

Aus dem Institut für Agrar-und Ernährungswissenschaften
(Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Reinhold Jahn)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III
(Dekan: Prof. Dr. Peter Wycisk)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



**„Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von
Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Anja Bettzieche
geb. am 07.12.1977 in Halle

Gutachter:

Prof. Dr. Gabriele Stangl
Prof. Dr. Klaus Eder
Prof. Dr. Gerald Rimbach

Verteidigung am: 18.10.2010

Halle/Saale 2010

Für meine Familie...

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
2. Zielstellung	9
3. Material und Methoden	15
3.1. Versuchsaufbau	15
3.1.1. Untersuchungen zur lipidsenkenden Wirkung von Proteinen aus weißer Lupine bei normocholesterinämischen Ratten (V1)	15
3.1.1.1. Zusammensetzung der Diät	15
3.1.2. Untersuchungen zur lipidsenkenden Wirkung von Proteinen aus weißer Lupine bei hypercholesterinämischen Ratten (V2)	16
3.1.2.1. Zusammensetzung der Diät	17
3.1.3. Vergleich verschiedener Proteine aus blauer Lupine und ihrer lipidsenkenden Wirkung bei hypercholesterinämischen Ratten (V3)	17
3.1.3.1. Zusammensetzung der Diät	18
3.1.4. Einfluss von Proteinen aus blauer Lupine auf die Milchfettsynthese und den Milchfettgehalt laktierender Ratten, sowie den Einfluss auf den maternalen Lipidstoffwechsel (V4)	18
3.1.4.1. Zusammensetzung der Diät	19
3.1.5. Einfluss von Aminosäuren auf den Lipidstoffwechsel von humanen Leberzellen (V5)	19
3.2. Versuchstiere und deren Haltung	19
3.3. Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials	20
3.3.1. Blutgewinnung und Organentnahme	20
3.3.2. Gewinnung der Milchproben	20
3.3.3. Gewinnung und Aufbereitung der Fäzesproben	21
3.3.4. Fraktionierung der Lipoproteine	22
3.3.5. Extraktion der Gesamtlipide aus der Leber	22
3.3.6. Extraktion von Lipiden aus Milch	23
3.4. Analytische Methoden	23
3.4.1. Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma	23
3.4.2. Bestimmung von Gallensäurekonzentration im Fäzes	24
3.4.3. Messung Cholesterin und Triglyceride	25
3.4.4. Bestimmung des Fettsäuremusters von Fetten	26
3.4.5. Bestimmung der Proteinkonzentration in Milch und Leberhomogenaten	26
3.4.6. Aminosäureanalyse im Diätfutter und im Rohprotein	27
3.4.7. Glucagon RIA	28
3.4.8. Insulinkonzentration ELISA	29
3.4.9. Quantifizierung der Apolipoproteine mittels SDS-Polyacrylamid	30

Gelelektrophorese	
3.4.10. Quantifizierung der LDL-Rezeptorproteinkonzentration in der Leber mittels SDS-PAGE und Westernblot	31
3.4.11. Untersuchungen zur Genexpression	34
3.4.11.1. RNA-Präzipitation	34
3.4.11.2. cDNA Synthese	36
3.4.11.3. Quantifizierung von mRNA-Konzentrationen mittels realtime-detection PCR	37
3.4.11.4. Gelelektrophorese	41
3.4.12. Glutathion-, Cystein- und Homocysteinkonzentration im Plasma	42
3.4.13. Genistein-, Daidzein und Genistinkonzentrationen im Rohprotein	44
3.4.14. Bestimmung der Tryptophan-Konzentration	45
3.4.15. Kultivierung der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2	47
3.4.15.1. Bestimmung der Zellzahl und Zellaktivität mit Trypanblau	48
3.4.15.2. Herstellung der Stammlösungen	48
3.4.15.3. Inkubation der Zellen	48
3.4.15.4. MTT-Test	48
3.4.15.5. Proteinbestimmung in HepG2 Zellen	49
3.4.15.6. Lipidextraktion aus HepG2 Zellen	49
3.4.15.7. RNA-Isolation	50
3.4.15.8. cDNA – Synthese	50
3.4.15.9. Real - Time Detection PCR	50
3.4.15.10. Glutathion-, Cystein- und Homocysteinkonzentration	52
3.4.16. Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung	52
4. Ergebnisse	53
4.1. Untersuchungen zur lipidsenkenden Wirkung von Proteinen aus Lupinus albus bei normocholesterinämischen Ratten (V1)	53
4.1.1. Leistungsparameter	53
4.1.2. Parameter des Lipidstoffwechsels	53
4.2. Untersuchungen zur lipidsenkenden Wirkung von Proteinen aus Lupinus albus bei normo- und hypercholesterinämischen Ratten (V2)	54
4.2.1. Leistungsparameter	54
4.2.2. Parameter des Lipidstoffwechsels	54
4.2.3. Gallensäurekonzentration und –exkretion	58
4.2.4. Insulin- und Glucagonkonzentrationen im Plasma	60
4.2.5. Verteilung ausgewählter Apolipoproteine in den Plasmalipoproteinen	60
4.2.6. Glutathion-, Homocystein- und CysteinKonzentrationen im Plasma	63
4.2.7. Genistein-, Daidzein und Genistinkonzentrationen im Rohprotein	64
4.2.8. Hepatische mRNA-Expression von lipogenen Enzymen	64
4.2.9. Hepatische mRNA-Expression von Genen des Triglyceridabbau	66
4.2.10. Hepatische mRNA-Expression von PPAR alpha regulierten Genen der Fettsäureoxidation	67
4.2.11. Hepatische mRNA-Expression ausgewählter Gene des Cholesterinstoffwechsels	67
4.3. Vergleich verschiedener Proteine aus blauer Lupine bezüglich ihrer lipidsenkenden Wirkung bei hypercholesterinämischen Ratten (V3)	70
4.3.1. Leistungsparameter	70
4.3.2. Parameter des Lipidstoffwechsels	70

4.3.3.	Expression von Genen des Triglyceridstoffwechsels in der Leber	73
4.3.4.	Expression ausgewählter Gene des Cholesterinstoffwechsels in der Leber	74
4.3.5.	Expression ausgewählter Gene in Muskelgewebe	76
4.4.	Untersuchungen zur lipidsenkenden Wirkung von Protein aus blauer Lupine bei laktierenden Ratten und ihren Nachkommen (V4)	77
4.4.1.	Leistungsparameter der Muttertiere	77
4.4.2.	Leistungsparameter der Nachkommen	78
4.4.3.	Körpermassenentwicklung der Jungtiere nach der Laktationsperiode	79
4.4.4.	Parameter des Lipidstoffwechsels bei den Muttertieren	80
4.4.4.1.	Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in Plasma, Lipoproteinen und Leber	80
4.4.4.2.	Freie Fettsäuren im Plasma	81
4.4.4.3.	Triglycerid- und Proteinkonzentration in der Milch	82
4.4.5.	Parameter des Lipidstoffwechsel bei den Nachkommen	83
4.4.6.	Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Lipidstoffwechsels in der Leber der Muttertiere	83
4.4.7.	Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Lipidstoffwechsels in der Milchdrüse	86
4.4.8.	Proteinkonzentration des LDL-Rezeptors in der Leber der Muttertiere	88
4.5.	Einfluss von Aminosäuren auf den Lipidstoffwechsel von humanen Leberzellen (V5)	89
4.5.1.	Zellzahl und Zellvitalität	89
4.5.2.	Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c und Fettsäuresynthase nach Inkubation mit L-Arginin, L-Methionin und L-Cystein	89
4.5.3.	Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und ausgewählter Zielgene nach 2, 6 und 24 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an L-Cystein	91
4.5.4.	Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und ausgewählter Zielgene nach 2, 6 und 24 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein	92
4.5.5.	Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP2 und ausgewählter Zielgene nach 2h Inkubation mit 5 mM L-Cystein	94
4.5.6.	Triglyceridkonzentration in HepG2-Zellen und im Inkubationsmedium nach 24 h Behandlung mit L-Cystein	93
4.5.7.	Cholesterinkonzentration in HepG2-Zellen nach 24 h Behandlung mit L-Cystein	95
4.5.8.	Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und ausgewählter Zielgene nach 2 und 6 h Inkubation mit L-Cystein und BSO	96
4.5.9.	Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP2 und ausgewählter Zielgene nach 2 und 6 h Inkubation mit L-Cystein und BSO	97
4.5.10.	Gesamtglutathion- und Cysteinkonzentration nach 6 h Inkubation mit L-Cystein und BSO	98
4.5.11.	Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und ausgewählter Zielgene nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein und 10 μ M CuSO ₄	98

5.	Diskussion	100
5.1.	Versuchsaufbau	101
5.2.	Wirkungen von Lupinenprotein auf den Cholesterinmetabolismus	102
5.3.	Wirkungen des Lupinenproteins auf den Triglyceridmetabolismus	113
5.4.	Wirkungen des Lupinenproteins auf die Körpermasse während der Laktation und Stillzeit	122
5.5.	Wirkungen des Lupinenproteins auf die Milchfettsynthese	123
5.6.	Cystein als mögliche bioaktive Komponente des Lupinenproteins	126
5.7.	Ausblick	130
6.	Zusammenfassung	133
7.	Summary	137
8.	Literaturverzeichnis	140

Abbildungsverzeichnis

Abbildungen

- Abbildung 1 Milchgewinnung bei einer laktierenden Ratte
- Abbildung 2 RNA-Gel von Darmmucosa bzw. Leber von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischer Diät mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Typ Vitabor
- Abbildung 3 SDS-Polyacrylamid-Gradientengel: Apolipoproteine in den Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL und HDL
- Abbildung 4 Gesamtglutathionkonzentration im Plasma von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*
- Abbildung 5 Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c; Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; Fatty Acid Synthase; Delta-9-Desaturase und Acyl-CoA:Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase in Rattenleber nach 2-wöchiger Fütterung von normo- oder hypercholesterinämischen Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*
- Abbildung 6 Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c; Fatty Acid Synthase und Delta-9-Desaturase in Rattenleber nach 2-wöchiger Fütterung mit hypercholesterinämischer Diät mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Probor, Vitabor und Boregine
- Abbildung 7 Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP2; HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor in Rattenleber nach 2-wöchiger Fütterung mit hypercholesterinämischer Diät mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Probor, Vitabor und Boregine
- Abbildung 8 unterschiedliche Körpermassenentwicklung der Jungtiere nach 6-wöchiger Fütterung der Muttertiere mit hypercholesterinämischer Diät mit 20% Casein oder Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Boregine TPE
- Abbildung 9 mittlere Körpermasseentwicklung der männlichen und weiblichen Jungtiere innerhalb 7-wöchiger Fütterung mit Standarddiät nach Absetzen vom laktierenden Muttertier

- Abbildung 10 Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma von laktierenden Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Boregine TPE
- Abbildung 11 Triglycerid- und Proteinkonzentrationen in der Milch laktierender Ratten am 14. Laktationstag nach 5-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Boregine TPE
- Abbildung 12 Relative hepatische mRNA-Konzentrationen von SREBP-2; HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor von weiblichen Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius*
- Abbildung 13 Relative hepatische mRNA-Konzentrationen von PPAR alpha; ACO und CPT-1 von weiblichen Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius*
- Abbildung 14 Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c; FAS und Delta-9-Desaturase in Milchdrüsen weiblicher Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius*.
- Abbildung 15 Proteinbanden vom LDL-Rezeptor in Lebern von Ratten durch Western Blot Analyse
- Abbildung 16 Relative Proteinkonzentration des LDL-Rezeptors in der Leber laktierender Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius*
- Abbildung 17 Korrelation zwischen relativem Proteingehalt von LDL-Rezeptor und relativer mRNA-Konzentration und LDL-Cholesterin-Konzentration
- Abbildung 18 Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c (A) und FAS (B) in HepG2-Zellen nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Arginin, L-Methionin, L-Cystein
- Abbildung 19 Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, FAS, G-6-PDH und Delta-9-Desaturase in HepG2-Zellen nach 2 h , 6 h und 24 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein

-
- Abbildung 20 Triglyceridkonzentration in HepG2-Zellen und im Zellüberstand nach 24 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein
- Abbildung 21 Cholesterinkonzentration in HepG2-Zellen nach 24 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein
- Abbildung 22 Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, FAS, G-6-PDH und Delta-9-Desaturase in HepG2-Zellen nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein, 1 mM BSO, Koinkubation von 5 mM L-Cystein + 1 mM BSO
- Abbildung 23 Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, FAS, G-6-PDH und Delta-9-Desaturase in HepG2-Zellen nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein, 10 μ M CuSO₄, Koinkubation von 5 mM L-Cystein plus 10 mM CuSO₄

Tabellenverzeichnis

Tabellen

Tabelle 1	Zusammensetzung der Diät in der ersten Studie V1
Tabelle 2	Zusammensetzung der Diät in der zweiten Studie V2
Tabelle 3	Zusammensetzung der Diät aus der dritten Studie V3
Tabelle 4	Zusammensetzung der Diät aus der vierten Studie V4
Tabelle 5	Reagenzien für die Auftrennung der Lipoproteinfraktionen
Tabelle 6	Zusammensetzung des Gradientengels
Tabelle 7	Zusammensetzung der verwendeten Puffer
Tabelle 8	Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel
Tabelle 9	Zusammensetzung der Puffer
Tabelle 10	Zusammensetzung des RT-Mastermix
Tabelle 11	Primersequenzen und Annealing Temperaturen der verwendeten Primer für Real-Time RT-PCR Analysen von Rattengewebe
Tabelle 12	Reagenzien für die DNA-Gel-Elektrophorese
Tabelle 13	Elutionsprofil Glutathion-, Cystein- und Homocysteinbestimmung
Tabelle 14	Zusammensetzung der Reagenzien
Tabelle 15	Elutionsprofil Tryptophan-Bestimmung
Tabelle 16	Primersequenzen und Annealing Temperaturen der verwendeten humanen Primer für real-Time RT-PCR Analysen
Tabelle 17	Leistungsparameter der Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normo-cholesterinämischer Diät mit Casein oder 1% bzw. 5% Lupinenprotein aus <i>L. albus</i>
Tabelle 18	Triglyzerid- und Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Leber von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normo-cholesterinämischer Diät mit Casein oder 1% bzw. 5% Lupinenprotein aus <i>L. albus</i>
Tabelle 19	Leistungsparameter der Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normo-(-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus <i>L. albus</i>

- Tabelle 20 Konzentrationen von Triglyceriden und Cholesterin in Plasma, Lipoproteinen und Leber von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normo- (-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*
- Tabelle 21 Fäzesmenge, Gallensäurekonzentration und Gallensäureexkretion bei Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normo- (-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*
- Tabelle 22 Insulin- und Glucagonkonzentrationen in Plasma von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normo- (-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*
- Tabelle 23 Apolipoproteinverteilung in den Lipoproteinen von Rattenplasma nach 2-wöchiger Fütterung von normo- (-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*
- Tabelle 24 Homocystein- und Cysteinkonzentrationen im Rattenplasma nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*
- Tabelle 25 relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Cholesterin- und Triglyzeridmetabolismus in Rattenlebern nach 2-wöchiger Fütterung Fütterung von normo- (-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*
- Tabelle 26 Leistungsparameter der Ratten nach 2-wöchiger Fütterung mit 5% Casein oder verschiedenen Sorten Lupinenprotein aus *L. angustifolius*
- Tabelle 27 Konzentrationen von Triglyceriden und Cholesterin in Plasma, Lipoproteinen und Leber von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 5% Casein oder verschiedenen Sorten Lupinenprotein aus *L. angustifolius*
- Tabelle 28 mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Cholesterin- und Triglyzerid-metabolismus in Rattenlebern nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischer Diät mit 5% Casein oder mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Probor, Vitabor und Boregine
- Tabelle 29 mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene im Skelettmuskel von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischer Diät mit 5% Casein oder mit 5% Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Vitabor

Tabelle 30	Leistungsparameter der weiblichen Ratten während der Laktation und der Trächtigkeit nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischer Diät mit 20% Casein oder Lupinenprotein aus <i>L. angustifolius</i> Sorte Boregine TPE
Tabelle 31	Leistungsparameter der Jungtiere vom Tag der Geburt bis zum 18. Laktationstag nach 6-wöchiger Fütterung der Muttertiere mit hypercholesterinämischer Diät mit 20% Casein oder Lupinenprotein aus <i>L. angustifolius</i> Sorte Boregine TPE
Tabelle 32	Konzentrationen von Triglyceriden und Cholesterin in Plasma, Lipoproteinen und Leber von laktierenden Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus <i>L. angustifolius</i> Sorte Boregine TPE
Tabelle 33	Konzentrationen von Triglyceriden und Cholesterin in Plasma und Leber von Jungtieren am 18. Laktationstag von Muttertieren, die 6 Wochen hypercholesterinämische Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus <i>L. angustifolius</i> Sorte Boregine TPE erhielten
Tabelle 34	Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Cholesterin- und Triglyceridmetabolismus in Lebern von weiblichen Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus <i>L. angustifolius</i>
Tabelle 35	Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Triglyceridmetabolismus in Rattenmilchdrüsen von weiblichen Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus <i>L. angustifolius</i>
Tabelle 36	Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Triglyceridstoffwechsels in HepG2-Zellen nach 2 h, 6 h und 24 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an L-Cystein
Tabelle 37	Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Cholesterin- stoffwechsels in HepG2-Zellen nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein oder Medium allein (Kontrolle)
Tabelle 38	Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Triglycerid- stoffwechsels in HepG2-Zellen nach 6 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein, 1 mM BSO oder 5 mM L-Cystein + 1 mM BSO
Tabelle 39	Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Cholesterin- stoffwechsels in HepG2-Zellen nach 2 und 6 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein, 1 mM BSO oder 5 mM L-Cystein +1 mM BSO
Tabelle 40	Gesamtglutathion- und Cysteinkonzentrationen in HepG2-Zellen nach 6 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein, 1 mM BSO und 5 mM L-Cystein + 1 mM BSO

Abkürzungsverzeichnis

a.d.	aqua dest.
ABC-G5	ATP-binding cassette transporter sub-family G member
ABC- A1	ATP-binding cassette transporter
ACE	Angiotensin Converting Enzym
ACO	Acyl CoA-Oxidase
AIN	American Institut of Nutrition
Apo-A1	Apolipoprotein A1
Apo-A5	Apolipoprotein A5
ApoE	Apolipoprotein E
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure
BSEP	Bile Salt Export Pump
CD 36	Cluster of Differentiation 36
CETP	Cholesterol Ester Transfer Protein
CPT-1	Carnitine palmitoyltransferase I
Cyp7A1	Cholesterin-7-alpha-Hydroxylase 1
CYP4A1	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Delta-9-D.	Delta-9-Desaturase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FATP	Fatty Acid Transport Protein
FAS	Fettsäuresynthase
FXR	Farnesoid X Rezeptor
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
Glut-4	Glucosetransporter Typ 4
GPAT	Glycerol-3-Phosphate O-Acyltransferase
GSH	Glutathion
GSH-Px	Glutathionperoxidase
HL	Hepatische Lipase
HCl	Salzsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA-R.	β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA-Reduktase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Körpermasse
KMZ	Körpermassezunahme
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R.	Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor
LPL	Lipoproteinlipase
LXR- α	Leber-X Rezeptor
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
N	Stickstoff
NEFA	Not Esterified Fatty Acids
NRC	National Research Council

PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PPAR α	Peroxisome Proliferator aktivierter Rezeptor α
PTP-1b	protein tyrosine phosphatase
Rel.	relativ
RIA	Radioimmunoassay
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP-HPLC	Reverse-Phase-Chromatographie
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAA	schwefelhaltige Aminosäuren
SCAP	SREBP cleavage activating protein
SDS-Page	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SR-B1	Scavenger receptor class B, type I
SRE	Sterol Response Elements
SREBP	Sterol Regulatory Element-binding Protein
Std.	Standard
TG	Triglyceride
TM	Trockenmasse
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
TPE	Totalproteinextrakt
UPR	unfolded protein response
U/ min	Umdrehungen pro Minute
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
β -Actin	beta-Actin

1. Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems wie Herzinfarkt und Schlaganfall zählen zu den häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrieländern. Atherosklerose ist hauptverantwortlich für die Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen. Ursachen hierfür sind dabei unter anderem Imbalancen im Lipidstoffwechsel, die häufig zu klinischen Problemen führen. Es wird bereits angenommen, dass bis zu 30% der mitteleuropäischen Bevölkerung an der häufig noch unentdeckten Atherosklerose leiden. Dabei ist u.a. durch Fehl- und Mangelernährung in den Industrieländern der Cholesterin- und Triglyceridspiegel seit einigen Jahrzehnten aus dem Gleichgewicht geraten. Besonders das Verhältnis zwischen low density lipoprotein - (LDL) und high density lipoprotein (HDL) - Cholesterin hat sich deutlich verschoben (Grundy et al. 1998, Gotto et al. 1998). Ein ungünstiges Verhältnis dieser Lipoproteine zueinander zählt neben Übergewicht, Diabetes, Nikotinabusus und arterieller Hypertonie zu den gesicherten Risikofaktoren und ausreichenden Stimuli für kardiovaskuläre Erkrankungen (Law et al., 1994, Grundy et al., 2004, Greene et al. 2005). Unter allen Risikoparametern einer Atherosklerose bzw. koronaren Herzerkrankung erwies sich LDL-Cholesterin mit dem höchsten prognostizierbaren Wert (Law et al. 1994, Adult Treatment Panel III 2002). Ein hoher LDL-Cholesterinspiegel im Blut korreliert mit dem Risiko des Auftretens einer koronaren Herzerkrankung (KHK). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Veränderungen des zellulären Cholesterinstoffwechsels bei der Entwicklung von Atherosklerose bzw. KHK eine bedeutende Rolle spielen. Neben erhöhten LDL-Cholesterinkonzentrationen können auch niedrige HDL-Cholesterinkonzentration die Gefahr an einer KHK zu erkranken, erhöhen (Kottke et al. 1988, Vega und Grundy 1996). HDL-Lipoproteine sind für den Abtransport von Cholesterin aus der Peripherie und dem Blut zurück zur Leber verantwortlich (Norum et al. 1983, Miller et al. 1987). Das bedeutet, dass zwischen niedrigen HDL-Cholesterinkonzentrationen im Blut und der Inzidenz an KHK zu erkranken eine inverse Beziehung besteht (Badimon et al. 1992).

Atherosklerose entsteht durch komplexe pathophysiologische Vorgänge an den Gefäßwänden. Eine der ersten großen Studien, die diesen Zusammenhang darstellte, war die Framingham Study von 1971, in der gezeigt wurde, dass die Senkung des Cholesterinspiegels eine geringere Inzidenz der KHK zur Folge hat (Kannel et al. 1971). Es gibt inzwischen zahlreiche Untersuchungen, die beweisen konnten, dass eine Erniedrigung der Serum- und LDL-Cholesterinkonzentration zu einer Verringerung kardiovaskulärer Letalität und der Prävalenz

kardiovaskulärer Krankheiten führt (Grundy et al. 1985, Babiak et al. 1987, Heyden et al. 1988, Feher et al. 1989, Baigent et al. 2005).

