.1 Gefriertrocknen Methode 29

2.5. Derivatisierung 30

2.5.1 Derivatisierung Methode 31

2.6. Gaschromatographie (GC) 33

2.6.1 Gaschromatographie Methode 37

2.6.2 Gaschromatographie Auswertung Methode 38

3. ERGEBNISSE 39

3.1. Allgemeines Projektdesign 39

3.2. Studiendesign 39

3.3. Ergebnisse der Cholesterinbestimmung 40

3.3.1 Cholesteringehalt der Fraktionen aller Probanden 40

3.3.2 Cholesteringehalt der Fraktionen einzelner Probanden 42

3.4. Ergebnisse Gehalt an Gesamtfettsäuren im Plasma 43

3.5 Ergebnisse Lipoproteine 45

3.5.1 Gehalt an Gesamtfettsäuren in den Lipoproteinen 45

3.5.2 Gehalt an Fettsäuren in den einzelnen Lipoproteinen 46

3.5.3 Fettsäurenverteilung in den einzelnen Lipoproteinen 50

3.6. Veränderungen nach dem Frühstück 53

3.6.1 Veränderung der Gesamtfettsäuren der Lipoproteine 55

3.6.2 Veränderung der VLDL 56

3.6.3 Veränderung der LDL 58

3.6.4 Veränderung der HDL 59

3.6.5 Veränderung der Alb 60

3.7 Korrelationsanalyse der Fettsäuren mit HOMA-IR 61

4. DISKUSSION 63

4.1 Gehalt an Gesamtfettsäuren im Plasma 63

4.2 Gehalt an Fettsäuren pro Lipoprotein 67

4.3 Veränderungen nach dem Frühstück 70

4.4 Fettsäuren und HOMA-IR 71

4.5 Methodendiskussion 73

4.5.1 Methodendiskussion der Lipoproteingewinnung 73

4.5.2 Methodendiskussion der Fettsäurebestimmung 73

ZUSAMMENFASSUNG 75

LITERATURVERZEICHNIS 76

ANHANG 89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 95

ABBILDUNGSVERZEICHNIS 96

TABELLENVERZEICHNIS 97

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG..... 100

Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Nahrungszusammensetzung und die Überernährung sind neben der mangelnden Bewegung und der genetischen Disposition wichtige Faktoren für die Entstehung von Adipositas und Insulinresistenz. Da die Veränderungen im Lipidstoffwechsel frühzeitig in Erscheinung treten, bedürfen sie der besonderen Betrachtung. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Analyse des Fettsäuregehaltes der Plasma-Lipoproteine von Nachkommen von Typ II Diabetikern.

Im Rahmen dieser Arbeit soll zunächst getestet werden, in welcher Konzentration die einzelnen Fettsäuren in den Lipoproteinklassen vorkommen und ob sich die Fettsäureprofile der einzelnen Lipoproteinklassen mit der bereits bekannten Lipidklassen-Zusammensetzung erklären lassen. Desweiteren soll geprüft werden, wie sich der Fettsäuregehalt der Lipoproteine im zeitlichen Verlauf nach der oralen Aufnahme einer definierten Fettmenge (Fettfrühstück) verändert. Zuletzt sollt betrachtet werden, wie die Insulinresistenz der Probanden, dargestellt durch HOMA-IR, mit den Fettsäuremustern in den einzelnen Lipoproteinklassen korreliert, um damit das eventuelle Potential von Lipoprotein-Fettsäuren als metabolische Biomarker zu erkunden.

1. Einleitung

1.1 Insulinresistenz und Metabolisches Syndrom

1.1.1 Metabolisches Syndrom

Das metabolische Syndrom (MetS) wird als Zusammensetzung von Risikofaktoren verstanden, welche die Entstehung von Herz-Kreislauferkrankungen und/oder einem Diabetes mellitus Typ 2 (DMT 2) begünstigen (Isomaa et al. 2001, Lakka et al. 2002, Laaksonen et al. 2002). Die meisten Studien zeigen für Personen, die am MetS leiden, ein zweifach erhöhtes Risiko, eine kardiovaskuläre Komplikation zu erleiden und ein mehr als fünffach erhöhtes Risiko einen DMT 2 zu entwickeln (Lorenzo et al. 2007).

Definiert wird das MetS über die Komponenten Gewicht, Lipide, Blutdruck und Glukose (Blutzucker). Zur Erarbeitung einer einheitlichen Definition, mit der klinisch die Diagnose eines MetS gestellt werden kann, haben sich die hauptsächlich beteiligten Organisationen, unter anderem die Internationale Diabetes Federation (IDF), die American Heart Association (AHA), das National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) sowie das National Cholesterol Education Programme Adult Treatment Panel III (NCEP/ATP III) zusammengesetzt und Grenzwerte vorgeschlagen. Meist werden die NCEP ATPIII Kriterien benutzt. Beim Übergewicht wird hier ein Maß für abdominale Adipositas, der Taillenumfang (waist circumference, WC) genommen. Für Männer gilt WC ≥ 102 cm und für Frauen WC ≥ 88 cm, wobei populations- und länderspezifische Grenzwerte berücksichtigt werden sollten. Bei den Blutlipiden werden die Triglyceride (TG) geschlechtsübergreifend mit ≥ 150 mg/dl und die HDL-C für Männer mit < 40 mg/dl und für Frauen mit <50 mg/dl angegeben. Der Grenzwert für den nüchternen Blutzuckerwert liegt bei ≥ 100 mg/dl. Der Bluddruck wird mit ≥130 mmHg systolisch oder ≥ 85 mmHg diastolisch bewerted. Eine medikamentöse Behandlung in den Kategorien Blutlipidwerte, Blutzucker und Blutdruck gilt als Überschreitung des Grenzwertes, auch wenn der Wert im Normbereich liegt. Ein MetS kann diagnostiziert werden wenn drei der fünf angegebenen Grenzwerte überschritten sind (Alberti et al. 2009). Es handelt sich demnach um Störungen des Stoffwechsels, die bei unausgewogenem Energiehaushalt vor allem bei Personen mit hohem Körpergewicht auftreten.

Jedoch entwickeln nicht alle Übergewichtigen Personen ein MetS. Seltener aber dennoch treten diese Stoffwechselstörungen auch bei normalgewichtigen Personen auf (Ruderman et al. 1998).

Die Ursachen für diese Anfälligkeit liegen einerseits in der genetischen Disposition und der ethnischen Zugehörigkeit, andererseits tragen Überernährung und Bewegungsmangel einen großen Teil zur Entwicklung bei. Das Alter spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle. Ältere Menschen leiden häufiger unter den Erkrankungen aus dem Kreis des MetS. Allerdings sind mittlerweile auch schon viele Kinder betroffen (Zimmet et al. 2007). Die Prävalenz des MetS steigt weltweit, deshalb betreffen die entstehenden Probleme einerseits den Bereich„Public Health“und andererseits den klinischen Bereich (Alberti et. al. 2009).

Therapeutische Ansätze finden sich bisher in erster Linie in der Reduktion des Körpergewichtes und der Steigerung der körperlichen Aktivität. Eine medikamentöse Behandlung kann bei Diabetes mellitus, Hypertonie und Hyperlipidämie nötig sein.

Prävalenzangaben sind aufgrund der bislang uneinheitlichen Definitionen schwierig zu vergleichen. Eine konstante Erkenntnis beim Vergleich der Studien hinsichtlich der Definitionen ist die erhöhte Prävalenz des MetS bei älteren Menschen. (Cameron et al. 2004). Laut Angaben des IDF, sind weltweit etwa 25% der Erwachsenen vom MetS betroffen. Es wird von einer Verdoppelung des Wertes in den nächsten 20 Jahren ausgegangen. In Deutschland ergab eine Analyse auf der Datengrundlage des Bundes-Gesundheitssurveys 1998 nach ATP III (Adult Treatment Panel III) Kriterien eine Prävalenz des MetS in der erwachsenen Allgemeinbevölkerung von knapp über 20% (Neuhauser und Ellert 2005). Eine neuere Untersuchung des „German Metabolic and Cardiovascular Risk Projekt“ (GEMCAS) in 1511 Hausarztpraxen ergab ebenfalls eine Prävalenz dieser Größenordnung (Moebus et al. 2007). Die Prävalenz des MetS in den USA ist ähnlich und wurde nach der NCEP/ATP III Definition vom National Health and Nutrition Survey (NHANES III 1988-1994) mit 23,1% und im NHANES 1999-2000 mit 26,7% angegeben (Ford et al. 2002).

1.1.2 Insulinresistenz und HOMA-IR

Die Insulinresistenz (IR) scheint eine wichtige pathophysiologische Grundlage des MetS zu sein, weshalb einige Autoren auch vom „insulin-resistance-syndrome“ schreiben. Die IR ist ein entscheidender Faktor in der Pathophysiologie des DMT 2 (DeFronzo et al. 1992). Weiterhin ist sie assoziiert mit Adipositas, Hypertension, Dyslipidämie und koronarer Herzkrankheit (KHK) (Serrano Rios 1998, Reaven et al. 1996, Scherrer und Sartori 1997).

Bei der beginnenden IR handelt es sich um eine Stoffwechsellage mit noch normalen Insulinwerten aber einer reduzierten Antwort der Gewebe (Leber, Muskulatur, Fettgewebe) auf diese (Saltiel 2000). In der Folge steigt der Blutzucker (BZ) an und lässt die IR messbar werden. Als Folge auf den erhöhten BZ wird die Insulinsekretion, von zum Teil auch minderwertigem Insulin, gesteigert. Die dadurch entstehende Herabregulation der Anzahl der Insulinrezeptoren sowie die auf Dauer sinkende Funktionsfähigkeit der Betazellen verstärkt wiederum die IR.

Zur Bestimmung der IR wurde ein mathematisches Model, der HOMA-IR (HomeostasisModel Assessment), eingeführt. Er gilt als Surrogatmarker für IR und berechnet sich: HOMA-IR= Nüchterninsulin (µU/ml) x Nüchterngluckose (mg/dL) / 22,5. Ein niedriger Wert von <1 gilt als normal, bei einem Wert von >2 kann von einer vorhandenen IR ausgegangen werden. Werte von >5 lassen sich durchschnittlich beim DMT 2 finden (Matthews et al. 1985).

Der HOMA-IR korreliert gut mit dem „Clamp-Test“ (DeFronzo et al. 1997), welcher der Goldstandard zur Ermittlung der IR ist. Eine gute Korrelation erreicht auch der Quantitative Insulin Sensitivity Check Index (QUICKI), welcher speziell entwickelt wurde um die Bestimmung der Insulinsensitivität in der Klinik zu vereinfachen. Er berechnet sich: QUICKI= 1/(log (Nüchterninsulin [µU/ml]) + log (Nüchterngluckose [mg/dL]). Im Gegensatz zum HOMA-IR gelten hier, ähnlich wie beim Clamp-Test, hohe Werte als normal, mittlere Werte zeigen eine IR an und niedere Werte finden sich bei DMT 2 (Katz et al.2000).

Dass die Bestimmung der IR bedeutungsvoll ist zeigt die Verona Diabetes Complications Study, in welcher der HOMA-IR als ein unabhängiger Risikofaktor ermittelt wurde, der bei Typ 2 Diabetikern eine Vorhersage über die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse erlaubt (Bonora et al. 2002).

Als Ursachen für die Entwicklung einer IR werden vor allem Übergewicht, zunehmendes Alter, Bewegungsmangel und unausgewogener Lebensstil sowie ein niedriges Geburtsgewicht und

eine genetische Prädisposition angenommen (Bloomgarden 1998). Ein Überangebot von freien Fettsäuren (FFS) scheint an der Entstehung der IR beteiligt zu sein (Boden und Shulman 2002). Die IR der Fettzelle ist vermutlich der auslösende Faktor, der zu einer vermehrten intrazellulären Hydrolyse von TGn und zur vermehrten Freisetzung von FFS in die Blutbahn führt (Ginsberg 2000). Es konnte gezeigt werden, dass unter anderem die FFS zur Verhinderung oder Störung der Signaltransduktion des Insulinrezeptors durch Hemmung der IRS-1 (insulin receptor substrate 1)-assoziierten PI3(Phosphoinositid-3)-Kinase führen (Shulman 2000). Der entstehende Entzündungsprozess steht ebenfalls mit der IR und vor allem mit einer KHK in Verbindung. Es wurde gezeigt, dass die IR positiv mit CRP (C-reaktivem Protein) korreliert (Festa A 2000).

Die Prävalenz der IR wurde z.B. in der Bruneck Studie ermittelt. Bei dieser Studie handelt es sich um eine epidemiologische Untersuchung an 888 zufällig ausgewählten Bewohnern der italienischen Stadt Bruneck. Die IR wurde mit der HOMA-IR Methode nach Matthews et al. 1985 quantifiziert. Die Gesamtprävalenz der IR mit einem HOMA-IR > 2,77 betrug etwa 45 %. Die Prävalenz der IR bezogen auf die jeweilige metabolische Störung wurde ebenfalls angegeben. Sie betrug bei Patienten mit DMT 2, Hypertriglyceridämie oder erniedrigtem HDL-Cholesterin etwa 85%. Patienten mit Hypercholesterinämie, Hyperuricämie oder Hypertension wiesen zu 30-60% eine IR auf. Traten mehrere metabolische Störungen in Kombination auf, so war eine IR in 95% der Fälle vorhanden. 5,1% der Probanden waren insulinresistent obwohl sie normalgewichtig und ohne metabolische Störungen waren (Bonora et al. 1998).

1.1.3 IGT, IFG, Typ 2 Diabetes mellitus

Beim DMT 2 handelt es sich um eine Regulationsstörung des Glukosestoffwechsels, die sich durch eine chronische Hyperglykämie bemerkbar macht. Die Ursache liegt in einer unzureichenden Insulinsekretion, einer unzureichenden Insulinwirkung (Insulinresistenz) oder in einer Kombination aus beidem. Die Folge ist ein relativer Insulinmangel. Die chronische Hyperglykämie führt zu den gefürchteten Folgeerkrankungen zu denen die Mikroangiopathien (Retinopathie, Nephropathie, Neuropathie) und die Makroangiopathien (KHK, AVK (Arterielle Verschluß Krankheit)der peripheren Arterien, AVK der Hirnarterien) gehören.

Es gibt drei diagnostische Richtwerte um einen DMT 2 zu diagnostizieren. Entweder erreicht die Blutglukose bei der Blutentnahme (venös) am nüchternen Patienten einen Wert von ≥ 126 mg/dl (normal < 100 mg/dl) oder, ein einmaliger Gelegenheitsblutzucker wird ≥ 200 mg/dl ge-

messen oder, ein Oraler Glukose-Toleranztest (OGTT) ergibt einen 2h-Blutzucker- Wert von ≥ 200 mg/dl (normal < 140 mg/dl).

Es lassen sich zwei, als Prädiabetes bekannte, Stadien beschreiben, die ein erhöhtes Risiko für die Entstehung eines DMT 2 und kardiovaskuläre Erkrankungen darstellen. Dazu gehört einerseits die gestörte Glukosehomöostase IFG (impaired fasting glucose) mit einem Blutglukosewert von ≥ 110 < 126 mg/dl bei der venösen, nüchternen Blutentnahme und andererseits die gestörte Glukosetoleranz IGT (impaired glucose tolerance) mit einem 2 h-Wert von ≥ 140 < 200 mg/dl im OGTT. Etwa 60 % der Personen, die einen DMT 2 entwickeln, haben 5 Jahre zuvor entweder IGT oder IFG, 40% haben zu diesem Zeitpunkt eine normale Glukosetoleranz (Unwin et al.2002). Dennoch entwickeln nicht alle Personen mit einer IR einen DMT 2.

Die WHO schätzt in ihrem fact sheet Nr.312, dass weltweit mehr als 220 Millionen Menschen an dieser Erkrankung leiden. Die Berechnungen ergeben, dass sich diese Zahl bis ins Jahr 2030 mehr als verdoppeln würde. Im Jahr 2004 starben bereits etwa 3,4 Millionen Menschen an den Folgen von zu hohem Blutzucker. Länder mit niedrigen bis mittleren Einkommensstatus sind hauptsächlich betroffen (WHO 2011) Die sozialen und wirtschaftlichen Folgen dieser Erkrankung geben die Grundlage zur intensiven Forschung.

1.1.4 Adipositas und BMI

Die Adipositas ist der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung einer Reihe von Erkrankungen, einschließlich DMT 2, Herz-Kreislauferkrankungen, Gallensteinleiden und bestimmter Krebsarten (Eckel 2003). Sie ist der Hauptrisikofaktor bei der Entwicklung eines MetS.

Bei der Adipositas handelt es sich um eine chronische Erkrankung mit überdurchschnittlicher Vermehrung des Körperfettanteils, was zu einer Erhöhung des Körpergewichts führt. Die Erkrankung liegt vor, wenn der Anteil der Fettmasse am Körpergewicht bei Frauen 30% und bei Männern 20% übersteigt. Dieser Fettmassenanteil am Körpergewicht kann mit dem Körpermassenindex BMI (Body mass index) abgeschätz werden. Der BMI berechnet sich als BMI= Körpergewicht (kg)/Körpergröße $(m)^2$. Normalgewicht liegt bei einem BMI von 18,5-24,9 vor. Übergewicht beginnt pauschal ab einem BMI von ≥ 25. Das Übergewicht wird weiter unterteilt in ein Stadium der Präadipositas mit BMI von 25-29,5, der Adipositas Grad I mit BMI 30,0-

34,9, der Adipositas Grad II mit BMI 35,0-39,9 und der extremen Adipositas Grad III mit BMI ≥ 40 (Internationale Einteilung des Gewichts von Erwachsenen nach BMI, modifiziert nach WHO 2004)

Die Ursachen für die Entstehung der Adipositas sind multifaktoriell. Neben generellen life-style Veränderungen zählen Über- oder Fehlernährung, Bewegungsmangel und Stress, zu den Hauptfaktoren. Zu nennen sind ebenfalls Essstörungen, endokrine Störungen, Medikamenteneinnahmen und der Nikotinverzicht. Eine genetische Komponente, sowie komplexe hormonelle und metabolische Interaktionen verstärken das Risiko für zentrale Fettleibigkeit (Després et al.1992).

Laut WHO fact sheet Nr. 311von 2011 gilt: " In 2008 lebten über 1,5 Milliarden Erwachsene, die älter als 20 Jahre sind, mit Übergewicht. 500 Millionen davon waren fettleibig. Seit 1980 habe sich die Zahl der Fettleibigen mehr als verdoppelt". Zunächst war es ein Problem in Ländern mit hohem Einkommensstatus, mittlerweile sind Übergewicht und Fettleibigkeit zunehmend in Ländern mit niederem und mittlerem Einkommensstatus zu verzeichnen. Es handelt sich um eine Pandemie.

Die Datengrundlage für die Bewertung der Verbreitung von Übergewicht in Deutschland bilden aktuelle nationale Studien. Der Kinder- und Jugendgesundheitssurvey (KIGGS) des Robert-Koch-Instituts (RKI) ergab, dass etwa 15% der Kinder und Jugendlichen zwischen 0-17 Jahren übergewichtig und davon 6% als adipös eingestuft wurden.

Laut den Kernaussagen der nationalen Verzehrstudie II 2008, der zur Zeit größten epidemiologischen Studie zur Erfassung der Ernährungsgewohnheiten und des Lebensmittelverzehrs in Deutschland sind 68% der Männer und 50% der Frauen übergewichtig. Davon haben 20% der Männer und 21% der Frauen einen BMI über 30. Mit zunehmendem Alter steigt der Anteil übergewichtiger Personen. Die jungen Erwachsenen sind zu 25% übergewichtig oder adipös. Bei den 70-80 Jährigen steigt der Anteil bereits auf 75-85 %.

In den USA wird die Prävalenz der Adipositas von NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) verfolgt. Die Prävalenz ist in den letzten 30 Jahren enorm gestiegen. Zurzeit haben etwa 30% der Erwachsenen einen BMI über 30 und 16% der Kinder sind übergewichtig (Baskin et al.2005).

Mit steigendem Gewicht erhöht sich das Risiko für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, DMT 2 und Hypertonie (West und Kalbfleisch 1971, Havlik et al. 1983 Wilson et al. 2002, Van-Gaal et al. 2006)). Dennoch werden nicht alle Übergewichtigen zu Diabetikern (Felber und Golay 2002), allerdings sind oder waren 60-90% der DMT 2 übergewichtig (Harris 1992).

1.1.5 Diabetische Dyslipidämie

Abnormalitäten der Plasmalipide und Lipoproteine sind wegen der zentralen Rolle der IR lange vor einer Hyperglykämie sichtbar (Ginsberg 1991, Kreisberg 1998, Haffner 2002). Die Dyslipidämie ist ein weiterer Bestandteil des MetS. Sie gilt neben der Hyperglykämie und der Hyperinsulinämie bei DMT 2 als ein weiterer Hauptrisikofaktor bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen.

Die diabetische Dyslipoproteinämie ist gekennzeichnet durch quantitative und qualitative Veränderungen der Lipoproteine (Chahil et al. 2006) Es handelt sich um ein typisches Profil mit erhöhten Triglyceridwerten, nüchtern ≥ 150 mg/dl und postprandial ≥ 300 mg/dl. Das HDL Cholesterin ist erniedrigt, bei Frauen mit HDL-C < 50 mg/dl und bei Männern mit HDL-C < 40 mg/dl. Die LDL-Cholesterin Konzentration ist unverändert oder moderat erhöht, während die Anzahl von small dense LDL (SD LDL) Partikeln deutlich erhöht ist. Cholesterin gilt ab einem Wert von > 200 mg/dl als erhöht. Zusätzlich wird das ApoB, Strukturprotein der VLDL und LDL erhöht und das ApoA-I, Strukturprotein der HDL, erniedrigt gemessen. Als Ursache für die Plasmalipidveränderungen werden verschiedene Mechanismen diskutiert. Die erhöhten Triglyceridwerte entstehen aus den vermehrt anfallenden Chylomikronen und VLDL. Bei der IR liegt eine Reduktion der Lipolyse durch die insulinsensitive LPL vor (Merkel et al. 2002). Dadurch wird der Abbau der Chylomokronen und VLDL eingeschränkt. Es kommt zu einer Akkumulation der TG-reichen Chylomikronen. Desweiteren bildet die Leber, beim Versuch, die angebotenen TG zu verarbeiten um die Homöostase aufrecht zu erhalten, vermehrt VLDL und ApoB. Folglich kommt es zu erhöhten VLDL-Plasmaspiegeln und somit insgesamt zu erhöhten Plasma-TG- Spiegeln. Bei massivem Lipidüberschuß erfolgt der Einbau von TG in die Leber selber, so daß eine Steato-Hepatitis entsteht.

Eine mögliche Erklärung für die reduzierten HDL Werte und die Bildung der SD LDL ist das Cholesteryl ester transfer protein (CETP) (Tall 1993). Bei übergewichtigen Personen mit erhöhten TG tauscht das CETP besonders viel TG aus triglyceridhaltigen Lipoproteinen (VLDL) gegen Cholesterin aus den cholesterinreichen Lipoproteinen (LDL, HDL) aus. Die so mit TG beladenen HDL und LDL werden in der Leber durch die hepatische Lipase hydrolisiert. Dabei wird das ApoA1 der HDL abdissoziiert und zum Teil über die Nieren ausgeschieden. Durch das Fehlen des ApoA1 reduziert sich insgesamt die Anzahl der HDL Partikel und damit deren antiatherogene Funktion. Aus den LDL werden durch die hepatische Lipase SD LDL (small dense LDL) (Dullaart et al.1994, Arai et al. 1994). Das sind cholesterinarme Partikel, die kleiner aber in größerer Zahl vorhanden sind. Die SD LDL stehen im Verdacht, stärker atherogen zu wirken, da sie unter anderem leichter in die Arterienwand eindringen können. (Lamarche et al. 1999,Brunzell 2005, Krauss 2004).

Etwa 50% der über 40 jährigen Personen in den westlichen Industrieländern haben erhöhte Cholesterinwerte. Ernährungs- und lebensstilbedingte Hypertriglyceridämien sind ebenfalls häufig (Herold 2006). Da die KHK die weltweit häufigste Todesursache ist, wurden Konzepte zur Erfassung des individuellen Risikoprofils entwickelt, welche u.a. LDL, HDL, TG als Hauptrisikofaktoren mit einberechnen. Zudem gibt es bereits pharmakologische Möglichkeiten der Therapie von Fettstoffwechselstörungen.

Die Prävalenz der Hypertriglyceridämie bei DMT 2 ist zwei bis drei Mal höher als bei Nichtdiabetikern (Vasilios et al. 2011).

1.2. Lipide

Die folgenden Kapitel geben einen kurzen Überblick über die zum Verständnis notwendigen Grundlagen der Biochemie und Chemie.

Neben Kohlenhydraten und Proteinen stellen Lipide eine Klasse energiereicher Substanzen dar, die vom menschlichen Organismus zur Energiespeicherung, zum Membranaufbau und für die Signaltransduktion benötigt werden. Ebenfalls werden sie zur Synthese von Vitaminen, Steroidhormonen und Gallensäuren verwendet.

Bei den Lipiden handelt es sich um Moleküle, die sich aus sehr unterschiedlichen Teilen zusammensetzen. Gemeinsam ist ihnen die schlechte Löslichkeit in Wasser.

Sie lösen sich hingegen gut in unpolaren organischen Lösungsmitteln wie Methanol, Aceton oder Chloroform. Zu den einfachen, nicht hydrolysierbaren Lipiden gehören Fettsäuren, Terpene und Steroide. Die hydrolisierbaren Lipide enthalten Esterbindungen. Dazu gehören Wachse, TG, Phospholipide, Glycolipide und Cholesterinester.

1.2.1 Triglyceride

In Form von Triglyceriden (= Triacylglycerolen) wird langfristig Energie im Organismus gespeichert. Triglyceride (TG) entstehen durch Veresterung des Alkohols Glycerin mit drei Fettsäuren. Die höchste Konzentration an TG kommt im Speicherfett des Fettgewebes vor. Die Körperfettmenge eines normal ernährten, 70kg schweren Menschen beträgt 10-12 kg. Die Fähigkeit des Körpers eines normal ernährten, 70kg schweren Menschen Kohlenhydrate zu speichern liegt hingegen bei etwa 400 g Glycogen. Der Physikalische Brennwert bei TG beträgt 40 kJ/g. Proteine und Kohlenhydrate haben einen Brennwert von 17-18 kJ/g. Der normale Plasma bzw. Serumspiegel sollte nüchtern < 150 mg/dl und postprandial < 300 mg/dl liegen.

1.2.2 Cholesterin und Cholesterinester

Cholesterin (= Cholesterol) ist ein essentieller Bestandteil der Zellmembranen. Es ist ebenfalls Grundlage für die Biosynthese von Steroidhormonen, Vitamin D und Gallensäuren. In Form von Cholesterinestern wird Cholesterin in den Zellen gespeichert. Cholesterin kann von allen Zellen synthetisiert werden, hauptsächlich aber von der Leber. Der gesamte Cholesterinbestand des menschlichen Körpers beläuft sich auf 140 g und setzt sich aus exogenem, mit der Nahrung aufgenommenem, und endogenem, synthetisiertem Cholesterin zusammen. Der normale Plasma bzw.Serumspiegel liegt bei 110-220 mg/dl. Die erhöhten Plasmakonzentrationen von Cholesterin können zu dessen Ablagerung an den Wänden der Blutgefäße führen und damit das Atheroskleroserisiko erhöhen.

1.2.3 Phospholipide

Phospholipide (PL) sind wichtige Membranlipide, die mit ihrer amphiphilen Eigenschaft am Aufbau der Doppelschicht von Biomembranen beteiligt sind. Sie bestehen aus einem hydrophilen Kopfteil und einem hydrophoben Schwanzteil. Die meisten PL haben Glycerin als Grundgerüst (Glycerophospolipide). An dem Glycerin sind zwei Fettsäuren gebunden und ein Phosphatrest, welcher mit einer Alkoholkomponente (Cholin, Ethanolamin, Serin, Inositol) verestert ist. Die häufigsten PL, die in Zellmembranen vorkommen, sind demnach Phosphatidylcholin (Lecithin), Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin (Kephalin) und Phosphatidylinositol. Die Sphingolipide, ebenfalls amphiphil und wichtiger Bestandteil von Membranen, enthalten als Grundgerüst Sphingosin, an welchem eine Fettsäure sowie ein hydrophiler Rest gebunden ist.

1.3 Lipoproteine

1.3.1 Aufbau

Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften der Lipide, werden für ihren Transport im Blut Lipoproteine benötigt. Die Lipoproteine bestehen aus einem lipophilen Kern, der gebildet wird aus Cholesterinestern und Trigyceriden, sowie einer hydrophilen Hülle bestehend aus freiem Cholesterin, PL und Apoproteinen. Die PL gruppieren sich mit ihrer lipophilen Domäne um den lipophilen Kern. Die hydrophile Domäne vermittelt die Wasserlöslichkeit, welche den Transport in wässriger Lösung ermöglicht.

Die Apoproteine sind wichtig für den Stoffwechsel der Lipoproteine. Sie aktivieren und inhibieren Enzyme und wirken als Liganden von Rezeptoren, die für die Aufnahme der Lipoproteine zuständig sind. Diese Rezeptoren befinden sich in der Leber und im peripheren Gewebe. Diese spezielle Struktur ermöglicht den Transport der Lipide im Blut.

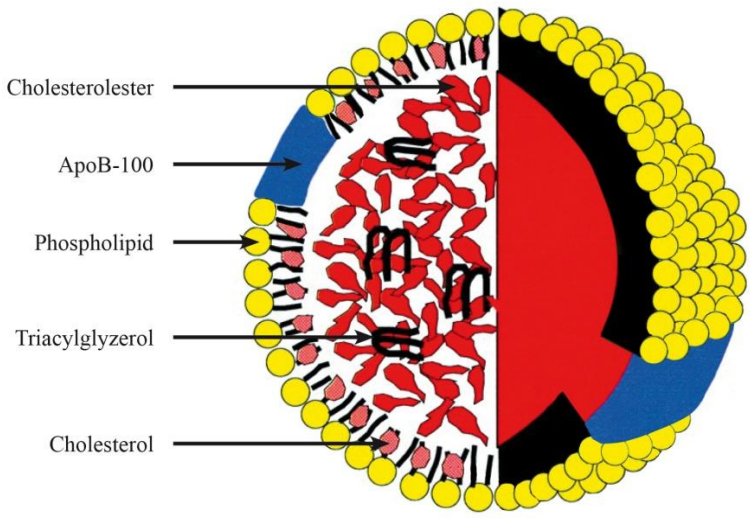

Abbildung 1 Struktur eines Lipoproteins

Der Lipidkern besteht aus TG und CE. Die Hülle besteht aus PL und freiem Cholesterol. In die Oberfläche sind Apoproteine eingelagert. (Abbildung modifiziert nach Segrest et al.2001)

Es gibt vier Hauptklassen von Lipoproteinen, die sich in der Zusammensetzung bezüglich ihrer Lipide und Apoproteine unterscheiden. Die Einteilung erfolgt nach ihrer Dichte und Größe. Unterschieden werden mit zunehmender Dichte und zunehmendem Apoproteinanteil Chylomikronen, „very low density lipoproteins“ (VLDL), „low density lipoproteins“ (LDL) und „high density lipoproteins“(HDL). Einen Überblick über die wichtigsten Eigenschaften gibt die folgende Tabelle.

Tabelle 1 Eigenschaften der Lipoproteine (nach Havel und Kane 2001)

	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
Dichte [g/ml]	~ 0,93	0,93-1,006	1,019-1,063	1,063- ~1,28
Durchmesser [nm]	75-1200	30-80	18-25	5-12
Triglyceride [%]	86	55	6	0-5
Cholesterin [%]	2	7	8	5
Cholesterinester [%]	3	12	42	0-17
Phospholipide [%]	7	18	22	5-33
Apolipoproteine [%]	2	8	22	40-90
Apolipoprotein	B48	B100	B100	A
		C	C	C
		E	E	E

1.3.2 Lipoproteinmetabolismus

Die in diesem Kapitel dargestellten Zusammenhänge orientieren sich an den Ausführungen von Schwandt P (2006) Eine ausführliche Übersicht über den Lipoproteinmetabolismus sowie weiterführende Referenzen sind dort zu finden. Zum Lipoproteinmetabolismus gehören der exogene (postprandiale) und der endogene (nüchterne) Lipoproteinstoffwechsel sowie der reverse Cholesterintransport. Postprandial werden die Nahrungslipide durch Lipasen im Darm gespalten. Gallensäuren verpacken die Spaltprodukte in Micellen, welche von den Mucosazellen des Darmepithels aufgenommen werden. In den Mucosazelllen entstehen TG, welche mit ApoB48 zu triglyceridhaltigen Chylomikronen assoziieren und in die Lymphbahn abgegeben werden. Von dort gelangen sie ins Blut. Die Chylomikronen transportieren die exogenen Lipide zur Leber. Im Blut befindet sich die endothelständige Lipoproteinlipase (durch Insulin induziert), welche aus den Chylomikronen Fettsäuren freisetzt, die von der Muskulatur, vom Herz und vom Fettgewebe aufgenommen werden. Gleichzeitig gibt ein ApoE-haltiges HDL sein ApoE an den verbleibenden Chylomikronen Remnant ab, welcher in der Leber über den LRP1 aufgenommen wird. Zur Versorgung der peripheren Gewebe mit TG, CE und PL während der nüchternen Phase des Stoffwechsels werden die „endogen Lipide“ herangezogen. In der Leber erfolgt deshalb eine Umverpackung in VLDL, welche mit ApoB100 bestückt TG zu den extrahepatischen Ge-

weben transportieren. Durch die gewebsständigen Lipoproteinlipasen werden aus den VLDL Fettsäuren freigesetzt und zu den jeweiligen Zellen transportiert. Die VLDL werden weiter abgebaut und dann in der Leber über LDL zu den cholesterinreichen LDL umgebaut, um Cholesterin zu den Geweben zu bringen. Fast alle Gewebe enthalten den LDL-Rezeptor, über den die Aufnahme möglich wird. Es wird so viel Cholesterin aufgenommen, wie benötigt wird. HDL sind für den reversen Cholesterintransport zuständig. Sie nehmen aus den Membranen der Gewebe als kleine discoidale HDL Cholesterin auf und werden dann letztendlich zu den größeren HDL_2. Das Cholesterin gelangt zur Leber, wo es in Form von Gallensäuren ausgeschieden wird. Möglich ist auch eine Umwandlung der HDL_2 in HDL_3. Dabei werden die Cholesterinester der HDL_2 gegen TG der TG-reichen Lipoproteine ausgtauscht, welche dann durch die hepatische Triglyceridlipase hydrolisiert werden. Es entstehen kleinere, dichte HDL_3.

1.4 Fettsäuren

1.4.1 Nomenklatur und Klassifizierung

Die in diesem Kapitel behandelte grundlegende Darstellung der Fettsäuren (FS) orientiert sich an den Ausführungen von Gunstone (2007). Detaillierte Beschreibungen der FS sowie weiterführende Referenzen sind dort zu finden.

Die FS bestehen aus einer Kette von Kohlenstoffatomen und einer Carboxylgruppe. Sie enthalten meistens eine gerade Anzahl von C-Atomen, da sie aus Einheiten von je 2 Kohlenstoffatomen, den Essigsäureeinheiten, synthetisiert werden. Die Anzahl der C-Atome ist die Grundlage der Namensgebung. Für die molekulare Bezeichnung wird die Anzahl der C-Atome inklusive der Carboxylgruppe angegeben. Nach dem Doppelpunkt folgt die Angabe der Anzahl der Doppelbindungen. Durch den griechischen Buchstaben ω wird die Position der ersten Doppelbindung beschrieben wenn vom Methylende ausgehend gezählt wird. Mit diesen Informationen erfolgt die Einteilung in gesättigte (SAFA= saturated fatty acid), einfach ungesättigte (MUFA= mono unsaturated fatty acid) und mehrfach ungesättigte FS (PUFA= poly unsaturated fatty acid). Die gesättigten FS sind maximal mit Wasserstoffatomen beladen und haben keine Doppelbindungen innerhalb der Kohlenwasserstoffkette. Durch das Auftreten von Doppelbindungen zwischen den C-Atomen werden die FS ungesättigt. Daraus ergibt sich unter anderem auch ihre räumliche Anordnung in cis- oder trans-Isomerie. Bei natürlichen Fetten liegt weitestgehend die

cis-Position vor. Die trans-Position hingegen kommt in den sogenannten Transfettsäuren vor, die bei der Raffination von Speisefetten wie z.B. Margarine entstehen. Sie stehen im Verdacht, kardiovaskuläre Risiken zu bergen (Willett 2006). Zu den einfach ungesättigten FS gehören die FS der delta 9-Desaturase Familie. Zu den mehrfach ungesättigten FS gehören die FS der ω3- sowie der ω6-Familie. Die mehrfach ungesättigten FS sind von besonderer Bedeutung für den menschlichen Organismus sind, da zu dieser Gruppe die essentiellen FS gehören. Dabei handelt es sich um FS, die vom Organismus nicht selber synthetisiert werden können, da sie Doppelbindungen enthalten, die mehr als 9 C-Atome von der Carboxylgruppe entfernt sind. Sie stammen von Pflanzen, da dort die entsprechenden Desaturasen vorkommen. Daher müssen sie mit der Nahrung aufgenommen werden. Zu den essentiellen FS gehören die Linolsäure, die Linolensäure sowie die Nervonsäure. Die Einteilung nach der Kettenlänge ergibt kurzkettige (bis zu 4 C-Atome), mittelkettige (6-10 C-Atome) und langkettige FS (über 10 C-Atome). Die Konsistenz der Fette wird durch die Länge der Kohlenwasserstoffkette und die Anzahl der Doppelbindungen bestimmt. Je länger die Kohlenwasserstoffkette desto höher der Schmelzpunkt und je mehr Doppelbindungen vorliegen, desto niedriger liegt der Schmelzpunkt. Feste Produkte enthalten eher lange gesättigte FS, während flüssige Öle aus einfach oder mehrfach ungesättigten FS bestehen. Die Trivialnamen der FS wiederum ergeben sich zum Teil aus dem Grundmaterial aus welchem sie zuerst isoliert werden konnten. Die Palmitinsäure wurde beispielsweise erstmals aus der Ölpalme Elaeis guineensis isoliert und ist, neben Ölsäure, überwiegend in Palmöl enthalten. Fette und Öle bestehen prinzipiell aus einer Mischung verschiedener FS (Small 1991). Es gibt jedoch FS, die den hauptsächlichen Anteil der Mischung ausmachen. Die Ölsäure beispielsweise ist überwiegend in Erdnußöl, Haselnußöl, Olivenöl, Palmöl, Rapsöl, Mandelöl, aber auch in Schweineschmalz, Rindertalg, Gänseschmalz und Butterfett enthalten. Zu den FS rein pflanzlichen Ursprungs gehört, die Linolsäure, die in Diestelöl, Sojaöl, Sonnenblumenöl, Traubenkernöl, Maiskeimöl, Walnußöl und Weizenkeimöl überwiegend vorkommt. Die γ-Linolensäure ist überwiegend in Leinöl enthalten. Zu den Fetten tierischen Ursprungs zählt die Palmitinsäure und insbesondere bei Schweineschmalz und Rindertalg die Stearinsäure. Die Arachidonsäure kommt in Pflanzenölen praktisch nicht vor, ist aber als wichtiger Membranbestandteil in allen Geweben vorhanden. Die ω3-FS (EPA und DHA) sind vorwiegend in Fischölen zu finden und standen im Verdacht, die Insulinsensitivität und Insulinsekretion zu verbessern. Diese Annahmen konnten allerdings nicht bewiesen werden (Vessby 2001).

Tabelle 2 Nomenklatur der Fettsäuren

Trivialname/Abkürzung	Molekulare Bezeichnung	Wissenschaftliche Bezeichnung
Gesättigt		
Myristinsäure	14:0	tetradecanoic acid
Palmitinsäure	16:0	hexadecanoic acid
Stearinsäure	18:0	octadecanoic acid
Arachinsäure	20:0	eicosanoic acid
Behensäure	22:0	docosanoic acid
Lignocerinsäure	24:0	tetracosanoic acid
D9 Desaturase Familie		
Myristölsäure	14:1ω5	cis 9- tetradecenoic acid
Palmitölsäure	16:1ω7	cis 9- hexadecenoic acid
Vaccensäure	18:1ω7	cis 11- octadecenoic acid
Ölsäure	18:1ω9	cis 9- octadecenoic acid
Eicosaensäure	20:1ω9	cis 11- eicosenoic acid
Erucasäure	22:1ω9	cis 13- docosenoic acid
Nervonsäure	24:1ω9	cis 15- tetracosanoic acid
Omega 3 Familie		
α-Linolensäure	18:3ω3	cis 9,12,15- octadecatrienoic acid
Stearidonsäure	18:4ω3	cis 6,9,12,15- octadecatetraenoic acid
Eicosatriensäure (ETA)	20:3ω3	cis 11,14,17- eicosatrienoic acid
ω-3- Arachidonsäure	20:4ω3	cis 8,11,14,17- eicosatetraenoic acid
Eicosapentaensäure (EPA)	20:5ω3	cis 5,8,11,14,17- eicosapentaenoic acid
Docosapentaensäure (DPA)	22:5ω3	cis 7,10,13,16,19- docosapentaenoic acid
Docosahexaensäure (DHA)	22:6ω3	cis 4,7,10,13,16,19- docosahexaenoic acid
Omega 6 Familie		
Linolsäure	18:2ω6	cis 9,12- octadecadienoic acid
γ-Linolensäure	18:3ω6	cis 6,9,12- octadecatrienoic acid
Eicosadiensäure	20:2ω6	cis 11,14- eicosadienoic acid
Dihomo-γ-Linolensäure	20:3ω6	cis 8,11,14- eicosatrienoic acid
Arachidonsäure	20:4ω6	cis 5,8,11,14- eicosatetraenoic acid

1.4.2 Synthesewege der Fettsäuren

Die de novo Fettsäurebiosynthese aus Acetyl-CoA Einheiten ist allen Eukaryoten möglich. Dafür steht ihnen mit der Fettsäuresynthase (FASN) ein Multienzymkomplex zur Verfügung, der FS bis zu einer Länge von 16 C-Atomen bilden kann. Die in den Mitochondrien und im Endoplasmatischen Retikulum vorkommenden Elongasen (ELOVL= elongation- of- very- long-chain fatty acids) können die Kohlenwasserstoffkette am Carboxylende um jeweils zwei Kohlenwasserstoffmoleküle verlängern. Für die Bildung der FS sind verschiedene Elongasen und Desaturasen von Bedeutung, die in einem Artikel von Guillou et al. 2010 zusammengefasst werden, an welchem sich die folgenden Ausführungen orientieren. Die ELOVL6 benutzt als Substrate FS mit 12 bis 16 C-Atomen und verlängert die Kohlenwasserstoffketten der gesättigten sowie der einfach ungesättigten FS. Die ELOVLs 1 und 3 verlängern die Kohlenwasserstoffketten der gesättigten und einfach ungesättigten FS mit 18 bis 24 C-Atomen. Die ELOVL5 verlängert bei den mehrfach ungesättigten FS Linolsäure zu Eicosadiensäure und γ-Linolensäure zu Dihomo-γ-Linolensäure, sowie α-Linolensäure zu Eicosatriensäure und Stearidonsäure zu Eicosatetraensäure. Die ELOVLs 2 und 5 verlängern ebenfalls bei den mehrfach ungesättigten FS die Kohlenwasserstoffketten und zwar die der EPA sowie die der DPA. Für das Einfügen von Doppelbindungen zur Synthese einfach und mehrfach ungesättigter FS sind die Desaturasen verantwortlich.Sie entfernen enzymatisch zwei Wasserstoffatome und lassen so die Doppelbindung entstehen. Bei Säugetieren sind delta 5-, delta 6- und delta 9-Desaturasen bekannt, Doppelbindungen können also nicht jenseits vom C-9-Atom eingefügt werden. Die delta 9-Desaturase, auch bekannt als Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD), bildet hauptsächlich Palmitölsäure aus Palmitinsäure und Ölsäure aus Stearinsäure. Die delta5- und delta 6-Desaturasen, die auch FADS1 und FADS2 genannt werden, fügen Doppelbindungen an den C-Atomen 5 bzw. 6 von ungesättigten FS ein. Dadurch entsteht aus der essentiellen Linolsäure im Verlauf des ω6-Syntheseweges die Arachidonsäure, aus welcher schließlich die Eikosanoide gebildet werden, die eine wichtige Rolle bei der Überempfindlichkeits- und Entzündungsreaktion spielen. Aus der α-Linolensäure entstehen durch die FADS1 und FADS2 im Verlauf des ω3 Synthesewegs EPA und DHA. Aus EPA werden Prostaglandine gebildet und DHA gilt als besonders wichtige Komponente des Nervensystems. Die Aktivität der Desaturasen ist reguliert durch den Konkurrenzkampf der Substrate, durch Produktinhibition und durch Insulin. Wahrscheinlich beeinflusst die körperliche Aktivität ebenfalls die Funktion der Enzyme (Vessby et al. 2002). Die Abbildung 2 gibt einen zusammenfassenden Überblick über den Stoffwechsel der FS bei Säugetieren.

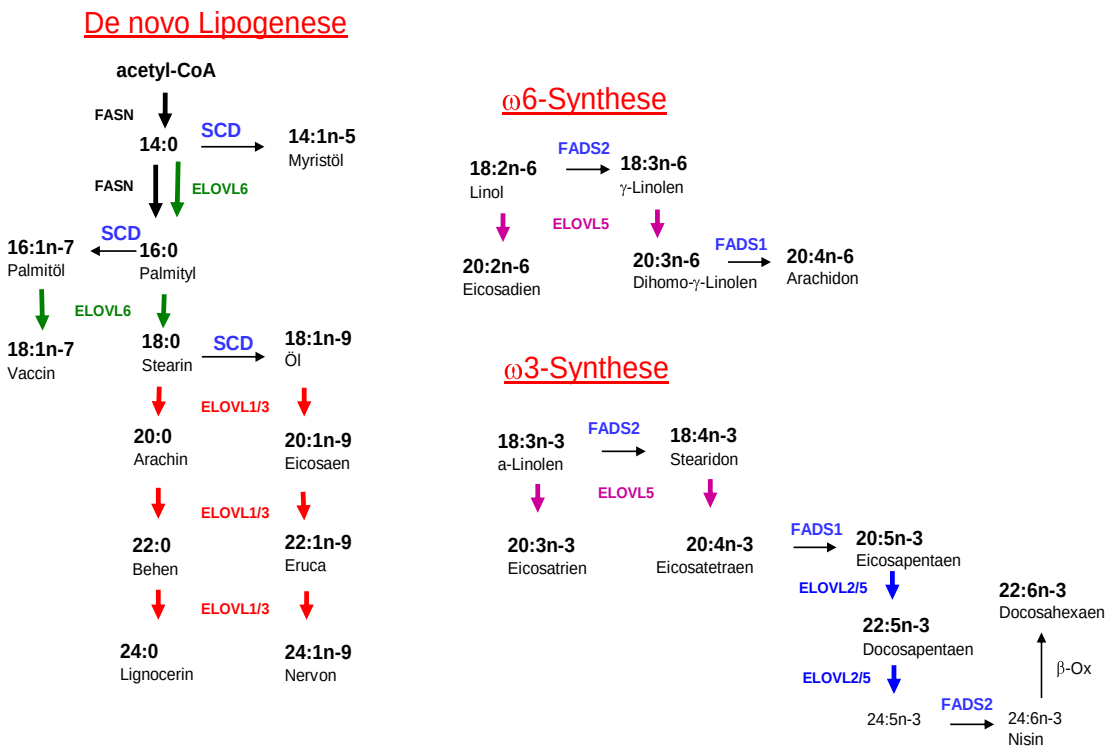

Abbildung 2 Stoffwechsel der Fettsäuren bei Säugetieren

Abkürzungen: SCD, Stearoyl-CoA-Desaturase (delta 9-Desaturase); FASN, Fettsäuresynthase; ELOVL6, Elongase 6; ELOVL1/3, Elongase 1/Elongase 3; ELOVL2/5, Elongase 2/Elongase 5; FADS1, delta 5-Desaturase; FADS2, delta 6-Desaturase (Mit freundlicher Genehmigung von Dr. Ludger Scheja, Institut für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, UKE Hamburg).

1.4.3 Fettsäure Veränderungen im Metabolischen Syndrom

Eine generell wichtige Rolle für die Fettzusammensetzung des Blutes nehmen neben der Art und Menge der Ernährung der individuelle Stoffwechsel, das Alter, die Erbanlagen und das Geschlecht ein. Die Mischung an Fetten, die in der Nahrung enthalten ist spiegelt sich zum Teil in der Zusammensetzung der FS der Gewebe wieder (Van Staveren et al. 1986, Nikkari et al.

1995). Das bedeutet, daß sich nach der Fettaufnahme innerhalb der ersten Stunden eine Veränderung der Serum TG einstellt. Die Fettsäurezusammensetzung der Cholesterinester und PL spiegelt die FS der Nahrung der letzten 3-6 Wochen wieder. Die Erythrocytenmembran beispielsweise spiegelt die Fettsäureaufnahme der vergangenen Monate wieder, die TG des Fettgewebes die der letzten Monate bis Jahre (Vessby 2002). Es hat sich herausgestellt, dass die gesteigerte Aufnahme von gesättigten FS mit steigender IR vergesellschaftet ist, während die Aufnahme von mehrfach ungesättigten FS die IS tendenziell verbessert (Vessby et al. 2001). Liegt eine Insulinresistenz vor, so verändert sich neben der Zusammensetzung der Skelettmuskelmembranen auch die Zusammensetzung der Serumlipide. Die Konzentration der Palmitinsäure (16:0) erhöht sich und die Linolsäure Konzentration (18:2 n-6) fällt ab. Die Gründe dafür scheinen eine erhöhte de novo Lipogenese und veränderte Aktivitäten der Desaturasen zu sein. Die geschätzten Aktivitäten der delta 6- und delta 9-Desaturasen steigen an und die der delta 5-Desaturase sinkt ab (Vessby 2002). Geschätzt werden die Aktivitäten dieser Enzyme im Übrigen durch die Desaturase Indices, die sich aus dem Verhältnis von Produkt zu Edukt errechnen. Ein hohes Verhältnis von Arachidonsäure (20:4 n-6) zu Dihomo-γ-Linolensäure (20:3 n-6) gibt eine gute delta 5- Desaturase Aktivität an, welche wiederum für eine gute Insulin Sensitivität spricht.

2. Material und Methoden

Der praktische Teil der Arbeit beinhaltet die Aufbereitung der Proben im Labor und gliedert sich in fünf Arbeitsschritte. Zuerst wird mit der FPLC (Fast Protein Liquid Chromatographie) eine Größentrennung der Bestandteile vorgenommen. Mit einer Cholesterinbestimmung werden die Lipoproteine ihren Kategorien zugeordnet und im Pooling miteinender vereint. Die sich anschließende Derivatisierung dient der Herstellung der Fettsäuremethylester, welche für die Gaschromatographie benötigt werden. Die Gaschromatographie bildet die enthaltenen FS ab. In diesem Kapitel werden die Grundlagen der verschiedenen Verfahren erläutert.