Cholesterin ist ein essentieller Bestandteil von Zellmembranen und Ausgangsverbindung für die Synthese von Steroidhormonen und Gallensäuren und wird mit der Nahrung aufgenommen. Cholesterin wird endogen hauptsächlich in der Leber gebildet und im Dünndarm resorbiert, zirkuliert dann größtenteils verpackt als LDL-Cholesterin in der Peripherie. Dabei wird das Cholesterin bevorzugt vom membranständigen LDL-Rezeptor mittels Endozytose eingeschleust. Das LDL-gebundene Cholesterin wird in der Zelle zu freiem Cholesterin verstoffwechselt und bewirkt eine Hemmung des Schlüsselenzyms der Cholesterinbiosynthese, der 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase). Gleichzeitig wird auch die Expression des LDL-Rezeptors gehemmt. Ist die Zelle also ausreichend mit Cholesterin versorgt, wird auch weniger endogenes Cholesterin gebildet. Die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase und des LDL-Rezeptors regulieren die Konzentration des LDL-Rezeptors und damit gleichzeitig die Konzentration an Cholesterin im Plasma. Es ist bekannt, dass der LDL-Rezeptor für die Cholesterinaufnahme in periphere Zellen, durch maßgebliche Regulation von zirkulierendem LDL-Cholesterin, verantwortlich ist (Meddings et al. 1986). Neben einer erblich bedingten Hypercholesterinämie wird vor allem fettreiche Ernährung ursächlich für erhöhte LDL-Cholesterinspiegel verantwortlich gemacht. Zur Therapie werden vorwiegend HMG-CoA-Reduktase-Hemmer aus der Wirkstoffgruppe der Statine eingesetzt (Walker et al. 1986, Mantell et al. 1989, Gomez-Perez et al. 1992, Scharnagl et al. 2004). Deshalb erscheint es wirtschaftlich immer interessanter, potentielle Inhaltsstoffe für funktionelle Nahrungsmittel zu identifizieren, die ebenso eine Cholesterinsenkung bewirken könnten, wie medikamentöse Behandlungen, die in der Regel mit hohen Kosten und Nebenwirkungen verbunden sind. Vor allem bei Menschen mit einem leicht erhöhten, aber noch nicht medikamentös behandlungsbedürftigen Cholesterinspiegel kann eine Umstellung der Ernährungsgewohnheiten einen entscheidenden Beitrag zur Krankheitsprävention leisten.

Neben hohen Plasma-Cholesterinspiegeln stellen auch erhöhte Triglyceridkonzentrationen im Blut einen Risikofaktor für Atherosklerose dar (Kraus et al. 1998), vor allem wenn gleichzeitig LDL-Cholesterin erhöht und HDL-Cholesterin erniedrigt ist (Vega und Grundy 1996). Triglyceride unterliegen in besonderem Maße nahrungsbedingten Abhängigkeiten und sollten deshalb auch vor allem im fortgeschrittenen Alter engmaschig kontrolliert werden (Kris-Etherton et al. 1997). Nahrungstriglyceride werden im Darm resorbiert und gelangen in Form von Chylomikronen in die Blutbahn. Im Depotfett stellen

Triglyceride eine wichtige Energiespeicherform dar. Endogen in Leber und Fettgewebe gebildete Triglyceride werden in Very-Low-Density Lipoprotein (VLDL) und Intermediate-Density-Lipoprotein (IDL) -Lipoproteinpartikel verpackt und im Blut zur Peripherie transportiert. Die Metabolisierung erfolgt mittels hormonsensitiver Lipase, welche die Triglyceride in freie Fettsäuren aufspaltet. Exogen zugeführte Nahrungstriglyceride werden durch die Pankreaslipase in Monoglyceride und Fettsäuren hydrolysiert und im Dünndarm resorbiert. In der Darmepithelzelle werden dann erneut Triglyceride synthetisiert und mittels Chylomikronen über den Ductus thoracicus in die venöse Blutbahn zur Peripherie transportiert.

Es ist inzwischen bekannt, dass neben Kohlenhydraten und Fetten auch Nahrungsproteine maßgeblich den Lipidstoffwechsel (Jaques 1990, Lindholm et al. 1991/1993, Jaques et al. 1995, Kayashita et al. 1997, Brandsch et al. 2006) beeinflussen können. Dabei ist zwischen pflanzlichen und tierischen Proteinen zu unterscheiden. Frühere Studien, in denen tierisches Protein durch pflanzliches Protein, wie beispielsweise Soja ersetzt wurde, zeigten ausschließlich signifikante Verbesserungen der kardiovaskulären Risikofaktoren, wie erhöhtes Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyceride (Caroll et al. 1991, Bakhit et al. 1994, Anderson et al. 1995, Caroll und Kurowska 1995, Sirtori et al. 1995, 2001, Iritani et al. 1996, Sugiyama et al. 1996, Ni et al. 1998, Potter et al. 1998, Wang et al. 1998, Koba et al. 2003, Zhan und Ho 2005, Shukla et al. 2007). Eine Ausnahme bildet jedoch das Fischprotein, dessen Wirkung in verschiedenen Studien kontrovers diskutiert wird. Zum einen wurde in einige Studien an Ratten (Murata et al. 2002, Ait Yahia et al. 2005) und einem Versuch an Kaninchen (Bergeron et al. 1992) beobachtet, dass sich nach Verfütterung von Fischprotein der Triglyceridspiegel in Plasma und VLDL im Vergleich zu Casein erniedrigte. Andere Studien an Ratten fanden jedoch keinen Einfluss von Fischprotein auf den Triglyceridspiegel in Plasma und VLDL (Yahia et al. 2003, Wergedahl et al. 2004).

Bisher gibt es nur eine begrenzte Anzahl an untersuchten Proteinen. Leguminosen stellen dabei eine wertvolle Quelle für Nahrungsproteine dar. Sojaprotein gehört zu den am häufigsten eingesetzten Leguminosen in der Humanernährung. Neben dem ernährungsphysiologischen Nutzen durch seine hohe biologische Eiweißwertigkeit gilt Sojaprotein als triglycerid- (Tovar et al. 2002, Ascencio et al. 2004, Shukla et al. 2007) und cholesterinsenkend (Anderson et al. 1995, Sirtori et al. 1995, Sugiyama et al. 1996, Iritani et al. 1996, Sirtori et al. 1998, Tovar et al. 2002, Koba et al. 2003). Durch den Einsatz von Sojaprotein beim Menschen und an zahlreichen Tiermodellen konnte das Serum- und LDL-Cholesterin signifikant gesenkt und das HDL-Cholesterin erhöht werden (Terpstra et al. 1984/

1991, Potter 1993/ 1996, Tovar et al. 2002, Ascencio et al. 2004, Shukla et al. 2007, Velasquez 2007, Xiao et al. 2008.). Erste Studien wurden bereits ab den 70er Jahren durchgeführt (Sirtori et al. 1977, 1979, Descovich et al. 1980, Carroll, 1982). Die vielfältigen lipidsenkenden Wirkungen von Sojaprotein haben bereits dazu geführt, dass Soja einen Health Claim erlangte (Food and Drug Administration. Fed Regist 1999).

Bereits viele Male wurde über den hypotriglyceridämischen und –cholesterinämischen Effekt von Sojaprotein diskutiert, aber welche der Sojakomponenten für diesen Effekt verantwortlich sind, ist nach wie vor unklar. Frühere Studien vermuteten, dass die hohen Isoflavongehalte in Sojaprotein für die lipidsenkenden Wirkungen verantwortlich sind (Anderson et al. 1995, Kirk et al. 1998, Adams et al. 2002). Inzwischen deuten aber neuere Studien darauf hin, dass die positive Wirkung der Sojabohne durch das Protein per se hervorgerufen wird (Lichtenstein et al. 2002, Shukla et al. 2007, Nagarian et al. 2007, Cho et al. 2008). Tachibana et al. (2005) fanden heraus, dass Isolate aus Sojaprotein signifikant die Expression von Genen des Steroidabbaus erhöhten, was wiederum in einer Reduktion des Serumcholesterinspiegels resultierte. Andere Experimente an isolierten Hepatozyten haben gezeigt, dass bestimmte Peptidkomponenten des Sojaproteins die LDL-Expression stimulieren können (Lovati et al. 1992, Lovati et al. 1996).

Bislang wird besonders im asiatischen Raum fast ausschließlich Soja als pflanzliche Proteinquelle genutzt, allerdings steigt seit einiger Zeit die Anzahl gentechnisch veränderter Sorten an. Es ist inzwischen schwierig, nicht gentechnisch veränderter Lebensmittel aus Soja zu erhalten. Da gentechnisch veränderte Nahrungsmittel von Verbrauchern abgelehnt werden, gelten alternative pflanzliche Proteinquellen als wirtschaftlich immer interessanter. Neben Fisch-, Kartoffel-, Ei- und anderen Nahrungsproteinen ist in den letzten Jahren immer mehr das Lupinenprotein in den Focus der Wissenschaft gerückt. So gilt das Lupinenprotein als weiterer Vertreter der pflanzlichen Proteine als viel versprechende Alternative zu herkömmlich eingesetzten Nahrungsproteinen. Die Lupine gilt als reines Naturprodukt, von dem bisher keine gentechnisch veränderten Produkte auf dem Lebensmittelmarkt sind. Die Lupine zählt wie Soja zu den Leguminosen. Sie hat einen ähnlich hohen Protein- und Aminosäuregehalt, ist reich an Nicht-Stärke-Polysacchariden und Oligosacchariden (von Barneveld et al. 1999), aber ärmer an Öl und Isoflavonen (Gueguen et al. 1994, Katagiri et al. 2000). Die Geschichte der Lupine reicht schon über Jahrtausende zurück. Damals wurden meist Pflanzen der weißen Lupine als Futterpflanzen oder für medizinische Zwecke angebaut. Erst im zwanzigsten Jahrhundert wurden neue alkaloidarme Sorten für den menschlichen Verzehr gezüchtet. In Deutschland werden vorwiegend Süßlupinen der weißen Lupine

(*Lupinus albus*), der blauen Lupine (*Lupinus angustifolius*) und der gelben Lupine (*Lupinus luteus*) angebaut (Gesellschaft zur Förderung der Lupine e.V. 2007). In Südamerika, Australien und weiten Teilen Europas wird darüber hinaus auch noch eine weitere Sorte der Süßlupine angebaut, *Lupinus mutabilis*. Vorteile gegenüber anderen Nahrungsproteinen sind die geringen Gehalte an Isoflavonen und Alkaloiden und Lupinenproteine enthalten nur geringe Mengen an antinutritiven Inhaltsstoffen wie Phytaten, Tanninen, Lectinen und Proteaseinhibitoren (Evans et al. 1993, Muzquiz et al. 1998, Champ et al. 2001). Das Lupinenprotein besitzt ideale technofunktionelle und sensorische Eigenschaften und ist daher besonders gut als Lebensmittelzutat geeignet (Duranti et al. 1997) und bildet deshalb die Grundlage für eine optimale Verbraucherakzeptanz. Wie auch bei anderen proteinhaltigen Nahrungsmitteln, kann es auch beim Verzehr von Lupinenprotein zu einer allergischen Reaktion kommen. Dabei handelt es sich meist um eine Kreuzallergie mit Erdnuss (Shaw et al. 2008). Es ist daher notwendig, lupinenhaltige Lebensmittel entsprechend zu deklarieren. Inzwischen ist es sogar gesetzlich verpflichtend, Lupinen in Nahrungsmitteln zu kennzeichnen. Lupinensamen enthalten als Speicherproteine vorwiegend Globuline und weniger Albumine (Verhältnis 9:1) (Osbourne et al. 1924). Dabei werden die Globuline von 2 Hauptfraktionen gebildet, den hochmolekularen β -Conglutinen und den α -Conglutinen. Neben diesen Hauptfraktionen sind auch γ - und δ -Conglutine enthalten. Die unterschiedlichen Fraktionen können durch spezielle Extraktionsverfahren getrennt und isoliert werden (Wait et al. 2005).

In den letzten Jahren konnte bereits gezeigt werden, dass Lupinenprotein hypolipidämisches Potential aufweist. In vorangegangenen tierexperimentellen Studien konnten physiologische Wirkungen der Süßlupine auf den Lipidstoffwechsel aufgezeigt werden. Bereits 1998 zeigten erste Studien an Ratten, dass die Verfütterung von Lupinensaatmehl zu einer Cholesterinsenkung führte (Rahman et al., 1998). In einer weiteren Untersuchung führte die Verfütterung einer mit Protein aus weißer Lupine angereicherten semisynthetischen Diät an Ratten zu einer signifikanten Erniedrigung des Serumcholesterins um 21% und des LDL-Cholesterins um 30% im Vergleich zu Casein-gefütterten Ratten (Sirtori et al. 2004). Die Autoren fanden heraus, dass möglicherweise eine gesteigerte Aktivität des LDL-Rezeptors dafür verantwortlich ist. Untersuchungen an Leberzellen lieferten Hinweise, dass es durch Lupinenprotein zu einer gesteigerten Cholesterinaufnahme in die periphere Zelle kommt und somit die Cholesterinkonzentrationen im Plasma sinken. Ähnliche Ergebnisse zeigten Studien an Schweinen, die das Protein der blauen Lupine erhielten (Martins et al. 2005). Dabei wurde durch Verabreichung von Lupinendiät das

Plasma- und das LDL-Cholesterin im Vergleich zur Kontrolldiät mit Casein gesenkt. Außerdem erniedrigte sich das LDL- zu HDL-Cholesterin-Verhältnis um 25%. Neueste Studien unserer Arbeitsgruppe haben außerdem gezeigt, dass die LDL-Cholesterin-Konzentrationen auch beim Menschen signifikant reduziert wurden (Weiße et al. 2009b).

Da die präzisen Stoffwechselwege der lipidsenkenden Lupinenproteine jedoch nach wie vor weitgehend unbekannt sind, wurden die vorliegenden Studien (V1-V5) dazu genutzt, um die Mechanismen einer solchen Lipidprofilveränderung aufzuklären. Es gibt 2 Hauptmechanismen, wie Lupinenprotein auf den Lipidmetabolismus wirken kann. Zum einen könnte Lupinenprotein entweder direkt oder indirekt auf Enzyme oder Rezeptoraktivitäten wirken, wie kürzlich erschienene Untersuchungen am LDL-Rezeptor zeigten (Sirtori et al. 2004). Ein anderer möglicher Mechanismus berücksichtigt die transkriptionelle Regulierung von Genen, die in die Synthese, der Aufnahme und dem Abbau von Lipiden involviert sind. Eine veränderte Transkriptionsrate kann letztendlich auch zu einer veränderten Aktivität eines Transporters, Rezeptors oder Enzyms führen. Eine Reihe vorangegangener Studien, welche die Wirkungen von Soja- und Fischprotein untersuchten, konnten proteinspezifische Effekte auf die mRNA-Konzentration lipogener Enzyme in der Leber aufzeigen (Tovar et al. 2002, Mullen et al. 2004, Shukla et al. 2007). Es ist bekannt, dass Sojaprotein durch Verringerung der hepatischen Fettsäuresynthese mittels sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c)-Downregulation Plasma- und Lebertriglyceride senken kann (Tovar et al. 2002/2005, Nagasawa et al. 2003, Ascencio et al. 2004, Shukla et al. 2007). Dies weist daraufhin, dass Nahrungsproteine die SREBP-vermittelte Transkription hepatischer Gene der Fettsäuresynthese verändern können. Das führte zu der Hypothese, dass auch Lupinenprotein durch Beeinflussung der Genexpression oder proteolytischer Aktivierung des SREBP-1c in der Leber, einen Einfluss auf den hepatischen Lipidstoffwechsel haben könnte. Dabei rückt die Regulation durch hepatische Transkriptionsfaktoren, wie dem SREBP-1c und dem sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP 2) in das besondere Interesse der Untersuchungen. Das Lipidgleichgewicht in Wirbeltierzellen ist hauptsächlich reguliert durch eine Familie von membrangebundenen Transkriptionsfaktoren, den SREBP's. Die Kopplung zwischen Stoffwechsel und Genregulation erfolgt insbesondere durch diese zelluläre Regulatoren. SREBP's können direkt die Expression von mehr als 30 Genen aktivieren. Die SREBP's gehören zu einer Gruppe von cholesterinsensitiven Transkriptionsfaktoren, die als Vorläuferproteine im rauen endoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind und zur Familie der bHLH- Zip (basic Helix Loop Helix Lecine Zipper)-Proteine gehören. SREBPs translozieren nach proteolytischer Spaltung in den Zellkern und aktivieren dort durch Bindung bestimmte

Promotoren SREBP-regulierter Gene, welche beispielsweise für den LDL-Rezeptor oder die HMG-CoA-Reduktase kodieren. Es kommt so zu einer vermehrten LDL-Rezeptor-vermittelten Cholesterinaufnahme in periphere Zellen durch entsprechende SREBP2-Genaktivierung (Wang et al. 1994). Sie gelten als Schlüsselregulatoren der Cholesterinbiosynthese und aktivieren wichtige Enzyme für die zelluläre Aufnahme von Lipiden (Horton et al. 1999). Dabei gilt SREBP2 als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Regulation des Cholesterinspiegels durch Aktivierung der Expression von Genen, die für die Cholesterinsynthese kodieren (Vallet et al. 1996, Horton et al. 2002) und SREBP-1c ist für die Regulation von Schlüsselenzymen der Fettsäuresynthese verantwortlich. Um die Hypothese zu bestätigen, dass Lupinenprotein die SREBP-vermittelte Transkription hepatischer Gene des Lipidstoffwechsels beeinflusst, wurden neben den mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c und SREBP2 auch ausgewählte Zielgene bestimmt. Zu den Zielgenen des SREBP-1c gehören unter anderem die Fettsäuresynthetase (FAS), die Delta-9-Desaturase (D-9-Des.) und die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH), zu den Zielgenen des SREBP2 zählen vor allem HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor (Horton et al. 1999, Shimano 2001, Goldstein and Brown 2002, Schweizer et al. 2002). Auch Insulin und Glucagon gelten als relevante Parameter der Lipogenese. Insulin erhöht die Transkription und die Aktivität des SREBP-1c. Das bedeutet, dass Insulin entscheidend an der Genregulation einiger Zielgene für die Fettsäuresynthese beteiligt ist (Kim et al. 1998, Foretz et al. 1999). Deshalb wurde auch die Menge an zirkulierendem Insulin und Glucagon bestimmt. Es gibt jedoch auch Gene, die SREBP-unabhängig für eine proteininduzierte Veränderung des Triglycerid- und Cholesterinmetabolismus verantwortlich sein können. So spielen beispielsweise Lipoproteinlipase (LPL), hepatische Lipase (HL) oder Apolipoprotein 5 (Apo A5) eine kritische Rolle bei der Hydrolyse zirkulierender Triglyceride (Mead et al. 2002, Santamarina-Fojo et al. 2004). Aber auch Peroxisome Proliferator aktivierter Rezeptor α (PPAR α)-regulierte Gene, die in die Oxidation von Fettsäuren involviert sind, wie Carnitin-Palmitoyltransferase (CPT)-1a, Acyl-CoA-Oxidase (ACO) und Cytochrom P450 (Cyp) 4A1 und hepatische Gene, wie Cholesterol 7 α -Hydroxylase (Cyp7A1), Liver X Rezeptor (LXR), ATP-binding cassette transporter (ABC)-A1, Acyl-CoA cholesterol Acyltransferase (ACAT), Lecithin:cholesterol Acyltransferase (LCAT) und Class B type 1 Scavenger Rezeptor (SR-B1) könnten helfen, die möglichen Mechanismen aufzuklären, wie und wodurch Lupinenprotein den Lipidmetabolismus maßgeblich beeinflusst.

Daher bestand die Zielsetzung dieser Arbeit darin, die Wirkung von Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel insbesondere auf die Plasmalipide unter hyper- und

normolipämischen Bedingungen zu untersuchen, die Aufklärung der Wirkung von Lupinenproteinen aus verschiedenen Sorten, die Wirkungen von Lupinenprotein auf die Milchfettsynthese bei laktierenden Ratten und die Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen unter Verwendung eines Tiermodells und anhand der Zellkultur.

2. Zielstellung

Zur Beantwortung der Zielstellung wurden insgesamt 5 Untersuchungen durchgeführt. In den Versuchen 1-3 sollte geklärt werden, welche lipidsenkenden Wirkungen von isoliertem Lupinenprotein unter normo- und hyperlipämischen Bedingungen ausgehen und ob Lupinenprotein den Lipidstoffwechsel modifizieren kann. Als Kontrollprotein wurde bei diesen Untersuchungen Casein oder Eialbumin entsprechend dem Bedarf an essentiellen Aminosäuren eingesetzt. Als Studienmodelle für diese Untersuchungen wurden adulte und wachsende Ratten gewählt. Nager gelten als hervorragende Studienspezies, weil sie als Labortiere optimal unter standardisierten Versuchsbedingungen gehalten und gefüttert werden. Dabei wurden die Proteinisolate aus weißer und blauer Lupine entsprechend der Fragestellung in verschiedenen Konzentrationen semisynthetischen Diäten beigemischt und den Tieren über einen Zeitraum von 2-3 Wochen verabreicht.

In Untersuchung 4 sollte geklärt werden, welche Wirkung Lupinenprotein auf die Milchfettsynthese hat und ob sich die lipidmodulierenden Wirkungen von Lupinenprotein auch bei trächtigen und laktierenden Ratten und ihren Nachkommen abzeichnen. Als Untersuchungsmodell hierfür dienten weibliche Ratten, die während der Verpaarung, Gestation und Laktation eine mit Lupinenprotein angereicherte hypercholesterinämische Diät supplementierten.

Ziel der 5. Untersuchung war es zu aufzuklären, welcher Inhaltsstoff des Lupinenproteins für die lipidsenkenden Wirkungen verantwortlich ist. Dafür wurde als Untersuchungsmodell eine hepatische Zellkultur gewählt, um so optimal mögliche isolierte Wirkungen einzelner Aminosäuren näher zu charakterisieren.

2.1. Wirkung von Lupinenprotein der weißen Lupine unter normo- und hyperlipämischen Bedingungen

Zunächst sollte untersucht werden, welche modifizierenden Wirkungen weiße Lupinen auf das Lipidprofil bei adulten Ratten haben. In einem ersten Versuchsansatz (**V1**) erhielten die Versuchstiere eine normocholesterinämische Diät ohne zusätzliche Zulage an Cholesterin oder Choleat. In den meisten Rattenstudien, welche die Wirkung von Pflanzenproteinen auf den Lipidstoffwechsel untersuchten, enthielt die Diät eine beachtliche Menge von bis zu 25% Protein (Madani et al. 1998, Ascencio et al. 2004, Tovar et al. 2005, Shukla et al. 2007, Yang et al. 2007). In dieser ersten Studie wurde Sprague Dawley Ratten über eine 2-wöchige

Fütterungsperiode 2 verschiedene Stufen (bis zu 5 %) des Proteinisolates Typ E aus *Lupinus albus* verabreicht, weil vermutlich diese moderaten Gehalte die gegenwärtige humane Ernährungssituation besser darstellen. Die Kontrollgruppe erhielt als Referenzprotein Casein. Einige vorangegangene Studien konnten bereits belegen, dass der hypocholesterinämische Effekt des Sojaproteins speziell in hypercholesterinämischen Individuen auftritt (Carroll 1991). Verschiedene Studien belegen, dass durch eine künstlich erzeugte Hypercholesterinämie größere Effekte zu erwarten sind (Iritani et al. 1979, Iwata et al. 1993, Kayashita et al. 1997, Shibata et al. 2001, Mawatari et al. 2003, Sirtori et al. 2004, Martins et al. 2005, Kayashima et al. 2005, Sudhakar et al. 2006, Sen et al. 2006). Eine andere Studie an wachsenden Ratten hat gezeigt, dass die Verfütterung von Reisprotein größere lipidsenkende Wirkungen aufweist, wenn zusätzlich Cholesterin supplementiert wurde (Yang et al. 2007). Allerdings ist bisher wenig darüber bekannt, ob auch unter normocholesterinämischen Bedingungen solche Effekte auftreten. Unsere Hypothese ist, dass der hypocholesterinämische Effekt vom Ausgangslevel der zirkulierenden Lipide abhängt. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass sich durch Verfütterung eines Proteinextraktes aus *Lupinus albus* die Serumtriglyceride, sowie die Triglyceride in den VLDL und in der Leber deutlich erniedrigten (Spielmann et al. 2007). Deshalb sollte nun in einem weiteren Versuchsansatz (V2) untersucht werden, ob auch hypocholesterinämische Effekte zu erwarten sind, wenn man zusätzlich zur Kontroll- und Behandlungsdiät Cholesterin und Choleat verfüttert. Hyperlipämische Bedingungen lassen sich im Nagermodell nur unter Zugabe von Cholesterin und Choleat erreichen (Nath's hypercholesteremic diet, Nath et al. 1953). Um herauszufinden, in welchem Konzentrationsbereich Effekte zu erwarten sind, wurde in einem mehrfaktoriellen Versuchsansatz adulten Ratten entweder eine normocholesterinämische oder eine hypercholesterinämische Diät verabreicht. Dabei wurden adulten Sprague Dawley Ratten über eine zweiwöchige Fütterungsperiode entweder 50 g/kg Lupinenprotein mit 1 % Cholesterin und 0,5 % Choleat oder nur Lupinenprotein verabreicht. Auch in dieser Untersuchung entschieden wir uns für eine 5%ige Proteinzulage, entweder Lupinenprotein der weißen Lupine oder als Referenzprotein Casein.