2.1 FPLC- Fast Protein Liquid Chromatographie

Das Prinzip dieser Methode ist die Trennung der Probenbestandteile nach deren Größe (Sheehan 1996, Ordovas und Osgood 1998). Das Patientenplasma wird mit Puffer verdünnt und in die FPLC-Säule injiziert. Die Säule besteht aus porösem Material (gepackte Säule). Große Bestandteile gelangen schnell, der Schwerkraft folgend durch das Säulenmaterial und belegen die ersten Reaktionsröhrchen im Fraktionssammler. Die kleinen Bestandteile benötigen mehr Zeit, je kleiner sie sind, da der Durchgang der Säule nicht auf dem direkten Wege erfolgt. Die Teilchen werden vermehrt abgelenkt und über Umwege gelangen sie in die letzteren Reaktionsröhrchen des Fraktionssammlers.

2.1.1 FPLC- Methode

Es werden zwei Plasmaproben auf dem Rotor bei 30 U/min. in 10 Min. aufgetaut. Nach dem Zentrifugieren, 10 Minuten bei 14.000 U/min., werden 150 µl der Probe, unter vorsichtigem Rühren in der oberen Rahmschicht, mit der Pipette abgenommen. Dieser Teil wird in eine Mikroröhre gegeben und mit 100 µl FPLC-Puffer vermischt. Mit der Kanüle einer Einmalspritze werden 250µl der Probe aufgenommen und in die FPLC injiziert, bis der Loop gefüllt ist. Es wird das Programm 2 ausgewählt. Die Probe durchläuft die Superose TM 6 Säule und wird in 40 Fraktionen zu je etwa 400-500 µl aufgeteilt.

<u>Geräte:</u>

- Rotor CAT RMS r-80
- Zentrifuge Sigma 1-15 K
- Säule Superose TM 6 10/300 GL
- Finpipette 20-200

Verbrauchsmaterial:

- Mikroröhren 1,5 ml mit Verschluß (Sarstedt)
- Pipettenspitzen 200 µl gelb
- Einmalspritzen
- Kanülen

Reagenz:

Chemikalie	Hersteller
Tris- HCL pH8	Sigma
NaCl	Baker
EDTA	Sigma

Angesetzte Lösung/Chemikalie	Verhältnis
10 x FPLC Puffer	100 mM Tris, 1,5 M NaCl, 100 mM EDTA
FPLC Puffer	200ml 10x FPLC Puffer in 1800 ml Aqua dest.

2.2 Cholesterinbestimmung

Das Prinzip der Cholesterinbestimmung beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion, die photometrisch gemessen und mit einer Eichreihe verglichen wird. Die Durchführung der Cholesterinbestimmung ist notwendig, um den Cholesteringehalt der einzelnen Fraktionen zu ermitteln. Die Einteilung der Zugehörigkeit der Fraktionen zu der entsprechenden Lipoproteinklasse erfolgt nach Größe und Cholesteringehalt.

2.2.1 Cholesterinbestimmung- Methode

Eine 96-Well Platte wird zunächst mit einer Eichreihe in Doppelbestimmung bestückt. Anschließend werden 100µl jeder Fraktion auf die Platte pipettiert. Nach der Zugabe von je 200µl Cholesterinreagenz und der zehnminütigen Inkubation wird mit dem Photometer der Cholesteringehalt bestimmt.

Geräte:

- Biotrak-Reader (Amersham biosciences)Plate Reader
- Finnpipette Multikanal 50-300
- Finpipette 20-200

Verbrauchsmaterial:

- PS Mikroplatte 96 Well non-sterile (greiner bio-one)
- Finntipps 300 µl
- Pipettenspitzen 200 µl gelb

Reagenzien:

Chemikalie	Hersteller
Cholesterinreagenz Cholesterol CHOD-PAP	Roche/Hitachi
Precipath L	Roche Systems

2.3 Pooling

In diesem Schritt werden die Fraktionen, die aufgrund des Cholesteringehaltes den vier Lipoproteinkategorien VLDL, HDL, LDL und FFS entsprechen, zusammengefügt. Durch die Zugabe von BHT-Lösung als Antioxidans werden die FS stabilisiert (Christie 1985). Für die Doppelbestimmung werden zwei identische Proben hergestellt.

2.3.1 Pooling- Methode

Alle verwendeten Reagenzgläser werden zuerst mit Aceton, danach mit Methanol-Toluol ausgewaschen und im Trockenschrank kurz getrocknet. Nach Vorgabe der Kurve der Cholesterinbestimmung (Abbildung 7) werden die jeweiligen Fraktionen gepoolt, d.h. die entsprechenden Einzelfraktionen werden, entsprechend der Tabelle 3, in einem größeren Reagenzglas zusammengefügt. Aus den 40 Einzelfraktionen entstehen vier Pools, denen jeweils eine Lipoproteinklasse zugeordnet wird:

Tabelle 3 Zuordnung der Fraktionen zu Lipoproteinklassen

Fraktion	Lipoproteinklasse
7-10	VLDL
13-18	LDL
22-26	HDL
31-36	ALB

Von jedem Pool wurden 50µl in eine Mikroröhre abpipettiert und eingefroren. Aus dieser neugewonnenen Probe soll eine Apo E Bestimmung durchgeführt werden. Nach dieser Entnahme

wird in jeden Pool, entsprechend der Anzahl der Fraktionen, BHT zugegeben. Pro Fraktion wird 50 µl BHT berechnet. Anschließend wird jeder Pool auf zwei kleine Reagenzgläser aufgeteilt um zwei gleichgroße Proben für die Durchführung einer Doppelbestimmung zu erhalten.

Geräte:

- Eppendorfpipette 10-100 µl
- Eppendorfpipette 20-200 µl
- Eppendorfpipette 500-1000 µl
- Kulturröhrchen mit Schraubkappe K 251.1 (Roth)
- Trockenschrankk Memmert
- Dispenser 0,5 ml (Aceton)
- Dispenser 1 ml (Methanol-Toluol 4:1)
- Waage Sartorius LA 120S

Verbrauchsmaterial:

- Pipettenspitzen gelb
- Pipettenspitzen blau
- Mikroröhren 1,5 ml mit Verschluß (Sarstedt)
- Etiketten Zweckform 3636

Reagenzien:

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Baker
BHT (2,6-Di-tert-butyl-p-cresol)	Fluka
Methanol	Baker
Toluol	Merck

Angesetzte Lösung/Chemikalie	Verhältnis
BHT-Lösung	0,1M BHT in Toluol
Methanol-Toluol	4:1 (V:V)

2.4. Gefriertrocknen (Lyophilisation)

Den Proben wird mit dieser Technik aus der Kombination von Zentrifugalkraft, Vakuum und Kühlung schonend das gesamte Wasser entzogen, so dass nur die festen Bestandleile der Probe übrig bleiben. Das Wasser sublimiert dabei vom festen zum gasförmig Aggregatzustand.

2.4.1 Gefriertrocknen Methode

Die 8 Pool-Proben werden geöffnet in den Zentrivac gestellt. Nach dem Schließen des Deckels der Zentrifuge und Einschalten des Rotors erzeugt die Ölpumpe ein Vakuum. Die Kühlfalle kühlt bis -120 Grad Celsius. Auf diese Weise wird der Probe in etwa 8 Stunden die gesamte Flüssigkeit entzogen. Es bleiben die Lipoproteine und andere feste Bestandteile übrig. Bei laufender Ölpumpe muß eine Schutzbrille getragen werden.

Geräte:

- Zentrivac
- Kühlfalle
- Ölpumpe
- Schutzbrille

2.5. Derivatisierung

Die FS, die in den extrahierten Lipoproteinen enthalten sind können mit dem Gaschromatographen gemessen werden. Dazu müssen sie in ihre Methylester überführt werden. Fettsäuremethylester (FAMES=fatty acid methyl ester) sind flüchtige Verbindungen und ihre Hersetellung gelingt mit der Methode der „direct transesterification“, bei der die Lipide mit einem Alkohol (Alkoholyse) direkt umgeestert werden (Lepage und Roy 1986). Die Reaktionen finden in ein und demselben Gefäß bei 100°C statt und benötigen als Katalysator Acetylchlorid. Nach Zugabe von Methanol:Toluol (4:1) reagieren die freien FS, Triglycheride und Cholesterinester mit Methanol zu den jeweiligen Fettsäuremethylestern, die sich nach der Neutralisierung der Reaktion mit Natriumcarbonat in der polaren Toluolphase lösen. Durch Zentrifugation erfolgt eine Phasentrennung und die Fettsäuremethylester können mit der obenliegnden Toloulphase abpipetiert werden. Vor der Entwicklung dieser Methode wurden die Reaktionen, Verseifung mit anschließender Neuveresterung, einzeln nacheinander ausgeführt. Dieser Prozeß war sehr zeitintensiv und führte zu Verlusten bei der Ausbeute. Die Methylester entstehen nach folgenden Reaktionsgleichungen:

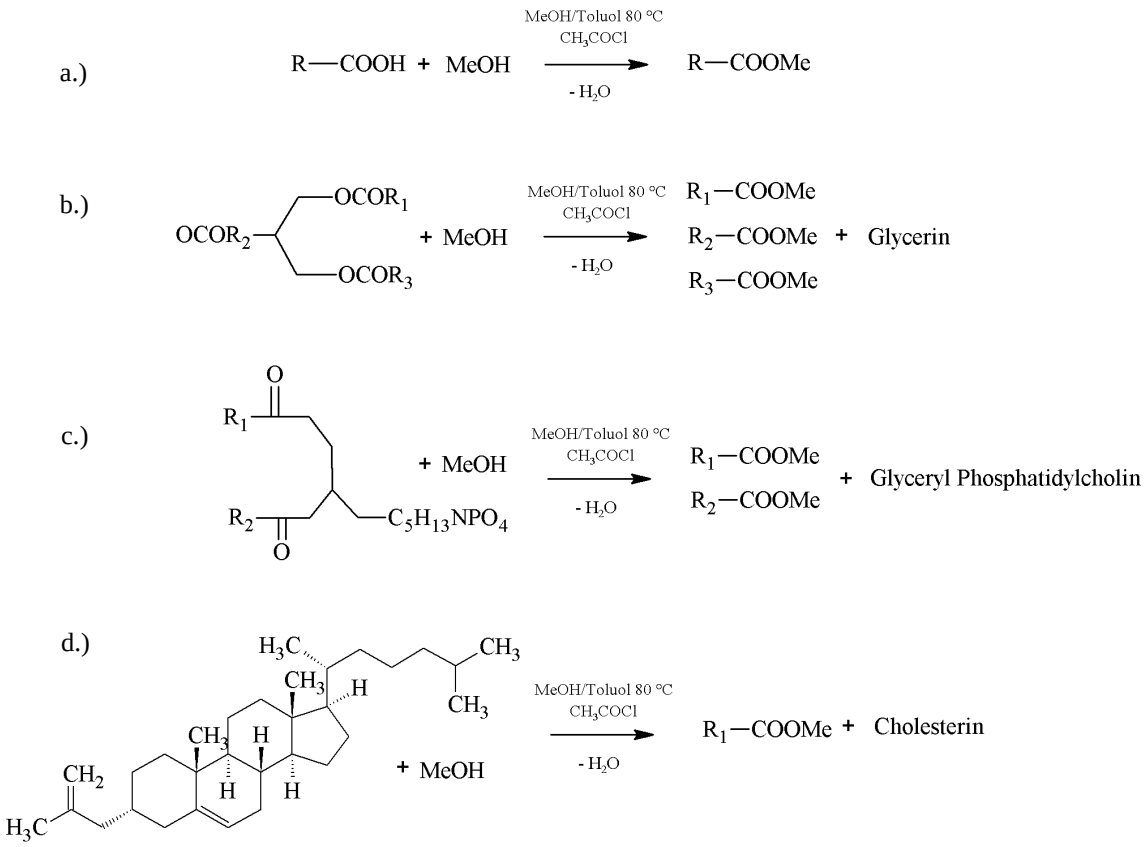

Abbildung 3 Fettsäuremethylester

Bildung der Fettsäuremethylester der Lipide nach Alkoholyse a.) Methylester einer freien FS, b.) Triglycerid ergibt drei Fettsäuremethylester und Glycerin, c.) Phospholipid ergibt zwei Fettsäuremethylester und Glyceryl Phosphatidylcholin, d.) Cholesterinester ergibt ein Fettsäuremethylester und Cholesterin

2.5.1 Derivatisierung Methode

Die eingedampften Proben werden mit je 1 ml Methanol-Toluol (4:1) aus dem Dispenser gelöst und mit 50 µl Heptadekansäurestandard (interner Standard) versehen. Unter Vortexrotation wird jeder Probe vorsichtig und langsam 100 µl Acetylchlorid zugegeben. Es muß eine Schutzbrille getragen werden, da es bei diesem Schritt zu einer heftigen Reaktion kommen kann. Vorbereitend werden alle verwendeten Schraubverbindungskappen, Unterlegscheiben und Dichtungen zuerst mit Aceton, danach mit Methanol-Toluol ausgewaschen und im Trockenschrank kurz getrocknet. Da die Schraubverbindungskappen dem durch Wärme erzeugten Druck standhalten

müssen, werden sie durch das Einlegen von Unterlegscheiben stabilisiert und mit Silikondichtungen versehen, deren Teflonseite zur Reagenzglasöffnung gerichtet ist. Jeder so ausgestattete Deckel wird sorgfälltig auf das Glas geschraubt. Die Gläser werden für eine Stunde in den auf 100 Grad temperierten Trockenschrank gestellt um unter Druck die gewünschte Umesterung zu ermöglichen. Nach dem Abkühlen und dem Abnehmen der Deckel werden je 1,5 ml Natriumcarbonat (6%) mit dem Dispenser dazugegeben um die Reaktion durch Neutralisierung zu stoppen. Anschließend werden die Gefäße 5 Minuten bei 2000 Upm zentrifugiert. Es bilden sich 2 Phasen. In der oberen Toluolphase sind die Fettsäuremethylester gelöst. Aus ihr werden vorsichtig 150µl abpipettiert und in ein Insert gegeben. Das Insert wird in eine braune Chromatographieflasche gesetzt und beides wird gemeinsam mittels Bördelzange mit einer Bördelkappe fest verschlossen. Die Proben können in dieser Form mit dem Gaschromatographen gemessen oder in der Tiefkühltruhe bei -30 bis -80 °C gelagert werden.

Geräte:

- Schraubverbindungskappen mit Bohrung für DIN Gewinde G14, Schott
- Unterlegscheiben
- Dichtung Silikon, teflonbeschichtet Gewinde G14
- Eppendorfpipette10-100 µl
- Eppendorfpipette 20-200 µl
- Labsystems Pipetti 50-200 ml,Achetylchloridpipette
- Dispenser 1 ml (Methanol-Toluol 4:1)
- Dispenser 1,5 ml (Natriumcarbonat 6%)
- Vortexrotor
- Trockenschrank Memmert
- Zentrifuge Laboratory Centrifuges 6 K 15 (Sigma),Rotor Nr.13127,306g 299/01
- Bördelzange

Verbrauchsmaterial:

- Pipettenspitzen gelb
- Mikroeinsatz G30 Is/6MM HK 3 Art.-Nr.:30140

  (CS-Chromatographie Service GmbH)
- Flasche R 1, braun/6,2mm-BF+FM Art.-Nr.:301128

  (CS-Chromatographie Service GmbH)
- Bördelkappe R 11-1,0/HP Art.-Nr.:301114

  (CS-Chromatographie Service GmbH)

Reagenzien:

Chemikalie	Hersteller
Acetylchloride	Fluka
Heptadekansäure	Fluka
Methanol	Baker
Natriumcarbonat wasserfrei	Fluka
Toluol	Merck

Angesetzte Lösung/Chemikalie	Verhältnis
Heptadekansäurestandard	200µg HDS auf 1 ml Methanol:Toluol (4:1)
Methanol-Toluol	4:1 (V:V)
Natriumcarbonat	6%

2.6. Gaschromatographie (GC)

Bei der Gaschromatographie (Abbildung 4) werden die Analyten in ihre Bestandteile aufgetrennt indem sie mit einer mobilen Phase über eine stationäre Phase bewegt werden. Die Säule des Gaschromatographen bildet die stationäre Phase, über welche die zu analysierenden Substanzen, in diesem Fall die Fettsäuremethylester, mittels der mobilen Phase (Helium) bewegt

werden. Bei der Gaschromatographiesäule handelt es sich um eine 30 Meter lange Quarzkapillare, deren Innendurchmesser 0,25 Millimeter beträgt. Die Innenwandung der Kapillare ist mit sehr polaren Cyanopropylgruppen und weniger polaren Trimethylgruppen zu gleichen Anteilen beschichtet (Kapillarsäule). Die Beladung der Säule erfolgt automatisch. Mit einer Mikroinjektionsspritze wird das Probengemisch durch ein selbstschließendes Septum in den Injektor appliziert. Bei einer dort herrschenden Temperatur von 260°C verdampft die Probe und kann mit dem Gas über die Säule getragen werden. Aufgrund der unterschiedlichen Siedepunkte und Polaritäten der verschiedenen Substanzen innerhalb einer Probe wird das Ende der Säule und damit der Flammenionisationsdetektor (FID) nach unterschiedlicher Zeit erreicht (Abb. 5). Diese sogenannte Retentionszeit ist für FS umso länger, je mehr C-Atome und Doppelbindungen vorhanden sind.

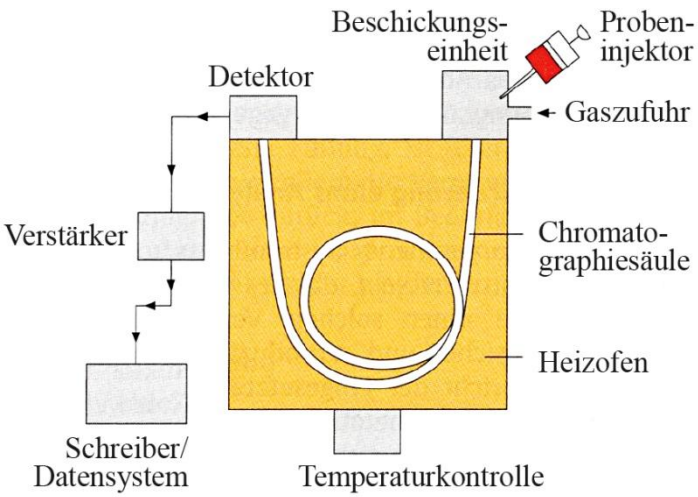

Abbildung 4 Anlage zur Gasflüssigkeitschromatographie **(aus Richter 2003)**

Der Flammenionisationsdetektor (Abbildung 5) ist ein in der GC eingesetzter Detektor für organische Verbindungen. Die zu analysierenden Substanzen werden in einer Flamme bei etwa 400° C ionisiert. Das führt zu einer Änderung der Leitfähigkeit zwischen zwei Elektroden. Die eine Elektrode entspricht einem Brenner, in dessen Luft/Wasserstoff-Flamme die organischen Substanzen verbrennen. Die dabei, neben den Radikalen und Elektronen entstehenden Ionen treffen auf die zweite Elektrode, eine als Anode geschaltete Ringelektrode aus Messsing oder Platin. Dabei fließt ein Strom zwischen der Anode und der als Kathode geschalteten Brennerdüse. Der Strom ist der Anzahl der C-Atome proportional und somit auch der Menge der verbrannten Substanz.

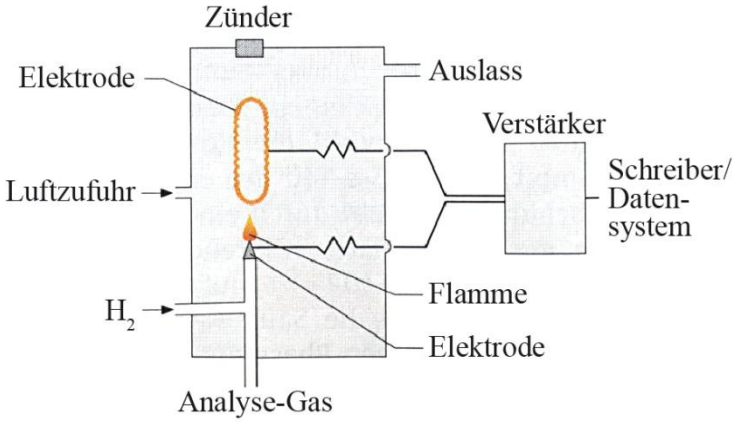

Abbildung 5 Aufbau eines Flammenionisationsdetektors (FID) (aus Richter 2003)

Ein Auswertungsprogramm stellt die elektrischen Signale in Abhängigkeit von der verstrichenen Zeit seit Messbeginn (Retentionszeit) in Form eines Peaks grafisch dar (Abbildung 6). Die Fläche des Peaks ist proportional zur Substratkonzentration. Die Quantifizierung erfolgt nach der internen Standardmethode. Durch die Messung der zugegebenen definierten Menge an Heptadekansäure, kann die Menge der FS errechnet werden. In einem Report werden die Ergebnisse festgehalten. Die Dauer der GC Analyse einer Probe betrug 86 Minuten plus die Zeit zum Abkühlen. Die Dauer ist prinzipiell abhängig von den Einstellungen des Chromatographen (Masood et al. 2005).

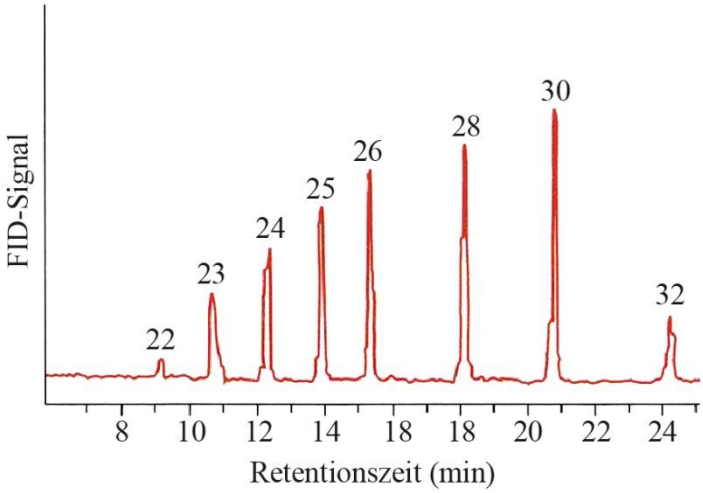

Abbildung 6 Gaschromatogramm **(aus Richter 2003)**

2.6.1 Gaschromatographie Methode

Die beschrifteten Fläschchen werden in den Auto-Sampler sortiert. Das weitere Verfahren ist automatisiert.

Geräte:

- Gaschromatograph Hewlett Packard 5890 Series II
- Auto-Sampler Hewlett Packard 7673A Controller
- Injektor 260 °C, Injektionsvolumen 1µl; Split/Splitless, 90 sec. Purge off
- Säule: DB-225, Länge 30m, i.D 0,25mm, Filmdicke 0,25µm; (Agilent)
- Flammenionisationsdetektor: 300°C, Helium make up Gas, 30ml/min
- Trägergas: Helium, 37m/s bei 70°C, konstanter Fluss
- Computer Wing Windows® XP Propessional 1-2 CPU with Plus

Die Einstellungen des Gaschromatographen werden nicht verändert.

Verbrauchsmaterial:

- Helium
- Wasserstoff
- Synthetische Luft
- Standard
- Aceton
- Toluol

2.6.2 Gaschromatographie Auswertung Methode

Die ausgegebenen Chromatogramme werden zusätzlich manuell mit der Bearbeitungssoftware ausgewertet. Bei dieser Bearbeitung wird ein Vergleich der beiden Chromatogramme der doppelbestimmten Proben vorgenommen. Ausserdem beinhaltet sie unter anderem den Abgleich mit dem internen Standard (Heptadekansäure), die Betrachtung der Grundlinien und die Detektion von eventuellen Verunreinigungen. Gegebenenfalls erfolgt eine manuelle Integration der entsprechenden Peaks, damit diese von der Software erkannt und zugeordnet werden können.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeines Projektdesign

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zur „Lilly Offspring“ Studie aus dem Projekt „Insulin Resistance Projekt“. Bei diesem Projekt handelt es sich um eine Gemeinschaftsarbeit des Biochemischen Institutes der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf und des Unternehmens Eli Lilly. Es wird die Beziehung zwischen Adipositas, Fettstoffwechsel und Insulinresistenz untersucht. Gesucht werden diagnostische Marker, um die Prophylaxe und Therapiemöglichkeiten von insulinresistenten Patienten und Typ II Diabetikern zu verbessern.

3.2. Studiendesign

Insgesamt wurden 92 gesunde, nicht rauchende Nachkommen von Typ II Diabetikern im Zeitraum von Oktober 2005 bis Februar 2006 rekrutiert. Es wurde jeweils ein oraler Glukosetoleranztest durchgeführt. Von diesen 92 Probanden wurde eine Untergruppe (n= 40) ausgewählt, welche den gesamten Schwankungsbereich der Kohorte bezüglich IR (niedriger HOMA-IR- hoher HOMA-IR) und BMI (niedrig- hoch) repräsentativ darstellt.Diese 40 Probanden wurden zwischen März und Mai 2006 noch einmal eingeladen um einen oralen Fettbelastungstest (fettreiches Frühstück) durchzuführen.

Die Blutabnahme erfolgte jeweils zu drei Zeitpunkten:

1. Vor dem Fettfrühstück (nüchtern), nach einer Fastenperiode von mindestens acht Stunden

2. Zwei Stunden nach dem Fettfrühstück,

3. Vier Stunden nach dem Fettfrühstück.

Die Blutproben wurden aufbereitet, hinsichtlich ihres metabolischen Profils (Hormone, Lipide, Entzündungsmarker, usw.) untersucht und anschließend bei -80ºC eingefroren. Aus diesen Proben (Blutplasma) wurden für die vorliegende Arbeit die Lipoproteine isoliert. In den Lipoproteinen wurde das Vorkommen von 22 verschiedenen FS geprüft. Mit den schon bestehenden Daten der Datenbank werden Korrelationen zwischen den Fettsäuremustern der

Lipoproteine und anderen metabolischen Parametern gesucht. Eine Übersicht der Kohorte zu den wichtigsten gemessenen Parametern bietet die Tabelle 7 (s.S.65). Es konnten 38 der 40 Probanden untersucht werden. Zwei Probanden schieden aus, einer aufgrund initial zu hoher Triglyceridwerte und der andere wegen fehlender Proben.

Der Ergebnisteil gliedert sich in fünf Teile: Im ersten Abschnitt (3.3) wird der zur Analyse notwendige Zwischenschritt der Cholesterinbestimmung behandelt. Im zweiten Abschnitt (3.4) erfolgt die Darstellung der Fettsäuredaten des nüchtern entnommenen Plasmas. Im dritten Abschnitt (3.5) werden die erhobenen Fettsäuredaten der Lipoproteine zum Zeitpunkt 0 Stunden (nüchtern) präsentiert. Im vierten Abschnitt (3.6) werden postprandiale Veränderungen untersucht. Im fünften Abschnitt (3.7) werden die Daten einer Korrelationsanalyse zwischen HOMA-IR und den FS des Plasmas, beziehungsweise den FS der Lipoproteinen gezeigt.

3.3. Ergebnisse der Cholesterinbestimmung

3.3.1 Cholesteringehalt der Fraktionen aller Probanden

Um genauere Angaben über die Verteilung des Cholesterins zu bekommen, erfolgte bei allen Probanden die direkte Messung der Plasmakonzentrationen der Lipoproteine VLDL, LDL, HDL und Albumin zu den drei Zeitpunkten. Zuerst wurden die Plasmabestandteile nach Partikelgröße mittels FPLC (Kapitel 2.1.) getrennt. Anschließend wurden anhand des Cholesteringehaltes (Kapitel 2.2) die entsprechenden Fraktionen gepoolt, so dass die Konzentration des Cholesteringehalts der VLDL, LDL, HDL und Albumin der Summe des Cholesteringehaltes der entsprechenden Fraktionen entsprach.

Für alle 38 Probanden wurde bereits der Cholesteringehalt der Fraktionen zu den 3 Zeitpunkten, nach Durchlaufen der FPLC, von Herrn Bülent Polat im Labor gemessen. Diese Daten kommen in der Abbildung 7 zur Darstellung und sollen als Vergleichswerte dienen, um die Funktionsfähigkeit der Säule und die Beibehaltung der zu poolenden Fraktionen zu überprüfen. Für diese Arbeit wurde deshalb auf die Bestimmung des Cholesteringehaltes in jeder einzelnen Probe verzichtet. Es wurde aber in Stichproben der Cholesteringehalt gemessen um die Position und Anzahl der poolbildenden Fraktionen zu kontrollieren (Kapitel 3.3.2).

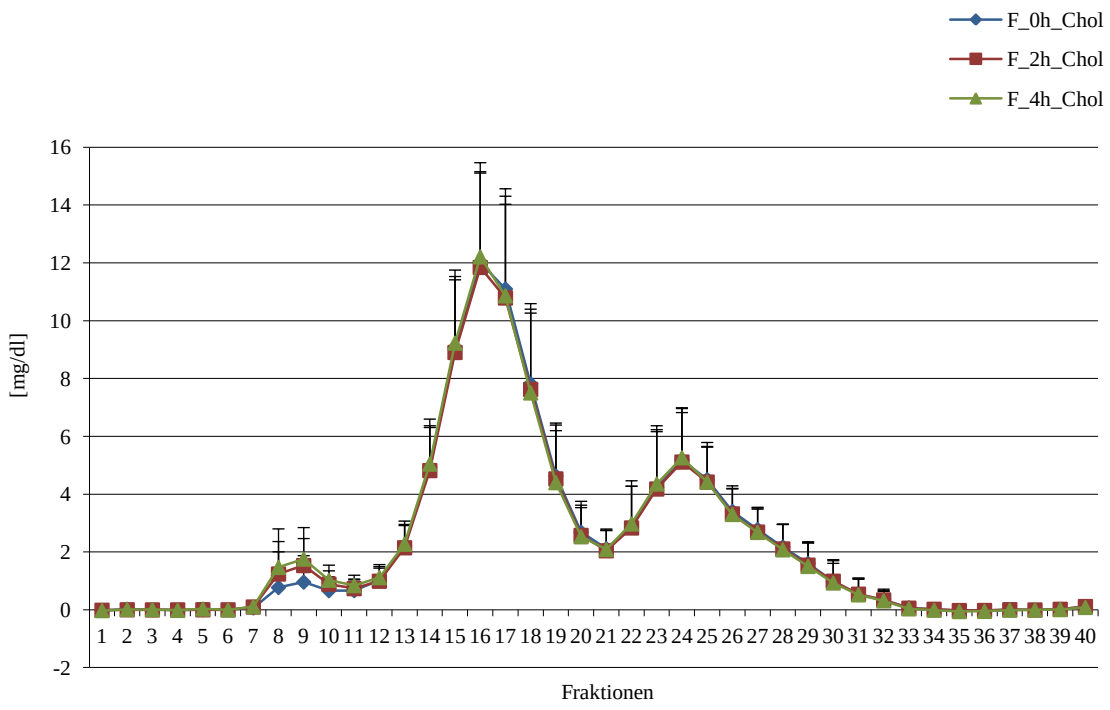

Abbildung 7 Cholesteringehalt der Plasma FPLC Fraktionen aller 40 Probanden

Cholesteringehalt in (mg/dl) der 40 Fraktionen nach Durchlaufen der FPLC zu den Zeitpunkten 0h (F_0h), 2h (F_2h), 4h (F_4h) gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen, (n=38). (Daten mit freundlicher Genehmigung von Herrn Bülent Polat),

Es ist ein typisches dreigipfeliges Profil zu erkennen. Die Fraktionen 7-10 enthalten die größten Partikel mit niedrigem Cholesteringehalt. Diese werden den VLDL und Chylomikronen zugeordnet. Die Fraktionen 13 bis 18 repräsentieren die LDL, mit mittlerer Größe und dem höchsten Cholesteringehalt. In den Fraktionen 23-26 sind mit kleinerer Größe und mittlerem Cholesteringehalt die HDL enthalten. Die Fraktionen 31- bis 36 beinhalten Serumproteine (v.a. Albumin), die kleinsten Partikel mit dem geringsten Cholesteringehalt. Im Folgenden werden die Albumine der Einfachheit halber ebenfalls als Lipoproteinklasse bezeichnet. Albumin bindet langkettige FS zum Transport im Blut.

In den VLDL und Chylomikronen Fraktionen 7-10 scheint der Cholesteringehalt zwei und vier Stunden nach der Nahrungsaufnahme jeweils etwas anzusteigen, während er in den anderen

Fraktionen nahezu unverändert bleibt. Da es sich um einen analysetechnischen Zwischenschritt handelt, wird auf eine weitere Interpretation der Werte verzichtet.

3.3.2 Cholesteringehalt der Fraktionen einzelner Probanden

Die durch FPLC und Cholesterinbestimmung ermittelten Lipoproteinklassen bilden die Grundlage der im Folgenden beschriebenen Fettsäureanalyse. Aus diesem Grund wurden von den 114 Proben (38 Probanden x 3 Zeitpunkte) zufällig 35 Proben ausgewählt, in welchen nach Durchlaufen der FPLC ebenfalls eine enzymatische Cholesterinbestimmung durchgeführt wurde. Diese Daten, die zur Kontrolle und Bestätigung erhoben wurden, sind in Abbildung 8 dargestellt.

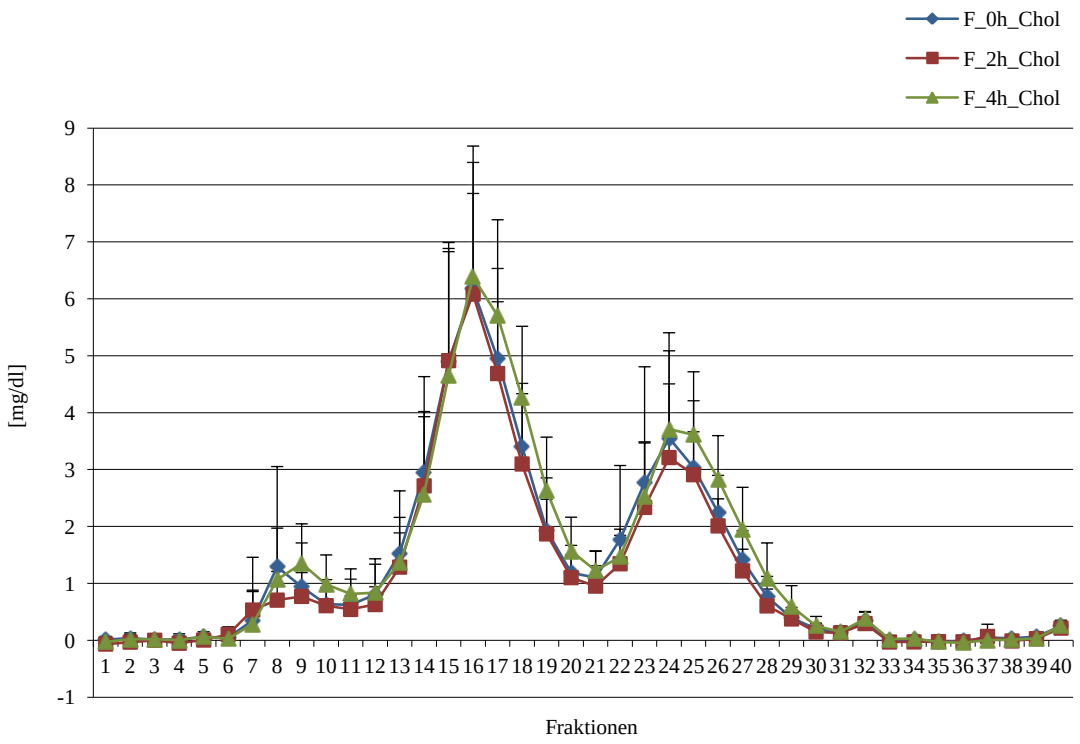

Abbildung 8 Wiederholung der Cholesterinmessung in Plasma FPLC Fraktionen zur Qualitätskontrolle

Cholesteringehalt in (mg/dl) der 40 Fraktionen nach Durchlaufen der FPLC zu den Zeitpunkten nüchtern (F_0h),sowie 2 Stunden (F_2h) und 4 Stunden (F_4h) postprandial; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen, F_0h: n=12, F_2h: n=12, F_4h: n=11.

Im Vergleich mit den Messungen aus 3.3.1 ergab sich wieder das typische dreigipflige Cholesterinprofil. Es kam zu keiner Verschiebung der Fraktionen, so dass die Position und Anzahl der poolbildenden Fraktionen für alle Proben beibehalten werden konnte. Eine Übersicht über die Fraktionen die den jeweiligen Lipoproteinen zugeordnet wurden bietet die Tabelle 3.

3.4. Ergebnisse Gehalt an Gesamtfettsäuren im Plasma

Neben den etablierten Bestimmungsmethoden unter anderem für Cholesterin, TG und HDL aus Blutplasma, besteht auch die Möglichkeit bestimmte FS und ihre Konzentrationen direkt nachzuweisen. Dieses ist eine Spezialität des Labors von Herrn Dr. Klaus Tödter. Er verwendet dabei die in Kapitel 2.6 beschriebene GC-Methode.

Im Plasma aller Probanden wurden mit dieser Methode 22 verschiedene FS nachgewiesen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (in µg|ml) der GesamtFS des Blutplasmas wurden aus der Datenbank extrahiert um in der Abbildung 9 als Vergleichswerte zur Darstellung zu kommen. Die dazugehörigen Daten finden sich in der Tabelle 13 des Anhangs.

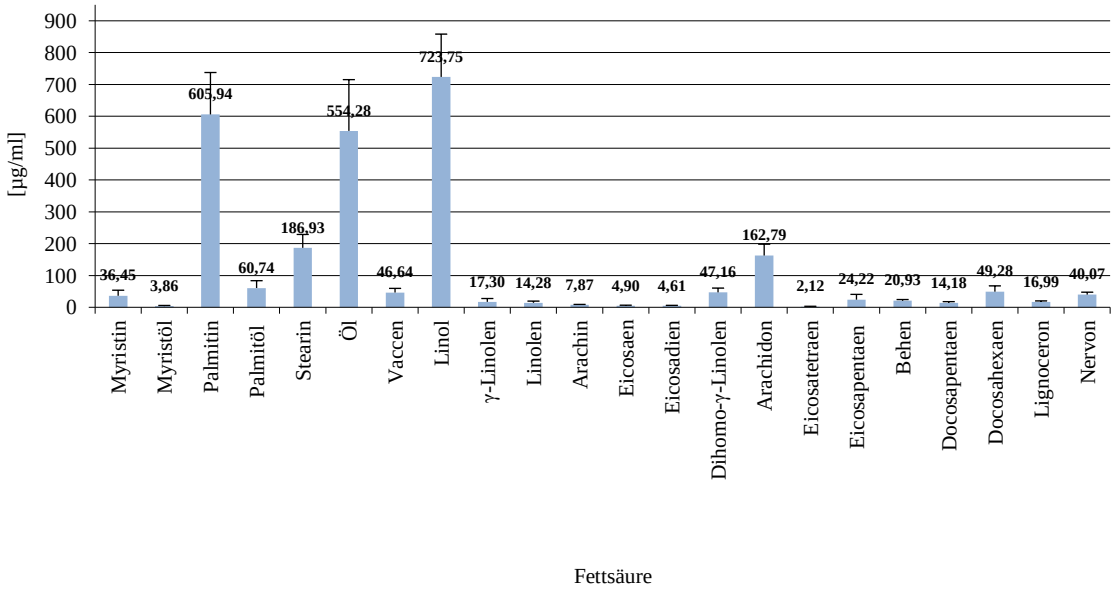

Abbildung 9 Fettsäureprofil des Blutplasmas

Fettsäuregehalt des Blutplasmas in µg/ml bei nüchternen Probanden; gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen, n= 38

Zu erkennen ist ein typisches Fettsäuremuster mit den höchsten Werten für Linolsäure und in absteigender Reihenfolge Palmitinsäure, Ölsäure, Stearinsäure, Arachidonsäure, wie es in verschiedenen Kohorten der Literatur bereits beschrieben wurde (Kotronen et al. 2009, Leskinen et al. 2005, Laaksonen et al. 2002).

Daraus ergab sich die Frage, in welchem Kompartiment des Blutes sich die jeweiligen FS befinden könnten. Zur Beantwortung dieser Frage wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt.

3.5 Ergebnisse Lipoproteine

3.5.1 Gehalt an Gesamtfettsäuren in den Lipoproteinen

Die Lipoproteine enthalten neben den Apoproteinen PL, TG und Cholesterin. Damit sind sie Träger der FS, welche mit ihnen verestert sind, um im Blut transportiert werden zu können. Um zu untersuchen, welche Lipoproteinklasse mit welchen FS assoziiert ist, wurden die FS der durch Poolen entstandenen Lipoproteinklassen ebenfalls derivatisiert und das Fettsäuremuster jeder Gruppe gaschromatographisch ermittelt. Um einen Vergleich zu dem Fettsäuregehalt des Blutplasmas zu bekommen, wurden die Mittelwerte der FS der vier Lipoproteinklassen (VLDL, LDL, HDL, Alb) zum Zeitpunkt 0h (nüchtern) addiert und grafisch in Abbildung 10 dargestellt. Die zugehörigen Werte finden sich in der Tabelle 14 des Anhangs.

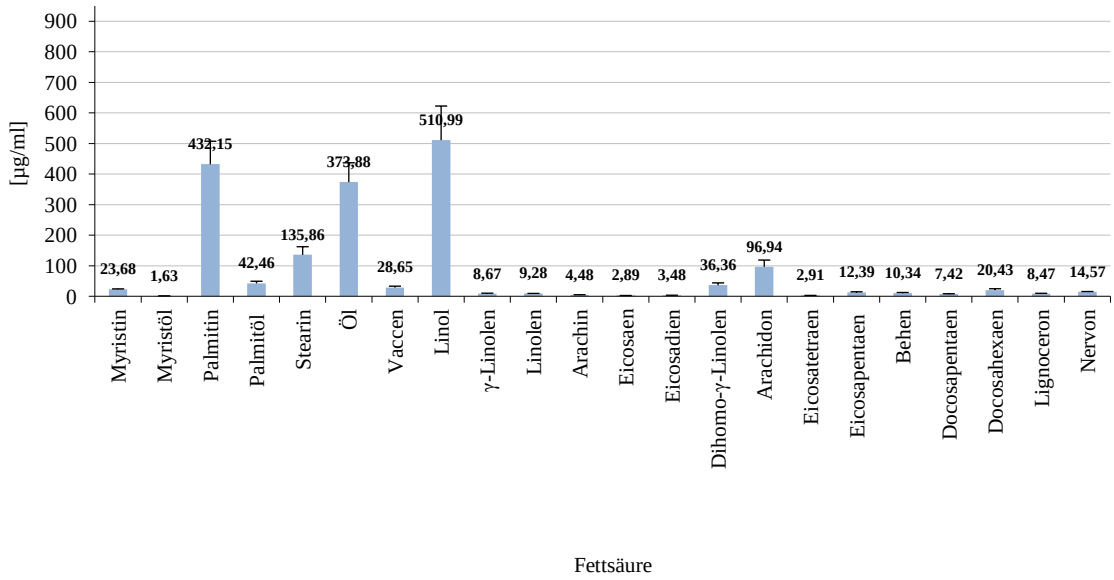

Abbildung 10 Gesamt-Fettsäureprofil der Lipoproteine

Addierte Mittelwerte und Standardabweichungen der FS der Lipoproteine (s. Tabelle 5) in µg/ml zum Zeitpunkt 0h (nüchtern), n=38.

Es ist, wie erwartet, das typische Fettsäuremuster wie in Abildung 9 zu erkennen. Zu den höher konzentrierten FS der Lipoproteine gehören in absteigender Reihenfolge die Linolsäure, die

Palmitinsäure, die Ölsäure, die Stearinsäure, sowie die Arachidonsäure. Im Vergleich mit den direkt gemessenen FS des Plasmas aus Kapitel 3.4.1 fällt die ermittelte Konzentration der GesamtFS der Lipoproteine allerdings etwa 30-35% geringer aus. Bei der Untersuchung der Lipoproteine wurden insgesamt 25 verschiedene FS gemessen. Dennoch konnten nicht alle FS an der Auswertung teilnehmen, da einigen FS im Chromatogramm kein eindeutiger „Peak“ zugeordnet werden konnte. Aus diesem Grund wurden die Stearidonsäure, die Eicosatriensäure sowie die Erucasäure insgesamt von der Auswertung ausgeschlossen, so dass hier die gleichen 22 FS präsentiert werden, die bei der Untersuchung des Plasmas bereits dargestellt wurden. Zu erwähnen ist weiterhin, dass bei den VLDL Messungen die Nervonsäure nicht ausgewertet werden konnte und in der Albuminfraktion insgesamt nicht mehr als 6 FS auswertbar waren.

3.5.2 Gehalt an Fettsäuren in den einzelnen Lipoproteinen

Nach der Betrachtung der FS im Blutplasma und in der Gesamtmenge der Lipoproteine werden in den folgenden beiden Kapiteln die Lipoproteine: VLDL, LDL, HDL und Alb im Einzelnen untersucht. Um die Verhältnisse der FS innerhalb des Lipoproteins zu sehen und um diese mit den anderen Klassen zu vergleichen wird zunächst der prozentuale Anteil der FS an der gemessenen Grundgesamtheit der FS pro Lipoproteinklasse gezeigt. Im darauf folgenden Kapitel erfolgt die quantitative Betrachtung der FS in µg/ml. Es wird dort die Menge der vorhandenen FS je Lipoproteinklasse analysiert und im Vergleich dargestellt.

Die Einzelbetrachtung der Lipoproteine bezüglich ihrer Fettsäureanteile ist in Abbildung. 11 grafisch dargestellt. Von den 22 ausgewerteten FS sind die 16 mit den höchsten Konzentrationen zur Darstellung ausgewählt worden. Die in den Lipoproteinen VLDL, LDL und HDL vorkommenden prozentual größten Anteile haben folgende FS: Linolsäure, Ölsäure sowie Palmitinsäure gefolgt von Stearinsäure und Arachidonsäure. Nicht gezeigt werden die gering konzentrierten FS: Myristölsäure, Arachidinsäure, Eicosaensäure, Eicosadiensäure, Eicosatetraensäure, Behensäure.

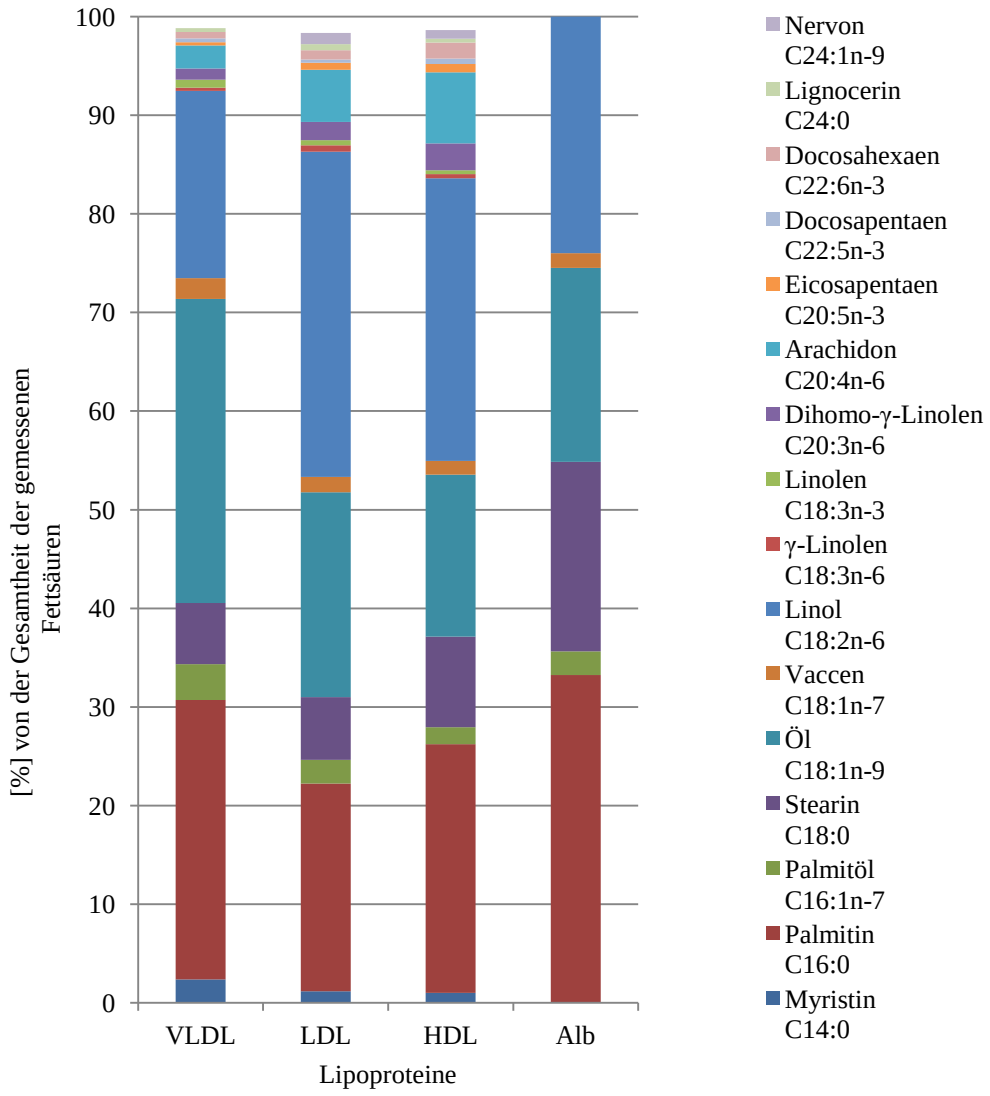

Abbildung 11 Fettsäureanteile der Lipoproteine [%]

Prozentuale Anteile der häufigsten FS, dargestellt pro Lipoproteinklasse, zum Zeitpunkt 0 Stunden bezogen auf 1 ml Plasma, die Reihenfolge der Legende entspricht der Reihenfolge der Farbbalken.