2.2 Wirkung von Lupinenprotein aus verschiedenen Sorten der blauen Lupine

In einem weiteren Versuch (V4) wurde 4 Wochen alten Ratten über eine 17-tägige Fütterungsperiode verschiedene Proteinextrakte aus *Lupinus angustifolius* (Boregine, Probor, Vitabor) verabreicht. Aufgrund des hohen Proteingehaltes, der Stickstoffbindungsqualitäten

und ökologischer Widerstandsfähigkeit bietet auch die blaue Lupine interessante Perspektiven für die Nahrungsmittelindustrie und die Agrarökologie. Außerdem besitzt die blaue Lupine hervorragende sensorische Eigenschaften für eine optimale Verbraucherakzeptanz. Eine Studie an Schweinen konnte zeigen, dass Lupinensaat der blauen Lupine die LDL-Cholesterinkonzentration im Vergleich zu Casein senken kann (Martins et al. 2005). Bisher ist nicht bekannt, ob auch isolierte Proteine der blauen Lupine solche hypocholesterinämischen Effekte erzielen können. Daher hatte die 3. Studie das Ziel, zu untersuchen, welche Effekte von totalem Proteinextrakt (TPE) verschiedener Sorten der blauen Lupine (Probor, Vitabor, Boregine) auf die Konzentrationen von Plasmalipiden, Lipoproteinen und Leberlipiden in Ratten ausgehen. Einige Studien deuten an, dass spezifische Polypeptide der Leguminosen wie β -Conglycinin von Soja (Manzoni et al. 2003, Kohno et al. 2006) und Conglutin γ (Sirtori et al. 2004) von weißer Lupine zum hypolipämischen Effekt beitragen können. Um ein mögliches hypolipämisches Potential von Conglutinen zu testen, bekam eine Versuchsgruppe einen α -/ β -Conglutin-beihaltenden Totalproteinextrakt TPE vom Typ Boregine. Derartige Eiweißkonzentrate dürfen Tierfutter und Lebensmitteln ohne negative Auswirkungen auf Wachstum, Stickstoffbilanz oder den Geschmack des Lebensmittels bis ca. 10% Anteil zugesetzt werden (Bundesinstitut für Risikobewertung 2005). Es gibt bereits Hinweise, dass isoliertes Conglutin die LDL-Aufnahme über die Stimulation des LDL-Rezeptors erhöht (Sirtori et al. 2004). Es wurden diesmal wachsende Ratten eingesetzt, weil noch größere Effekte als bei adulten Ratten erwartet wurden. Auch in diesem Versuch wurden 5% des jeweiligen Proteins eingesetzt und allen Versuchstieren eine hypercholesterinämische Diät verabreicht. Als Basisprotein wurde diesmal Eialbumin gewählt.

2.3. Wirkungen von Lupinenprotein auf die Milchfettsynthese bei laktierenden Ratten

Die beobachteten Effekte von Lupinenprotein auf den Lipidmetabolismus wurden bisher explizit in adulten und wachsenden Ratten gefunden. Im Gegensatz zur Wirkung von Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel beim wachsenden Tier, sind die Auswirkungen von Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel bei trächtigen und laktierenden Ratten weitgehend unbekannt. Auch jüngste Veröffentlichungen über die Effekte von Lupinenprotein auf zirkulierende Lipide und den Lipidstoffwechsel zeigen ausschließlich Daten von wachsenden und adulten Ratten, Schweinen, Schafen und Hühnern (Ponnampalam et al. 2002, Sirtori et al. 2004, Martins et al. 2005, Viveros et al. 2007). Deshalb hatte eine vierte tierexperimentelle Studie (V4) zum Ziel, die Wirkung von Lupinenprotein aus *Lupinus angustifolius* während

der Trächtigkeit und der Laktation auf die Lipidkonzentration von Plasmalipoproteinen, Leber und Milch bei den Muttertieren, die eine hypercholesterinämische Diät erhielten, zu untersuchen. Bekannt ist, dass sich der Lipidmetabolismus während der Trächtigkeit und Laktation vom Lipidmetabolismus während des Wachstums unterscheidet. So sinkt während der Spätschwangerschaft die Lipoproteinlipase-Aktivität in der Leber, steigt allerdings in der Milchdrüse an (Herrera et al. 1988). Diese Veränderungen spielen eine entscheidende Rolle für das Schicksal zirkulierender Triglyceride, weil diese weg von der Aufnahme in die Leber zur Milchdrüse für die Milchfettsynthese wandern. Daher war eine unserer Hypothesen, dass Lupinenprotein, welches maßgeblich die Lipogenese vermindern kann, auch während der Laktation milchfettensenkend wirken könnte, weil die Lipogeneseaktivität per se in der Milchdrüse ansteigt. Weiterhin ist bisher bekannt, dass mütterliche Hypertriglyceridämie eine Besonderheit während der Schwangerschaft ist und stark korrespondiert mit einer Akkumulierung von Triglyceriden nicht nur in VLDL-, sondern auch in LDL- und HDL-Partikeln (Herrera 2002). Die Milch-Triglyceridsynthese hängt dabei von der Verfügbarkeit der Fettsäuren in der Milchdrüse ab, welche von 2 verschiedenen Quellen abstammen können. So können zum einen Fettsäuren in den Milchdrüsenzellen *de novo* synthetisiert werden. Das geschieht durch die Aktivierung lipogener Enzyme, die durch SREBP-1c kontrolliert werden (Barber et al. 2003). Eine andere Möglichkeit für die Milch-Triglyceridsynthese bilden lipoproteingebundene Fettsäuren aus dem Plasma oder unveresterte Fettsäuren, welche vom Fettgewebe freigesetzt wurden. Diese Fettsäuren werden danach in die Milchdrüse aufgenommen (Scow et al. 1977). Da inzwischen Lupinenprotein verbreitet in der Futter- und Nahrungsmittelindustrie eingesetzt wird, wurden Untersuchungen durchgeführt, die einen möglichen Effekt des Lupinenproteins auf den Milchfettgehalt und den Lipidstoffwechsel bei laktierenden Ratten nachweisen können. Da in bislang durchgeführten Studien zum Teil sehr deutliche Effekte durch Lupinenprotein auf den Triglyceridstoffwechsel festgestellt wurden, sollte in dieser Studie (V4) getestet werden, inwieweit Lupinenprotein der blauen Lupine den Lipidmetabolismus, sowie den Triglyceridgehalt der Milch laktierender Ratten durch Beeinflussung der mRNA-Expression der SREBP's und weiterer relevanter Gene, die in die Regulation des Plasma- und Gewebelipidstatus eingreifen, beeinflussen kann. Auch in diesem Fütterungsversuch wurden Ratten als Versuchstiere gewählt, weil Ratten ähnliche Veränderungen im Lipidstoffwechsel während der Trächtigkeit und Laktation aufzeigen wie Menschen (Smith et al. 1998, Herrera et al. 2000). Da bekannt ist, dass Lupinenprotein stärkere lipidmodulierende Effekte ausübt, wenn die Ratten eine hypercholesterinämische Diät erhielten, erhielten alle Muttertiere dieser Studie eine Cholesterin- und Choleat-

angereicherte Diät, um maximale Effekte durch das Diätprotein zu erlangen. Es wurden 24 adulte weibliche Ratten entweder mit 20 % Lupinenprotein aus *Lupinus angustifolius* oder mit Casein als Kontrollprotein für die Zeit der einwöchigen Verpaarung, der Trächtigkeit und 18 Tage der Laktation gefüttert.

2.4. Einfluss von Aminosäuren auf den Lipidstoffwechsel von humanen Leberzellen

In einer weiteren Studie (V5) sollte die Bedeutung potentiell wirksamer proteinassoziierter Aminosäuren auf den Lipidstoffwechsel im Lupinenprotein *in vitro* untersucht werden. In dieser Untersuchung wurde als Studienmodell eine humane hepatische Zellkultur gewählt – die HepG2-Zelllinie, weil diese dafür bekannt ist, dass sie weitgehend ihre metabolischen und physiologischen Funktionen, vor allem im Fettstoffwechsel erhalten hat (Javitt et al. 1990, Roder et al. 2007, Shin et al. 2007). Außerdem zeigen aktuelle Studien mit Peptiden aus Sojaproteinen, dass HepG2-Zellen ein geeignetes Modell für Untersuchungen der Lipidhomöostase darstellen (Lovati et al. 2000, Manzoni et al. 2003). Zusätzlich haben HepG2-Zellen, verglichen mit anderen humanen hepatischen Zellmodellen (Hep3B, J5), den höchsten Quotient zwischen reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH) (Liu et al. 2000) und sind daher per se ein anerkanntes Modell für Untersuchungen zum Glutathionstoffwechsel (Lin et al. 2007, Jimenez-Lopez et al. 2008).

In den letzten Jahren wurde vielfach spekuliert, ob und wie einzelne Aminosäuren oder Peptide, die während der intestinalen Hydrolyse freigesetzt werden, in die SREBP-1c-vermittelte Regulation des Lipidstoffwechsel eingreifen. Einige Untersuchungen, die sich mit Nahrungsproteinen und ihrer Wirkung auf den Lipidstatus beschäftigen, belegen die Hypothese, dass ausgewählte Aminosäuren die SREBP-regulierte Lipogenese beeinflussen (Ascencio et al. 2004, Shukla et al. 2007). Bisher ist allerdings nicht klar, welche dieser Aminosäure für die Lipidsenkung verantwortlich ist. In dieser Studie (V5) wurde deshalb untersucht, welche Effekte speziell von der Aminosäure Cystein auf SREBP-regulierte Gene ausgehen. Cystein kommt im Lupinenprotein in relativ hoher Konzentration vor und könnte für die lipidmodulierenden Wirkungen verantwortlich sein. Unsere Hypothese besteht in der Vermutung, dass Cystein eine von den möglichen Aminosäuren sein könnte, weil lipidsenkende Proteine häufig einen höheren Gehalt an Cystein aufweisen, als Casein (Shukla et al. 2006, Yang et al. 2007). So hatten Balb/cA Mäuse, die 5 verschiedenen Cystein-enthaltenen Wirkstoffen verabreicht bekamen, signifikant niedrigere Aktivitäten lipogener Enzyme, wie dem Malic Enzym und der Fettsäuresynthase (Lin et al. 2004). Eine weitere

Studie hat gezeigt, dass die Triglyceridsynthese in Caco-2 Zellen durch Inkubation mit 5 mM N-Acetyl-Cystein signifikant erniedrigt wurde (Rivabene et al. 2001). Cystein gilt als limitierender Baustein für die Synthese von GSH. Hohe Konzentrationen an GSH führen zum Abbau freier Radikale (Meister et al. 1983).

Des weiteren wurde der Effekt von L-Cystein auf die Genexpression von SREBP-regulierten Genen untersucht. Außerdem wurden die Zellen gleichzeitig mit L-Cystein und L-Buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO), einem Inhibitor der γ -Glutamylcysteine-Transferase, dem Schlüsselenzym der intrazellulären GSH-Synthese (Lin et al. 2007), behandelt. Das diente unter anderem der Klärung, ob eine L-Cystein-induzierte Veränderung der Genexpression durch GSH vermittelt wird. Um Hinweise dafür zu finden, ob Cystein die Expression lipogener Enzyme über die Verbesserung des antioxidativen Status beeinflusst, wurden die Zellen neben L-Cystein zusätzlich mit prooxidativem CuSO_4 inkubiert.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchsaufbau

3.1.1. Untersuchungen zur lipidsenkenden Wirkung von Proteinen aus weißer Lupine bei normocholesterinämischen Ratten (V1)

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, welche lipidsenkenden Wirkungen von Proteinen aus weißer Lupine ausgehen. Dafür wurden 36 männliche Ratten (Sprague Dawley, Charles River, Sulzfeld, Deutschland) in 3 Gruppen aufgeteilt, die jeweils Casein als Kontrolle oder 1% bzw. 5 % Lupinenprotein erhielten. Als Behandlungsprotein wurde Proteinisolat aus *Lupinus albus* Typ E eingesetzt. Alle Lupinenprotein-Isolate wurden uns vom Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung, Freising, Deutschland bereitgestellt. Die Versuchstiere hatten zu Beginn der Untersuchungen eine mittlere Lebendmasse von 284 ± 15 g und wurden für 14 Tage kontrolliert gefüttert.

Versuchsgruppen

K	Kontrolle (Casein)
L1	1 % Lupinenprotein
L5	5 % Lupinenprotein

3.1.1.1. Zusammensetzung der Diät

Alle Diäten wurden vor dem Füttern einer Gefriertrocknung (Christ BETA 1-8, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland) unterzogen und bei -20 °C gelagert. Die Zusammensetzung der Diät ist in Tabelle 1 aufgeführt

Tabelle 1: Zusammensetzung der Diät in der ersten Studie

Diätkomponenten	Konzentration [g/kg Diät]
Casein	150
Lupinenprotein-Isolat	50
Stärke	387,5
Zucker	200
Zellulose	50
Vitamine und Mineralstoffe	60
Fett ¹	100
Cholesterin	0,5
DL-Methionin	2

¹Schweineschmalz (LARU, Langensiepen und Ruckebier, Bottrop, Deutschland)

3.1.2. Untersuchungen zur lipidsenkenden Wirkung von Proteinen aus weißer Lupine bei hypercholesterinämischen Ratten (V2)

Ziel der zweiten Studie war es zu untersuchen, inwieweit Lupinenprotein unter Zulage von hypercholesterinämisch wirkendem Cholesterin und Choleat Auswirkungen auf den Lipidstoffwechsel bei männlichen Ratten hat. Dafür wurden 48 Tiere auf 4 Gruppen aufgeteilt. Als Testprotein erhielten die Tiere jeweils 5 % Casein oder 5 % Lupinenprotein aus *Lupinus albus* Typ TPE. Die Versuchstiere hatten zu Beginn eine mittlere Lebendmasse von 464 ± 21 g und wurden für 20 Tage restriktiv gefüttert.

Versuchsaufbau:

Behandlungsgruppen

- C -** 5 % Casein als Kontrollprotein ohne Cholesterin und Choleat
- C +** 5 % Casein als Kontrollprotein plus 1% Cholesterin und 0,5 % Choleat
- L -** 5 % Lupinenprotein ohne Cholesterin und Choleat
- L +** 5 % Lupinenprotein plus 1 % Cholesterin und 0,5 % Choleat

3.1.2.1. Zusammensetzung der Diät

Die Zusammensetzung der Diät ist in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Diät in der zweiten Studie

Diätkomponenten	Konzentration [g/kg Diät]
Albumin	150
Lupinenprotein-Isolat od. Casein (Kontrolle)	50
Stärke	390
Zucker	200
Zellulose	35
Vitamine und Mineralstoffe	60
Fett ¹	100
Cholesterin	10
Natrium-Choleat	5

¹Schweineschmalz (LARU, Langensiepen und Ruckebier, Bottrop, Deutschland)

3.1.3. Vergleich verschiedener Proteine aus blauer Lupine und ihrer lipidsenkenden Wirkung bei hypercholesterinämischen Ratten (V3)

In der dritten Studie sollten verschiedene Sorten der *Lupinus angustifolius* untersucht werden. Dafür wurde erneut ein hypercholesterinämisches Modell gewählt, d.h. die Versuchsdiät enthielt zusätzlich Cholesterin und Choleat. 72 männliche adulte Ratten wurden in 6 Gruppen a' 12 Tiere aufgeteilt und hatten ein mittleres Anfangsgewicht von 85 ± 12 g. Sie wurden für 14 Tage restriktiv gefüttert.

Versuchsgruppen

C	5 % Casein als Kontrollprotein plus 1 % Cholesterin und 0,5 % Choleat
B TPE	5 % Lupinenprotein Boregine TPE plus 1% Cholesterin u. 0,5 % Choleat
α-/β-Conglutin-Fraktion	5 % Lupinenprotein Boregine α -/ β -Conglutin-Fraktion plus 1% Cholesterin u. 0,5 % Choleat
P	5 % Lupinenprotein Probor TPE plus 1% Cholesterin u. 0,5 % Choleat
V	5 % Lupinenprotein Vitabor TPE plus 1% Cholesterin u. 0,5 % Choleat

3.1.3.1. Zusammensetzung der Diät

Die Zusammensetzung der Diät ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Diät aus der dritten Studie

Diätkomponenten	Konzentration [g/kg Diät]
Albumin	150
Lupinenprotein-Isolat od. Casein (Kontrolle)	50
Stärke	389
Zucker	200
Zellulose	35
Vitamine und Mineralstoffe	60
Fett ¹	100
Cholesterin	10
Natrium-Choleat	5
DL-Methionin	0,6

¹Schweineschmalz (LARU, Langensiepen und Ruckebier, Bottrop, Deutschland)

3.1.4. Einfluss von Proteinen aus blauer Lupine auf die Milchfettsynthese und den Milchfettgehalt lactierender Ratten, sowie den Einfluss auf den maternalen Lipidstoffwechsel (V4)

Ziel der vierten Studie war es zu untersuchen, ob lipidsenkende Eigenschaften der *Lupinus angustifolius* Boregine Typ E während Gestation und Laktation zu beobachten sind. Dafür wurden 24 weibliche Ratten mit einem mittleren Anfangsgewicht von 312 ± 18 g in 2 Gruppen eingeteilt. Dabei erhielt die Kontrollgruppe 20 % Casein und die Behandlungsgruppe 20 % Lupinenprotein ad libitum über einen Zeitraum von 6 Wochen. Die Tiere wurden bereits während der einwöchigen Verpaarungsphase mit der Diät gefüttert. Die Anzahl der Jungen wurde 1 Tag nach Wurf auf 10 Jungen/ Wurf standardisiert und gleichmäßig auf die Mütter innerhalb einer Gruppe verteilt.

Versuchsgruppen

- C** 20 % Casein als Kontrollprotein plus 1 % Cholesterin und 0,5 % Choleat
L 20 % Lupinenprotein plus 1 % Cholesterin und 0,5 % Choleat

3.1.4.1. Zusammensetzung der Diät

Die Zusammensetzung der Diät ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Diät aus der vierten Studie

Diätkomponenten	Konzentration [g/kg Diät]
Protein (Casein oder Lupine)	200
Stärke	390
Zucker	200
Zellulose	35
Vitamine und Mineralstoffe	60
Fett ¹	95
Leinöl	5
Cholesterin	10
Natrium-Choleat	5
AS-Gemisch ² (Methionin, Lysin + Zucker)	10

¹ Schweineschmalz (LARU, Langensiepen und Ruckebier, Bottrop, Deutschland)

² Methionin und Lysin wurden so eingesetzt, dass der erhöhte Bedarf gedeckt wurde

3.1.5. Einfluss von Aminosäuren auf den Lipidstoffwechsel von humanen Leberzellen (V5)

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, welche Inhaltsstoffe des Lupinenproteins für die lipidsenkenden Wirkungen verantwortlich sind. Dafür wurden als Zellkulturmodell humane Leberkrebszellen (HepG2 Zellen) eingesetzt. Diese wurden mit 3 verschiedenen Aminosäuren inkubiert (L-Methionin, L-Cystein, L-Arginin). Aufgrund der Ergebnisse wurden weiterführende Untersuchungen nur mit L-Cystein durchgeführt.

3.2. Versuchstiere und deren Haltung

Im Rahmen der tierexperimentellen Studien 1, 2 und 3 wurden wachsende männliche Sprague-Dawley Ratten, sowie in Studie 4 wachsende weibliche Sprague Dawley Ratten der Firma Charles-Rivers Wiga (Sulzfeld, Deutschland) eingesetzt. Die Tiere erhielten Versuchsbeginn eine Diät für Ratten und Mäuse der Firma Altromin, Lage („Haltungsdiät 1320“; Inhaltsstoffe: 19% Rohprotein, 4% Rohfett, 6% Rohfaser, 7% Rohasche, 11.9MJ/kg

umsetzbare Energie), in Pelletform. Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen der Größe 4 mit Metallgitterabdeckung auf Einstreu.

In allen Fütterungsversuchen wurden die Tiere einzeln gehalten. Die Umgebungstemperatur in der Versuchstieranlage betrug durchschnittlich 22°C bei 50-60% relativer Luftfeuchtigkeit. Die Hell-/ Dunkelphase des Zyklus betrug 12 Stunden. Wasser stand den Tieren in allen Versuchen *ad libitum* zur Verfügung. In den Versuchen 1, 2 und 3 wurde die Versuchsdiaät restriktiv gefüttert, um allen Tieren die gleiche Verzehrsmenge gewährleisten zu können. Dabei orientierte sich die Futtermenge am geringsten täglichen Verzehr.

In Versuch 4 stand den Tieren das Futter *ad libitum* zur Verfügung, um den trächtigen und laktierenden Tieren eine ausreichende Energiezufuhr zu gewährleisten. Bei allen Versuchsdurchführungen wurden sowohl die tägliche Futteraufnahme, als auch die wöchentliche Lebendmassezunahme protokolliert.

3.3. Gewinnung und Aufbereitung des Probenmaterials

3.3.1. Blutgewinnung und Organentnahme

Nach den Fütterungsperioden wurden die Tiere unter Äthernarkose dekapitiert. Die Tiere erhielten 4 h vor Tötung je 4 g Diät. Das Blut wurde in heparinisierten Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen. Zur Gewinnung des Plasmas wurde das Blut bei 3000 U/min 10 min bei 4°C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland) und der Überstand bei -20°C gelagert. Für Expressionsanalysen wurden aus verschiedenen Organen Proben entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C gelagert. Des Weiteren wurden die Reste der Organe und die Plasmen für weitere Analysen bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C gelagert.

3.3.2. Gewinnung der Milchproben

In Versuch 4 wurden die laktierenden Tiere zusätzlich am 14. Laktationstag gemolken. Dazu wurden die Jungtiere 1 h vor dem Melken von den Müttern separiert. Durch einen medizinischen Veterinär wurden die Muttertiere narkotisiert (siehe unten) und bekamen Oxytocin injiziert, um den Milchfluß zu stimulieren. Nach ca. 10 min wurden die Tiere an einer selbst konstruierten Vakuumpumpe (Eigenbau, Institut für Ernährungsphysiologie, TU München Weihenstephan, Deutschland) für ca. 25 min gemolken (Abbildung 1), die gewonnene Milch durch Vortexen gemischt und zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

Anschließend wurden die Tiere mit Atipamezol behandelt, um die sedative und analgetische Wirkung von Ketamin und Xylazin (α_2 -Adrenorezeptor-Agonisten) aufzuheben. Danach blieben die Muttertiere noch 2 h von ihren Jungen getrennt.