Die Verteilung dieser Säuren über die Lipoproteinklassen unterscheidet sich jedoch. In den VLDL weisen die Ölsäure und die Palmitinsäure den größten prozentualen Anteil auf. In den LDL ist prozentual am meisten Linolsäure enthalten. HDL enthalten ebenfalls am meisten Linolsäure, aber im Verhältnis dazu mehr Arachidonsäure und Dihomo-γ-Linolensäure, die zur ω-6 Familie gehören. Bei den FS mit kleineren Anteilen wie Myristinsäure Palmitölsäure und Vaccensäure zeigen sich, wenn die VLDL, LDL und HDL betrachtet werden, die größten Antei-

le jeweils in den VLDL. Die Nervonsäure ist mit einem kleinen Anteil jeweils in den LDL und HDL enthalten, konnte in den VLDL jedoch nicht nachgewiesen werden. Bei den ω3-FS (Eicosapentaensäure, DPA und DHA) finden sich die größten Anteile jeweils in den HDL, wobei DHA den größten Anteil dieser drei FS ausmacht. In der Albuminfraktion verteilen sich die Anteile über 6 FS. Die größten Anteile gehören der Palmitinsäure, der Linolsäure und der Ölsäure. Palmitölsäure und Vaccensäure sind mit entsprechend kleineren Anteilen vertreten. Einen etwa gleichgrossen Anteil wie die Ölsäure nimmt die Stearinsäure ein. Die folgende Tabelle 3 enthält die zur Abildung 11 gehörigen Daten, um die Verhältnisse genauer zu verdeutlichen. Zusätzlich enthält sie in der letzten Spalte die aus den Plasma Werten ermittelten prozentualen Anteile der Mittelwerte der FS. Dieser Tabelle ist zu entnehmen, dass die im Gesamtplasma gemessenen FS am ehesten den FS Werten der LDL entsprechen.

Tabelle 4 Prozentuale Anteile der Fettsäuren in Lipoproteinen und Plasma

Prozentuale Anteile der häufigsten FS bezogen auf die Gesamtheit der gemessenen FS in den Lipoproteinen und im Plasma im nüchternen Zustand.

Fettsäure/ Formel	VLDL [%]	LDL [%]	HDL [%]	Alb [%]	Plasma [%]
Myristin C14:0	2,38	1,18	1,02		1,38
Palmitin C16:0	28,32	21,05	25,20	33,25	22,91
Palmitöl C16:1n-7	3,64	2,43	1,72	2,39	2,30
Stearin C18:0	6,21	6,34	9,20	19,21	7,07
Öl C18:1n-9	30,81	20,78	16,41	19,65	20,95
Vaccen C18:1n-7	2,14	1,55	1,41	1,51	1,76
Linol C18:2n-6	18,96	32,97	28,66	23,99	27,36
γ-Linolen C18:3n-6	0,32	0,66	0,39		0,65
Linolen C18:3n-3	0,83	0,51	0,40		0,54
Dihomo-γ-Linolen C20:3n-6	1,13	1,83	2,74		1,78
Arachidon C20:4n-6	2,32	5,29	7,20		6,15
Eicosapentaen C20:5n-3	0,33	0,74	0,84		0,08
Docosapentaen C22:5n-3	0,38	0,32	0,55		0,54
Docosahexaen C22:6n-3	0,68	0,93	1,62		1,86
Lignoceron C24:0	0,37	0,62	0,39		0,64
Nervon C24:1n-9		1,13	0,90		1,51

3.5.3 Fettsäurenverteilung in den einzelnen Lipoproteinen

Eine wichtige Rolle für die Fettzusammensetzung des Blutes nehmen neben der Art und Menge der Ernährung der individuelle Stoffwechsel, das Alter, die Erbanlagen und das Geschlecht ein. In diesem Kapitel wird dargestellt, in welcher Menge sich im Nüchternzustand welche FS in welchem Lipoprotein bindet.

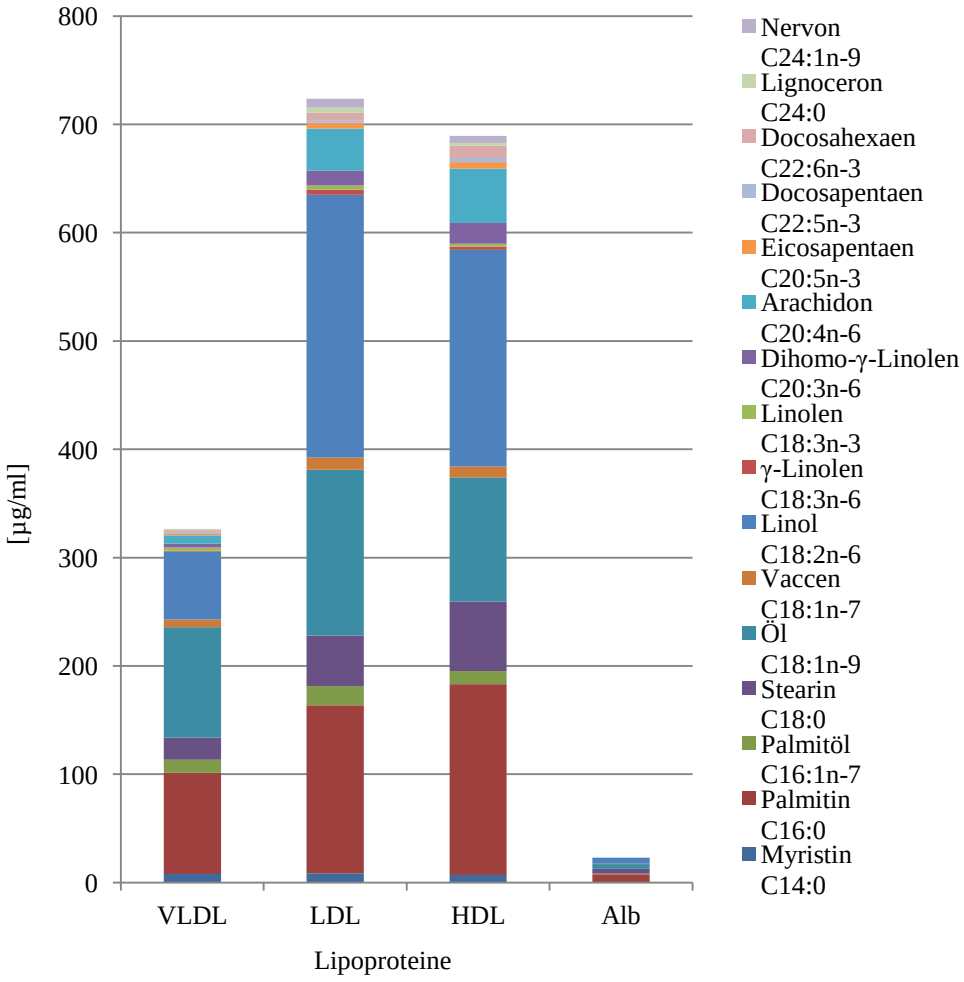

Abbildung 12 Fettsäureprofile der Lipoproteine [µg/ml]

Quantitative Darstellung der Mittelwerte der häufigsten FS pro Lipoproteinklasse in µg/ml, bezogen auf 1 ml Plasma zum Zeitpunkt 0 Stunden. Die Reihenfolge der Legende entspricht der Reihenfolge der Farbbalken

Es wurden von den 22 FS die 16 FS mit den höchsten Konzentrationen zur Darstellung ausgewählt. Nicht gezeigt werden die gering konzentrierten FS (< 1µg/ml): Myristölsäure, Arachidinsäure, Eicosaensäure, Eicosadiensäure, Eicosatetraensäure, und Behensäure. Die Auswahl und das Farbschema entsprechen dem, welches in der Abbildung 11 verwendet wurde. In den einzelnen Lipoproteinen binden sich FS in unterschiedlichen Mengen. Die Hauptfettsäuremengen befinden sich in den LDL und den HDL, wobei die HDL-Gesamtmenge etwas kleiner als die Menge der LDL ist. Die VLDL und die Albuminfraktion sind in deutlich kleineren Mengen vorhanden, was sich in einem geringen Gehalt an FS in diesen Klassen niederschlägt. Die Verteilung der einzelnen FS über die Lipoproteine zeigt für die SAFAs Palmitinsäure und Stearinsäure steigende Mengen, von VLDL über LDL zu HDL an. Bei der MUFA Palmitölsäure ist die größte Menge in den LDL enthalten, dementsprechend enthalten sie auch die größte Menge der MUFA Vaccensäure. Die größte Menge an Ölsäure liegt in den LDL. Bei den ω-6 FS zeigt die Linolsäure den Hauptanteil in den LDL, die γ-Linolensäure zeigt in allen Lipoproteinen kleine Mengen, wobei die größte Menge in den LDL detektiert wurde. Die Dihomo-γ-Linolensäure und die Arachidonsäure hingegen zeigen im Vergleich dazu größere Mengen, wobei diese hauptsächlich in den HDL liegen. Bei den ω-3 FS ist die Menge der Linolensäure in allen Lipoproteinen gering, wobei die Hauptmenge der Linolensäure in den LDL liegt. Die größeren Mengen für EPA, DPA und DHA liegen in den HDL, dann in absteigender Menge in den LDL und kaum nachweisbar in den VLDL. Die langkettigen FS Lignocerinsäure und die Nervonsäure weisen geringe Mengen in den LDL und HDL auf. Ein Kleinstanteil an Lignocerinsäure kann in den VLDL festgestellt werden, die Nervonsäure konnte nicht nachgewiesen werden.

Die zur Abbildung 12 gehörigen Daten befinden sich in Tabelle 5. Die Tabelle beinhaltet zusätzlich die Summen der Mittelwerte der FS über die Lipoproteinklassen, wie sie in Abbildung 10 dargestellt wurden. Zur Beurteilung der prozentualen Verteilung der FS über die Lipoproteinklassen wurde eine Tabelle erstellt (Tabelle 15 im Anhang).

Tabelle 5 Fettsäure-Gehalte der Lipoproteinklassen

Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (SD) der gemessenen FS pro Lipoprotein in µg/ml bezogen auf 1 ml Plasma zum Zeitpunkt 0 Stunden, sowie die Summe der addierten Mittelwerte

	VLDL [µg/ml]		LDL [µg/ml]		HDL [µg/ml]		Alb [µg/ml]		Summe [µg/ml]
Fettsäure	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
Myristin	7,86	± 6,7	8,68	± 3,8	7,14	± 2,8			23,68
Myristöl	0,73	± 0,7	0,51	± 0,4	0,39	± 0,2			1,63
Palmitin	93,55	± 71,6	154,87	± 59,7	176,10	± 56,1	7,64	± 3,3	432,15
Palmitöl	12,03	± 9,2	17,85	± 9,5	12,04	± 5,2	0,55	± 0,3	42,46
Stearin	20,52	± 16,4	46,68	± 15,1	64,26	± 20,2	4,41	± 0,9	135,86
Öl	101,77	± 86,8	152,94	± 46,6	114,66	± 36,6	4,51	± 2,8	373,88
Vaccen	7,06	± 7,1	11,38	± 4,7	9,86	± 3,8	0,35	± 0,2	28,65
Linol	62,63	± 42,6	242,61	± 76,0	200,25	± 65,8	5,51	± 2,7	510,99
γ-Linolen	1,07	± 0,8	4,86	± 2,9	2,74	± 1,8			8,67
Linolen	2,75	± 2,4	3,75	± 1,5	2,77	± 1,3			9,28
Arachin	0,48	± 0,4	2,34	± 0,9	1,66	± 0,9			4,48
Eicosaen	0,89	± 0,9	1,06	± 0,3	0,94	± 0,3			2,89
Eicosadien	0,63	± 0,6	1,36	± 0,7	1,49	± 1,2			3,48
Dihomo-γ-Linolen	3,73	± 2,6	13,48	± 5,3	19,15	± 6,4			36,36
Arachidon	7,68	± 5,5	38,96	± 15,6	50,30	± 20,5			96,94
Eicosatetraen	0,45	± 0,3	1,27	± 0,7	1,19	± 0,6			2,91
Eicosapentaen	1,08	± 0,8	5,45	± 4,0	5,87	± 4,1			12,39
Behen	0,72	± 0,5	5,77	± 2,1	3,86	± 1,5			10,34
Docosapentaen	1,25	± 0,7	2,34	± 4,4	3,83	± 5,4			7,42
Docosahexaen	2,24	± 1,7	6,85	± 4,6	11,34	± 8,7			20,43
Lignoceron	1,23	± 1,5	4,54	± 40,5	2,70	± 1,7			8,47
Nervon			8,31	± 3,8	6,26	± 3,1			14,57

3.6. Veränderungen nach dem Frühstück

Um die Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung der Lipoproteine zu beobachten, wurden die Ergebnisse der Werte des OFTT gemeinsam mit dem eingenommenen Frühstück betrachtet. Die Zusammensetzung der Frühstücke und ihre prozentualen Anteile der FS sind im Anhang in den Tabellen 1 und 2 aufgelistet. Es handelt sich, um die in einer normalen westlichen Ernährung typischerweise enthaltenen FS (Katan et al. 1994).Allerdings ist die Myristinsäure durch die verabreichten Milchprodukte überrepräsentiert.

Plasmalipoproteine ändern sich in Abhängigkeit von der Ernährung quantitativ und qualitativ. (Wolfram 1995). Es sind kurzfristige und langfristige Veränderungen bekannt. Zu den kurzfristigen Veränderungen gehört, dass nach der Aufnahme von Fett die Serum TG Konzentration innerhalb der ersten Stunden durch die Bildung der Chylomikronen und VLDL ansteigt. Zu den langfristigen Veränderungen zählen die Veränderungen der Cholesterinester und PL, die die FS der Nahrung der letzten 3 bis 6 Wochen wiederspiegeln, sowie die TG des Fettgewebes, die das Nahrungsfett der letzten Monate bis Jahre aufzeigen (Vessby 2001).

Zur Veranschaulichung wurde die Fettsäurezusammensetzung des Fettfrühstücks in einem Kreisdiagramm dargestellt (Abbildung 13).

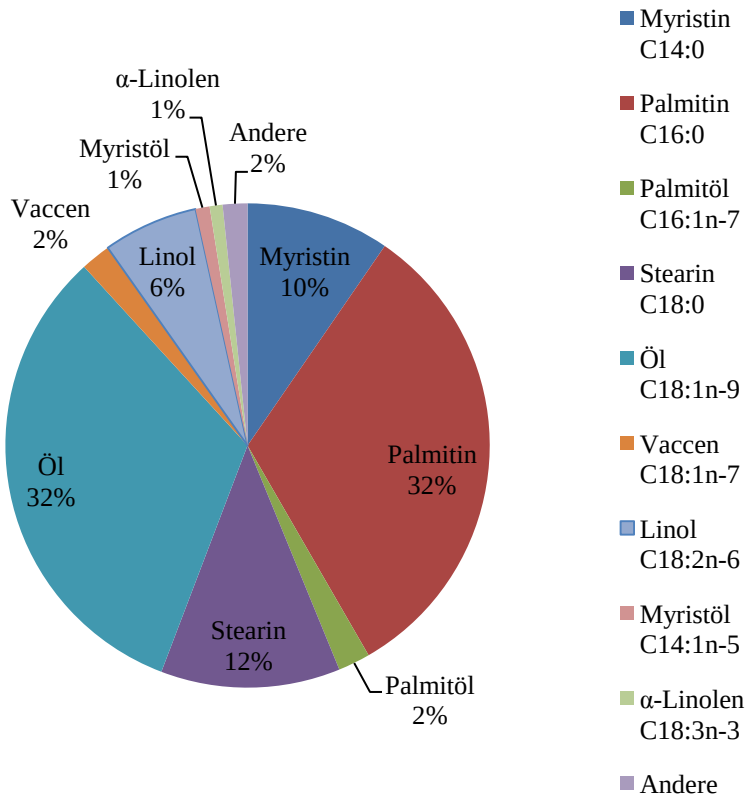

Abbildung 13 Durchschnittliche Fettsäurezusammensetzung des Fettfrühstücks [%]

Prozentuale Anteile der FS des verabreichten Frühstücks

Die Palmitinsäure und die Ölsäure nehmen mit je 32% die größten Anteile ein, gefolgt von Stearinsäure und Myristinsäure mit Anteilen von 12% bzw. 10%. Die essentielle Linolsäure ist mit 6% ebenfalls vertreten, sowie die Vaccensäure und Palmitölsäure mit Anteilen von je 2%. Die α-Linolensäure und die Myristölsäure haben Anteile von je 1%.Die unter Andere zusammengefassten 13 FS (γ-Linolensäure, Arachinsäure, Eicosaensäure, Eicosadiensäure, Arachidonsäure, Eicosatriensäure, Eicosapentaensäure, Behensäure, Erucasäure, Docosapentaensäure, Docosahexaensäure, Lignoceronsäure, Nervonsäure) machen insgesamt einen Anteil von 2% aus. Die Probanden wählten eins der drei Frühstücksangebote und nahmen es komplett ein. Dazu tranken sie Kaffee oder Tee mit etwa 20 ml skimmed Milch.

Die postprandialen Veränderungen der FS der Lipiproteine werden in den folgenden Kapiteln dargestellt.

3.6.1 Veränderung der Gesamtfettsäuren der Lipoproteine

In diesem Kapitel werden einerseits die Konzentrationsveränderungen der verschiedenen FS in den einzelnen Lipoproteinklassen über die Zeit betrachtet und andererseits Vermutungen über den Verbleib der im Frühstück enthaltenen FS angestellt.

Zunächst werden aus Gründen der Übersicht die mit den Lipoproteinen assoziierten FS und deren Konzentrationsänderung im zeitlichen Verlauf dargestellt.

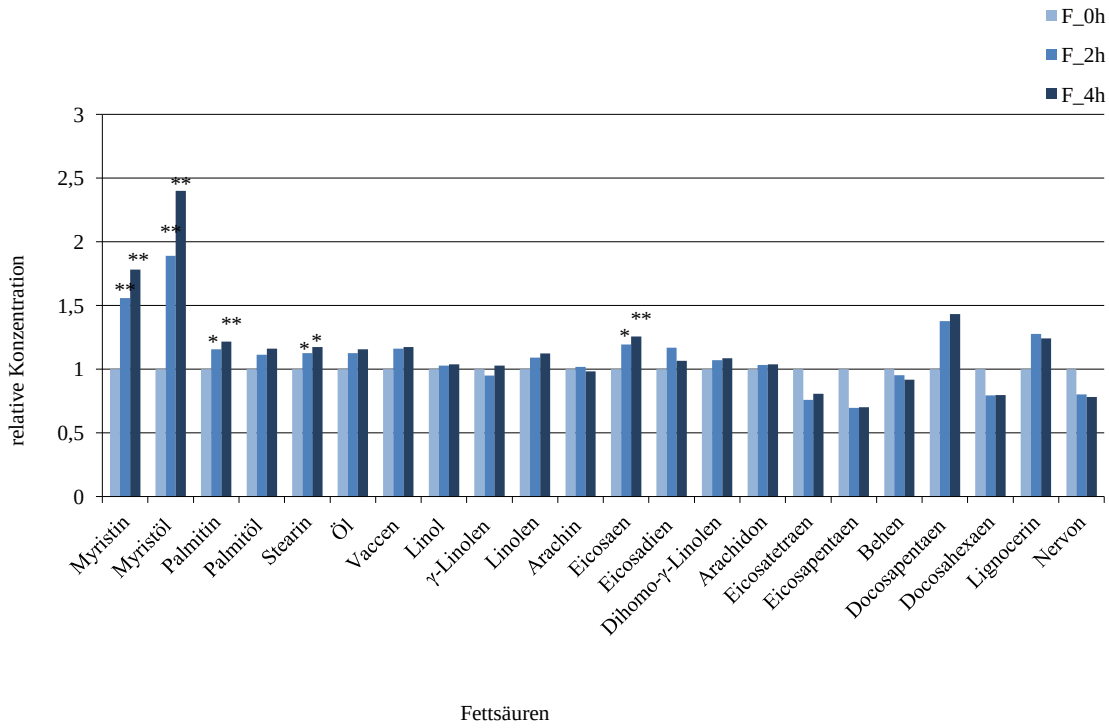

Abbildung 14 Relative, postprandiale Änderung der Lipoprotein-assoziierten Fettsäuren

Gezeigt ist die Änderung der Konzentrationen (µg/ml) relativ zur Konzentration im Nüchternzustand (F_0 h) nach 2Stunden (F_2h) und 4 Stunden (F_4h). Die Mittelwerte der einzelnen FS in den Liporoteinfraktionen (VLDL, LDL, HDL, Alb) wurden addiert. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

In der Abbildung 14 sind die Veränderungen der Fettsäurekonzentrationen der Lipoproteine veranschaulicht. Aus Übersichtsgründen wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen verzichtet.Erkennbar ist der nach 2 und 4 Stunden postprandial hoch signifikante Anstieg der Myristinsäure- und der Myristölsäurekonzentration (** $p < 0{,}01$). Die Palmitinsäure zeigt nach 2

Stunden einen signifikanten und nach 4 Stunden einen hochsignifikanten Anstieg der Konzentration. Der Anstieg der Stearinsäure liegt nach 2 und 4 Stunden im signifikanten Bereich (* $p < 0,05$). Die Ölsäure, die mit 32% den gleichen Anteil am Frühstück hatte wie die Palmitinsäure, ergeben keine signifikanten Veränderungen. Die Eicosaensäure hingegen zeigt nach 2 Stunden einen signifikanten und nach 4 Stunden einen hochsignifikanten Anstieg. Während die restlichen Säuren nicht signifikante Veränderungen in beide Richtungen haben, ist zu beobachten, dass die Linolsäure und die Arachidonsäure zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen erkennen lassen. Diese für den Körper sehr wichtigen Säuren die zur Herstellung der Eikosanoide dienen, sind anscheinend in immer gleicher Menge vorhanden.

Im Folgenden wird betrachtet, wie sich die Konzentrationen die FS bezogen auf die jeweilige Lipoproteinklasse postprandial verändern.

3.6.2 Veränderung der VLDL

Die Chylomikronen und VLDL, welche sich 1-2 Stunden nach der Fettaufnahme bilden, zeigen erwartungsgemäß die meisten Veränderungen der mit ihnen assoziierten FS.

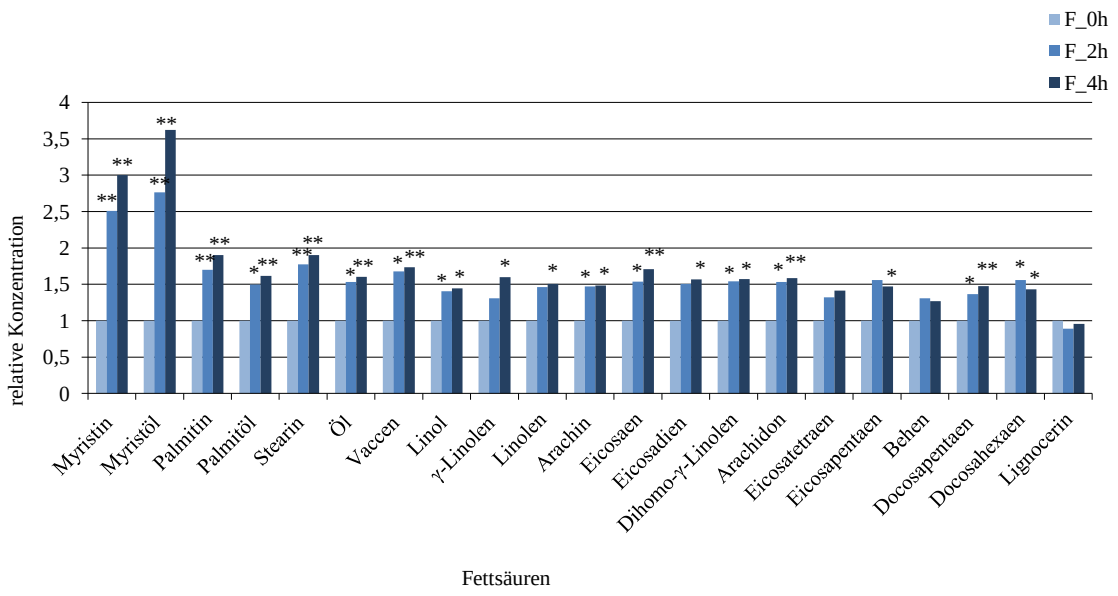

Abbildung 15 Postprandiale Änderung der VLDL-assoziierten Fettsäuren

Gezeigt ist die Änderung der Konzentrationen (µg/ml) relativ zur Konzentration im Nüchternzustand (F_0h) nach 2Stunden (F_2h) und 4 Stunden (F_4h). Die Mittelwerte der FS der VLDL sind abgebildet. * p< 0.05, ** p< 0.01

In der Abbildung 15 sind die Fettsäureveränderungen der VLDL dargestellt. Aus Übersichtsgründen wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen verzichtet.Bei fast allen FS können Veränderungen beobachtet werden. Die stärksten Effekte zeigen die Konzentrationen für Myristinsäure, Myristölsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure. Sie zeigen jeweils hochsignifikante Veränderungen (** p< 0,01) nach zwei und vier Stunden. Nach zwei Stunden zunächst signifikante (* p< 0,05) und nach vier Stunden hochsignifikante Anstiege der Konzentrationen zeigen die Palmitölsäure und die Vaccensäure, sowie die Ölsäure und die Eicosaensäure.Die Lignocerinsäure und die Behensäure zeigen keine signifikanten Veränderungen. Bei den ω-6 FS zeigen die Linolsäure und die Dihomo-γ-Linolensäure signifikante Anstiege nach zwei und vier Stunden. Die Arachidonsäure zeigt nach zwei Stunden einen signifikanten und nach vier Stunden einen hochsignifikanten Anstieg. Bei den ω-3 FS zeigt die Linolensäure nach vier Stunden einen signifikanten Anstieg, dieEPA nach vier Stunden jedoch einen signifikanten Abfall bezogen auf einen nichtsignifikanten Anstieg nach 2 Stunden. Die DPA steigt nach zwei Stunden signifikant und nach vier Stunden hochsignifikant an, während DHA ebenfalls nach zwei Stunden signifikant ansteigt, nach vier Stunden aber signifikant abfällt.

3.6.3 Veränderung der LDL

Die LDL entstehen über die Zwischenstufe IDL aus den VLDL. Die etwa gleichgrossen Chylomikronen Remnants sind vermutlich mit in die Messung einbezogen worden. Eine genauere Unterscheidung hätte die Bestimmung der Apo B-Proteine bringen können, welche hier jedoch nicht durchgeführt wurde.

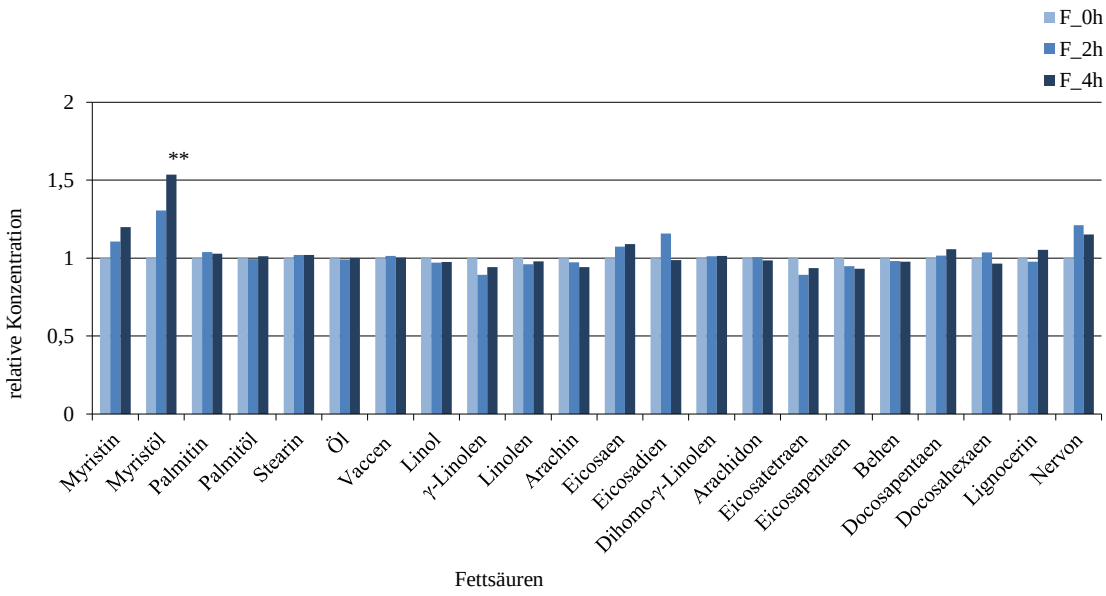

Abbildung 16 Postprandiale Änderung der LDL-assoziierten Fettsäuren

Gezeigt ist die Änderung der Konzentrationen (µg/ml) relativ zur Konzentration im Nüchternzustand (F_0h) nach 2Stunden (F_2h) und 4 Stunden (F_4h). Die Mittelwerte der FS der LDL sind abgebildet.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Die Abbildung 16 zeigt die Konzentrationänderungen der mit den LDL assoziierten FS. Es stellen sich kaum signifikante Veränderungen ein. Lediglich die Myristölsäure zeigt einen signifikanten Anstieg der Konzentration nach vier Stunden. Die FS der LDL verhalten sich überwiegend konstant. Aus Übersichtsgründen wurde auf die Darstellung der Standardabweichung verzichtet

3.6.4 Veränderung der HDL

Die HDL sind für den reversen Cholesterintransport verantwortlich und werden vermutlich in Leber und Darm gebildet.

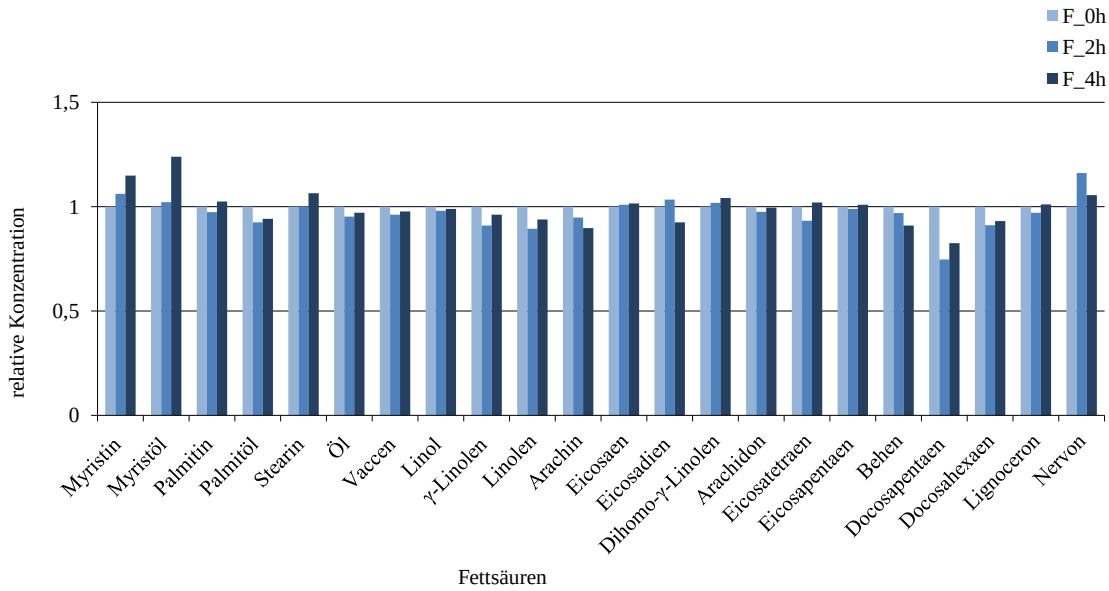

Abbildung 17 Postprandiale Änderung der HDL-assoziierten Fettsäuren

Gezeigt ist die Änderung der Konzentrationen (µg/ml) relativ zur Konzentration im Nüchternzustand (F_0h) nach 2Stunden (F_2h) und 4 Stunden (F_4h). Die Mittelwerte der FS der HDL sind abgebildet. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Die Abbildung 17 stellt die Änderung der mit den HDL assoziierten FS dar. Diese zeigen nach zwei und vier Stunden keine signifikanten Veränderungen der Konzentration. Ein Trend ist bei der Änderung der Myristinsäurekonzentration zu erkennen, mit einem p-Wert von 0,12 und bei der Myristölsäurekonzentration mit einem p-Wert von 0,14. Auf die Darstellung der Standard-abweichung wurde aus Übersichtsgründen verzichtet.

3.6.5 Veränderung der Alb

Neben den Lipoproteinen sind die Albumine in der Lage, langkettige FFS im Blut zu transportieren. Die FFS im Blut gehen prinzipiell aus zwei Quellen hervor. Dieser Vorgang wird als Lipolyse bezeichnet: Zum einen zerlegt die LpL die TG der Chylomikronen, der VLDL sowie die der Remnants in FFS und Glycerol. Zum anderen mobilisieren die hormonsensitive Lipoproteinlipase und andere Lipasen des Fettgewebes die dort gespeicherten TG und zerlegen diese ebenfalls in FFS und Glycerol. Die FFS werden entweder zur Energiebereitstellung verwendet, oder sie werden zu Leber transportiert, wo sie wiederum zu TG Synthese benutzt werden.

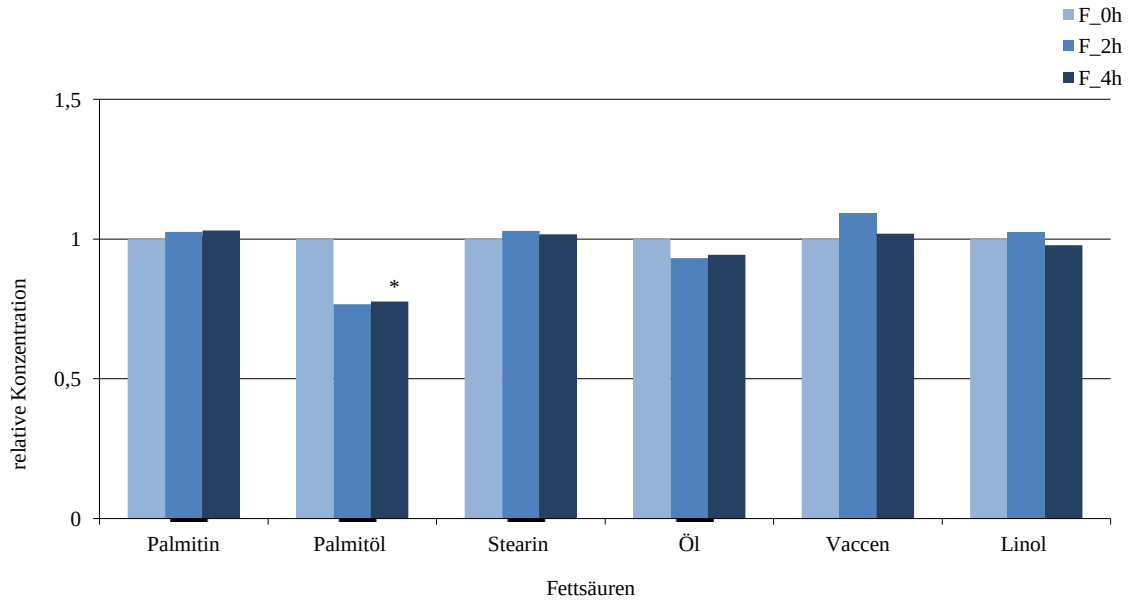

Abbildung 18 Postprandiale Änderung der Alb-assoziierten Fettsäuren

Gezeigt ist die Änderung der Konzentrationen (µg/ml) nach 2 (F_2h) und 4 (F_4h) Stunden relativ zur Konzentration im Nüchternzustand (F_0h) .Die Mittelwerte der FS der Alb sind abgebildet. * $p < 0.05$, ** $p<0.01$

In der Abbildung 18 sind die Veränderungen der FS der Albuminfraktion über die Zeit dargestellt. Es ist zu beobachten, dass sich die Konzentration der Ölsäure und die der Palmitölsäure nach zwei und vier Stunden gegenüber dem Nüchternzustand verringern. Eine Signifikanz zeigt sich lediglich in der Verringerung der Palmitölsäurekonzentration nach vier Stunden. Die Palmitinsäurekonzentration steigt nach zwei sowie nach vier Stunden an. Die Stearinsäure, die

Vaccensäure und die Linolensäure zeigen tendentiell Konzentrationsanstiege nach zwei Stunden und Konzentrationsabfälle nach vier Stunden.Auf die Darstellung der Standardabweichung wurde aus Übersichtsgründen verzichtet.

3.7 Korrelationsanalyse der Fettsäuren mit HOMA-IR

Frühere Studien haben einen Zusammenhang zwischen FS und IR gefunden.In der hier untersuchten Kohorte wurde bisher kein starker Zusammenhang zwischen der Änderung einzelner FS im OFTT und den metabolischen Parametern gefunden (Ludger Scheja, nicht veröffentlichte Daten). In der vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grund nur die nüchtern FS untersucht. Mit dem Statistica Programm wurde eine bivariate Korrelationsanalyse zwischen dem HOMA-IR und den FS des Plasmas einerseits und den FS der einzelnen Lipoproteine andererseits durchgeführt. In der Tabelle 6 sind die Korrelationsergebnisse dargestellt.

Tabelle 6 Korrelationen zwischen den versterten Fettsäuren der Lipoproteinklassen und des Plasmas mit HOMA-IR Prozentwerte der FS des Plasmas sowie der Lipoproteine wurden mit HOMA-IR korreliert. Dargestellt sind Korrelationskoeffizienten (R). + p<0.1, * p<0,05, ** p<0,01

Fettsäuren		Plasma	VLDL	LDL	HDL	Alb
Myristinsäure	14:0	0,33 *	0,05	0,04	0,06	
Myristölsäure	14:7n-7	0,12	-0,05	-0,1	-0,09	
Palmitinsäure	16:0	0,19	0,29 +	-0,19	0,27	0,07
Palmitölsäure	16:1n-7	0	-0,08	-0,02	-0,04	0,03
Stearinsäure	18:0	-0,02	-0,08	0,35 *	0,34 *	0,05
Ölsäure	18:0n-9	0,18	0,1	0,07	0,08	0,2
Vaccensäure	18:1n-7	0,01	0,23	-0,05	-0,3 +	-0,33 *
Linolsäure	18:2n-6	-0,33 *	-0,26	0,02	-0,2	-0,25
g-Linolensäure	18:3n-6	0,05	0,03	0,13	-0,03	
Alpha -Linolensäure	18:3n-3	0,11	0,14	0,03	-0,06	
Arachinsäure	20:0	-0,14	-0,19	0,04	-0,15	
Eicosaensäure	20:1	0,02	0,13	-0,09	0,03	
Eicosadiensäure	20:2	0,08	-0,31 +	-0,08	-0,14	
Dihomo-γ-Linolensäure	20:3n-6	0,21	-0,01	0,42 **	0,32 +	
Arachidonsäure	20:4n-6	-0,04	0	0,21	0,09	
Eicosatetraensäure	20:4n-3	0,19	0,01	0,26	0,25	
Eicosapentaensäure	20:5n-3	-0,01	-0,09	0	-0,01	
Behensäure	22:0	-0,05	-0,33 *	0,09	-0,15	
Docosapentaensäure	22:5n-3	-0,07	-0,27	-0,04	-0,13	
Docosahexaensäure	22:5n-3	-0,03	-0,05	0,03	-0,15	
Lignocerinsäure	24:0	-0,28 +	0	0,07	-0,01	
Nervonsäure	24:1	-0,17		-0,41 *	-0,23	

Bei der Korrelationsanalyse des Plasmas mit dem HOMA-IR zeigt sich, daß die Myristinsäure positiv und die Linolsäure negativ korrelieren.

Bei der Korrelationsanalyse der einzelnen Lipoproteine mit dem HOMA-IR ergibt sich bei der Palmitinsäure der VLDL ein positiver Trend. Bei den LDL und HDL korreliert die Stearinsäure positiv. Auffällig ist desweiteren die hoch positive Korrelation der Dihomo-γ-Linolensäure der LDL. Bei den HDL ist ein positiver Trend der Dihomo-γ-Linolensäure zu beobachten. Die Vaccensäure der HDL korreliert mit einem negativen Trend. In der Albuminfraktion korreliert die Vaccensäure negativ.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass sich die Ergebnisse des Gesamtplasmas und der Lipoproteine deutlich unterscheiden.

4. Diskussion

4.1 Gehalt an Gesamtfettsäuren im Plasma

In der vorliegenden Arbeit wurden die FS Muster in den verschiedenen Lipoproteinklassen im Nüchternzustand sowie nach oraler Fettbelastung analysiert und ein Zusammenhang mit der IR untersucht.

Der Gesamtgehalt an FS des untersuchten Nüchtern-Blutplasmas (Kapitel 3.4.1) zeigt ein typisches FS Muster, wie es in der Literatur in verschiedenen Kohorten bereits beschrieben wurde (Kotronen et al. 2009, Leskinen et al. 2005, Laaksonen et al. 2002). Linolsäure, Palmitinsäure und Ölsäure sind die prozentual am häufigsten vorkommenden FS des Plasmas, gefolgt von Stearinsäure und Arachidonsäure. Danach reihen sich Palmitölsäure, DHA, Dihomo-γ-Linolensäure, Vaccensäure und Myristinsäure sowie EPA und DPA ein. Die prozentuale Verteilung der FS kann jedoch von Kohorte zu Kohorte variieren, wie der Vergleich der hier untersuchten „Lilly-Offspring Kohorte“ mit der von Kotronen et al. 2009 untersuchten Kohorte zeigt. Die wichtigsten Kohortencharakteristika wurden in den Tabellen 7 und 8 zusammengefasst. Die „Kotronen Kohorte“ wurde deshalb als Vergleichskohorte ausgewählt, da bei dieser ebenfalls, neben den FS des Gesamtplasmas auch die FS der Lipoproteine untersucht wurden. Zudem sind in beiden Kohorten die Frauen in der Überzahl und alle Probanden sind nicht an DMT 2 erkrankt. Die jeweiligen prozentualen Anteile der FS im Serum bzw. Plasma beider Kohorten sind in der Tabelle 9 zur Gegenüberstellung gebracht worden.

Die „ Lilly Kohorte“ enthielt im Gesamtplasma von den untersuchten FS prozentual am meisten Linolsäure, in absteigender Menge folgten erwartungsgemäß Palmitinsäure, Ölsäure, Arachidonsäure und Stearinsäure. Die „Kotronen Kohorte“ dagegen enthielt im Serum prozentual am meisten Palmitinsäure, in absteigender Menge folgen Ölsäure, Linolsäure, Stearinsäure und Arachidonsäure. Die Werte für Palmitölsäure sind in beiden Kohorten gleich hoch. Die „Kotronen Kohorte“ enthält zudem höhere Werte für Vaccensäure, aber auch für Dihomo-γ-Linolensäure, EPA, DPA und DHA.

Der deutlich höhere Linolsäureanteil der „Lilly Kohorte“,der sich v.a. in einem höheren Linolsäureanteil in den LDL und HDL zeigt, während der Anteil in den VLDL im Vergleich

gleich hoch ist, könnte einerseits für eine pflanzenreichere Ernährung sprechen. Andererseits wäre denkbar, dass der niedrigere Linolsäureanteil der „Kotronen Kohorte“ eine stärkere IR anzeigt. Hierbei können drei, sich nicht gegenseitig ausschliessende Mechanismen zum Tragen kommen: 1. Die Stimmulation der delta 6-Desaturase durch Insulin, 2. Die stärkere Adipositas und 3. Die de novo Lipogenese.

Bei einer beginnenden IR scheint der erhöhte Serum Insulinspiegel die Aktivität der delta 6-Desaturase zu stimmulieren, so dass die Linolsäurekonzentration absinkt, die Dihomo-γ-Linolensäurekonzentration hingegegen etwas ansteigt. Ein relativ hoher Dihomo-γ-Linolensäureanteil bei niedriger Linolsäurekonzentration ist bei der „Kotronen Kohorte“ zu beobachten.

Die höheren Werte der „Kotronen Kohorte“ für Palmitinsäure und Ölsäure im Serum könnten eventuell einen Hinweis auf die vorhandene stärkere Adipositas der „Kotronen Kohorte“ geben, da es sich bei diesen FS um die im Fettgewebe hauptsächlich vorkommenden FS handelt (Gong et al. 2011, Garaulet et al.2006). Prinzipiell kann festgestellt werden, je mehr WAT (white adipose tissue) vorhanden ist, desto höher ist auch die Konzentration an Ölsäure im Serum. Zudem wird auch bei erhöhten TG Werten im Plasma mehr Ölsäure gefunden. Die Zusammensetzung der Lipoproteine zeigt, daß die VLDL der „Kotronen Kohorte“ im Vergleich mehr Ölsäure enthalten. Der Palmitinsäureanteil liegt dort in den LDL deutlich höher.

Es könnte weiterhin vermutet werden, dass der in der IR erhöhte Insulinspiegel die hepatische de novo Lipogenese zur verstärkten Bildung von Palmitinsäure und MUFAs anregt (Hellerstein et al. 1996). Die Untersuchung von Donnelly at al. 2005 zeigt die Herkunft der FS der Lipoproteine bei Patienten mit NAFLD: „Der Hauptanteil der FS der Lipoproteine stamme aus den NEFAs des Fettgewebes und der zweitgrößte Anteil aus der der novo Lipogenese der Leber“.

Die höheren Werte für EPA, DPA und DHA der „Kotronen Gruppe“ im Serum wowie in allen Lipoproteinen könnten prinzipiell einen Hinweis auf eine fischreichere Ernährung geben, die in Finnland nicht unüblich wäre. Fettsäurekonzentrationen im Plasma spiegeln die Nahrungsanteile der jeweiligen FS wieder, wie Yli-Jama et al. 2001 zeigen.

Die Arachidonsäurekonzentration im Serum ist in beiden Kohorten annähernd gleich hoch.Bei den Lipoproteinen zeigt die Kotronen Kohorte etwas höhere Werte in den LDL und HDL. Damit könnte die von Vessby et al. 2002 aufgestellte Vermutung gestärkt werden, dass es sich bei dem Arachidonsäuregehalt des Serums um eine strikt regulierte und kontrollierte Größe handelt.

Aus der Arachidonsäure werden proinflammatorische Eikosanoide gebildet (Wolfe und Harrocks 1994), die bei zahlreichen Erkrankungen, wie z.B. Krebs- und Herz-Kreislauferkrankungen relevant sind.

Tabelle 7 Klinische Daten der Lilly-Offspring Studie

Variable	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
n (Frauen)	38 (25)		
Alter [Jahre]	46 ± 12		19 - 65
HOMA-IR	1,7 ± 1,34	1,28	0,24 - 6,53
Nüchtern Insulin [µU/ml]	6,98 ± 4,99		1,10 - 23,20
Nüchtern Glukose [mg/dl]	95,97 ± 9,48		79,00 - 114,00
Gewicht [kg]	77,35 ± 16,26		49,30 - 115,10
BMI [kg/m2]	25,33 ± 4,47		17,05 - 35,13
Nüchtern TAG [mg/dl]	93,42 ± 48,17		39,00 - 293,00
Nüchtern HDL [mg/dl]	50,87 ± 16,10		21,00 - 107,00
Nüchtern LDL [mg/dl]	103 ± 28,64		62,6 - 176,8

Tabelle 8 Klinische Daten der Kotronen Kohorte 2009

Variable	Mittelwert ± SD	Median	Min-Max
n (Frauen)	16 (14)		
Alter [Jahre]	46± 5		39 - 60
HOMA-IR		1,7	0,38 - 4,86
Nüchtern Insulin [µU/ml]	9,1 ± 1,4		2,01 - 22,17
Nüchtern Glucose [mg/dl]	90,1 ± 10,8		77,48 - 115,32
Gewicht [kg]	84 ± 20		56 - 122
BMI [kg/m^2]	30,2± 5,3		20,8 - 37,7
Nüchtern TAG [mg/dl]	109,6 ± 44,7		36,84 - 207,89
Nüchtern HDL [mg/dl]	68,3 ± 12,7		40,93 - 85,71
Nüchtern LDL [mg|dl]	104,6 ± 30,9		58,69 - 163,32

Tabelle 9 Vergleich der prozentualen Anteile der Fettsäuren im Gesamtplasma verschiedener Kohorten (Kotronen et al. 2009)

	LillyOffspring Plasma n= 38 Frauen&Männer Nichtdiabetiker	Kotronen Serum n=16 Frauen&Männer Nichtdiabetiker
Myristin	1,38	0,88
Myristöl	0,15	0,06
Palmitin	22,91	27,72
Palmitöl	2,30	2,34
Stearin	7,07	9,34
Öl	20,95	22,51
Vaccen	1,76	2,23
Linol	27,36	21,49
g_Linolen	0,65	0,4
Linolen	0,54	1,01
Arachin	0,30	
Eicosaen	0,19	
Eicosadien	0,17	
Dihomo-γ-Linolen	1,78	2,03
Arachidon	6,15	6,81
Eicosatetraen	0,08	
Eicosapentaen	0,92	1,88
Behen	0,79	
Docosapentaen	0,54	1,2
Docosahexaen	1,86	4,16
Lignoceron	0,64	
Nervon	1,51	
	100,00	104,06

4.2 Gehalt an Fettsäuren pro Lipoprotein

Die Untersuchung des Fettsäuregehaltes der Lipoproteine aus Kapitel 3.5.2 ergab, dass Linolsäure, Ölsäure und Palmitinsäure sowie Stearinsäure, Palmitölsäure und Vaccensäure die hauptsächlich vorkommenden FS in allen Lipoproteinklassen sind. Die Arachidonsäure und die DHA kommen ebenfalls mit nennenswerten Anteilen vor. In jeder Lipoproteinklasse sind diese FS zu unterschiedlichen Anteilen enthalten. Daraus ergibt sich die Frage, warum bestimmte FS mit bestimmten Lipoproteinen assoziiert sind? Ist die Zusammensetzung der Lipoproteine aus verschiedenen Lipidklassen verantwortlich für deren Fettsäuremuster und welchen Einfluss hat die metabolische Situation? Zur Beantwortung dieser Frage wird im Folgenden der unterschiedliche Gehalt der Lipoproteine an den entsprechenden Lipidklassen (Havel und Kane 2001) beleuchtet und analysiert ob die Fettsäurepräferenzen der Lipidklassen eine Rolle spielen könnnten. Die Abbildung 19 zeigt die prozentualen Anteile der Lipidklassen der Lipoproteine. Die Untersuchung des Fettsäuregehaltes der Lipidklassen der Lipoproteine aus dieser Kohorte ist Gegenstand der Dissertation von Herrn Ralf Uken, die Ergebnisse stehen jedoch noch nicht zur Verfügung. Als Referenz für die Fettsäuremuster der Lipidklassen werden daher "Wissenschaftliche Tabellen" (Geigy, 1979) benutzt.