Arzneimittel-Wirkstoffe

Ketamin 10 %:	0,3 ml i.m.
Xylazin 2 %:	0,2 ml i.m.
Atipamezol:	0,04 - 0,05 ml s.c.
Oxitocin:	0,1 ml i.m./ Tier = 1 IE/ Tier

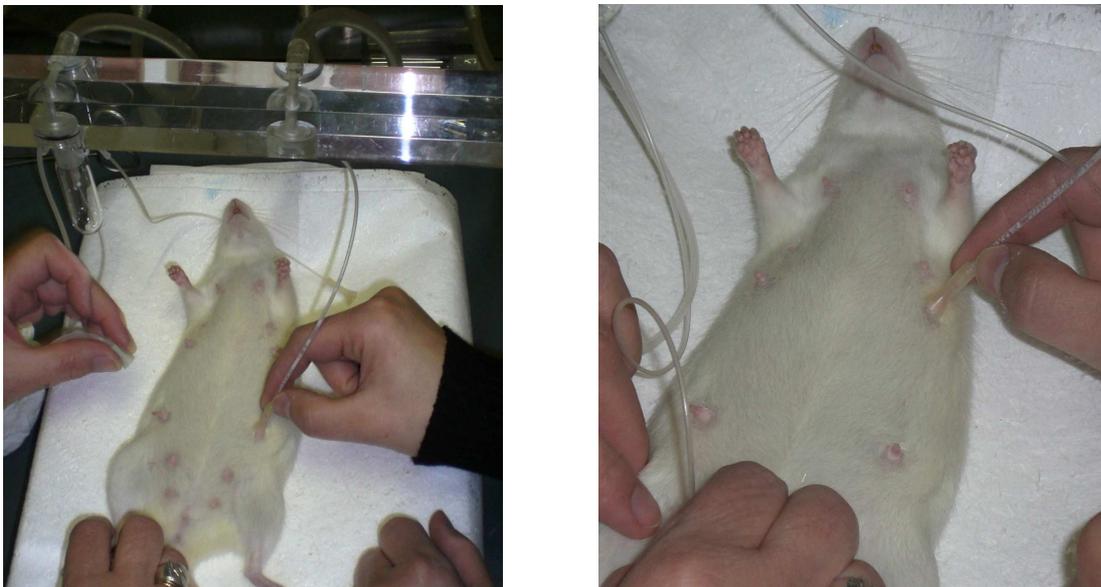


Abbildung 1: Milchgewinnung bei einer lactierenden Ratte

3.3.3. Gewinnung und Aufbereitung der Fäzesproben

Für die Bestimmung der Gallensäurenkonzentration wurden die Kotproben über einen Zeitraum von 1 Woche gesammelt, gefriergetrocknet (Christ BETA 1-8, Martin Christ Gefrier-trocknungsanlagen GmbH, Osterode, Deutschland), anschließend mit einer Analysemühle (M20 Universalmühle, IKA, Staufen, Deutschland) zerkleinert und für weitere Analysen bei -20°C aufbewahrt.

3.3.4. Fraktionierung der Lipoproteine

Die Auftrennung der einzelnen Lipoproteinfraktionen aus dem Plasma erfolgte nach einer Methode von Tiedink u. Katan (1989) mittels präparativer Dichtegradienten-Zentrifugation in Anlehnung an die Vorschrift der Firma Sorvall (1997).

Im ersten Schritt wurde die Dichte des Plasmas mit einer Lösung A (0,195 M NaCl, 0,27 mM EDTA-Na-Salz, 1 mM NaOH) auf 1,006 g/ml eingestellt und bei 900.000 g 1 h bei 4°C zentrifugiert (Mikro-Ultrazentrifuge RC M 150 GX, Fa. Sorvall, Hanau, Deutschland). Anschließend wurden die VLDL (Dichte < 1,006 g/ml) als obere Schicht abpipettiert. Der Rest des Plasmas wurde mit 300 µl Lösung B versetzt (24,27 mM NaBr in Lösung A), um eine Dichte von 1,063 g/ml zu erreichen.

Durch weiteres Zentrifugieren bei 900.000 g, 1,5 h, 4°C wurde die LDL-Fraktion abgetrennt, die als obere Schicht abpipettiert wurde (Dichte zwischen 1,006-1,063 g/ml). Durch Zugabe von 300 µl Lösung C und einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 900.000 g für 2,5 h bei 4°C wurde die HDL-Fraktion mit einer Dichte von >1,063 g/ml abgetrennt. In Versuch 4 wurde außerdem eine Zwischenfraktion aus LDL und HDL (Dichte 1,040<p<1,063) gewonnen. Diese Fraktion wurde mit Hilfe von Lösung L und einem Zentrifugationsschritt bei 150.000 U/min und 4°C für 1,5 h abgetrennt (die Reagenzien sind in Tabelle 5 aufgeführt).

Tabelle 5: Reagenzien für die Auftrennung der Lipoproteinfraktionen

Reagenzien	Zusammensetzung
Lösung A	0,195 M Natriumchlorid (=1,006 g/ml)
Lösung B	0,195 M Natriumchlorid und 2,44 M Natriumbromid (=1,182 g/ml)
Lösung C	0,195 M Natriumchlorid und 7,65 M Natriumbromid (=1,500 g/ml)
Lösung L	Lösung A (10 ml) + Lösung B (14,17 ml) (=1,108 g/ml)

3.3.5. Extraktion der Gesamtlipide aus der Leber

Die Gewinnung der Gesamtlipide aus der Leber erfolgte in Anlehnung an die Methode nach Hara und Radin (1978), modifiziert durch Eder und Kirchgessner (1994). Für die Extraktion wurde 0,5 g Leberhomogenat eingewogen, zerkleinert und mit 4 ml Hexan:Isopropanol-Gemisch (3:2 v/v) versetzt und gevortext, anschließend wurde das Gemisch über 18 h bei Raumtemperatur im Schüttelinkubator (G 25 Incubator Shaker, New Brunswick Scientific Co.

Inc., Edison, New Jersey, USA) geschüttelt. Das Extrakt wurde in Weißglasfläschchen überführt und bei -20°C gelagert.

3.3.6. Extraktion von Lipiden aus Milch

Für die Extraktion der Lipide wurden 50 mg der aufgetauten Milchproben in HPLC-Vials überführt und mit 1 ml Chloroform versetzt. Anschließend wurde das Gemisch kräftig gevortext und für 1 h in einer Schüttelkammer (Bühler, Bühler AG, Schweiz) bei 200 mot 1/min inkubiert. Nach einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei 2000 U/min wurde der klare Überstand mit einer Mikronadel abpipettiert und in neue Reaktionsgefäße überführt. Die gewonnenen Extrakte wurden zur weiteren Analyse eingesetzt (siehe unter 4.3.).

3.4. Analytische Methoden

3.4.1. Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma

Die Ermittlung der freien Fettsäuren (NEFA) im Plasma im Laktationsversuch erfolgte modifiziert mittels eines enzymatischen Testkits (NEFA CKit, Wako Chemicals GmbH, Neuss).

Prinzip:

Dabei werden NEFA mit einer Acyl-CoA-Synthetase versetzt und anschließend wird das entstehende Acyl-CoA durch eine zugesetzte Acyl-CoAOxidase zu 2,3-trans-Enoyl-CoA oxidiert. Die entstandenen Hydrogenperoxide bilden nach Zugabe einer Peroxidase einen roten Farbstoff, Chinonimin, welcher spektralphotometrisch bei 550 nm gemessen wird (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech). Die Intensität des roten Farbstoffs ist dabei proportional der Konzentration an unveresterten Fettsäuren im Plasma.

Methode:

Die Messung der NEFA im Plasma erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

Berechnung:

$$\text{NEFA [mg/dl]} = \frac{\text{Ep} \cdot \text{Cst}}{\text{Est}}$$

Ep	Extinktion Probe
Cst	Konzentration Standard
Est	Extinktion Standard

3.4.2. Bestimmung von Gallensäurekonzentration im Fäzes

Die Gesamtgallensäurekonzentration wurde mittels einer modifizierten 3-alpha-Hydroxysteroiddehydrogenase-Methode nach Dongowski (Dongowski et al. 2002) und Marlett (Marlett et al. 2002) bestimmt. Dafür wurde ein kommerzieller Kit der Firma Ecoline (DiaSys Diagnostic systems GmbH, Holzheim, Deutschland) zur Gallensäurebestimmung *in vitro* verwendet.

Prinzip:

Das Prinzip des Assays beruht auf der Umwandlung der 3-alpha-Hydroxygruppe der Gallensäure in eine Ketogruppe durch die NAD⁺-abhängige 3-alpha-Hydroxysteroiddehydrogenase und letztlich auf der photometrischen Bestimmung des entstandenen NADH bei 540 nm.

Methode:

Es wurden 25 mg gemahlene und gefriergetrocknete Probe mit 11,5 ml Ethanol und 1,275 ml 0,5 M NaOH für 1 h bei 80°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt und nach dem Absedimentieren wurden die Überstände abpipettiert und 15 min bei 13.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Danach wurde 1 ml des Überstandes entnommen und in der Vakuumzentrifuge abgedampft. Der Probenrest wurde in einem BSA/ NaCl-Gemisch aufgenommen und mittels Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 1.100 U/min für 5 min gelöst. Durch Zugabe von HCl wurde der pH-Wert eingestellt. Die Extinktionszunahme nach NADH-Bildung wurde bei 540 nm anhand eines Mikrotiterplattenreaders (SpectroFluor Plus, Tecan, Crailsheim, Deutschland) bestimmt und in die

Gallensäurekonzentration mittels unterschiedlicher Cholsäurekonzentrationen im Standard umgerechnet. Dabei ist der entstandene Farbkomplex direkt proportional zur Gallensäurekonzentration in der Probe.

3.4.3. Messung Cholesterin und Triglyceride

Die Konzentrationen an Cholesterin und Triglyceriden im Plasma, in den Lipoproteinfraktionen, in der Milch und in der Leber wurden unter Verwendung von Testkits der Firma Merck (ECOLINE 25, MERCK Eurolab GmbH, Darmstadt, Deutschland) bestimmt.

Prinzip:

Cholesterin und Cholesterinester werden nach Freisetzung enzymatisch hydrolysiert und oxidiert, dabei entsteht H_2O_2 . Dieser reagiert mit 4-Aminoantipyrin und Phenol zu einem farbigen Chinonimin (Trinder-Reaktion), welches bei einer Wellenlänge von 500 nm (Utraspec 2000) gemessen wird.

Die Triglyceride werden durch enzymatische Spaltung mittels Lipoproteinlipase zu Glycerin und freien Fettsäuren hydrolysiert. Auch bei dieser Umsetzungsreaktion entsteht H_2O_2 . Über die Bildung des farbigen Chinonimins kann die Konzentration an Triglyceriden spektralfotometrisch bei 550 nm bestimmt werden.

Methode:

Die Konzentrationen an Cholesterin und Triglyceriden im Plasma und in den Lipoproteinfraktionen wurden nach vorgeschriebenen Protokollen bestimmt und das Volumen entsprechend der Lipoproteine modifiziert. Aliquote der Milch- und Leberlipidextrakte wurden 6 h bei Raumtemperatur abgedampft, mit 20 μ l Triton-X-100:Chloroform (1:1 v/v) versetzt und das Chloroform über Nacht bei Raumtemperatur verdampft.

Die Bestimmung von Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen erfolgte nach im Kit enthaltener Arbeitsvorschrift.

Berechnung:

Anhand von mitgeführten Standards (Calibrator, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurden die Konzentrationen von Cholesterin und Triglyceriden in den Proben mittels Verhältnisgleichung berechnet und in den Leberlipiden auf die Einwaage bezogen.

$$c_P = \frac{E_P}{E_{St}} \cdot c_{St}$$

c_P	Konzentration an Triglyceriden/ Cholesterin in der Probe
E_P	Extinktion Probe
E_{St}	Extinktion Standard
c_{St}	Konzentration Standard

3.4.4. Bestimmung des Fettsäuremusters von Fetten

Zur Bestimmung des Fettsäuremusters der verwendeten Diätfette wurden die Fettsäuren mit Trimethylsulfoniumhydroxid methyliert (Mentlein und Butte, 1989) und die Fettsäuremethylester (FAME) quantitativ mit einem Gaschromatographen (HP 5890, Hewlett Packard GmbH, Waldbronn, Deutschland) mittels Flammenionisationsdetektor (FID) bestimmt (Dänicke et al., 1999). Dabei erfolgte die Trennung der Fettsäuremethylester auf einer 30 m langen FFAP-Si-Trennsäule (0,53 mm Innendurchmesser, Fa. Macherey und Nagel, Düren, Deutschland) mit Helium als Trägergas und einer Fließgeschwindigkeit von 8,9 ml/min. Die FAME wurden mittels internem Standard (C15:0) quantifiziert und mit der HP 3365 Chemistation ausgewertet.

3.4.5. Bestimmung der Proteinkonzentration in Milch und Leberhomogenaten

Prinzip:

Der Bicinchoninsäure (BCA)-Assay kombiniert BCA als Detektionssystem mit dem Biuret Assay, bei dem gelöstes Biuret (Carbamoylharnstoff) und Kupfersulfat in alkalischem, wässrigem Milieu einen rotvioletten Farbkomplex bilden. Dabei werden zwei Peptidbindungen (CO-NH) mit Cu^{2+} komplexiert. Der BCA-Assay beruht wie der Lowry-Assay auf einer Reduzierung von Cu^{2+} zu Cu^+ , wobei hierbei BCA mit Cu^+ einen Farbkomplex bildet.

Methode:

Zu 25 μl verdünnter homogenisierter Probe wurden 200 μl frisch angesetzte BCA/Kupfersulfatlösung (10 ml/ 200 μl) gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Der kolorimetrische

Nachweis von Proteinen erfolgte mittels Mikrotiterplatten-Photometer (SpectroFluor Plus, Tecan, Crailsheim, Deutschland) bei 595 nm. Unter Verwendung einer Standardreihe mit Rinderalbumin - BSA (Bovines Serum Albumin) wurde die Konzentrationen mit Hilfe des Auswerteprogramms berechnet.

3.4.6. Aminosäureanalyse im Diätfutter und im Rohprotein

Die Bestimmung der Aminosäuren im Diätfutter und im Rohprotein erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Bech-Andersen et al. (1980).

Prinzip:

Unter Verwendung eines Aminosäureanalyzers können nach vorangegangener Oxidation alle Aminosäuren mit Ausnahme von Tryptophan im Hydrolysat bestimmt werden.

Die Proben wurden nach vorheriger Oxidation in einem geschlossenen Gefäß mit Salzsäure hydrolysiert. Danach wurde das Hydrolysat auf einen pH-Wert von 2,2 eingestellt und die Aminosäuren wurden mittels Ionenaustauschchromatographie in einem Aminosäureanalyzer (Biochrom B 30, Berlin, Deutschland) getrennt und identifiziert. Die Trennung der Aminosäuren erfolgt durch Elution mit Pufferlösungen verschiedenen pH-Wertes, das Eluat wird kontinuierlich mit Ninhydrin-Reagenz versetzt und die Extinktion der Probenlösung photometrisch in der Durchflußküvette gemessen. Die Extinktionsmessung erfolgt für Hydroxyprolin und Prolin bei 440 nm und bei allen anderen Aminosäuren bei 570 nm.

Methode:

Für die Oxidationsmischung wurden 0,5 ml H₂O₂ mit 4,5 ml phenolhaltiger Ameisensäurelösung und 25 mg Phenol gemischt. Die Lösung wurde 1 h bei 30 °C inkubiert und anschließend für 15 min in ein Eisbad gestellt. Für die Hydrolyselösung wurden 492 ml HCl unter Zusatz von 1 mg Phenol mit Wasser auf 1 l aufgefüllt. 25 mg der vorbereiteten Probe wurden in eine Pyrex-Glasflasche eingewogen, 5 ml kalte Oxidationsmischung zugegeben und für 24 h verschlossen im Kühlschrank verwahrt. Die Oxidation wurde durch Zugabe von 0,9 g Natriumdisulfit abgebrochen. Anschließend wurden die Proben mit 50 ml Hydrolyselösung versetzt und für 24 h bei 110°C in den Trockenschrank gestellt.

Die im Eisbad abgekühlte Lösung wurde mit Citratpuffer (19,61 g Natriumcitrat, 5 ml Thiodiglycol, 1 g Phenol, 16,5 ml HCl, pH 2,2) in ein Becherglas überführt und unter ständigem Rühren mit 40 ml NaOH auf pH 2,2 eingestellt. Dann wurde der Inhalt in einem

Meßkolben mit Pufferlösung überspült und 2 ml interner Standard zugesetzt. Das Gemisch wurde anschließend durch einen Membranfilter filtriert. Dabei wurde wieder der genaue pH-Wert überprüft. Ein Aliquot des Filtrats wurde in den Aminosäureanalyser appliziert. Für die Berechnung werden die Peakflächen der einzelnen Aminosäuren und des internen Standards (Norleucin) aus den Chromatogrammen ermittelt. Der Gehalt (w) der einzelnen Aminosäuren errechnet sich nach folgender Formel:

$$w_{\text{Aminosäure}} = \frac{F_{\text{AS}} \times 0,2 \times M \times F_{\text{Nor/Std.}}}{F_{\text{Std.}} \times E \times 10000 \times F_{\text{Nor/Pr}}} \quad [\%]$$

F_{AS}	Fläche der Aminosäure in der Probenlösung
$F_{\text{Std.}}$	Fläche der Aminosäure in der Kalibrierlösung
0,2	Konzentration der Kalibrierlösung
M	Molmasse der Aminosäure
E	Einwaage
$F_{\text{Nor/Std.}}$	Fläche des internen Standards in der Kalibrierlösung
$F_{\text{Nor/Pr}}$	Fläche des internen Standards in der Probenlösung

3.4.7. Glucagon RIA

Zur quantitativen Bestimmung des pankreatischen Hormons Glucagon im Plasma wurde ein Radioimmunoassay (RIA) (Linco Research Inc., Missouri, USA) verwendet.

Prinzip:

Das nicht markierte Glucagon in Plasma bzw. Standard konkurriert mit ^{125}I -markiertem Tracer um die begrenzte Zahl an vorhandenen Antikörper-Bindungsstellen. Die Zahl der verfügbaren Bindungsstellen sinkt mit Zunahme des gebundenen markierten Tracers (Glucagon). Die Konzentration der gebundenen Radioaktivität ist daher umgekehrt proportional zur Analytkonzentration im Plasma bzw. im Standard.

Methode:

Die verdünnten Plasmaproben wurden mit dem Assaypuffer versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Hydrierung des Glucagon-Tracers mit Puffer. Alle Proben wurden mit diesem Tracer versetzt und nach gründlichem Vortexen erneut über Nacht bei 4°C inkubiert. Nun erfolgte die Zugabe einer Präzipitationsreagenz bei 4°C und der Überstand wurde nach Zentrifugation (4°C; 6.000 U/min; 20 min) abpipettiert und die Radioaktivität im Pellet nach der Zugabe von 2 ml Szintillatormischung im Gammacounter gemessen (Flüssigkeits-Szintillations-Zähler (TRI-Carb 2100TR, Camberra Packard, Dreieich, Deutschland).

3.4.8. Insulinkonzentration ELISA

Für die Quantifizierung der Seruminsulinkonzentrationen wurde der Rat Insulin ELISA-Kit (DRG Instruments GmbH, Marburg, Deutschland) genutzt.

Prinzip:

Hierbei handelt es sich um einen ELISA nach dem „Sandwichprinzip“, da hierbei 2 monoklonale Antikörper gegen verschiedene Antigene des Insulins zum Einsatz kommen und das Antigen so von beiden Seiten (Sandwich) gebunden werden kann. Voraussetzung ist die Markierung eines Reaktionspartners mit Enzymen, die ein Farbsubstrat umsetzen.

Methode:

Zu den festgebundenen spezifischen Antikörpern werden 25 µl Probe oder Standard mit der zu bestimmenden Insulinkonzentration gegeben und inkubiert. Nach Entfernung des Überschusses werden nun enzymmarkierte spezifische Antikörper (Konjugate) zugegeben. Nach mehrmaligen Waschschritten mit einer Waschlösung wurden die Wells mit einer schwefelhaltigen Stop-Lösung versetzt und im Mikrotiterplattenreader (SpectroFluor Plus, Tecan, Crailsheim, Deutschland) gemessen. Das gemessene Signal der Nachweisreaktion der enzymmarkierten Antikörper ist direkt proportional zur Insulinkonzentration der Probe.

Methode zur Bestimmung des Insulin im Plasma

Probe ¹	25 µl
Enzymkonjugat	50 µl
1. Inkubation [Zeit]	30 min
Waschschritte ² [Anzahl x Volumen]	3x 350 µl
Substrat	200 µl
2. Inkubation [Zeit]	15 min
Stopplösung	50 µl 1.8 N Schwefelsäure
Kreuzreaktivitäten ³	human, Ratte

¹ verdünnte Probe; ² Waschpuffer: Insulin = Tween 20-Lösung; ³ Herstellerangabe

3.4.9. Quantifizierung der Apolipoproteine mittels SDS-Polyacrylamid**Gelelektrophorese**

Durch die Fütterung verschiedener Diätkomponenten kann es zu einer Modifizierung der Apolipoproteine kommen. Die elektrophoretische Trennung von Apolipoproteinen erfolgte in einer sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-Page). Die SDS-Page nach Laemmli (1970) ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS). Dabei dissoziieren Proteinkomplexe in ihre Untereinheiten, die Proteine werden denaturiert und das SDS bildet mit den Proteinmolekülen einen Komplex. Je größer diese Protein-SDS-Komplexe sind, desto stärker werden sie in ihrer Wandergeschwindigkeit durch die Polyacrylamid-Matrix gebremst, d.h. ihre elektrophoretische Mobilität nimmt ab. Die Trennung der Proteine erfolgt nach ihrer Größe, wobei kleinere Proteine schneller durch das Gel wandern als größere Proteine.

Zunächst wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers ein Gradientengel aus 2 Trenngelen (15 und 5%) gegossen. Danach konnte das Trenngel über Nacht bei 4°C auspolymerisieren. Im Anschluss wurde ein Sammelgel (4,5%) überschichtet und ein Kamm für die Proben eingeführt. Die Polymerisationszeit betrug ca. 30 min. Anschließend wurden die Kammern mit einem Laufpuffer (0,025 M TRIS, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS) überspült. Für eine präzise Identifizierung der Apolipoproteine wurden ein niedermolekularer und ein nativer hochmolekularer Standard (Amersham Oharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland) verwendet. Die verdünnten Lipoproteinproben wurden nun im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer gemischt. Beim Einsatz des hochmolekularen Standards enthielt der Probenpuffer zusätzlich 5% β-Mercaptoethanol. Die Inkubation verlief beim

hochmolekularen Standard bei Raumtemperatur für 30 min und beim niedermolekularen Standard für 5 min bei 95° C. Pro Gelspur wurden je 40 µl Probe und 20 µl Albumin als interner Standard aufgetragen. An die Elektrophoreseeinheit (Owl Separation Systems, Inc. Portsmouth, USA) wurden eine Spannung von 75 V angelegt und schrittweise bis auf 200 V erhöht. Die Zusammensetzung des Gradientengels ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Gradientengels

Reagenzien	Trenngel 15%	Trenngel 5%
Acryl-/ Bisacryamid (30%)	6,25 ml (27,5 % : 1 %)	2,083 ml
Aqua Bidest		6,00 ml
Puffer ¹	4,125 ml	4,125 ml
Glycerol	1,25 ml	
Bromphenolblaulösung	835 µl	
SDS (10%)	125 µl	125 µl
TEMED ²	10 µl	10 µl
APS (10%) ³	62,5 µl	62,5 µl

¹ Trenngelpuffer: 1,125 M TRIS pH 8,8; Sammelgelpuffer: 0,5 M TRIS pH 6,8

² N,N,N,N.- Tetramethyl-Ethylendiamin

³ Ammoniumpersulfat

Im Anschluss wurde das Gel in einer Coomassie-Färbelösung für 1 h angefärbt und danach mit einem Methanol/ Eisessig- (v/v) Gemisch entfärbt und einem Fixierbad aus 10% Glycerin unterzogen. Für die qualitative und quantitative Auswertung wurde das Gel in einem Geldokumentationssystem (Syngene, GeneGenius, Synoptics Inc., USA) unter Weiß-Licht visualisiert und digitalisiert.

3.4.10. Quantifizierung der LDL-Rezeptorproteinkonzentration in der Leber mittels SDS-PAGE und Westernblot

Hierfür wurden 200 mg tiefgefrorene Leber mit 1 ml Resuspensionspuffer (siehe unten) homogenisiert. Die Leberproben wurden anschließend auf Eis für 1 h inkubiert und danach 10 min bei 4°C und 13.000 U/min zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt (analog Punkt 2.4.5.).

Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach Laemmli (1970). Es wurden 7,5%ige Gele der Größe 8×7 cm verwendet (siehe Tabelle 8)

Die Leberproben wurden entsprechend mit dem Resuspensionspuffer verdünnt. Pro Slot der SDS-PAGE wurden 90 bis 200 μg des Proteinhomogenates aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde der PAGE Ruler™ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) genutzt.

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran (Bio Trace NT, Pall Corporation, Pensacola, FL) geblottet (Khyse-Andersen, 1984). Zur Überprüfung des erfolgreichen Transfers wurde eine Anfärbung der Membran mit Ponceau S durchgeführt. Anschließend erfolgte die Entfärbung mit 1xTBS-T-Puffer (siehe Tabelle 7).

Nach der Blockierung mit einer 3%igen Magermilchpulverlösung (AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in TBS-T-Puffer über Nacht bei 4°C erfolgte die Detektion des membranständigen LDL-R.s mit polyklonalem Kaninchen-Anti-LDL-Rezeptor-Antikörper (Abcam pic, Cambridge, UK). Der Antikörper wurde 1:200 mit einer Lösung aus 1% Magermilchpulver in TBS-T verdünnt und die Membran mit dieser Antikörperlösung für 2 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Membran dreimal 5 min in TBS-T gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter *anti-rabbit*-IgG-Antikörper (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt. Anschließend erfolgte erneut dreimaliges Waschen der Membran für 20 min. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszens-Detektions-Reagenz (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland). Dabei wurden die Blots 5 min in den kurz davor frisch gemischten ECL-Reagenzien inkubiert, anschließend getrocknet und zwischen Klarsichtfolie gelegt. Die Membran wurde danach bis zu 6 min mit einer Chemilumineszenz-Imager-Kamera (F-ChemiBIS, BIOSTEP, Jahnsdorf, Deutschland) belichtet. Die relative Menge des Proteins wurde mit dem Programm *Gel Pro Analyzer 4.0* (Media Cybernetics) ermittelt und mit der Intensität der Kontroll-Bande normalisiert.

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Puffer

Reagenzien	Zusammensetzung
Resuspensionspuffer	20 mM TRIS-Cl (1 M), pH 7,4 4,2 mM NaCl (0,9%) 10% v/v Glycerol 0,1 % SDS 0,5 % Deoxycholeat 1% Triton-X 100 2 mM EDTA (50 mM) 37,13 ml Reinstwasser
Sammelgelpuffer pH 6,8	6,057 g TRIS 100 ml Reinstwasser
Trenngelpuffer pH 8,8	18,171 g TRIS 100 ml Reinstwasser
Transferpuffer pH 8,3	3,028 g TRIS 14,4 g Glycin 200 ml Methanol 0,375 g SDS 800 ml Reinstwasser
Laufpuffer pH 8,3	6,04 g TRIS 28,8 g Glycin 2 g SDS 2 l Reinstwasser
5xTBS-T Puffer pH 7,5	15,14 g TRIS 50 mM 21,915 g NaCl 2,5 ml Tween 500 ml Reinstwasser

Tabelle 8: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Reagenzien	Trenngel 7,5%	Sammelgel 5%
Acryl-/ Bisacryamid (40%)	0,938 ml	150 µl
Aqua Bidest	2,762 ml	950 µl
Puffer ¹	1,25 ml	375 µl
SDS (10%)	50 µl	15 µl
TEMED ²	2 µl	2 µl
APS (10%) ³	50 µl	15 µl

¹ Trenngelpuffer: 1,125 M TRIS pH 8,8; Sammelgelpuffer: 0,5 M TRIS pH 6,8

² N,N,N,N.- Tetramethyl-Ethylendiamin

³ Ammoniumpersulfat

3.4.11. Untersuchungen zur Genexpression

3.4.11.1. RNA-Präzipitation

Prinzip:

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurde das Trizol Reagens der Fa. Life Technologies-Invitrogen (Köln, Deutschland) verwendet. Um ein RNase-freies Arbeiten zu gewährleisten, wurden Reaktionsgefäße mit Diethylpyrrocarbonat (DEPC; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) behandelt. Es handelt sich bei der Trizol Reagens um eine Mischung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat und gilt als stärkstes proteindenaturierendes Reagens. Diese RNA-Isolationsmethode beruht auf der Eigenschaft der RNA, in der sauren (pH 4) Trizol-Lösung wasserlöslich zu bleiben, während sich Proteine, DNA und Fette in der organischen bzw. Interphase befinden. (modifiziert durch Chomczynski und Sacchi, 1987).

Methode:

Dabei wurden ca. 35 mg der gefrorenen Organproben mit 1 ml Trizol versetzt und mit Hilfe eines Tissuelyzers (Quiagen, Retsch GmbH Co.KG, Haan, Deutschland) bei 15 Hz für 3 min homogenisiert. Anschließend wurde pro eingesetztem ml Trizol 0,2 ml Chloroform zugegeben, die Mischung 15 x kräftig geschüttelt und anschließend bei Raumtemperatur (RT) für 5 min inkubiert. Danach erfolgte ein erster Zentrifugationsschritt für 15 min bei 13.000 U/min und 4°C. Dabei wird die Mischung in eine untere organische, eine Interphase und eine obere wässrige Phase, welche die RNA enthält, separiert. Die obere Phase wird in neues steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach einer erneuten Inkubation für 10 min bei RT schloss sich ein weiterer

Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13.000 U/min und 4°C an. Nach einem anschließenden Waschschrift mit Ethanol (75%), wurde erneut für 5 min bei 9.700 U/min und 4°C zentrifugiert. Danach wurden die Proben für ca. 20 min unter dem Abzug luftgetrocknet. Im Anschluss daran wurde das RNA-Pellet in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und 10 min bei 60°C in einem Thermoschüttler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gelöst. Zur Bestimmung der Probenreinheit und der RNA-Konzentration wurden die Proben 1:100 mit DEPC-Wasser verdünnt und die Extinktion bei 260 und 280 nm photometrisch bestimmt.

Die Berechnung der RNA-Konzentration in den Proben erfolgte nach folgender Gleichung:

$$\text{Ext.}_{260} \cdot 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA/ ml}$$

Der Quotient der Messung diene als Maß für die Reinheit der RNA. Der Quotient sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen, kleinere Werte sprechen für eine Verunreinigung des Proteins. Zur Kontrolle eines möglichen Abbaus der RNA während der Isolation durch RNasen wurde eine denaturierende Formaldehyd-(FA)-Agarose-Gel-Elektrophorese (1,2%) bei 5-7 V/ cm durchgeführt. Die benötigten Reagenzien sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer

Reagenzien	Zusammensetzung
10 x FA Gelpuffer (pH 7.0)	200 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA
1 x FA Gellaufpuffer	100 ml 10 x FA Gelpuffer 20 ml 37% Formaldehyd (FA) 880 ml Rnase freies Wasser
5 x RNA Gelladepuffer	20 mg Bromphenolblau

Abkürzungen: MOPS, 3-[Morpholino]-Propanschwefelsäure; EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure

Hierfür wurden 2 µl RNA auf 10 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt, mit 2 µl RNA-Gelladepuffer versetzt und auf das vorbereitete Gel aufgetragen. Nach einer Stunde Laufzeit konnte das Gel mittels einer Fotokammer (Syngene, GeneGenius, Synoptics Inc., USA) unter

UV-Licht visualisiert werden. In Abbildung 2 ist beispielhaft ein RNA-Gel abgebildet. Hierbei wurden Leber- und Darmproben von Ratten aufgetragen, um zu überprüfen, ob die Proben intakte RNA enthielten oder während der Analysen durch RNasen geschädigt wurden. Anhand 2 exakter Banden (18S und 28S) konnte gezeigt werden, dass kein RNA-Abbau stattgefunden haben.

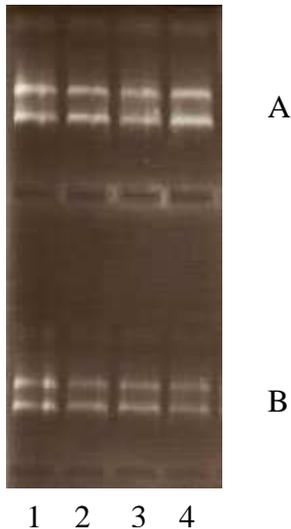


Abbildung 2: RNA-Gel von Darmmucosa (A) bzw. Leber von Ratten (B), nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischer Diät mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Typ Vitabor; Bande 1: Casein Tier 1; Bande 2: Lupine Tier 1; Bande 3: Casein Tier 2; Bande 4: Lupine Tier 2

3.4.11.2. cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurden jeweils 1,2 µg RNA verwendet. Dabei wird die komplette mRNA in einen zur mRNA komplementären DNA-Strang (cDNA) umgeschrieben. Dies erfolgt mittels Reverser Transcriptase und Oligo dT-Primern, die an die Poly-A-Enden der mRNA hybridisieren.

Alle Reaktionen wurden entsprechend den Herstelleranweisungen durchgeführt (1,2 µg Probe plus 20 µl Mastermix – (Tabelle 10). Dabei wurde der Ansatz gemischt und die cDNA für 60 min bei 42°C in einem Thermocycler (Eppendorf-Nathaler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland) synthetisiert. Danach erfolgte ein Denaturierungsschritt für 10 min bei 70°C. Nach Abschluss der Synthese wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des RT-Mastermix

Reagenzien	Menge
DEPC-Wasser	12,45 µl
5xBuffer RT ¹	5,00 µl
Primer Oligo dT ²	1,25 µl
dNTP Mix ²	1,00 µl
oRT (Reverse Transcriptase) ¹	0,3 µl

¹ MBI-Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)

² Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

3.4.11.3. Quantifizierung von mRNA-Konzentrationen mittels realtime-detection PCR

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht auf der Vervielfältigung eines bestimmten Genabschnittes mit Hilfe der hitzebeständigen Taq-Polymerase, die von Saiki et al. (1988) erstmals zur routinemäßigen Anwendung gebracht wurde.

Die PCR ist eine Methode, um kleinste Mengen an mRNA in Geweben zu detektieren. Dabei erlaubt das Light-Cycler System eine quantitative und qualitative online PCR mit Hilfe des Farbstoffes Sybr Green. Dieser fluoresziert nur, wenn er an doppelsträngige DNA gebunden ist. Zu Beginn der exponentiellen Produkt-Zunahme, der linearen Logphase der PCR, wird zunächst die Fluoreszenz bestimmt und entspricht dem sogenannten crossing point. Dieser korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz und kann deshalb zur Quantifizierung der Transkripte herangezogen werden.

Nach einer Hitzedenaturierungsphase bei 95°C, welche die beiden DNA-Stränge bzw. den RNA- und cDNA-Strang voneinander trennt, werden Reaktionsbedingungen gewählt, die eine Hybridisierung kurzer komplementärer DNA, den sense- und antisense-Primern, ermöglichen. Dabei wird die Annealingtemperatur, also die optimale Anlagerungstemperatur für Primer, für jedes Primerpaar individuell gewählt und an die jeweilige Schmelztemperatur angepasst. In Tabelle 11 sind die Sequenzen für die verwendeten Primer aufgeführt. Ausgehend von den Primern synthetisiert eine DNA-Polymerase in der Elongationsphase bei 72°C jeweils einen Strang neu. Danach erfolgt ein erneuter Denaturierungsschritt und ein weiterer Reaktionszyklus kann eingeleitet werden. Durch Wiederholung des Reaktionszyklus entsteht eine nahezu exponentielle Amplifikation des DNA-Fragments. Im Anschluss an die letzte Elongationsphase der PCR wurde jeweils eine Schmelzkurvenanalyse zur Identifizierung der

spezifischen Produkte durchgeführt. Jedes PCR-Produkt besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur, die sowohl von der Produktlänge, als auch vom GC-Gehalt abhängig ist. Die Auswertung erfolgte unter Ausnutzung der Kinetik mit Hilfe einer Software (Rotorgene 4.6) anhand der ermittelten Werte und Kontrolle der Schmelzkurve nach einer modifizierten Methode nach Pfaffl et al. (2002). Die Konzentrationen wurden relativ zu β -Actin bzw. GAPDH als Haushaltsgen normalisiert.

Tabelle 11: Primersequenzen und Annealing Temperaturen der verwendeten Primer für Real-Time RT-PCR Analysen von Rattengewebe

Gen	Forward Primer (5' zu 3')	Reverse Primer (5' zu 3')	Basen- paare	Annealing Temperatur (°C)
ABC-A1	GTTTTGGGGAGGAAATTGAT	AACCATCCACAGCAACCTTC	162	60
ABC-G5	ATGGCCTGTACCAGAAGTGG	AGCGGCAGAGAAGTATCCAA	152	60
ABC-G8	CTACGTGGACTTGACGAGCA	GGTGCCTGTGTGAGGGTCT	190	60
ACAT	GCAACATTTCCGAACCATCT	GTCTGGTAGGGCAGAAGCAG	201	60
ACO	CTTTCTTGCTTGCCTTCCTTCTCC	GCCGTTTCACCGCCTCGTA	415	60
Apo A5	CAGACCCTGTCCCACAAACT	GGTCAATGGCCTGAGTGAAT	235	60
Apo A1	CCTGGATGAATTCCAGGAGA	TCGCTGTAGAGCCCAAACCTT	192	60
Apo B100	CAGGGCACCAACCAGATAGT	TTCATACTGCCCACTGCTG	157	60
β-Actin	ATCGTGCGTGACATTAAAGAGAAG	GGACAGTGAGGCCAGGATAGAG	429	60
BSEP	CCTCCCACCCTTGATCACTA	CGCTCATTACAGAGGGAAGC	227	60
CD 36	TCGTATGGTGTGCTGGACAT	GGCCCAGGAGCTTTATTTTC	194	60
CPT-1a	GGAGACAGACACCATCCAACATA	AGGTGATGGACTTGTCAAACC	416	60
CYP4A1	CAG AATGGAGAATGGGGACAGC	TGAGAAGGGCAGGAATGAGTGG	460	65
CYP7A1	CAAGACGCACCTCGCTATCC	CCGGCAGGTCATTCAGTTG	206	60
FAS	AGGTGCTAGAGGCCCTGCTA	GTGCACAGACACCTTCCCAT	281	60
FABP	ACCATCCACTGCCGTCTTAC	CCCCGATGCGTAGGTATTCT	185	60
FATP	GGTAGCAAATGCACCCTCAT	CTCCTGCTGTGATGTGAGGA	235	60
FXR	CAGCCACAGATCTCCTCCTC	TCTTTGTCACAGGCATCTCG	160	60

GAPDH	GCATGGCCTTCCGTGTTCC	GGGTGGTCCAGGGTTTCTTACTC	337	60
Glut-4	GCTTCTGTTGCCCTTCTGTC	TGGACGCTCTTTCCAAC	166	60
GPAT	CAGCGTGATTGCTACCTGAA	CTCTCCGTCCTGGTGAGAAG	194	60
G6PDH	AGCCTCCTACAAGCACCTCA	TGGTTCGACAGTTGATTGGA	213	60
HL	TCCCACCACAAGTACA	TCAGCCAGGGCATTATTTTC	167	60
HMG-CoA Reduktase	AAGGGGCGTGCAAAGACAATC	ATACGGCACGGAAAGAACCATAGT	406	57
Ins-Rezeptor	AAAGTTTGCCCAACCATCTG	GTGAAGGTCTTGGCAGAAGC	222	60
LCAT	CTGGCTTTTGGCAAGACCTAC	TACCAGTCCTGCCAGCTTCT	191	60
LDL Rezeptor	AGAACTGCGGGGCCGAAGACAC	AAACCGCTGGGACATAGGCACTCA	490	65
L-FABP	TGGGAAAAGGAAACCTCATTG	GTCTCCAGTCGCACTCCTC	243	60
LPL	TCCCACCACAACGAAGTACA	TCAGCCAGGGCATTATTTTC	205	60
LXR	TGATGCTGAATTTGCTCTGC	GGCTCACCAGCTTCATTAGC	185	60
MTP	AGACTCCAGCCTCACTGGAA	TGCAGCCTTCATTCTGACAC	237	60
NPC-1L1	GCTGCCCCCACCTAAAGAAAAAGA	GAAGCCCGAGGTGGTGACAAAGTA	274	60
PPAR alpha	CCCTCTCTCCAGCTTCCAGCCC	CCACAAGCGTCTTCTCAGCCATG	177	60
PTP-1b	CACCAGTCACCTTGCTCAGA	CTGGCTTCTCTGGGTGAAAG	191	60
SCD1	CCAGAGCGTACCAGCTTTTC	TTACCCACTTCGCAAGCTCT	195	60
SR-BI	GGTGCCCATCATTTACCAAC	GCTTGCTTCTTGCAGTACC	155	60
SREBP-1c	GGAGCCATGGATTGCACATT	AGGAAGGCTTCCAGAGAGGA	191	60
SREBP-2	ATCCGCCCACACTCACGCTCCTC	GGCCGCATCCCTCGCACTG	214	65

3.4.11.4. Gelelektrophorese

Zur Identifizierung und Trennung von DNA-Fragmenten bzw. Gesamt RNA diente die Gelelektrophorese. Das Prinzip beruht auf der Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Als Referenz für das Molekulargewicht diente ein DNA-Längenstandard (100 bp), der parallel zu den Proben mitgeführt wurde. Um die Qualität neuer Primer auszutesten, wurden stichprobenartig PCR-Produkte nach der *real time detection* PCR auf ein Agarosegel aufgetragen. Dafür wurde ein 1% Agarose Gel (Tabelle 12) hergestellt und 1 min unter ständigem Rühren gekocht. Nach Abkühlen auf 65°C wurde Ethidiumbromid (0,2 µg/ ml Gel) zugesetzt, gemischt und in die Gelkammer gegossen. Das Ethidiumbromid interkaliert dabei in doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz messbar erhöht wird. Nach 20 min Lufttrocknung wurde das erstarrte Gel für weitere 30 min in 0,5xTBE-Laufpuffer equilibriert. 10 µl der entstandenen PCR-Produkte wurden mit 2 µl 6xDNA-Gelladepuffer versetzt und anschließend in die Gelslots aufgetragen. Die Trennung der PCR-Produkte erfolgte über 1 h bei einer konstanten Spannung von 5-7 V/ cm.

Tabelle 12: Reagenzien für die DNA-Gel-Elektrophorese

Reagenzien	Menge
5xTBE-Gelpuffer	54,0 g Tris Base
	27,5 g Borsäure
	0,1 M EDTA auf 1 l Reinstwasser aufgefüllt
0,5xTBE-Laufpuffer	100 ml 5xTBE Gelpuffer
	900 ml Reinstwasser
6xDNA-Gelladepuffer	2,5 µl Bromphenolblau
	300 µl Glycerol
	700 µl Reinstwasser

Abkürzungen: EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure; TBE, Tris-Borsäure-EDTA

Nach erfolgreicher Auftrennung wurden die Produkte unter UV-Licht in einer Fotoeinrichtung (SynGene GeneGenius) visualisiert und zur Dokumentation digitalisiert.

3.4.12. Glutathion-, Cystein- und Homocysteinkonzentration im Plasma

Die Bestimmung der Glutathion-, Cystein- und Homocysteinkonzentration im Plasma erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatographie = HPLC) in Anlehnung an Vester und Rasmussen (1991). Es wurde eine Gradientenelution anhand des in Tabelle 13 aufgeführten Elutionsprofils mit 2 Laufmitteln durchgeführt.

Prinzip:

Hierbei handelt es sich um ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem die zu untersuchende Substanz unter hohem Druck zusammen mit einem flüssigen Laufmittel, der „mobilen“ Phase (Eluent), auf die Trennsäule oder „stationäre Phase“ gegeben wird. Geht ein Bestandteil der zu untersuchenden Substanz eine Wechselwirkung mit der stationären Phase ein, so verbleibt er lange in der Säule. Sind die Wechselwirkungen hingegen schwach, so verlässt er die Säule früher. Je nach Stärke dieser Wechselwirkungen erscheinen die Bestandteile der Substanz zu unterschiedlichen Zeiten („Retentionszeiten“) am Ende der Trennsäule, wo sie mit einem geeigneten Fluoreszenzdetektor bei einer Exzitationswellenlänge von 385 nm und einer Emissionswellenlänge von 515 nm nachgewiesen werden können.

Anlage:	1100 Serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) Bestehend aus Vakuumentgaser, Quartärer Gradientenpumpe, Autosampler, Säulenthermostat und Fluoreszenzdetektor
Säule:	Lichrosphere 100 RP 18e (5 µm), 125 x 4 mm, (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Säulentemperatur:	30°C
Laufmittel:	A: 0,1 M Acetatpuffer pH 4.0, 2 % MeOH B: 0,1 M Phosphatpuffer pH 6.0, 5 % MeOH
Calibrator:	Plasma Control Homocysteine (Chromosystems, München, Deutschland)
Injektionsvolumen:	10 µl
Flussrate:	1,1 ml / min
Detektion:	Anregung bei 385 nm, Messung der Emission bei 515 nm

Tabelle 13: Elutionsprofil

	Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
1	0	100	0
2	6,5	0	100
3	14	0	100
4	17	100	0
5	20	100	0

Method:

Zur Vorbereitung auf die HPLC-Analytik wurden 30 µl Plasmaproben bzw. externes Kalibrierungsplasma mit 10 µl Internem Standard (1 % (v/v) Mercaptopropionylglycin in Kaliumboratpuffer) versetzt, gevortext und zentrifugiert (quick run). Anschließend wurde dieses Gemisch mit 4 µl des Reduktionsmittels Tri-n-Butylphosphat (TNB)/Dimethylformamid (DMF) versetzt, gemixt und erneut zentrifugiert (quick run). Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe von 25 µl Perchlorsäure/ EDTA wurden die Plasmaproteine gefällt. Nach erneuter Durchmischung des Ansatzes und Zentrifugation (quick run) erfolgte eine 10 min Inkubation bei Raumtemperatur. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13 000 U/min wurden die Proteine abgetrennt. 20 µl des wässrigen Überstandes wurden mit 40 µl des Boratpuffers 2 versetzt und zentrifugiert (quick run). Zur Derivatisierung der reduzierten Thiole wurden die Proben mit 20 µl Farbstofflösung (1 mg Ammonium-7-Fluorbenzofuranon-4-sulfonat (SBDF) in 1 ml Boratpuffer 3) gemischt, zentrifugiert (quick run) und danach in einem Thermoschüttler (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 60°C für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Eisbad abgekühlt und nochmals bei 13 000 U/min für 3 min zentrifugiert. 60 µl der Überstände wurden in HPLC-Vials mit Inserts überführt und an der HPLC analysiert. Die Zusammensetzung aller verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Zusammensetzung der Reagenzien

Reagenzien	Zusammensetzung
interner Standard	Mercaptopropionylglycin, 50 μ M im Ansatz, 200 μ M Boratpuffer 1
Reduktionsmittel TNB/ DMF ¹	10 %, v/v, Tri-n-Butylphosphin in Dimethylformamid
Perchlorsäurelösung	0,6 mol/l Perchlorsäure, 1 mM EDTA ²
Derivatisierungsreagenz	1 mg SBDF ³ in 1 ml Boratpuffer 3
Boratpuffer 1	100 mM H ₃ BO ₄ , 2 mM EDTA, pH 9,5, Einstellung mit 10 M KOH
Boratpuffer 2	2 M H ₃ BO ₄ , 5 mM EDTA, pH 10,5, Einstellung mit 10 M KOH
Boratpuffer 3	2 m H ₃ BO ₄ , pH 9,5, Einstellung mit 10 M KOH

¹ TNB – Tri-n-Butylphosphat, DMF – Trimethylformamid

² EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure

³ SBDF - Ammonium-7-Fluorbenzofuranon-4-sulfonat

3.4.13. Genistein-, Daidzein und Genistinkonzentrationen im Rohprotein

Die Konzentrationen an Genistein, Daidzein und Genistin im Rohprotein wurden mittels Reverse-Phase-Chromatographie (RP-HPLC) in Anlehnung an eine Methode von Sung et al. (2004) bestimmt.