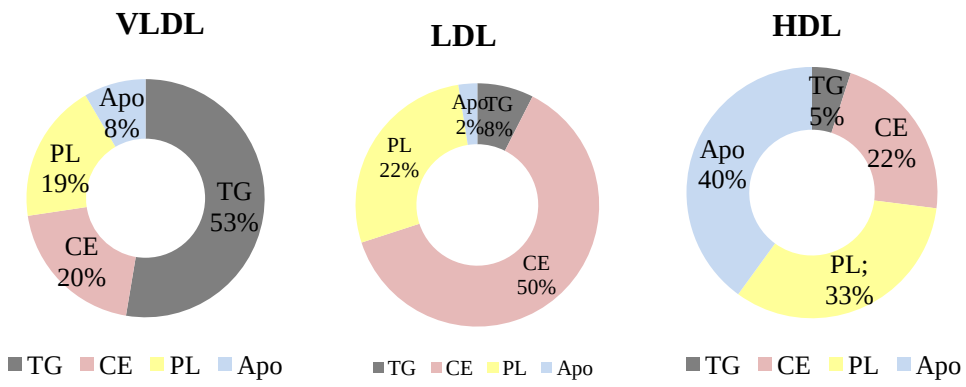

Abbildung 19 Typische prozentuale Zusammensetzung der Lipoproteine

Gezeigt sind die Bestandteile der Lipoproteine Triglyceride (TG), Cholesterin und Cholesterinester (CE), Phospholipide (PL) und Apoproteine (Apo) und ihre prozentuale Verteilung je Lipoprotein. (nach Havel und Kane 2001)

In der vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass die VLDL verhältnismäßig mehr Ölsäure und Palmitinsäure enthalten. Das kann mit der in der Literatur beschriebenen Anreicherung von Ölsäure und Palmitinsäure in den TG erklärt werden (Geigy 1979) und damit, dass die VLDL zu ca. 50% aus TG bestehen (Havel und Kane 2001).

Bei den LDL wurde beobachtet, dass die Linolsäure die FS mit dem größten Anteil ist. Diese Beobachtung könnte damit erklärt werden, dass Cholesterinester hauptsächlich mit Linolsäure assoziiert sind (Geigy 1979) und die LDL zu 50% aus Cholesterin und Cholesterinestern bestehen (Havel und Kane 2001).

Bei den HDL hatten die Arachidonsäure und die Stearinsäure verhältnismäßig den größten Anteil. Arachidonsäure und Stearinsäure werden hauptsächlich an die PL verstert (Geigy 1979). Die HDL haben mit 33%, den größten PL Anteil und enthalten vermutlich deshalb den größten Anteil an Arachidonsäure und Stearinsäure.

In der Lipoproteinklasse der Alb konnten insgesamt sechs FS ausgewertet werden. Die Literatur beschreibt, dass bei Untersuchungen der NEFA- Fraktion ebenfalls hohe Anteile ebendieser FS beobachtet wurden (Halliwell et al. 1996, Yli-Jama et al. 2001). Die hier untersuchte Alb-Fraktion scheint also sehr gut die NEFA-Fraktion wiederzuspiegeln. Auch der hier festgestellte, relativ hohe Stearinsäureanteil fügt sich in die Beobachtungen von Halliwell et al.1996 ein. Der dort festgestellte relativ hohe Stearinsäureanteil, entspricht nicht dem relativ niedrigen Stearin-

säuregehalt desFettgewebes. Als zugrunde liegende Ursache wird ein relativ schlechter Abtransport (Disposal) der Stearinsäure aus dem Blut diskutiert und nicht eine präferentielle Freisetzung aus dem Fettgewebe.

Nach der Beschreibung der mengenmäßig am meisten vorkommenden FS und ihrer Bindungspräferenz, werden im Folgenden die weniger häufig vorkommenden FS genannt. Der Palmitölsäure- und Vaccensäuregehalt fällt, entsprechend des TG Gehaltes von VLDL über LDL zu HDL ab. Es ist anzunehmen, dass diese MUFAs ebenfalls bevorzugt an TG gebunden werden. Von den langkettigen FS Lignocerinsäure und Nervonsäure ist bekannt, dass sie mit Sphingomyelin assoziiert sind (Kihara 2012). Dieses könnte ebenfalls durch die Ergebnisse der Untersuchungen dieser Arbeit Bestätigung finden. Lignocerinsäure und Nervonsäure konnten lediglich in den LDL und HDL nachgewiesen werden, nicht aber in den VLDL. Der Grund dafür könnte der geringe Sphingomyelinanteil der VLDL sein (Kotronen at al. 2009). Von den ω-3 FS EPA, DPA und DHA ist anzunehmen, dass sie ebenfalls mit PL assoziiert sind und sich daher nach dem gleichen Muster über die Lipoproteinklassen verteilen wie die Stearinsäure und die Arachidonsäure, d.h. der prozentuale Anteil steigt von VLDL über LDL zu HDL.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen in weitestgehender Übereinstimmung mit der Untersuchung des Fettsäuregehaltes der Lipoproteine, welche von Kotronen et al 2009. durchgeführt wurde Zwei Unterschiede sind jedoch hervorzuheben.

Ein Unterschied zeigt sich in den Anteilen der Linolsäure, der Palmitinsäure und der Stearinsäure der LDL und HDL. Bei der von Kotronen untersuchten Kohorte überwiegt der Linolsäuregehalt der LDL und HDL nicht deutlich zum Palmitinsäuregehalt, sondern die Anteile sind etwa gleich groß. Im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Arbeit, ist der Linolsäuregehalt der LDL und HDL deutlich kleiner und der Palmitinsäuregehalt sowie der Stearinsäuregahalt etwas größer.

Der niedrigere Linolsäuregehalt ist alimentär bedingt, da es sich bei dieser FS um eine essentielle FS handelt, die vom Körper nicht selber hergestellt werden kann. Sie gilt deshalb für diesen Bereich als valider Biomarker (Bradbury et al. 2010). Eine andere Erklärung wäre, wie in Kapitel 4.1 bereits erwähnt, eine verstärkte de novo Lipogenese und damit eine Veränderung der Verhältnisse. Die etwas höheren Werte für Palmitinsäure und Stearinsäure könnten einen größeren PL Anteil anzeigen. Die Erhöhung der FS EPA, DPA, DHA und Arachidonsäure in den LDL und HDL, könnte dieses Konzept unterstützen, da diese FS ebenfalls vorwiegend an PL gebunden werden. Wenn dies so wäre, könnte eine höhere Bildung von SD- LDL und HDL_3

vermutet werden. Es handelt sich dabei um kleine, cholesterinarme LDL und HDL -Partikel die sich im Rahmen der Diabetischen Dyslipidämie (Kapitel 1.5) bilden. Sie bilden sich in größerer Zahl und gelten als atherogen. In den Kohortencharakteristika könnten, unter Berücksichtigung des hohen Frauenanteils, die vergleichsweise hohen HDL-Werte einen Hinweis in diese Richtung geben. Aufgrund dieser Vermutungen könnte der Kotronen Kohorte eine schlechtere metabolische Situation zugesprochen werden. Ein Zusammenhang zwischen der Menge an Arachidonsäure im Plasma und metabolischen Parametern wird kontrovers diskutiert (Hjelte und Nilsson 2005).

Der zweite bedeutende Unterschied zwischen den Untersuchungen der beiden Kohorten ist bei den Anteilen der PUFAs: EPA, DPA und DHA zu beobachten. Die „Kotronen Kohorte“ zeigte in den VLDL, LDL und HDL, bei vergleichsweise niedrigen Linolsäurewerten deutlich höhere Werte für EPA, DPA und DHA an. Da die Anteile dieser FS in allen Lipoproteinen mehr als doppelt so groß sind und alle Lipoproteine gleichmäßig betroffen sind, liegt die Vermutung nahe, dass in erster Linie die fischreichere Ernährung verantwortlich ist. Es wird angenommen, dass exogene FS Quellen die FS Komposition in allen Lipoproteinen in gleicher Weise beeinflussen (Kotronen et al. 2009). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Synthese von EPA und DHA besonders hoch ist, wenn die Nahrung viele gesättigte FS (fettreiche Ernährung) und wenig Linolsäure (pflanzenarme Ernährung) enthält (Vessby 2003). Liegt hingegen viel Linolsäure vor, so wird die Synthese von EPA und DHA reduziert (Zhou and Nilsson 2001). Dieser Sachverhalt könnte eventuell für die „Lilly Kohorte“ zutreffen und neben der geringeren Aufnahme dieser FS (fischärmere aber pflanzenreichere Diät) die niedrigeren EPA und DHA Werte in den Lipoproteinen erklären.

4.3 Veränderungen nach dem Frühstück

Die Bestandteile der gemischten Frühstücke sowie die Fettsäurezusammensetzung sind in den Tabellen 1 und 2 des Anhangs beschrieben. Bislang konnte ein starker Zusammenhang zwischen der Menge der PUFAs in der Nahrung und den PUFAs des Serums beobachtet werden (Glatz et al. 1989, Ma et al. 1995). Die Beziehung für SAFAS ist schwächer und die für MUFAS gibt es fast gar nicht (Ma et al. 1995, Nikkari et al. 1995). Die in der Nahrung am häufigsten vorkommenden FS sind Myristinsäure, Palmitinsäure, Ölsäure, Stearinsäure und Linolsäure.

Ein bis zwei Stunden nach der Nahrungsaufnahme gelangen die FS erstmalig über die Chylomikronen ins Blut. Diese Aufnahme hält einige Stunden an. Dies erklärt den signifikanten Anstieg an FS nach zwei und vier Stunden (Kapitel 3.6).

Die Zusammensetzung der LDL bleibt nach zwei und vier Stunden weitestgehend ohne signifikante Veränderungen. Lediglich die Myristölsäure zeigt nach vier Stunden einen Anstieg im signifikanten Bereich. Die Zusammensetzung der HDL bleibt in den ersten vier Stunden nach Fettaufnahme ohne signifikante Veränderungen. Die signifikante Veränderung der Myristölsäure der LDL und der Trend der Myristinsäure und Myristölsäure der HDL ist ein Hinweis darauf, dass die FS aus der Nahrung nach gewisser Zeit in die LDL und HDL gelangen. Da die Myristölsäure in den VLDL nach vier Stunden prozentual am meisten gemessen wurde, könnte der Anstieg in den LDL und HDL eventuell auf die Aktivität des CETP (Kapitel 1.1.5) hinweisen. Ausserdem wäre eine Neusynthese von HDL denkbar, die sich als „surface remnants“ aus den VLDL bilden und somit Myristinsäure und Myristölsäure enthalten.

Der signifikante Abfall der Palmitölsäurekonzentration in der Albuminfraktion nach vier Stunden könnte für die insulinabhängige Unterdrückung der postprandialen Lipolyse sprechen. Wie Halliwell et al.1996 zeigen konnten wird Palmitölsäure im Nüchternzustand besser aus Fettgewebe freigesetzt als Stearinsäure und Palmitinsäure. Die Konzentration der beiden letzteren FS wird also weniger durch Lipolyse bestimmt, und sinkt folglich nicht in der Alb Fraktion postprandial, wenn die Lipolyse durch Insulin unterdrückt wird.

4.4 Fettsäuren und HOMA-IR

Der Einfluss der FS auf die IR wird allgemein als signifikant bewertet (Bevilacqua et al. 1987, Vessby et al. 2001, Summers et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Korrelationsanalyse zwischen den FS des Plasmas einerseits sowie den FS der Lipoproteine andererseits und dem HOMA-IR (Kapitel 3.7) durchgeführt. Im Folgenden wird diese Analyse mit der Analyse von Kotronen et al. 2009 verglichen.

Zunächst wurden die FS des Plasmas mit dem HOMA-IR korreliert. Dabei zeigte sich, dass in der „Lilly-Kohorte die Myristinsäure positiv und die Linolsäure negativ korrelierten. In der „Kotronen Kohorte“ korrelierten dagegen die Palmitinsäure, die Palmitölsäure sowie die Ölsäure positiv und die Linolsäure negativ.

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass im Serum gemessene hohe Anteile an Palmitinsäure und Stearinsäure, sowie niedrige Anteile an Linolsäure als Risikofaktoren für die Entwicklung eines DMT 2 (Hodge et. al 2007, Wang et al. 2003, Vessby et al. 1994), eines Myokardinfarkts (Ohrvall et al. 1996, Miettinen et al. 1982) sowie eines MetS (Warensjo et al. 2005) gelten. Des Weiteren gilt diese FS-Konstellation auch als Risikofaktor für die kardionvaskulär bedingte Sterblichkeit (Warensjo et al. 2008). Die Erhöhung der Myristinsäure im Serum als Ankündigung einer IR wurde von Lovejoy et al. 2001 beschrieben. Dies könnte einerseits eine erhöhte de novo Lipogenese in der Leber widerspiegeln, wodurch gleichzeitig die prozentuale Linolsäurekonzentration abnehmen würde, andererseits könnte es sich um den Ausdruck von erhöhten TG Werten handeln.

Der Vergleich der Lipoproteinfettsäuren mit dem HOMA-IR zeigte in der „Lilly Kohorte“ zwei signifikante Korrelationen bei den LDL. Auffallend stark war die Korrelation bei der Dihomo-γ-Linolensäure, für die bei den HDL diesbezüglich ein positiver Trend beobachtet werden konnte. Lovejoy et al. 2001 beschrieben, dass die Erhöhung der Dihomo-γ-Linolensäure als Zeichen für die Entstehung einer IR gewertet werden könne. Der zugrunde liegende Mechanismus könnte die Stimulation der delta 6-Desaturase Aktivität durch die in der IR vorherrschende Hyperinsulinämie sein. Dadurch würde mehr Linolsäure in Dihomo-γ-Linolensäure umgewandelt werden.

Desweiteren korrelierte bei den LDL die Stearinsäure positiv. Erklärt werden könnte dies mit erhöhten hepatischen ELOVL 6 (Eissing et al. 2013). In Mausmodellen wurde gezeigt, dass erhöhte ELOVL 6 in der Leber eine IR auslösen (Matsuzaka 2007). In der „Kotronen Kohorte“ hingegen ist eine positive Korrelation der Stearinsäure in den VLDL zu beobachten.

Als Fazit beschreiben Kotronen et al. 2009 die positive Korrelation von SAFAs mit HOMA-IR in VLDL und LDL, so wie von MUFAs und HOMA-IR in HDL. Dazu würden der in dieser Untersuchung beobachtete positive Trend der Palmitinsäure in den VLDL sowie der positive Trend der Vaccensäure in den HDL passen.Weiterhin ist zum einen die erhöhte de novo Lipogenese mit IR assoziiert, zum anderen zeigt die Konversion von Dihomo-γ-Linolensäure eine beginnende IR an. Die Dihomo-γ-Linolensäure wurde von Kotronen et al. 2009 leider nicht analysiert.

Es ist zu erkennen, dass insgesamt betrachtet die Ergebnisse der vorliegenden Studie in Auszügen mit denen in der Literatur übereinstimmen, was für deren Universalität spricht. Es zeigt sich hier, dass in Lipoproteinklassen gemesse FS eine bessere Korrelation mit IR ergeben, als die im

Gesamtplasma gemessen FS. Entsprechend ist davon auszugehen, dass zukünftige Analysen der Lipoproteine bezüglich ihrer FS Zusammensetzung wichtige Informationen im Hinblick auf die Erforschung der IR im Zusammenhang mit dem MetS liefern werden. Eventuell wären als Ausblick der Nachweis der SD-LDL und HDL_3 sowie deren differenzierte Untersuchung hinsichtlich des FS Musters ein weiteres Forschungsfeld in diesem Bereich.

4.5 Methodendiskussion

4.5.1 Methodendiskussion der Lipoproteingewinnung

In der Literatur wurde die Methode der Extraktion von Lipoproteinen aus Plasma mittels FPLC beschrieben. Dieser halb-automatische Prozeß gilt als reproduzierbar und valide. (Innis-Whitehouse et al. 1998). Im Vergleich zu anderen Möglichkeiten der Lipoproteinextraktion aus Plasma, wie z.B. der Säulenchromatografie ist die FPLC Methode weniger zeitaufwendig und benötigt weniger als 1 ml Plasma. Zudem kann diese Methode mit Plasmen durchgeführt werden, welche gefroren waren. Zum Erhalt der Funktionsfähigkeit der Säule muss diese regelmäßig gespült werden. Ein regelmäßig durchgeführtes Waschprogramm beseitigt eventuelle Anhaftungen an der Säule und eine Spülung vor dem Einfügen der nächsten Probe beseitigt eventuell zurückgebliebene Probenreste der vorherigen Probe. Dadurch wird die Genauigkeit der Messung erhöht.

4.5.2 Methodendiskussion der Fettsäurebestimmung

Die in der Literatur von Lepage and Roy 1986 beschriebene Methode zur direkten Umesterung von Lipiden in einem Reaktionsschritt gilt als Referenzmethode. Sie ist technisch sehr gut umsetzbar, präzise und zeitsparend. Die entstehenden Fettsäuremethylester sind die Voraussetzung für die Fettsäurebestimmung mittels Gaschromatographie. Die GC-Analyse ist sehr zuverlässig durch Einsatz eines internen Standards. Der interne Standard ist eine festgelegte Menge an Heptadekansäure, welche jeder Probe hinzugefügt wird. Bei einem Teilverlust der Probe, wäre der interne Standard ebenfalls von Verlust betroffen (Wiederfindungskontrolle). Zusätzlich wird mindestens zu Beginn und am Ende jeder Sequenz eine bestimmte Menge des internen Stan-

dards in den Injektor des Gaschromatographen eingespritzt. Diese Standards gelten als Referenz für die gemessenen Proben. Probleme in der Auswertung können sich lediglich in der Reproduzierbarkeit von manuell integrierten Peaks ergeben. Das ist beispielsweise nötig, wenn eine Fettsäure in einer sehr geringen Konzentration vorhanden ist, das Signal daraufhin schwach ist und somit kein eindeutiger Peak ermittelt werden kann. Um die Analyse von Fettsäuremethylestern für große klinische Studien einzusetzen, wurden die Methoden bereits weiterentwickelt (Masood et al. 2005). Die one- step-reaction von Lepage und Roy wurde dahingehend modifiziert, dass alle benötigten Reagenzien bereits vorher zu einer Lösung zusammengefügt wurden. Diese Lösung wird dann einmalig zur Probe gegeben. Damit entfallen die, für Störungen anfälligen, Zwischenschritte des Pipetierens. Des Weiteren wurde der Einsatz eines Roboters für diese Arbeit getestet. Der GC wurde durch ein Fast GC ersetzt, welcher mit einer besonderen Säule und anderen Einstellungen betrieben wird. Diese Methodenerweiterungen stellen eine Option dar, wurden aber im hiesigen Labor bisher nicht etabliert.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Plasma gesunder Probanden mit mindestens einem, an Typ II Diabetes erkrankten Elternteil untersucht und die FS Muster der Lipoproteine nüchtern und postprandial bestimmt. Daraus sollte das Potential von Lipoprotein-FS als metabolischen Biomarkern erkundet werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Lipoproteinklassen charakteristische FS Muster aufweisen, welche mit der in der Literatur beschriebenen Lipidzusammensetzung der Lipoproteine und der Präferenz der Lipidklassen für bestimmte FS zu erklären sind: In VLDL waren die in Triglyzeriden angereicherten Ölsäure und Palmitinsäure mengenmäßig am stärksten vertreten, während in LDL die mit Cholesterinestern assoziierte Linolsäure besonders häufig war. In HDL hingegen kamen ein relativ hoher Anteil von den in Phospholipiden angereicherten Arachidonsäure und Stearinsäure vor. Daneben wurden Linolsäure und Palmitinsäure als hauptsächlich vorkommende FS gemessen. Charakteristisch für VLDL war des Weiteren ein hoher Anteil an den ebenfalls Triglyzerid-angereicherten Palmitölsäure und Vaccensäure. Die postprandiale Veränderung der Lipoprotein-Fettsäuremuster wurde zu zwei Zeitpunkten nach der Einnahme eines definierten Fettfrühstücks betrachtet. Während sich in der VLDL-Fraktion signifikante Anstiege nahezu aller FS 2h und 4h nach Fettgabe nachweisen ließen, gab es in der LDL- und HDL-Fraktion nur einen leichten Anstieg der Myristin- und Myristölsäure, welche im Fettfrühstück besonders viel enthalten waren. In der Alb-Fraktion wurde lediglich ein signifikanter Abfall der Palmitölsäure nach 4h beobachtet. In einer Korrelationsanalyse wurde festgestellt, dass LDL-FS insgesamt stärker mit HOMA-IR assoziiert sind als die Gesamtplasma-FS beziehungsweise die FS in den anderen Lipoproteinklassen.

Die charakteristischen Fettsäuremuster bestätigen, dass die Lipoproteinklassen klar abgegrenzte Kompartimente sind, die stark durch die Lipidzusammensetzung definiert sind. Da die Partikelgröße die Lipidzusammensetzung beeinflusst, könnten FS Muster oder Lipidspeziesmuster der Lipoproteine als Ausgangspunkt zur Entwicklung von Biomarkern für pathologische Lipoproteinunterklassen, wie SD-LDL oder $HDL_{3,}$ genutzt werden. Nahrungs-FS sind postprandial in allen Lipoproteinklassen nachweisbar. Weitere Studien sollten erkunden, in welchen Lipidklassen bestimmte Nahrungs-FS postprandial erscheinen und welche Aussagen die Dynamik dieses Prozesses über das metablische Risiko erlaubt.

Literaturverzeichnis

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, Philip W, James T, Loria CM, Smith Jr SC. **Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity**. Circulation. 2009; 120: 1640-1645

American Heart Association; National Heart, Lung; and Bloood Institute; Grundy SM, Cleeman JI; Daniels SR; Donato KA; Eckel RH; Franklin BA; Gordon DJ; Krauss RM, Savage PJ; Smith Jr SC; Spertus JA; Costa F. **Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American Heart Association/ National, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. Executive summary**. Cardiol Rev. 2005; 13(6): 322-7.

Arai T, Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Kotani K, Fujioka S, Nozaki S, Keno Y, Yamane M, Shinohara E. **Increased plasma cholsteryl ester transfer protein in obese subjects. A possible mechanism for the reduction of serum HDL cholesterol levels in obesity**. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1994; 14: 1129-1136

Baskin ML, Ard J, Franklin F, Allison DB. **Prevalence of obesity in the United States**. Obesity reviews 2005; 6: 5-7

Bloomgarden ZT. **Insulin resistance: current concepts**.Clin Ther. 1998; 20(2): 216-31.

Boden G, Shulman GI. **Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction**. Eur J Clin Invest. 2002; 32(suppl 3): 14-23.

Bonora E, Kiechel S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Muggeo M. **Prevalence of Insulin Resistance in Metabolic Disorders: The Bruneck Study**. Diabetes. 1998; 47: 1643-9.

Bonora E, Formentini G, Calcaterra F, Lombardi S, Marini F, Zenari L, Saggiani F, Poli M, Perbellini S, Raffaelli A, Cacciatori V, Santi L, Targher G, Bonadonna R, Muggeo M. **HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: prospective data from the Verona Diabetes Complications Study**. Diabetes Care. 2002; 25: 1135-41.

Brunzell JD. **Increased ApoB in small dense LDL particles predicts premature coronary artery disease.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25(3): 474-5.

Bradbury KE, Skeaff CM, Green TJ, Gray AR, Crowe FL. **The serum fatty acids myristic acid and linoleic acid are better predictors of serum cholesterol concentrations when measured as molecular percentages rather than as absolute concentrations**. Am J Clin Nutr. 2010; 91: 398-405

Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. **The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations**. Endokrinol Metab Clin North Am. 2004; 33(2): 351-75

Chahil TJ, Ginsberg HN. **Diabetic Dyslipidemia**. Endocrinol Metad Clin N Am. 2006; 35: 491-510.

Christie WW. **Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection**. J. Lipid Res. 1985; 26: 507-512

DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. **Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview**. Diabetes Care. 1992; 15: 318-368

DeFronzo RA, Tobin JD, Andreas R. **Glukose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance**. Am J Physiol. 1997; 237: E214-E223.

Després JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A, Bouchard C. **Genetic aspects of susceptilility to obesity and related dyslipidemias**. Mol Cell Biochem 1992; 133(2):151-69.

Donnelly KL, Smith CL, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. **Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease**. J Clin Invest. 2005; 115(5): 1343-51

Dullaart RP, Sluiter WJ, Dikkeschei LD, Hoogenberg K, Van Tol A. **Effect of adiposity on plasma lipid transfer protein activities: a possible link between insulin resistance and high density lipoprotein metabolism**. Eur J Clin Invest. 1994; 24(3): 188-94

Eckel RH. **Obesity: mechanisms and clinical management**.Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins, 2003.

Eissing L, Schere T, Tödter K, Knippschild U, Greve JW, Buurman WA, Pinnschmidt HO, Rensen SS, Wolf AM, Bartelt A, Heeren J, Buettner C, Scheja L. **De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP-β and metabolic health**. Nat. Commun. x:x doi: 10.1038/ncomms2537

Felber JP and Golay A. **Pathways from obesity to diabetes**. International Journal of Obesity 2002; 26, Suppl 2: S39-S45

Ford ES, Giles WH, Dietz WH. **Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey**. JAMA 2002; 287: 356-59.

Ginsberg HN. **Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic ststes: relationship to atherogenesis**. Diabetes Care. 1991; 14: 839-55.

Ginsberg HN. **Insulin resistance and cardiovascular disease**. J Clin Invest. 2000; 106: 453-8.

Glatz JF, Soffers AE, Katan MB. **Fatty acid composition of serum colesteryl esters and erythrocyte membranes as indicators of linoleic acid intake in man**. Am J Clin Nutr. 1989; 49: 269-276

Guillou H, Zadravec D, Martin PG, Jacobsson A. **The key roles of elongases and desaturases in marmmalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice**. Prog Lipid Res. 2010; 49: 186-99

Gunstone FD, Harwood JL, Dijkstra. The Lipid Handbook. CRC Press Taylor and Francis Group 2007; 1-141

Haffner SM. **Lipoprotein disorders associated with type 2 diabetes mellitus and insulin resistance**. Am J Cardiol. 2002; 90(suppl): 55i-61i.