Methode:

Es wurden jeweils 50 mg Rohprotein aus *Lupinus angustifolius*, Boregine α -/ β -Conglutinin-Fraktion, Boregine TPE; Vitabor TPE; Probor TPE und aus *Lupinus albus* Typ E und TPE1 in Zentrifugengläschen eingewogen und mit einem Gemisch aus MeOH/ Dichlormethan (1:1, v/v) versetzt. Dieses Gemisch wurde anschließend 30 sec mit einem Ultraturrax (Ultraturrax T25, Jahnke & Klinkel IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) auf Eis homogenisiert und dann für 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Absedimentieren wurde der klare gewebefreie Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei RT und 13 000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mittels Vakuumzentrifuge (RCT 90, Thermo Electron Corporation ehemals Jouan GmbH, Femwald, Deutschland) eingengt. Die getrockneten Proben wurden danach in 200 μ l 60% EtOH resuspendiert und 5 min im Thermomixer bei 25°C gelöst. Nach einem

weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13.000 U/min und RT wurden 150 µl der klaren Überstände in Vials zur HPLC-Analyse überführt.

RP-HPLC-Bedingungen:

Anlage:	1100 Serie (Agilent) Bestehend aus Vakuumentgaser, Quartärer Gradientenpumpe, Autosampler, Säulenthermostat und Fluoreszenzdetektor
Säule:	Hypersil ODS, Partikelgröße 5µm, 4 mm x 250 mm (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland)
Säulentemperatur:	40°C
Laufmittel:	A: 270 ml 0,1 % Trifluoressigsäure + 30 ml Acetonitril B: 60 ml 0,1 % Trifluoressigsäure + 240 ml Acetonitril
Injektionsvolumen:	20 µl
Flussrate:	0,8 ml/ min
Detektion:	Messung der Emission bei 259 nm

3.4.14. Bestimmung der Tryptophan-Konzentration

Die quantitative Bestimmung von Tryptophan im Rohprotein erfolgte mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (HPLC) nach einer Methode in Anlehnung an Fontaine *et al.* (1998).

Prinzip:

Tryptophan liegt überwiegend proteingebunden vor. Das Rohprotein wird daher unter Luftausschluss im Autoklaven alkalisch verseift. Nach der Hydrolyse und Zugabe eines internen Standards wird das Tryptophan auf einer HPLC-Säule mit Umkehrphase RP-18 chromatographisch getrennt. Die Detektion erfolgt selektiv mit einem Fluoreszenzdetektor, so dass andere Aminosäuren die Analyse nicht beeinflussen können.

Methode:

Zunächst wurden die Proteinproben mit einer Mühle (M20 Universalmühle, IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert. 250 mg der Probe wurden anschließend mit 8,4 g Bariumhydroxid und 12 ml Reinstwasser versetzt. Im Anschluss erfolgte eine vierstündige

Hydrolyse im Autoklaven bei 110°C. Unter Zugabe des internen Standards (α -Methyl-DL-Tryptophan) wurde die Probe 15 min auf Eiswasser abgekühlt. Danach wurden dem Gemisch 5 ml 0,5 M Phosphorsäure und 7,5 ml 6 M HCl zugesetzt. Nach Abfiltration durch einen Faltenfilter wurde das Hydrolysat auf pH 3,0 eingestellt. Der Ansatz wurde dann mit Methanol verdünnt, erneut filtriert und in HPLC-Vials überführt. Das Elutionsprofil ist in Tabelle 15 dargestellt.

RP-HPLC-Bedingungen:

Vorsäule:	Umkehrphase RP 18; 5 μ m; 17 x 4,6 mm (Nucleosil C 18, Bischoff GmbH, Leonberg, Deutschland)
Säule:	Umkehrphase RP 18; 5 μ m; 250 x 4 mm (Lichrosphere 100, Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland)
Säulentemperatur:	35 - 40°C
Laufmittel:	A: 0,01 mol/l KH ₂ PO ₄ + 8 % Methanol B: Methanol
Injektionsvolumen:	10 μ l
Flussrate:	1,2 ml/ min
Detektion:	Anregungswellenlänge bei 280 \pm 5 nm Emissionswellenlänge bei 355 \pm 5 nm

Tabelle 15: Elutionsprofil

	Zeit [min]	Laufmittel A [%]
1	0	100
2	1	100
3	2	60
4	4	60
5	6	100
6	18	100

3.4.15. Kultivierung der humanen Leberkarzinomzelllinie HepG2

Die humanen Leberzellen (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Deutschland) wurden in RPMI 1640 (Gibco, Paisley, UK) Basalmedium bei 37°C, einer Atmosphäre von 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert. HepG2-Zellen zeichnen sich vor allem dadurch aus, dass viele leberspezifische metabolische Funktionen, vor allem im Bereich des Fett- und Glucosestoffwechsels erhalten geblieben sind. Zur Gewährleistung steriler Bedingungen diente als Arbeitsplatz eine LaminarFlowBox (Hera safe, Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland). Es wurde ausschließlich mit sterilen bzw. autoklavierten Materialien gearbeitet, um Kontaminationen zu vermeiden.

Die Subkultivierung der Zellen erfolgte in 75 cm²-Kulturflaschen (75er KF) (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Germany). Als Zusätze zum Nährmedium wurden bei dieser Zelllinie 10% Fötale Kälberserum (FKS) (GIBCO) und als Antibiotikum 0,5% Gentamycin (GIBCO) eingesetzt. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt, um eine optimale Nährstoffversorgung und Vitalitätserhaltung zu gewährleisten. Die subkonfluenten Zellen wurden vor dem Passagieren einmal mit sterilem *phosphat buffered saline* (PBS) gewaschen und zum Ablösen mit Trypsin-EDTA für 5 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Unter lichtmikroskopischer Beobachtung wurde der Verdau unterbrochen und das Trypsin abgezogen. Endgültiges Lösen des Zellrasens wurde durch Klopfen der Flasche erreicht. Um die Zellen zu resuspendieren, wurden sie mit 37°C warmen Medium versetzt. Anschließend wurde die Zellsuspension in einen Falcon-Tube überführt. Die Kulturflasche wurde mit Medium nachgespült, um die Zellverluste so gering wie möglich zu halten. Danach wurde die Zellzahl mittels Neubauerkammer bestimmt. Dafür wurden 10 µl der Zellsuspension luftblasenfrei in die Zählkammer gefüllt. Anhand eines inversen Durchlichtmikroskops (Axiovert 25 mit Beleuchtung HAL 6V 25W, Carl Zeiss Mikroskopie, Jena, Deutschland) konnte die Zellzahl bei 100-facher Vergrößerung ermittelt werden.

Für Inkubationsversuche wurden Zellen der 30. - 65. Passage verwendet. Zur Weiterführung der Zellen wurden 75 cm²-Kulturflaschen eingesetzt. Hierfür wurden je nach Analysenparametern die Zellen in 25 cm²-Kulturflaschen (250 000 Zellen/ 7 ml), 24-Well Zellkultur-Mikrotiterplatten (100 000 Zellen/ ml/ Well) und 96 Well-Zellkultur-Mikrotiterplatten (8 000 Zellen/ 0,25 ml) ausgesät.

3.4.15.1. Bestimmung der Zellzahl und Zellaktivität mit Trypanblau

Um die Vitalität der Zellen nach den verschiedenen Behandlungen zu bestimmen, wurde ein Viabilitätstest durchgeführt. Die Zellsuspension wurde mit einer Trypanblau-Lösung im Verhältnis 1:1 versetzt und 3 min bei 37°C inkubiert. Trypanblau färbt alle nekrotischen Zellen blau, da die Zellmembran löchrig wird und der Farbstoff in die Zellen eindringen kann. Durch Auszählen der Gesamtzellzahl und der toten Zellen wurde der prozentuale Anteil der lebenden Zellen berechnet. Die Ausbeute lebender Zellen betrug in der Regel >90%.

3.4.15.2. Herstellung der Stammlösungen

Die Inkubationsmedien (L-Cystein, L-Methionin, L-Arginin, BSO, CuSO₄) wurden als Stammlösungen mit einem Molekulargewicht von je 20 mM in FKS-freiem Medium bei -20°C aufbewahrt. Für Stimulationsversuche der Zellen wurden definierte Mengen der jeweiligen Stammlösung entnommen und der pH-Wert entsprechend dem Kontrollmedium eingestellt.

3.4.15.3. Inkubation der Zellen

Die Zellen wurden für Expressionsstudien und Lipidkonzentrationsmessungen in 24-Well Zellkulturplatten und für die Messung von Gesamtgluthation, Cystein, Homocystein und Taurin in 25 cm²-Kulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden in subkonfluentem Zustand jeweils am 4. Tag behandelt. Die Dauer der Inkubationen betrug hierbei 2, 6 oder 24 h.

3.4.15.4. MTT-Test

Mittels MTT-Test nach Moosmann (1983) und Vistica et al. (1991) wird die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen intakter Zellen gemessen. Das schwach gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium Bromid (MTT) gehört zu den Tetrazoliumsalzen und wird in aktiven Mitochondrien, in Peroxisomen und im Cytosol durch spezielle Oxidoreduktasen in ein alkohollösliches blaues Produkt (Formazan) umgesetzt.

Um zu überprüfen, inwieweit die Zellen die zugesetzten Konzentrationen an L-Cystein, L-Methionin, L-Arginin, BSO und CuSO₄ vertragen, wurden sie mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inkubationsmedien für verschiedene Zeiten versetzt. Hierfür wurden die

Hepatozyten in einer 24-Well Zellkulturplatte ausgesät und entsprechend dem Versuchsaufbau behandelt. Zunächst wurde das Kulturmedium der Zellen erneuert und 20 µl einer MTT-Lösung (5mg/ml PBS) zugefügt. Die Zellen wurden bei 37°C für 1 h inkubiert, anschliessend wurde das MTT-Medium abgezogen und das Formazansalz in 100 µl Isopropanol gelöst.

Das gelöste Formazan konnte anschließend mittels Plattenreader bei 595 nm photometrisch bestimmt und quantifiziert werden. Das Kontrollmedium ohne Zusatz wurde als 100%-Wert gesetzt. Alle Untersuchungen wurden in vierfacher Bestimmung durchgeführt.

3.4.15.5. Proteinbestimmung in HepG2 Zellen

Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Zelldichte auf den Zellkulturplatten wurde die Proteinmenge der Zellen mit dem BCA-Assay (Prinzip siehe Kapitel 3.4.5.) bestimmt. Dafür wurden die Zellen in 96 Well Zellkulturplatten ausgesät und entsprechen Kapitel 3.4.16.3. behandelt. Die Zellen wurden über Nacht mit 0,2 N NaOH lysiert und der Proteingehalt ,wie in Kapitel 3.4.5. beschrieben, gemessen.

Über die Photometersoftware WIN curvefitting Quantitativ wurde eine Standardkurve berechnet, die zur Ermittlung der Proteingehalte der Zellen verwendet wurde [µg/ ml].

3.4.15.6. Lipidextraktion aus HepG2 Zellen

Für die Bestimmung der Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen wurden die Zellen nach Inkubationsende zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl Hexan-Isopropanol (3:2) versetzt. Danach wurden die Zellen bei 200 mot 1/min in der Schüttelkammer für 20 min bei RT inkubiert. Die Überstände aus 4 Wells wurde gepoolt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden die Zellen noch dreimal mit 200 µl Hexan-Isopropanol gewaschen und in das Eppendorf-Tube überführt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße über Nacht unter dem Abzug verdampft und die Lipide am nächsten Morgen mit 200 µl Hexan-Isopropanol versetzt. Der Extrakt wurde erneut über Nacht verdampft und danach wurden 20 µl Triton-X-Chloroform zugegeben. Am nächsten Tag konnten die Proben dann entsprechend wie unter 3.4.3. gemessen werden.

Für die Bestimmung der Lipidkonzentrationen in den Mediumüberständen wurden 150 µl des Mediums nach Abzentrifugation von möglichen Zelltrümmern für 5 min bei 2000 U/min direkt zum Messen eingesetzt.

3.4.15.7. RNA-Isolation

Die Isolierung der RNA erfolgte analog der unter 3.4.3. beschriebenen Isolierung bei Gewebeproben. Zur Gewinnung ausreichend großer RNA-Mengen wurden die Zellen aus 2 identischen Wells gleicher Behandlung

Jedes Well wurde mit 150 μ l Trizol versetzt. Zur weiteren Auftrennung wurden 60 μ l Chloroform zugesetzt, nach kurzem Durchmischen gepoolt. Jedes Well wurde mit 150 μ l Trizol versetzt. Zur weiteren Auftrennung wurden 60 μ l Chloroform zugesetzt, nach kurzem Durchmischen wurde bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert. Nach Überführen der oberen wässrigen Phase in neue Eppendorf-Tubes wurde mit 150 μ l Isopropanol präzipitiert. Nach Inkubation und erneuter Zentrifugation wurde das RNA-Pellet mit 300 μ l Ethanol (75%) gewaschen und dann in 25 μ l DEPC – Wasser resuspendiert. Die Messung der RNA – Konzentration erfolgte wie unter 3.4.11.1. beschrieben.

3.4.15.8. cDNA – Synthese

Die Synthese der cDNA aus Zellen erfolgte analog der Bearbeitung der oben beschriebenen Gewebeproben (siehe 3.4.11.2.).

3.4.15.9. Real - Time Detection PCR

Die Real – Time PCR erfolgte analog der unter 3.4.11.3. beschriebenen Verfahrensweise. Es wurden die relativen mRNA – Konzentrationen von SREBP-1c, SREBP2, FAS, LDL-R., Delta-9-D., G-6-PDH-Phosphat-Dehydrogenase und HMG-CoA-R. gemessen. Die Konzentrationen wurden relativ zu β -Actin als Haushaltsgen normalisiert. Die verwendeten humanen Primer sind in Tabelle 16 aufgeführt.

Tabelle 16: Primersequenzen und Annealing Temperaturen der verwendeten humanen Primer für real-Time RT-PCR Analysen

Gen	Forward Primer (5' zu 3')	Reverse Primer (5' zu 3')	bp	Annealing Temperatur (°C)
β-Actin	GAGCGGGAAATCGTGCGTGAC	GCCTAGAAGCATTTGCGGTGGAC	518	60
FAS	CATCGGCGACGTGGGCATTTTG	CCGGGTTCCACCAGCAGGGAGCG	494	60
G6PDH	GGGTGTAGACCTCCTGTGGA	GAGCCACTTGCTGAGTTTCC	187	60
HMG-CoA Reduktase	TACCATGTCAGGGGTACGTC	CAAGCCTAGAGACATAATCATC	247	55
LDL Rezeptor	CCCCGCAGATCAACCCCCACTC	AGACCCCCAGGCAAAGGAAGACGA	369	60
SCD1	TTCCTGGCTCTACCCTGTCTGTCC	GGGCACCCTCACCAAGTAAGC	480	60
SREBP-1c	GTGGCGGCTGCATTGAGAGTGAAG	AGGTACCCGAGGGCATCCGAGAAT	362	60
SREBP2	CGCCACCTGCCCCCTCCTTCC	TGCCCTGCCACCTATCCTCTCACG	390	65

3.4.15.10. Glutathion-, Cystein- und Homocysteinkonzentration

Die Bestimmung der Glutathion-, Cystein- und Homocysteinkonzentration in den Zellen erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatographie = HPLC). Dafür wurden die Zellen nach Inkubationsende vom Inkubationsmedium befreit und mit einem Zellschaber von der Kulturflasche gelöst. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml PBS gespült und für 3 min bei 4 °C und 900 U/min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 1 ml PBS resuspendiert und für weitere Analysen bei -80 °C gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte danach analog wie unter 3.4.12. beschrieben.

3.4.16. Statistische Auswertung und Ergebnisdarstellung

Zur statistischen Auswertung des Datenmaterials wurde das Statistikprogramm Minitab (Version 13.1, Minitab Inc. USA) verwendet. Mittelwerte von 2 Gruppen wurden mittels Student's t-Test miteinander verglichen. Werte von Experimenten mit mehr als 2 Gruppen wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) ausgewertet.

Bei signifikantem F-Wert wurden die Mittelwerte mittels Fisher's multifaktoriellem Mittelwertvergleich analysiert. Bei einem zweifaktoriellen Versuchsansatz wurden die Daten mit Hilfe einer zweifaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet. Im Einzelfall wurden vorab die Daten mittels Levene's Test auf Homogenität der Varianzen getestet. Bei ungleichen Varianzen wurden die Werte durch Logarithmieren transformiert, um eine Homogenität der Varianzen zu erhalten. Bei signifikanten Effekten der Einflussfaktoren wurden die Mittelwerte mit Hilfe des Tukey's Test verglichen.

Als Signifikanzgrenze wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% festgelegt ($p \leq 0,05$). Bei $p < 0,1$ wurde der Unterschied als tendenziell bezeichnet. Die Darstellungen in den Ergebnisdiagrammen zeigen die jeweiligen Mittelwerte und die Standardabweichungen der Einzelwerte. Signifikante Unterschiede sind generell durch unterschiedliche Hochbuchstaben oder Sternchen gekennzeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen zur lipidsenkenden Wirkung von Proteinen aus *Lupinus albus* bei normocholesterinämischen Ratten (V1)

In ersten Untersuchungen wurde den Tieren über einen Zeitraum von 14 d eine semisynthetische Diät mit unterschiedlichen Gehalten an *Lupinus albus*, Typ E verabreicht. Die Kontrolltiere erhielten Casein als Referenzprotein.

4.1.1. Leistungsparameter

In Tabelle 17 sind die Leistungsdaten der Ratten aufgeführt. Die Körpermassen der Ratten, die Lupinenprotein erhielten, unterschieden sich nicht von den Ratten, die Casein in der Diät erhielten. Zwischen den Behandlungsgruppen ergaben sich bezüglich der Körpermassenentwicklung und den Lebergewichten keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 17: Leistungsparameter der Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normocholesterinämischer Diät mit Casein oder 1% bzw. 5% Lupinenprotein aus *L. albus*.

Parameter	Casein	1 % Lupinenprotein	5 % Lupinenprotein
Körpergewicht-Anfang (g)	284 ± 15	284 ± 15	284 ± 14
Körpergewicht-Ende (g)	352 ± 18	351 ± 13	357 ± 13
Körpermasse-Zunahme (g)	69 ± 21	67 ± 17	73 ± 15
Körpermasse-Zunahme (g/Tag)	4,9 ± 1,5	4,8 ± 1,2	5,2 ± 1,1
Lebergewicht (g)	13,1 ± 1,3	13,0 ± 1,2	12,6 ± 0,9
rel. Lebergewicht (g/100 g KM)	3,7 ± 0,2	3,7 ± 0,2	3,5 ± 0,2

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=10)
Student's t-Test

4.1.2. Parameter des Lipidstoffwechsels

Im Rahmen dieser Studie wurden ausschließlich die Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen im Plasma und in der Leber gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 zu sehen. Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tabelle 18: Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Leber von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normo-cholesterinämischer Diät mit Casein oder 1% bzw. 5% Lupinenprotein aus *L. albus*.

Parameter	Kontrolle	1 % Lupinenprotein	5 % Lupinenprotein
Triglyceride Plasma (mmol/l)	1,94 ± 0,72	1,74 ± 0,45	1,66 ± 0,47
Triglyceride Leber (µmol/g)	8,51 ± 0,84	8,93 ± 0,97	8,79 ± 0,94
Cholesterin Plasma (mmol/l)	1,95 ± 0,26	2,24 ± 0,51	2,16 ± 0,37
Cholesterin Leber (µmol/g)	4,87 ± 1,16	4,68 ± 1,03	4,12 ± 1,35

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=10)
Student's t-Test

4.2. Untersuchungen zur lipidsenkenden Wirkung von Proteinen aus *Lupinus albus* bei normo- und hypercholesterinämischen Ratten (V2)

In diesem Versuch wurde TPE von *Lupinus albus* mit Casein verglichen, wobei jeweils 5 g Protein pro kg Diät eingesetzt wurde. Außerdem wurden beide Proteine sowohl als Bestandteil einer normocholesterinämischen Diät (-), als auch einer hypercholesterinämischen Diät (10 g/kg Cholesterin plus 5 g/kg Choleat) (+) verabreicht. Casein diente als Kontrollprotein.

4.2.1 Leistungsparameter

In Tabelle 19 sind die Daten zu Körpermasse, Körpermasseentwicklung und Lebergewichten der verschiedenen Behandlungsgruppen aufgeführt.

Die Körperanfangs- und Endgewichte der Tiere unterschieden sich nicht zwischen den 4 Gruppen. Außerdem hatten die Tiere im Mittel gleiche Körpermasseszunahmen. Tiere, die zusätzlich mit Cholesterin und Choleat (+) gefüttert wurden, hatten unabhängig vom Protein ein signifikant höheres Lebergewicht gegenüber den Tieren der normolipämischen Diät.

4.2.2. Parameter des Lipidstoffwechsels

Es wurden in diesem Versuch die Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen von Plasma, Leber und Lipoproteinfraktionen bestimmt. In Tabelle 20 sind die Ergebnisse dargestellt.

Hypercholesterinämische Ratten, die Lupinenprotein mit Ihrer Diät erhielten, hatten niedrigere Triglyceridkonzentrationen im Plasma, als Ratten, die Casein verabreicht bekamen. Ratten, die eine normocholesterinämische Diät erhielten, unterschieden sich nicht. Auch in der VLDL-Lipoproteinfraktion waren die Triglyceridkonzentrationen bei Ratten, die eine hypercholesterinämische Diät mit Lupinenprotein erhielten, niedriger als bei Casein. Die beiden normolipidämischen Gruppen unterschieden sich nicht. Die Fütterung der hypercholesterinämischen Diät führte außerdem zu erhöhten Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in der Leber, als bei der normolipidämischen Diät. Gleichzeitig konnten bei Fütterung der hypercholesterinämischen Diät mit Lupinenprotein niedrigere Lebertriglyceridkonzentrationen beobachtet werden. Allerdings verhielten sich die Cholesteringehalte entgegengesetzt zu den Triglyceridkonzentrationen. Die Fütterung von Lupinenprotein führte zu höheren Cholesterinkonzentrationen in der Leber. Zusätzliche Cholesterin- und Choleatzulagen führten außerdem zu einer Erhöhung der Cholesterinkonzentrationen im Plasma. Hier spielten die eingesetzten Diätproteine keine Rolle. Auch in der HDL-Lipoproteinfraktion ergaben sich keine Unterschiede. In der LDL-Lipoproteinfraktion zeigten sich tendenzielle Unterschiede in der Gruppe, die Lupinenprotein mit der hypercholesterinämischen Diät erhielt. Die Ratio zwischen LDL und HDL war bei der Behandlungsgruppe, die zusätzlich Cholesterin und Choleat (+) konsumierten, signifikant erniedrigt im Vergleich zu den Ratten, die Casein erhielten.

Tabelle 19: Leistungsparameter der Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normo- (-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*.

Diätprotein	Casein	Lupinenprotein	Casein	Lupinenprotein	2-Way-ANOVA
Cholesterin/Choleat	(-)	(-)	(+)	(+)	Signifikanter Einfluss von (p<0,05)
Körpergewicht-Anfang (g)	464 ± 22	464 ± 20	464 ± 23	464 ± 20	-
Körpergewicht-Ende (g)	506 ± 21	502 ± 19	504 ± 24	506 ± 23	-
Körpermasse-Zunahme (g)	43,6 ± 15,8	37,9 ± 10,2	39,9 ± 5,7	42,9 ± 6,0	-
Körpermasse-Zunahme (g/Tag)	3,05 ± 0,98	2,71 ± 0,73	2,85 ± 0,41	3,07 ± 0,43	-
Lebergewicht (g)	15,3 ± 1,1 ^c	15,0 ± 0,9 ^c	20,1 ± 2,2 ^b	21,9 ± 2,7 ^a	Cholesterin/ Choleat
rel. Lebergewicht (g/100 g KM)	3,01 ± 0,22 ^c	3,00 ± 0,15 ^c	3,99 ± 0,33 ^b	4,35 ± 0,48 ^a	Cholesterin/ Choleat

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=12)

^{a,b,c} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's Test)

Tabelle 20: Konzentrationen von Triglyceriden und Cholesterin in Plasma, Lipoproteinen und Leber von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normo- (-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*.

Diätprotein	Casein	Lupinenprotein	Casein	Lupinenprotein	2-Way-ANOVA
Cholesterin/Choleat	(-)	(-)	(+)	(+)	Signifikanter Einfluss von (p<0,05)
Triglyceride					
Plasma (mmol/l)	2,58 ± 1,07 ^{ab}	2,80 ± 0,95 ^a	2,04 ± 0,70 ^{bc}	1,49 ± 0,88 ^c	Cholesterin/ Choleat
VLDL (mmol/l)	1,59 ± 0,58 ^a	1,75 ± 0,77 ^a	1,89 ± 0,33 ^a	0,90 ± 0,41 ^b	Protein x Cholesterin/ Choleat
Leber (µmol/g)	19,1 ± 9,4 ^c	12,7 ± 2,0 ^c	55,5 ± 16,2 ^a	30,4 ± 11,3 ^b	Protein x Cholesterin/ Choleat
Cholesterin					
Plasma (mmol/l)	2,08 ± 0,40 ^b	2,11 ± 0,32 ^b	4,11 ± 0,88 ^a	4,57 ± 1,30 ^a	Cholesterin/ Choleat
LDL (mmol/l)	0,83 ± 0,27	0,70 ± 0,28	1,39 ± 0,60	0,83 ± 0,30	-
HDL (mmol/l)	1,07 ± 0,38	1,19 ± 0,42	1,12 ± 0,78	1,61 ± 0,77	-
LDL/ HDL-Chol.	0,88 ± 0,45 ^b	0,75 ± 0,58 ^b	1,80 ± 1,58 ^a	0,40 ± 0,12 ^b	Protein x Cholesterin/ Choleat
Leber (µmol/g)	8,5 ± 2,8 ^c	9,0 ± 1,5 ^c	48,8 ± 12,9 ^b	74,6 ± 14,4 ^a	Protein x Cholesterin/ Choleat

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=12)

^{a,b,c} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's Test)

4.2.3. Gallensäurekonzentration und -exkretion

In Tabelle 21 sind die Gallensäurekonzentrationen im Fäzes, die Fäzesmenge und die Gallensäureexkretion aufgeführt.

Tiere, die Lupinenprotein plus Cholesterin und Choleat erhielten, schieden signifikant weniger Fäzes aus, als Tiere der anderen Gruppen. Zulage von Cholesterin und Choleat zur Diät führte zu signifikant höheren Gallensäurekonzentrationen in den Fäzes der Tiere, unabhängig vom Protein. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Lupinenprotein die Gallensäureausscheidung signifikant erniedrigt, vor allem wenn zusätzlich Cholesterin und Choleat verabreicht wurde.

Tabelle 21: Fäzesmenge, Gallensäurekonzentration und Gallensäureexkretion bei Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normo- (-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*.

Diätprotein	Casein	Lupinenprotein	Casein	Lupinenprotein	2-Way-ANOVA
Cholesterin/Choleat	(-)	(-)	(+)	(+)	Signifikanter Einfluss von (p<0,05)
Fäzesmenge (g/7 d)	13,2 ± 1,8 ^a	13,0 ± 1,4 ^a	13,0 ± 1,3 ^a	10,0 ± 1,2 ^b	Protein x Cholesterin/ Choleat
Gallensäurekonzentration (µmol/g)	11,2 ± 6,7 ^b	10,0 ± 6,2 ^b	55,7 ± 9,5 ^a	56,8 ± 10,0 ^a	Cholesterin/ Choleat
Gallensäureexkretion (µmol/d)	20,9 ± 12,5 ^c	14,5 ± 11,2 ^c	101,4 ± 13,7 ^a	80,2 ± 14,0 ^b	Protein x Cholesterin/ Choleat

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=12)

^{a,b,c} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's Test)

4.2.4. Insulin- und Glucagonkonzentrationen im Plasma

Die Konzentrationen an Insulin und Glucagon im Plasma der Ratten wurden nicht durch die diätetischen Faktoren beeinflusst. Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse.

Tabelle 22: Insulin- und Glucagonkonzentrationen in Plasma von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von normo- (-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus* (2-Way-ANOVA).

Parameter	Casein (-)	Lupine (-)	Casein (+)	Lupine (+)
Insulinkonzentration (pmol/l)	90,1 ± 24,5	110,5 ± 36,1	94,7 ± 33,0	95,5 ± 33,3
Glucagonkonzentration (pg/ml)	44,7 ± 19,3	35,0 ± 16,4	47,4 ± 15,4	42,7 ± 22,9

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=12)

Fisher's Test

4.2.5. Verteilung ausgewählter Apolipoproteine in den Plasmalipoproteinen

In Tabelle 23 sind ausgewählte Apolipoproteine in den VLDL, LDL und HDL-Fraktionen aufgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass Lupinenprotein keinen Einfluss auf die Konzentrationen der untersuchten Apolipoproteine hat. Zwischen der Casein- und der Lupinengruppe gab es keine signifikanten Unterschiede. Die zusätzliche Fütterung mit Cholesterin und Choleat beeinflusste jedoch die Konzentrationen der Apolipoproteine B48, AIV, E und AI in den VLDL und die Apolipoproteine E und CIII in den LDL. So konnte gezeigt werden, dass eine hypercholesterinämische Diät die Apolipoproteinkonzentrationen in den VLDL signifikant erhöht und in den LDL zum Teil erniedrigt. In Abbildung 3 sind repräsentative SDS-Polyacrylamidgele abgebildet.

Tabelle 23: Apolipoproteinverteilung in den Lipoproteinen von Rattenplasma nach 2-wöchiger Fütterung von normo- (-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*.

Diätprotein	Casein	Lupinenprotein	Casein	Lupinenprotein	2-Way-ANOVA
Cholesterin/Choleat	(-)	(-)	(+)	(+)	Signifikanter Einfluss von (p<0,05)
VLDL					
B48	375 ± 82 ^b	439 ± 163 ^b	630 ± 85 ^a	648 ± 46 ^a	Cholesterin/ Choleat
AIV	22,5 ± 4,8 ^a	16,5 ± 15,2 ^a	51,8 ± 40,3 ^{ab}	72,9 ± 43,3 ^a	Cholesterin/ Choleat
E	229 ± 40 ^b	319 ± 67 ^{ab}	381 ± 92 ^a	388 ± 98 ^a	Cholesterin/ Choleat
AI	11,5 ± 15,6 ^b	27,6 ± 44,0 ^{ab}	56,9 ± 45,4 ^a	66,4 ± 21,3 ^a	Cholesterin/ Choleat
LDL					
B100	172 ± 144	214 ± 119	129 ± 97	117 ± 113	-
B48	42,9 ± 31,5	51,6 ± 35,2	55,6 ± 28,7	46,2 ± 36,1	-
E	570 ± 235 ^a	587 ± 216 ^a	349 ± 102 ^b	225 ± 70 ^b	Cholesterin/ Choleat
CIII	418 ± 130 ^a	435 ± 134 ^a	298 ± 119 ^b	256 ± 79 ^b	Cholesterin/ Choleat
HDL					
AIV	36,0 ± 21,9	31,8 ± 10,7	42,5 ± 14,8	32,1 ± 24,7	-
AI	46,6 ± 36,3	53,6 ± 43,3	59,9 ± 45,3	60,0 ± 53,1	-

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=12)

^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's Test)

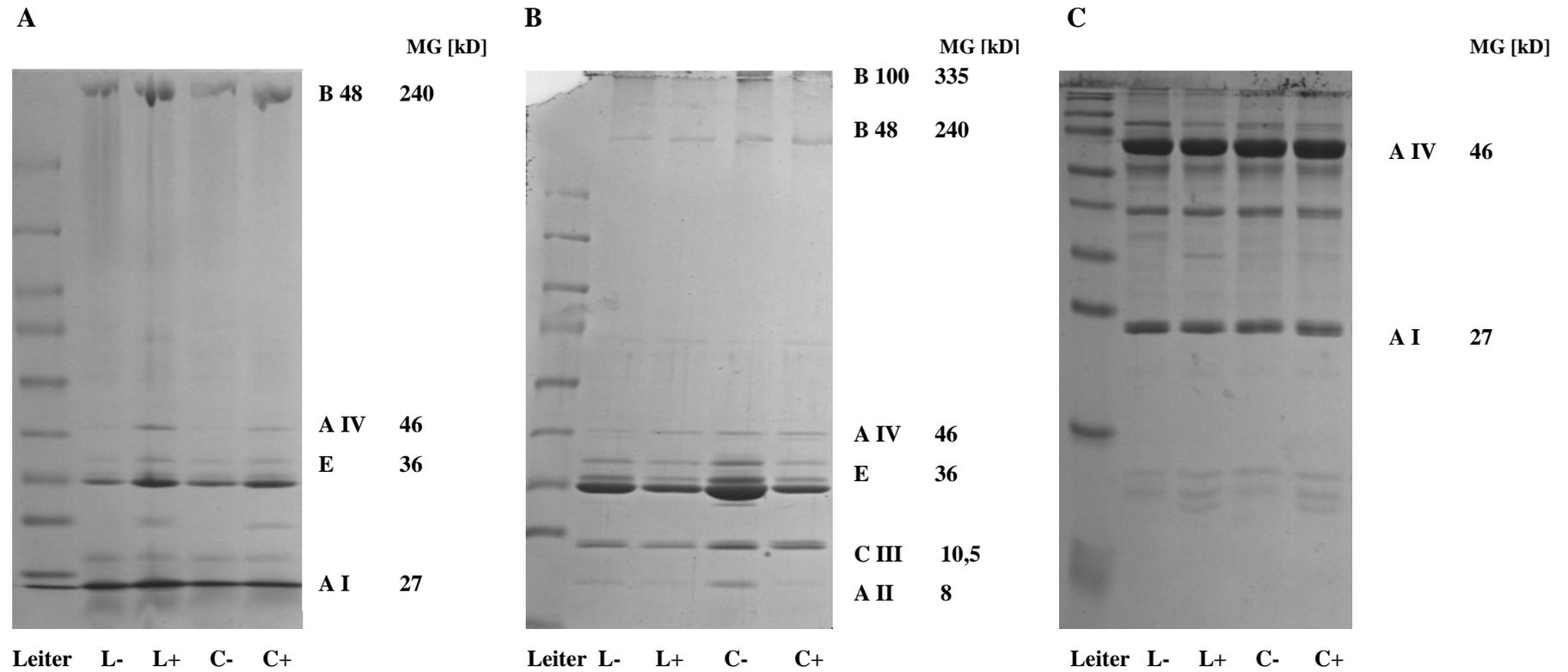


Abbildung 3: SDS-Polyacrylamid-Gradientengel: Apolipoproteine in den Lipoproteinfraktionen VLDL (A), LDL (B) und HDL (C).
 Abk. L, Lupinenprotein; C, Casein; -, normolipidämische Diät; +, hypercholesterinämische Diät mit 1% Cholesterin und 0,5% Choleat;
 MG (Molekulargewicht in Dalton)

4.2.6. Glutathion-, Homocystein- und Cysteinkonzentrationen im Plasma

In Tabelle 24 sind die Homocystein- und Cysteinkonzentrationen im Plasma aufgeführt. Es wurden nur die Gruppen (+) miteinander verglichen, die die hypercholesterinämische Diät erhielten. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den 2 Gruppen.

Tabelle 24: Homocystein- und Cysteinkonzentrationen im Rattenplasma nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*.

Parameter	Casein (+)	Lupine (+)
Homocysteinkonzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$7,6 \pm 2,3$	$8,4 \pm 2,6$
Cysteinkonzentration ($\mu\text{mol/l}$)	$85,9 \pm 20,9$	$94,9 \pm 24,1$

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=12)

Fisher's Test

Ratten, die eine hypercholesterinämische Diät mit Lupinenprotein erhielten, hatten 25% höhere Gesamtglutathionkonzentrationen im Plasma, als Ratten, die Casein erhielten (siehe Abbildung 4).

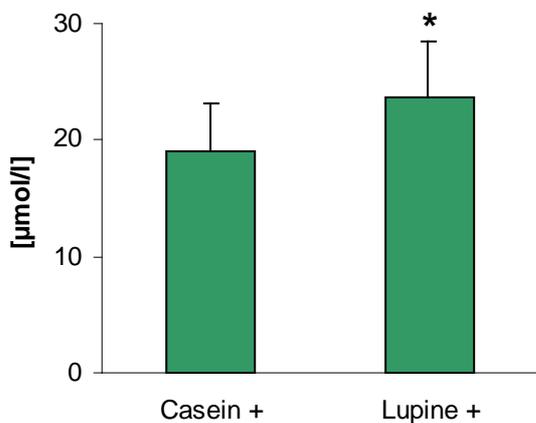


Abbildung 4: Gesamtglutathionkonzentration im Plasma von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*.

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=12)

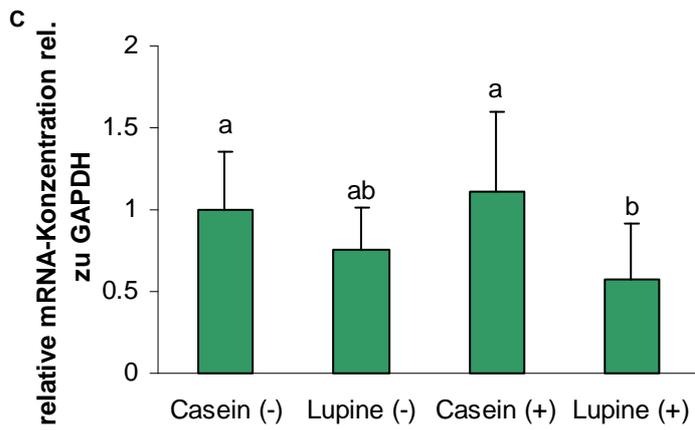
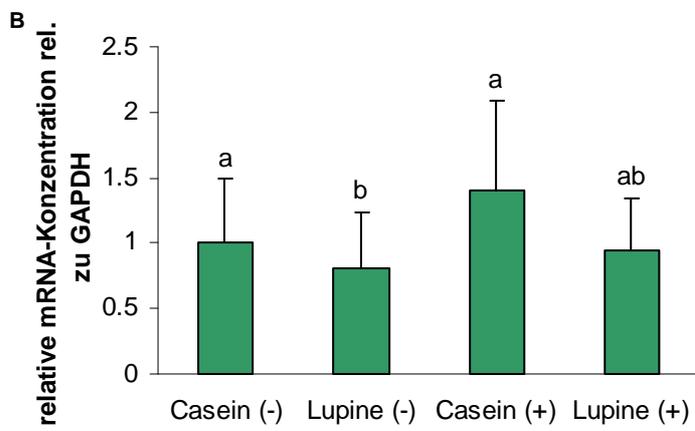
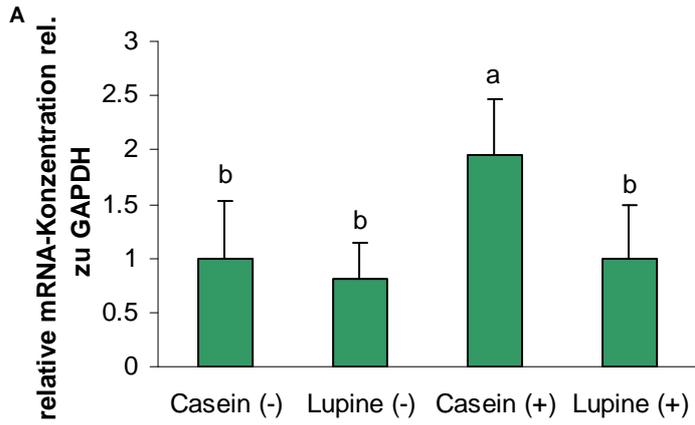
* Werte unterscheiden sich signifikant von Casein ($p < 0,05$; Student's t-Test)

4.2.7. Genistein-, Daidzein und Genistinkonzentrationen im Rohprotein

Die Messungen der Isoflavone Genistein, Daidzein und Genistin im Rohprotein aus *Lupinus angustifolius*, Boregine α -/ β -Conglutin-Fraktion, Boregine TPE; Vitabor TPE; Probor TPE und aus *Lupinus albus* Typ E und TPE1 ergaben nach unserer Analyse, dass alle Substanzen unter der Nachweisgrenze lagen. Das heißt, dass sich die gemessenen Werte von Genistein unter der Nachweisgrenze von 1,39 $\mu\text{mol/kg}$, die von Daidzein unter 1,18 $\mu\text{mol/kg}$ und die von Genistin unter 2,22 $\mu\text{mol/kg}$ befanden. Dementsprechend sind im Rohprotein der *Lupinus albus* und der *Lupinus angustifolius* so gut wie keine Isoflavone vorhanden.

4.2.8. Hepatische mRNA-Expression von lipogenen Enzymen

Die relative mRNA-Konzentration an SREBP-1c in der Leber wurde einerseits durch den Proteintyp ($p < 0,01$) und andererseits durch den Diättyp ($p < 0,05$) beeinflusst (Abbildung 5). Für die relative mRNA-Konzentration von SREBP-1c konnte eine signifikante Interaktion von Protein und Diät festgestellt werden. Bei Verfütterung der hypercholesterinämischen Diät führte Lupinenprotein zu niedrigeren mRNA-Konzentrationen an SREBP-1c als Casein, während bei normocholesterinämisch gefütterten Ratten keine Unterschiede zwischen den Diätproteinen auftrat. Somit konnte gezeigt werden, dass Lupinenprotein das hepatische mRNA-Niveau des SREBP-1c zwar in hypercholesterinämischen Ratten, aber nicht in normocholesterinämischen Ratten senken kann. Lupinenprotein erniedrigte die relativen mRNA-Konzentrationen von G-6-PDH ($p < 0,05$), FAS ($< 0,01$), Delta-9-D. ($p < 0,01$) und GPAT ($p < 0,01$) verglichen mit Casein sowohl in der normocholesterinämischen, als auch in der hypercholesterinämischen Gruppe (Abbildung 5). Ratten, welche die hypercholesterinämische Diät erhielten, hatten signifikant höhere mRNA-Konzentrationen an Delta-9-D. ($p < 0,05$) und GPAT ($p < 0,05$), als Ratten die eine Diät ohne Cholesterin und Choleat verzehrten. Die relativen mRNA-Konzentrationen von FAS und G-6-PDH wurden nicht durch den Diättyp beeinflusst.



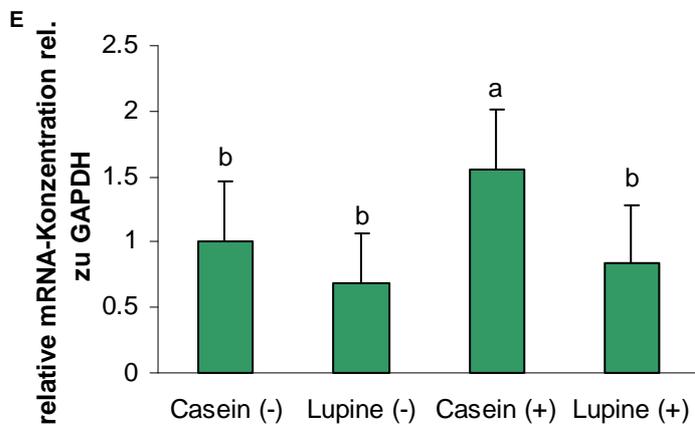
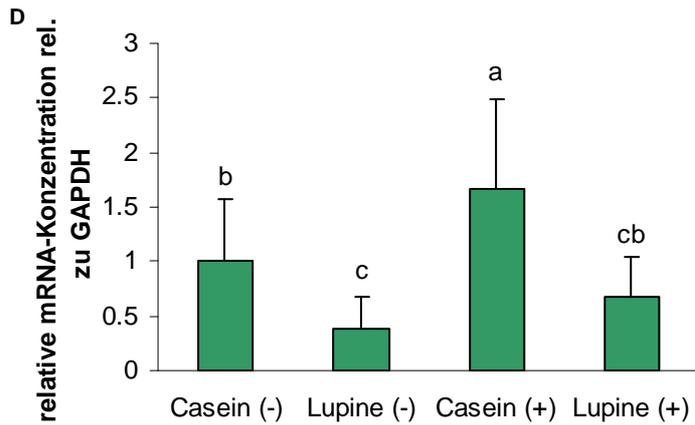


Abbildung 5: Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c (A); Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (B); Fatty Acid Synthase (C); Delta-9-D. (D) und Acyl-CoA:Glycerol-3-Phosphat Acyltransferase (E) in Rattenleber nach 2-wöchiger Fütterung von normo- oder hypercholesterinämischen Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*.

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung,

^{a,b,c} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$; Fisher's Test, 2-Way-ANOVA) (Casein (-) wurde gleich 1,00 gesetzt)

4.2.9. Hepatische mRNA-Expression von Genen des Triglyceridabbaus

Die relative hepatische mRNA-Konzentrationen von LPL, HL und Apo A5 waren in der Lupinengruppe signifikant höher als in der Caseindiät ($p < 0,05$) (Tabelle 25). Zusätzlich war die mRNA-Konzentration der HL bei Verfütterung der hypercholesterinämischen Diät signifikant höher, als bei der normocholesterinämischen Diät. Die mRNA-Konzentrationen von LPL und Apo A5 wurden nicht durch den Diättyp beeinflusst.

4.2.10. Hepatische mRNA-Expression von PPAR α -regulierten Genen der Fettsäureoxidation

Weder der Proteintyp, noch die Diätform hatten einen Einfluss auf die mRNA-Konzentrationen von ACO, CPT-1 und CYP4A1 (Tabelle 25).

4.2.11. Hepatische mRNA-Expression ausgewählter Gene des Cholesterinstoffwechsels

Ratten, die die hypercholesterinämische Diät erhielten, hatten über 35% geringere hepatische mRNA-Konzentrationen an HMG-CoA-R. als Ratten, die eine normolipidämische Diät verzehrten ($p < 0,01$) (Tabelle 25). Die hepatischen mRNA-Konzentrationen von ABC-A1 ($p < 0,05$), ACAT ($p < 0,01$), CYP7A1 ($p < 0,01$), LXR α ($p < 0,05$) und SR-B1 ($p < 0,01$) waren signifikant höher bei den Ratten, die die hypercholesterinämische Diät erhielten im Vergleich zu den Ratten, die normolipidämische Diät supplementierten (Tabelle 25). Die relative mRNA-Konzentration von LCAT blieb unverändert durch die Zulage von Cholesterin und Choleat. Die Ratten, die Lupinenprotein erhielten, hatten signifikant niedrigere mRNA-Konzentrationen an SR-B1 als Ratten, die Casein verzehrten ($p < 0,01$) und signifikant höhere mRNA-Konzentration an ABC-A1 ($p < 0,01$). Die relativen mRNA-Konzentrationen von ACAT, CYP7A1, LCAT und LXR α veränderten sich durch das Lupinenprotein nicht (Tabelle 25). Es ergaben sich keine interaktiven Effekte der beiden diätetischen Faktoren auf die mRNA-Konzentrationen von ABC-A1, ACAT, CYP7A1, HMG-CoA-R., LCAT, LDL-R., LXR α , SR-B1 und SREBP2 (Tabelle 25).

Tabelle 25: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Cholesterin- und Triglyceridmetabolismus in Rattenlebern nach 2-wöchiger Fütterung von normo- (-) oder hypercholesterinämischen (+) Diäten mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. albus*.