Halliwell KJ, Fielding BA, Samra JS, Humphreys , Frayn KN. **Release of individual fatty acids from human adipose tissue in vivo after an overnight fast**. J Lipid Res. 1996; 37: 1842-8

Harris MI, Zimmet P. **Classifikation of mellitus and other categories of glucose intolerance**. In: Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P (eds). International textbook of diabetes mellitus. John Wiley: Chichester; 1992: 3-18.

Havel RJ, Kane JP, **Introduction: Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins** in: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Hg.). The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease; 8. Aufl., New York: McGraw-Hill, 2001; 2705-16

Havlik RJ, Hubertus HB, Fabsitz RR, Feinleib M. **Weight and Hypertension**. Ann Intern Med.1983; 98: 855-9.

Hellerstein MK, Schwarz JM, Neese RA. **Regulation of hepatic de novo lipogenesis in humans**. Annu Rev Nutr. 1996; 16: 523-57.

Herold G. (2006) Innere Medizin. Eigenverlag, 603

Hjelte LE, Nilsson Å. **Arachidonic acid and ischemic heart disease**. J Nutr. 2005; 135: 2271-2273

Hodge AM, English DR, O`Dea K, Sinclair AJ, Makrides M, Gibson RA, Giles GG. **Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: interpreting the role of linoleic acid**. Am J Clin Nutr 2007; 86:189-97

Innis-Whitehouse W; Xianzhou L; Brown V; Ngoc-Anh L. **An efficient chromatographic system for lipoprotein fractionation using whole plasma**. J Lipid Res 1998; 39: 679-690.

Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lathi K, Nissén M, Taskinen MR, Groop L. **Cardiovaskular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome**. Diabetes Care. 2001; 24(4):683-9.

Katan MB, Zock PL, Mensink RP. **Effects of fats and fatty acids on blood lipids in humans: an overview**. Am J Clin Nutr.1994; 60(suppl): 1017S-22S

Katz A, Nambi SS, Mather K, Baron AD, Follmann DA, Sullivan G, Quon MJ.**Quantitative Insulin Sensitivity Check Index: A Simple, Accurate Method for Assessing Insulin Sensitivity In Humans**.J Clin Endokrinol Metab.2000; 85(7): 2402-2410

Kihara A. **Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders**. J Biochem. 2012; 152 (5): 387- 395

Kotronen A, Velagapudi VR, Yetukuri L, Westerbacka J, Bergholm R, Ekroos K, Makkonen J, Taskinen MR, Oresic M, Yki-Järvinen H. **Serum saturated fatty acids containing triacylglycerols are better markers of insulin resistance than total serum triacylglycerol concentrations**. Diabetologoca. 2009; 52: 684-690.

Krauss RM. **Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes**. Diabetes Care. 2004; 27(6): 1496-504).

Kreisberg RA. **Diabetic dyslipidemia**. Am J Cardiol. 1998; 82: 67U-73U.

Laaksonen DE, Lakka TA, Lakka HM, Nyyssönen K, Rissanen T, Niskanen LK, Salonen JT. **Serum fatty acid composition predicts development of impaired fasting glycemia and diabetes in middle-aged men**. Diabetic Medicine 2002; 19: 456-464.

Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT, Lakka TA. **Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study**. Am J Epidemiol. 2002; 156(11): 1070-77.

Lamarche B, Lemieux I, Després JP. **The small, dense LDL phenotype and the risk of coronary heart disease: edidemiology, patho-physiology, and therapeutic aspects**. Diabetes Metab. 1999; 25: 199-211.

Lakka HM, Laaksonen DE,Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. **The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle aged men**.Jama. 2002; 288: 2709-2716

Lepage G, Roy C. **Direkt transesterifikation of all classes of lipids in a one step reaction**. J Lipid Res. 1986; 27: 114-120.

Leskinen MH, Solakivi T, Kunnas T, Alho H, Nikkari ST. **Serum fatty acids in postinfarction middle- aged men**. Scand J Clin Lab Invest. 2005; 65: 485- 490.

Lovejoy JC, Champagne CM, Smith SR, DeLany JP, Bray GA, Lefevre M, Denkins YM, Rood JC. **Relationship of dietary fat and serum cholesterol ester and phospholipid fatty acids to markers of insulin resistance in men and woman with a range of glikose tolerance**. Metabolism. 2001; 50(1): 86-92

Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM. **The National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation, and World Health Organisation definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovaskular disease and diabetes**. Diabetes Care. 2007; 30(1): 8-13.

Ma J, Folsom AR, Shahar E, Eckfeldt JH. **Plasma fatty acid composition as an indicator of habitual dietary fat intake in middle aged adults**. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study investigators. Am J Clin Nutr. 1995; 62:564-571

Masood A, Stark KD, Salem N Jr. **A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies**. J. Lipid Res.2005; 46:2299-2305

Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, Kato T, Atsumi A, Yamamoto T, Inoue N, Ishikawa M, Okada S, Ishigaki N, Iwasaki H, Iwasaki Y, Karasawa T, Kumadaki S, Matsui T, Sekiya M, Ohashi K, Hasty AH, Nakagawa Y, Takahashi A, Suzuki H, Yatoh S, Sone H, Toyoshima H, Osuga J, Yamada N. **Crucial role of a long- chain fatty acid elongase, Elovl 6, in obesity-induced insulin reistance**. Nat Med. 2007; 13 (10): 1193-202

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. **Homeostasis model assessment: insulin resistance and β-cell funktion from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man**.Diabetologica.1985; 28: 412-419

Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. **Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake and regulation**. J Lipid Res. 2002;43: 1997-2006

Miettinen TA, Naukkarinen V, Huttunen JK, Mattila S, Kumlin T. **Fatty acid composition of serum lipids predicts myocardial infarction**. BMJ.1982; 285: 993-996

Moebus S, Hanisch J, Aidelsburger P, Bramlage P, Wasem J, Joeckel KH**: Impact of 4 different definitions used for the assessment of the prevalence of the Metabolic Syndrome in primary healthcare: The German Metabolic and Cardiovaskular Risk Projekt (GEMCAS).** Cardiovascular Diabetology 2007; 6: 22.

Neuhauser H, Ellert U. **Prävalenz des metabolischen Syndroms in Deutschland. Eine Sensitivitätsanalyse**. German Medical Science. 2005

Nikkari T, Lukkainen P, Pietinen, Puska P. **Fatty acid composition of serum lipid fractions in relation to gender and quality of dirtary fat**. Ann.Med.1995; 27(4): 491-498

Ohrvall M, Berglund L, Salminen I, Lithell H, Aro A, Vessby B. **The serum cholesterol ester fatty acid composition but not the serum concentration of alpha tocopherol predicts the development of myocardial infarction in 50-year-old men: 19 years follow up**. Atherosclerosis. 1996; 127: 65-71

Ordovas JM, Osgood D. **Preparative isolation of plasma lipoproteins using fast protein liquid chromatography (FPLC)**. Methods Mol Biol. 1998; 110: 105-11.

Reaven GM, Lithell H, Landsberg L. **Hypertension and associated metabolic abnormalities-the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system**. N Engl J Med. 1996; 334: 374-381.

Richter G. Praktische Biochemie Grundlagen und Techniken. Georg Thieme Verlag. 2003; 291.

Ruderman N, Chisholm D, Pi-Sunyer X, Schneider S. **The metabolically-obese, normal weight individual revisited**. Diabetes. 1998; 47: 699-713.

Saltiel AR. **Series introduction: the molecular and physiological basis of insulin resistance: emerging implications for metabolic and cardiovascular diseases**. J. Clin Invest. 2000; 106(2): 163-164.

Scherrer U, Sartori C. **Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity and cardiovascular morbidity**. Circulation. 1997; 96: 4104-4113.

Schwandt P. **Handbuch der Fettstoffwechselstörungen: Dyslipoproteinämien und Atherosklerose:Diagnostik, Therapie, Prävention**. Schattauer Verlag 2006; 2-56

Segrest JP, Jones MK, De Loof H, Dashti N, **Strukture of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins**, J Lipid Res 2001, 42, 1346-67

Serrano Rios M. **Relationship between obesity and the increased risk of major complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus**. Eur J Clin Invest. 1998; 28(Suppl 2): 14-18.

Sheehan D. **Fast protein liquid chromathography (FPLC) methods**. Methods Mol Biol. 1996; 59: 269-75.

Shulman GI .**Cellular mechanisms of insulin resistance**. J. Clin. Invest 2000; 106(2): 171-176.

Small DM. **The effects of glyceride structure on absoption and metabolism**. Annu Rev Nutr. 1991; 11: 413-34

Tall AR. **Plasma cholesteryl ester transfer protein**.J Lipid Res.1993; 34:1255-1274

The IDF consensus. **Worldwide definition of the metabolic syndrome**. Vol 2005; International Diabetes Federation, 2005.

Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KG. **Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention**. Diabet Med.2002; 19(9): 708-23.

Vasilios GA, Tziomalos K, Karagiannis A, Mikhailidis DP. **Dyslipidaemia of Obesity, Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes Mellitus: the Case for Residual Risk Reduktion after Statin Treatment**. The Open Cardiovascular Medicine Journal.2011; 5:24-34

Van-Gaal L, Mertens I, Block CD. **Mechanisms linking obesity with cardiovaskular disease**. Nature. 2006; 444(7121): 875-80.

Vessby B, Aro A,Skarfors E, Berglund L, Salminen I, Lithell H. **The risk to develop NIDDM is related to the fatty acid composition of the serum cholesterol esters**. Diabetes. 1994; 43: 1353-1357

Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA, Tapsell LC, Nälsén C, Berglund L, Louheranta A, Rasmussen BM, Calvert GD, Maffetone A, Pedersen E, Gustafsson IB, Storlien LH. **Substituting dietary for monounsaturated fat impaires insulin sensitivity in healthy men and woman: The KANWU Study**. Diabetologia 2001; 44(3): 312-319

Vessby B, Gustafsson I-B, Tengblad S, Boberg M, Andersson A. **Desaturation and Elongation of Fatty Acids and Insulin Action**. Ann N Y Acad Sci. 2002; 967: 183-95.

Vessby B. **Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome**. Curr Opin Lipidol. 2003; 14: 15-19

Wang L, Folsom AR, Zheng ZJ, Pankow JS, Eckfeldt JH, ARIC Study investigator. **Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle- aged adults**. Am J Clin Nutr. 2003; 78: 91-98

Warensjo E, Riserus U, Vessby B. **Fatty acid composition of serum lipids predicts the development of the metabolic syndrome in men**. Diabetologica. 2005; 48: 1999-2005

Warensjo E, Sundstrom J, Vessby B, Cederholm T, Riserus U. **Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: a population based prospective study**. Am J Clin Nutr. 2008; 88: 203-209

West KM, Kalbfleisch JM. **Influence of nutritional factors on prevalence of diabetes**. Diabetes . 1971; 20: 99-108.

Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Hämatologie und Humangenetik. 8. Auflage, Basel, 1979.

Wolfe LS, Horrocks LA: **Eicosanoids: Basis Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**. 1994; 5: 475-490

World Health Organisation. **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications**. Report of a WHO consultation 1999.Geneve: OMS; 1999.

Willett WC. **Trans fatty acids and cardiovascular disease- epidemiological data**. Atheroscler Suppl. 2006; 7: 5-8

Wilson PW, D´Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. **Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience**. Arch Intern Med. 2002; 162(16): 1867-72.

Wolfram G, Ernährungstherapie in: Schwandt P und Richter WO (Hg.) Handbuch der Fettstoffwechselstörungen: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie und Prävention der Dyslipoproteinämien,New York: Schattauer 1995

Yli-Jama P, Haugen TS, Rebnord HM, Ringstad J, Pedersen JI. **Selective mobilisation of fatty acids from human adipose tissue**. Eur J Intern Med. 2001; 12: 107-115

Zimmet P, Alberti G, Kaufman F, Tajima N, Silink M, Arslanian S, Wong G, Bennett P, Shaw J, Caprio S; **Internationale Diabetes Federation Task Force on Epidemiologiy and Prevention of Diabetes**. Lancet. 2007; 369(9579): 2059-61.

Anhang

Tabelle 10 Zusammensetzung der Fettfrühstücksangebote

Frühstück A	Fett [g]	Kohlenhydrate [g]	Proteine [g]
2 Weizenbrötchen a 60g	2,2	60	9,6
10g Butter	8,3		
50g „Cervelatwurst“	18	0,5	8
50g Maasdammer Käse 45% Fett im Trockenanteil	13,5		12,5
150g Yoghurt	12	22,2	4,2
150g Weintrauben		23,3	1
Summe	54	106	35
Kalorien		1078kcal	

Frühstück B	Fett [g]	Kohlenhydrate [g]	Proteine [g]
2 Weizenbrötchen a 60g	2,2	60	9,6
25g Butter	20,8		
1 Ei (60) nb	7,2		7,8
50g Maasdammer Käse 45% Fett im Trockenanteil	13,5		12,5
150g Yoghurt	12	22,2	4,2
30g Honig		22,5	
Summe	56	105	34
Kalorien		1088kcal	

Frühstück C	Fett [g]	Kohlenhydrate [g]	Proteine [g]
2 Weizenbrötchen a 60g	2,2	60	9,6
13g Butter	10,8		
50g Leberwurst	17,4	0,5	7,1
50g Camembert 50% Fett im Trockenanteil	13		10
150g Yoghurt	12	22,2	4,2
150g Weintrauben		23,3	1
Summe	55	106	32
Kalorien		1075kcal	

Tabelle 11 Zusammensetzung der Fettsäuren in den Frühstücken A, B, C

Fettsäuren	Frühstück A [%]	Frühstück B [%]	Frühstück C [%]
Myristinsäure	8,8	11,9	8,6
Myristölsäure	0,8	1,2	0,8
PalmitinSäure	31,4	34,5	31,8
PalmitölSäure	2,1	2,2	2,3
Stearinsäure	12,7	12	11,7
Ölsäure	33	31,6	34,6
Vaccensäure	2,2	1,4	2,5
Linolsäure	7,3	5	7,1
g-Linolensäure	0	0	0
Alpha -Linolensäure	1	0,8	0,9
Arachinsäure	0,2	0,4	0,4
Eicosaensäure	0,5	0,2	0,7
Eicosadiensäure	0,3	0,1	0,3
Arachidonsäure	0,2	0,4	0,4
Eicosatriensäure	0,1	0	0,1
Eicosapentaensäure	0	0,1	0
Behensäure	0,1	0,1	0
Erucasäure	0	0	0
Docosapentaensäure	0,1	0,1	0,2
Docosahexaensäure	0	0,1	0
Lignocerinsäure	0	0,1	0
Nervonsäure	0	0	0

Tabelle 12 Klinischen Kriterien der untersuchten Kohorte

	Kohorte (n=38)	Männer (n=13)	Frauen (n=25)
Alter [Jahre]	46 (19-65)	42 (23-54)	47 (19-66)
F_BMI [kg/m^2]	24,12 (17,05-35,13)	24,16 (21,02-35,13)	23,81 (17,05-35,09)
F_WHR	0,8 (0,67-1,02)	0,9 (0,75-1,02)	0,78125 (0,67-0,99)
F_HOMA-IR	1,28 (0,24-6,53)	1,32 (0,52-4,88)	1,22 (0,24-6,53)
F_HOMA_%B	61,86 (14,15-304,54)	66,39 (14,15-15,73)	53,51 (16,56-305,54)
F_0h_Glucose [mg/dl]	94,5 (79,00-114,00)	96 (84,00-114,00)	92 (79,00-114,00)
F_0h_Insulin [µU/ml]	5,55 (1,10-23,20)	5,7 (2,00-18,50)	5 (1,10-23,20)
F_Waist [cm]	82,5 (62,50-117,00)	90 (68,10-115,10)	76,5 (62,50-102,00)
F_0h_TAG [mg/dl]	81,5 (39,00-293,00)	86 (43,00-293,00)	78 (39,00-156,00)
F_0h_Chol [mg|dl]	163,5 (106,00-253,00)	162 (130,00-233,00)	166 (106,00-253,00)
F_0h_HDL [mg/dl]	48,5 (21,00-107,00)	41 (21,00-66,00)	52 (32,00-107,00)

Tabelle 13 Fettsäuregehalt des nüchterenen Blutplasmas der untersuchten Kohorte

Material: Blutplasma Zeitpunkt: 0h			
Fettsäure	Mittelwert [µg|ml]		SD [µg|ml]
Myristin	36,45	±	17,43
Myristöl	3,86	±	2,15
Palmitin	605,94	±	131,63
Palmitöl	60,74	±	23,00
Stearin	186,93	±	42,05
Öl	554,28	±	160,97
Vaccen	46,64	±	12,97
Linol	723,75	±	134,56
g_Linolen	17,30	±	10,50
Linolen	14,28	±	5,43
Arachin	7,87	±	1,42
Eicosaen	4,90	±	1,98
Eicosadien	4,61	±	1,78
Dihomo-γ-Linolen	47,16	±	13,44
Arachidon	162,79	±	35,72
Eicosatetraen	2,12	±	1,29
Eicosapentaen	24,22	±	16,53
Behen	20,93	±	3,66
Docosapentaen	14,18	±	3,77
Docosahexaen	49,28	±	18,15
Lignoceron	16,99	±	3,15
Nervon	40,07	±	7,66

Tabelle 14 Fettsäuren der Lipoproteine aus nüchternem Blutplasma

Material: Lipoproteine			
Zeitpunkt: 0h			
Fettsäure	Mittelwert [µg|ml]		SD
Myristin	23,68	±	0,77
Myristöl	1,63	±	0,17
Palmitin	432,15	±	75,53
Palmitöl	42,46	±	7,25
Stearin	135,86	±	26,67
Öl	373,88	±	63,16
Vaccen	28,65	±	4,88
Linol	510,99	±	112,00
g_Linolen	8,67	±	1,90
Linolen	9,28	±	0,57
Arachin	4,48	±	0,94
Eicosaen	2,89	±	0,09
Eicosadien	3,48	±	0,46
Dihomo-γ-Linolen	36,36	±	7,79
Arachidon	96,94	±	22,08
Eicosatetraen	2,91	±	0,45
Eicosapentaen	12,39	±	2,65
Behen	10,34	±	2,55
Docosapentaen	7,42	±	1,29
Docosahexaen	20,43	±	4,55
Lignoceron	8,47	±	1,66
Nervon	14,57	±	1,45

Tabelle 15 Relative Prozentanteile der Fettsäuren in den einzelnen Lipoproteinen

Fettsäure	Summe [µg/ml]	VLDL [%]	LDL [%]	HDL [%]	Alb [%]
Myristin	23,68	33,21	36,64	30,15	
Myristöl	1,63	44,79	31,29	23,92	
Palmitin	432,15	21,65	35,84	40,75	1,77
Palmitöl	42,46	28,32	42,04	28,35	1,29
Stearin	135,86	15,10	34,36	47,29	3,25
Öl	373,88	27,22	40,91	30,67	1,21
Vaccen	28,65	24,64	39,72	34,43	1,21
Linol	510,99	12,26	47,48	39,19	1,08
g_Linolen	8,67	12,31	56,06	31,63	
Linolen	9,28	29,68	40,43	29,89	
Arachin	4,48	10,70	52,15	37,15	
Eicosaen	2,89	30,76	36,83	32,41	
Eicosadien	3,48	18,08	39,02	42,90	
Dihomo-γ-Linolen	36,36	10,27	37,06	52,66	
Arachidon	96,94	7,92	40,19	51,89	
Eicosatetraen	2,91	15,50	43,57	40,94	
Eicosapentaen	12,39	8,68	43,95	47,37	
Behen	10,34	6,93	55,76	37,31	
Docosapentaen	7,42	16,86	31,55	51,59	
Docosahexaen	20,43	10,98	33,52	55,50	
Lignoceron	8,47	14,54	53,60	31,86	
Nervon	14,57		57,05	42,95	

Abkürzungsverzeichnis

Alb	Albumin
ApoA1	Apolipoprotein A 1
ApoB100	Apolipoprotein B-100
ApoB48	Apolipoprotein B-48
ApoC	Apolipoprotein C
ApoE	Apolipoprotein E
Apo-Lp	Apolipoprotein
BMI	Body mass Index
BZ	Blutzucker
CE	Cholesterolester
CETP	Cholesterol-Ester-Transfer-Protein
Chol	Cholesterol
CM	Chylomikronen
CR	Chylomikronen Remnants
DMT 2	Diabetes mellitus Typ 2
FS	Fettsäure
FFS	Freie Fettsäuren
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatographie
GC	Gaschromatographie
Glut4	Glukosetransporter 4
HDL	High density lipoprotein
HDL-C	High density lipoprotein-Cholesterin
HOMA-IR	Homeostasis model assessment of insulin resistance
HOMA-B	Homeostasis model assessment of β-Cell resistance
IFG	Impaired Fasting Glycämie
IGT	Impaired Glucose Tolerance
IR	Insulin Resistenz
IS	Insulin Sensitivität
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low density lipoproteins
LDL-C	Low density lipoprotein-Cholesterin
LpL	Lipoproteinlipase
PL	Phospholipid
QUICKI	Quantitative Insulin Sensitivity Check Index
rpm	Umdrehungen pro Minute
TG	Triacylglycerol
VLDL	Very low density lipoproteins
WAT	White adipose tissue
WC	Waist Circumference
WHO	World Health Organisation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Struktur eines Lipoproteins 16

Abbildung 2 Stoffwechsel der Fettsäuren bei Säugetieren 22

Abbildung 3 Fettsäuremethylester 31

Abbildung 4 Anlage zur Gasflüssigkeitschromatographie (aus Richter 2003) 34

Abbildung 5 Aufbau eines Flammenionisationsdetektors (FID) (aus Richter 2003) 35

Abbildung 6 Gaschromatogramm (aus Richter 2003) 36

Abbildung 7 Cholesteringehalt der Plasma FPLC Fraktionen aller 40 Probanden 41

Abbildung 8 Wiederholung der Cholesterinmessung in Plasma FPLC Fraktionen zur Qualitätskontrolle 42

Abbildung 9 Fettsäureprofil des Blutplasmas 44

Abbildung 10 Gesamt-Fettsäureprofil der Lipoproteine 45

Abbildung 11 Fettsäureanteile der Lipoproteine [%] 47

Abbildung 12 Fettsäureprofile der Lipoproteine [µg/ml] 50

Abbildung 13 Durchschnittliche Fettsäurezusammensetzung des Fettfrühstücks [%] 54

Abbildung 14 Relative, postprandiale Änderung der Lipoprotein-assoziierten Fettsäuren 55

Abbildung 15 Postprandiale Änderung der VLDL-assoziierten Fettsäuren 57

Abbildung 16 Postprandiale Änderung der LDL-assoziierten Fettsäuren 58

Abbildung 17 Postprandiale Änderung der HDL-assoziierten Fettsäuren 59

Abbildung 18 Postprandiale Änderung der Alb-assoziierten Fettsäuren 60

Abbildung 19 Typische prozentuale Zusammensetzung der Lipoproteine 68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Eigenschaften der Lipoproteine 17

Tabelle 2 Nomenklatur der Fettsäuren 20

Tabelle 3 Zuordnung der Fraktionen zu Lipoproteinklassen 27

Tabelle 4 Prozentuale Anteile der Fettsäuren in Lipoproteinen und Plasma 49

Tabelle 5 Fettsäure-Gehalte der Lipoproteinklassen 52

Tabelle 6 Korrelationen zwischen den versterten Fettsäuren der Lipoproteinklassen und des Plasmas mit HOMA-IR Dargestellt sind Korrelationskoeffizienten (R). + p<0.1, * p<0,05, ** p<0,01 62

Tabelle 7 Klinische Daten der Lilly-Offspring Studie 65

Tabelle 8 Klinische Daten der Kotronen Kohorte 2009 65

Tabelle 9 Vergleich der prozentualen Anteile der Fettsäuren im Gesamtplasma verschiedener Kohorten (Kotronen et al. 2009) 66

Tabelle 10 Zusammensetzung der Fettfrühstücksangebote 89

Tabelle 11 Zusammensetzung der Fettsäuren in den Frühstücken A, B, C 90

Tabelle 12 Klinischen Kriterien der untersuchten Kohorte 91

Tabelle 13 Fettsäuregehalt des nüchterenen Blutplasmas der untersuchten Kohorte 92

Tabelle 14 Fettsäuren der Lipoproteine aus nüchternem Blutplasma 93

Tabelle 15 Relative Prozentanteile der Fettsäuren in den einzelnen Lipoproteinen 94

[entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen]

Zunächst danke ich Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die exzellente Möglichkeit, es am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf bearbeiten zu dürfen.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Jörg Heeren für die freundliche Übernahme der Betreuung.

Ganz besonders danken möchte ich Herrn Dr. Klaus Tödter und Herrn Dr. Ludger Scheja für die jederzeit ausserordentlich freundliche und motivierende Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas. Mit stetem Interesse verfolgten sie den Fortgang meiner Arbeit.Ohne ihre Geduld und Hilfsbereitschaft wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Weiteren Dank schulde ich den MitarbeiterInnen des Institut für Biochemie und Molekularbiologie II: Molekulare Zellbiologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, insbesondere Sandra Ehret und Oliver Bruns für die zahlreichen Hilfestellungen während der Einarbeitung in die Methoden dieser Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Dr. Ralf Thrull für die ausdauernde Hilfe bei der Korrektur und Formatierung, sowie dem Team der Cosphatec GmbH für die Unterstützung bei technischen Fragen.

Von ganzem Herzen Danke ich meinem Mann Frank Brauns für seine ständige Motivation und emotionale Unterstützung, sowie meiner Mutter für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Betreuung meiner Kinder Anna und Paul. Durch sie konnte ich die Kraft und Zeit und gewinnen die nötig war, um diese Arbeit fertig zu stellen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

.....

Christiane Brauns