Diätprotein	Casein		Lupinenprotein		2-WayANOVA
	(-)	(-)	(+)	(+)	Signifikanter Einfluss von (p<0,05)
ACO	1,00 ± 0,32	1,01 ± 0,35	1,15 ± 0,68	0,99 ± 0,44	-
CPT-1	1,00 ± 0,88	0,62 ± 0,51	0,72 ± 0,89	1,23 ± 1,43	-
CYP4A1	1,00 ± 0,52 ^a	0,75 ± 0,55 ^a	0,60 ± 0,60 ^b	0,48 ± 0,51 ^b	-
SREBP2	1,00 ± 0,88	0,91 ± 0,41	0,60 ± 0,27	0,62 ± 0,33	-
HMG-CoA-R.	1,00 ± 0,82 ^a	0,72 ± 0,37 ^{ab}	0,36 ± 0,23 ^b	0,27 ± 0,15 ^b	Cholesterin/ Choleat
LDL-R.	1,00 ± 0,63	0,93 ± 0,54	0,60 ± 0,41	0,72 ± 0,15	-
CYP7A1	1,00 ± 0,66 ^b	0,92 ± 0,59 ^b	2,29 ± 0,79 ^a	1,39 ± 1,04 ^b	Protein x Cholesterin / Choleat
SR-B1	1,00 ± 0,58 ^b	0,49 ± 0,25 ^c	1,48 ± 0,49 ^a	0,81 ± 0,39 ^{bc}	Protein x Cholesterin/ Choleat
ABC-A1	1,00 ± 0,47 ^b	1,38 ± 0,54 ^{ab}	1,21 ± 0,32 ^b	1,78 ± 0,55 ^a	Protein x Cholesterin/ Choleat
LXR α	1,00 ± 0,19	1,08 ± 0,48	1,38 ± 0,60	1,24 ± 0,45	Cholesterin/ Choleat
Apo A1	1,00 ± 0,34	1,17 ± 0,36	1,07 ± 0,45	1,11 ± 0,32	-
ACAT	1,00 ± 0,61 ^b	0,90 ± 0,34 ^b	1,36 ± 0,37 ^a	1,34 ± 0,52 ^a	Cholesterin/ Choleat
LCAT	1,00 ± 0,42	1,21 ± 0,43	1,15 ± 0,45	1,45 ± 0,45	-

Fortsetzung auf der nächsten Seite

Fortsetzung aus Tabelle 25

LPL	1,00 ± 0,50 ^b	1,32 ± 0,60 ^a	1,26 ± 0,72 ^{ab}	1,77 ± 0,59 ^a	Protein
HL	1,00 ± 0,54 ^c	1,70 ± 0,66 ^{ab}	1,67 ± 0,66 ^b	3,32 ± 1,21 ^a	Protein x Cholesterin/ Choleat
Apo A5	1,00 ± 0,35 ^b	1,59 ± 1,08 ^{ab}	1,03 ± 0,37 ^b	1,92 ± 1,18 ^a	Protein

ACO, acyl-CoA-Oxidase; CPT-1, carnitine palmitoyltransferase-1a; CYP4A1, cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 1; SREBP2, sterol regulatory element-binding protein; HMG-CoA-R., 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA; LDL-R., LDL-receptor; CYP7A1, cholesterol 7 α -hydroxylase; SR-B1, class B type 1 scavenger receptor; ABC-A1, ATP-binding cassette transporter; LXR α , liver X receptor; Apo A1, apolipoprotein A1; ACAT, acyl-CoA cholesterol acyltransferase; LCAT, lecithin:cholesterol acyltransferase; LPL lipoprotein lipase; HL, Hepatic lipase, Apo A5, apolipoprotein A5

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=12)

^{a, b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's Test, 2-Way-ANOVA) (Casein (-) wurde gleich 1,00 gesetzt)

4.3. Vergleich verschiedener Proteine aus blauer Lupine bezüglich ihrer lipidsenkenden Wirkung bei hypercholesterinämischen Ratten (V3)

4.3.1 Leistungsparameter

In Tabelle 26 sind die Leistungsparameter der verschiedenen Behandlungsgruppen aufgeführt. Die Körperanfangs- und Endgewichte unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Alle Gruppen hatten im Mittel gleiche Körpermassezunahmen. Die absoluten Lebermassen unterschieden sich nicht. Die Ratten, die Lupinenprotein der α - β -Conglutin-Fraktion der Boregine erhielten, hatten signifikant höhere Lebermassen, als Ratten aller anderen Gruppen.

4.3.2. Parameter des Lipidstoffwechsels

Die Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen im Plasma, in der Leber und in den Lipoproteinfraktionen sind in Tabelle 27 dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass vor allem eine Fütterung von Lupinenproteinen der Sorte Boregine und Vitabor zu niedrigeren Triglyceridkonzentrationen im Plasma und in der VLDL-Fraktion führt, als die Supplementierung von Casein. Die Triglyceridkonzentrationen der anderen Gruppen unterschieden sich nicht voneinander. In der Leber waren die Triglyceridkonzentrationen durch Fütterung Vitabor im Vergleich zu Casein tendenziell erniedrigt.

Die Cholesterinkonzentrationen im Plasma unterschieden sich nicht zwischen den Behandlungsgruppen. Allerdings war die Cholesterinkonzentration in der LDL-Fraktion signifikant niedriger bei den Ratten, die Lupinenprotein der Sorte Vitabor erhielten, als bei Ratten, die Casein erhielten. Keine der Lupinenprotein-Sorten führten hier zu einer Veränderung der Cholesterinkonzentrationen in der Leber. Die Cholesterinkonzentration in der HDL-Fraktion unterschieden sich nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Tiere, die in ihrer Diät TPE der Sorte Boregine erhielten, hatten tendenziell niedrigere hepatische Cholesterinkonzentrationen verglichen mit Tieren der Kontrollgruppe. Die anderen Gruppen unterschieden sich nicht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Cholesterinkonzentration in der HDL-Fraktion war in den Ratten, die α - β -Conglutin-Fraktion der Boregine und Vitabor erhielten, tendenziell höher, verglichen mit Casein.

Tabelle 26: Leistungsparameter der Ratten nach 2-wöchiger Fütterung mit 5% Casein oder verschiedenen Sorten Lupinenprotein aus *L. angustifolius*.

Diätprotein	Casein	Boregine TPE	Boregine α -/ β -Conglutin- Fraktion	Probor TPE	Vitabor TPE
Körpergewicht-Anfang (g)	84,4 ± 9,2	86,6 ± 15,2	86,9 ± 14,2	84,8 ± 11,9	84,3 ± 11,8
Körpergewicht-Ende (g)	157,3 ± 8,2	156,5 ± 10,0	154,7 ± 11,3	156,5 ± 10,0	150,3 ± 9,3
Körpermasse Zunahme (g)	72,9 ± 6,1	69,9 ± 7,3	67,8 ± 8,0	68,8 ± 11,7	65,9 ± 5,2
Körpermasse Zunahme (g/d)	4,05 ± 0,34	3,88 ± 0,41	3,77 ± 0,45	3,82 ± 0,65	3,66 ± 0,29
Lebergewicht (g)	9,36 ± 0,79 ^b	8,24 ± 0,65 ^a	9,91 ± 0,60 ^c	9,35 ± 0,60 ^b	9,55 ± 0,76 ^{bc}
rel. Lebergewicht (g/100 g KM)	5,96 ± 0,51	5,92 ± 0,47	6,43 ± 0,52	6,10 ± 0,40	6,36 ± 0,47

TPE, Totalproteinextrakt; KM, Körpermasse

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n=12)

^{a,b,c} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's Test)

Tabelle 27: Konzentration von Triglyceriden und Cholesterin in Plasma, Lipoproteinen und Leber von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 5% Casein oder verschiedenen Sorten Lupinenprotein aus *L. angustifolius*.

Diätprotein	Casein	Boregine TPE	Boregine α -/ β -Conglutin-Fraktion	Probor TPE	Vitabor TPE
Triglyceride					
Plasma (mmol/l)	1,07 \pm 0,20 ^b	1,04 \pm 0,38 ^b	0,85 \pm 0,22 ^a	1,24 \pm 0,27 ^b	0,81 \pm 0,17 ^b ^c
VLDL (mmol/l)	0,83 \pm 0,19 ^b	0,77 \pm 0,37 ^b	0,59 \pm 0,19 ^a	0,96 \pm 0,21 ^b	0,50 \pm 0,30 ^a
Leber (μ mol/g)	37,8 \pm 9,6	35,3 \pm 9,5	33,7 \pm 10,4	30,9 \pm 11,3	31,3 \pm 8,0
Cholesterin					
Plasma (mmol/l)	8,96 \pm 3,39	8,09 \pm 3,75	8,55 \pm 2,49	9,51 \pm 4,65	7,87 \pm 2,43
LDL (mmol/l)	2,44 \pm 1,41 ^b	2,12 \pm 1,20 ^{ab}	1,97 \pm 0,90 ^{ab}	2,16 \pm 0,93 ^{ab}	1,53 \pm 0,51 ^a
HDL (mmol/l)	1,93 \pm 0,70	1,95 \pm 1,32	2,58 \pm 1,36	2,59 \pm 1,71	2,21 \pm 1,50
Leber (μ mol/g)	127,7 \pm 21,8 ^b	101,6 \pm 21,3 ^a	114,1 \pm 25,2 ^{ab}	125,3 \pm 25,0 ^b	125,1 \pm 21,3 ^b

TPE, Totalproteinextrakt; VLDL, Very low density lipoprotein; LDL, Low Density Lipoprotein; HDL, High Density Lipoprotein

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=12)

^{a,b,c} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's Test)

4.3.3. Expression von Genen des Triglyceridstoffwechsels in der Leber

Aufgrund der signifikant niedrigeren Triglyceridkonzentrationen in Plasma und in den VLDL durch Lupinenprotein wurde die mRNA-Expression ausgewählter Gene in der Leber untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass vor allem die mRNA-Konzentration lipogener Enzyme durch die Fütterung mit dem Totalproteinextrakt der Sorte Vitabor beeinflusst wurde. Abbildung 6 zeigt, dass eine Fütterung der Sorte Vitabor zu einer signifikanten Erniedrigung der mRNA von SREBP-1c, FAS und zu tendenziell niedrigeren mRNA-Konzentrationen bei Delta-9-D ($p=0,057$) führte.

Die mRNA-Konzentrationen von Apo A5 und Hepatischer Lipase unterschieden sich zwischen den Lupinenproteinsorten und Casein nicht (Daten sind nicht gezeigt).

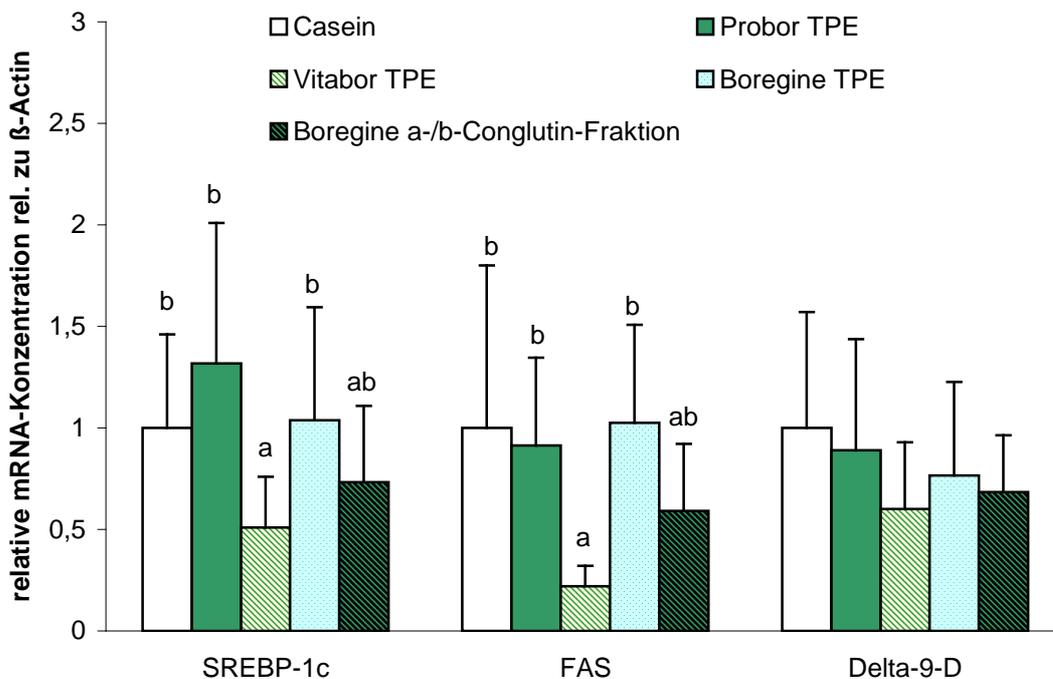


Abbildung 6: Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c; Fatty Acid Synthase und Delta-9-D. in Rattenleber nach 2-wöchiger Fütterung mit hypercholesterinämischer Diät mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Probor, Vitabor und Boregine.

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=12)

^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$; Fisher's-Test) (Casein = 1,00 gesetzt)

4.3.4. Expression ausgewählter Gene des Cholesterinstoffwechsels in der Leber

Die Ratten, die Lupinenprotein der Sorte Vitabor erhielten hatten 37% niedrigere mRNA-Konzentrationen an SREBP2 im Vergleich zur Caseingruppe. Allerdings konnte dieses Ergebnis aufgrund der hohen Standardabweichung statistisch nicht abgesichert werden. Ratten, die das Lupinenprotein der Sorte Vitabor erhielten, hatten eine signifikant niedrigere mRNA-Konzentration an HMG-CoA-R. und tendenziell niedrigere mRNA-Konzentrationen an LDL-R. als Ratten, die Casein erhielten. Die mRNA-Konzentrationen von SREBP2, HMG-CoA-R. und LDL-R. in den Ratten, die Lupinenprotein der Sorten Probor und Boregine erhielten, unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe (Abbildung 7). Fütterung des Lupinenproteins der Sorte Vitabor führte außerdem zu signifikant niedrigeren mRNA-Konzentrationen von Apo A1, Cyp-7A1, ABC-G5, ABC-G8 und FXR, als durch Fütterung mit Casein. Die mRNA-Konzentration des LXR α war hingegen signifikant um 43 % erhöht. (Tabelle 28). Die Gruppen, die Lupinenprotein der Sorten Probor und Boregine erhielten, hatten keine unterschiedlichen mRNA-Konzentrationen der genannten Gene (Daten nicht gezeigt).

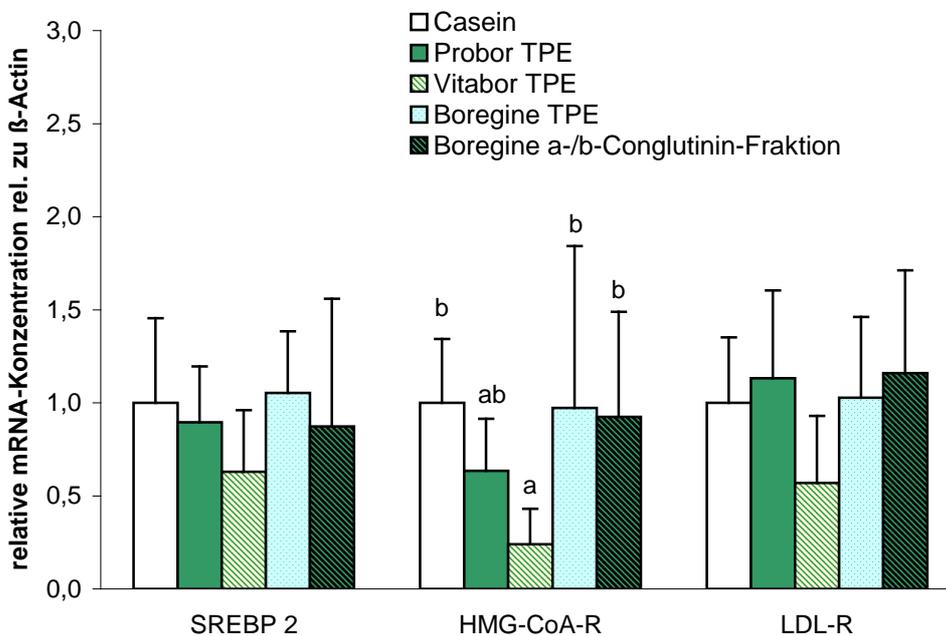


Abbildung 7: Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP2; HMG-CoA-R. und LDL-R. in Rattenleber nach 2-wöchiger Fütterung mit hypercholesterinämischer Diät mit 5% Casein oder Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Probor, Vitabor und Boregine.

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=12)

^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's-Test) (Casein = 1,00 gesetzt)

Tabelle 28: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Cholesterin- und Triglyceridmetabolismus in Rattenlebern nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischer Diät mit 5% Casein oder mit 5% Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Probor, Vitabor und Boregine.

Diätprotein	Casein	Boregine TPE	Boregine α -/ β -Conglutin- Fraktion	Probor TPE	Vitabor TPE
Apo A5	1,00 \pm 0,45 ^b	1,16 \pm 0,27	1,06 \pm 0,40	1,23 \pm 0,40	1,21 \pm 0,56
HL	1,00 \pm 0,51 ^a	1,13 \pm 0,67	1,17 \pm 0,74	0,90 \pm 0,30	0,97 \pm 0,35
CYP-7A1	1,00 \pm 1,07 ^a	1,14 \pm 0,55 ^b	0,91 \pm 0,60 ^b	0,91 \pm 0,34 ^b	0,49 \pm 0,36 ^a
FXR	1,00 \pm 0,68	0,90 \pm 0,56 ^b	0,98 \pm 0,68 ^b	0,72 \pm 0,29 ^b	0,32 \pm 0,12 ^a
ABC-G5	1,00 \pm 0,68	1,07 \pm 0,72 ^b	0,94 \pm 0,75 ^b	0,75 \pm 0,36 ^{ab}	0,45 \pm 0,34 ^a

Apo A5, apolipoprotein A5; HL, Hepatische Lipase; CYP7A1, Cholesterin-7 α -Hydroxylase; FXR, farnesoid X-receptor; ABC-G5, ATP-binding cassette transporter;

TPE, Totalproteinextrakt

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=12)

^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's-Test)

4.3.5. Expression ausgewählter Gene in Muskelgewebe

Um zu untersuchen, inwieweit die Fütterung von TPE der Sorte Vitabor eine Rolle bei insulinsensitiven Genen spielt, wurde die Genexpression im Skelettmuskel gemessen. Es zeigten sich jedoch in den mRNA-Konzentrationen von Protein-Tyrosin-Phosphatase 1b (PTP-1b), Insulin-Rezeptor (Ins-Rec.) und Glucosetransporter Typ 4 (Glut-4) keine Unterschiede im Vergleich zur Caseingruppe (Tabelle 29).

Tabelle 29: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene im Skelettmuskel von Ratten nach 2-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischer Diät mit 5% Casein oder mit 5% Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Vitabor.

Diätprotein	Casein	Vitabor TPE
PTP-1b	1,00 ± 0,38	0,96 ± 0,52
Ins-Rec.	1,00 ± 0,47	0,96 ± 0,40
Glut-4	1,00 ± 0,42	0,97 ± 0,81

TPE, Totalproteinextrakt; PTP-1b, Protein-Tyrosin-Phosphatase 1b; Insulin-Rezeptor, Ins-Rec; Glut-4, Glucosetransporter Typ 4

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, (n=12), Student's t-Test

4.4. Untersuchungen zur lipidsenkenden Wirkung von Protein aus blauer Lupine bei laktierenden Ratten und ihren Nachkommen (V4)

4.4.1. Leistungsparameter der Muttertiere

In Tabelle 30 sind die Leistungsparameter der Muttertiere aufgeführt. Die Anfangskörpergewichte unterschieden sich zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe nicht. Allerdings hatten die Tiere, die Lupinenprotein erhielten ab der dritten Fütterungswoche ein signifikant niedrigeres Körpergewicht, als die Tiere, die Casein verzehrten. Nach dem Ende der 6-wöchigen Fütterungsperiode hatten die Ratten der Lupinengruppe 20% niedrigere Körpergewichte verglichen mit Casein. Die mittlere Futtermittelaufnahme war bei der Kontrollgruppe signifikant höher, als in der Gruppe, die Lupinenprotein erhielt. Die relative Lebermasse war in der Gruppe, die Lupinenprotein erhielten signifikant höher, als bei den Tieren der Caseingruppe.

Tabelle 30: Leistungsparameter der weiblichen Ratten während der Laktation und der Trächtigkeit nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischer Diät mit 20% Casein oder Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Boregine TPE.

Parameter	Casein	Lupinenprotein
Körpergewicht-Anfang (g)	314,4 ± 16,0	310,0 ± 18,9
Körpergewicht-1.Woche (g)	339,4 ± 15,3	335,1 ± 20,0
Körpergewicht-2.Woche (g)	365,0 ± 14,5	349,0 ± 14,6
Körpergewicht-3.Woche (g)	455,5 ± 28,9	402,8 ± 24,3*
Körpergewicht-4.Woche (g)	373,5 ± 20,0	290,4 ± 39,0*
Körpergewicht-5.Woche (g)	371,1 ± 31,2	294,6 ± 17,6*
Körpergewicht-6.Woche (g)	357,9 ± 17,2	288,9 ± 17,0*
Mittlere Gesamtfuttermittelaufnahme (g/d/Tier)	31,3 ± 2,9	26,3 ± 1,8*
Lebergewicht (g)	29,6 ± 2,3	30,5 ± 3,7
rel. Lebergewicht (g/100 g KM)	8,3 ± 0,9	10,6 ± 1,1*

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein (p<0,05; Student's-t-Test)

4.4.2. Leistungsparameter der Nachkommen

In Tabelle 31 sind die Leistungsdaten der Jungtiere zusammengefasst. Dabei wurden keine Unterschiede in der Anzahl der Jungen pro Wurf zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt. Allerdings war sowohl die gesamte Wurfmasse, als auch das mittlere Körpergewicht der Jungtiere signifikant niedriger bei der Gruppe, deren Muttertiere Lupinenprotein erhielten. Um in allen Gruppen eine homogene Anzahl der Jungen pro Muttertier zu gewährleisten, wurden die Würfe auf 10 Jungtiere pro Muttertier angeglichen. Sowohl am 7., als auch am 14. und 18. Laktationstag waren die mittleren Wurfgewichte der Jungtiere, deren Muttertiere die Kontrolldiät erhielten, signifikant höher als die der Lupinenproteingruppe. Am Tag der Probennahme war das mittlere Körpergewicht pro Jungtier fast doppelt so hoch bei der Caseingruppe im Vergleich zur Lupinenproteingruppe (Abbildung 8). Für die Bestimmung der Lebermassen wurden die Lebern von 3 Jungtieren gepoolt. Dabei zeigte sich auch hier, dass die Lebergewichte bei der Kontrollgruppe signifikant höher waren, als in der Lupinenproteingruppe.

Tabelle 31: Leistungsparameter der Jungtiere vom Tag der Geburt bis zum 18. Laktationstag nach 6-wöchiger Fütterung der Muttertiere mit hypercholesterinämischer Diät mit 20% Casein oder Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Boregine TPE-

Parameter	Casein	Lupinenprotein
Anzahl Junge pro Wurf (gesamt)	12,9 ± 3,3	12,9 ± 3,6
Anzahl Junge pro Wurf (lebend)	12,9 ± 3,3	12,5 ± 3,5
Wurfmasse zur Geburt - gesamt (g)	85,5 ± 17,2	64,0 ± 16,9*
Mittlere KM / Tier zur Geburt (g)	6,8 ± 1,0	5,1 ± 1,1*
Wurfmasse 7 d - gesamt (g)	119,5 ± 25,0	79,2 ± 13,0*
Wurfmasse 14 d - gesamt (g)	229,3 ± 45,6	133,7 ± 8,7*
Wurfmasse 18 d - gesamt (g)	274,8 ± 57,4	147,9 ± 14,5*
Mittlere Körpermasse/ Tier am Versuchsende (g)	29,4 ± 5,9	15,6 ± 1,4*
Mittleres Lebergewicht (g/ gepoolt aus 3 Jungen)	1,20 ± 0,22	0,40 ± 0,08*
rel. Lebergewicht (g/100 g Leber)	0,46 ± 0,16	0,28 ± 0,06*

KM, Körpermasse

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein (p<0,05; Student's-t-Test)

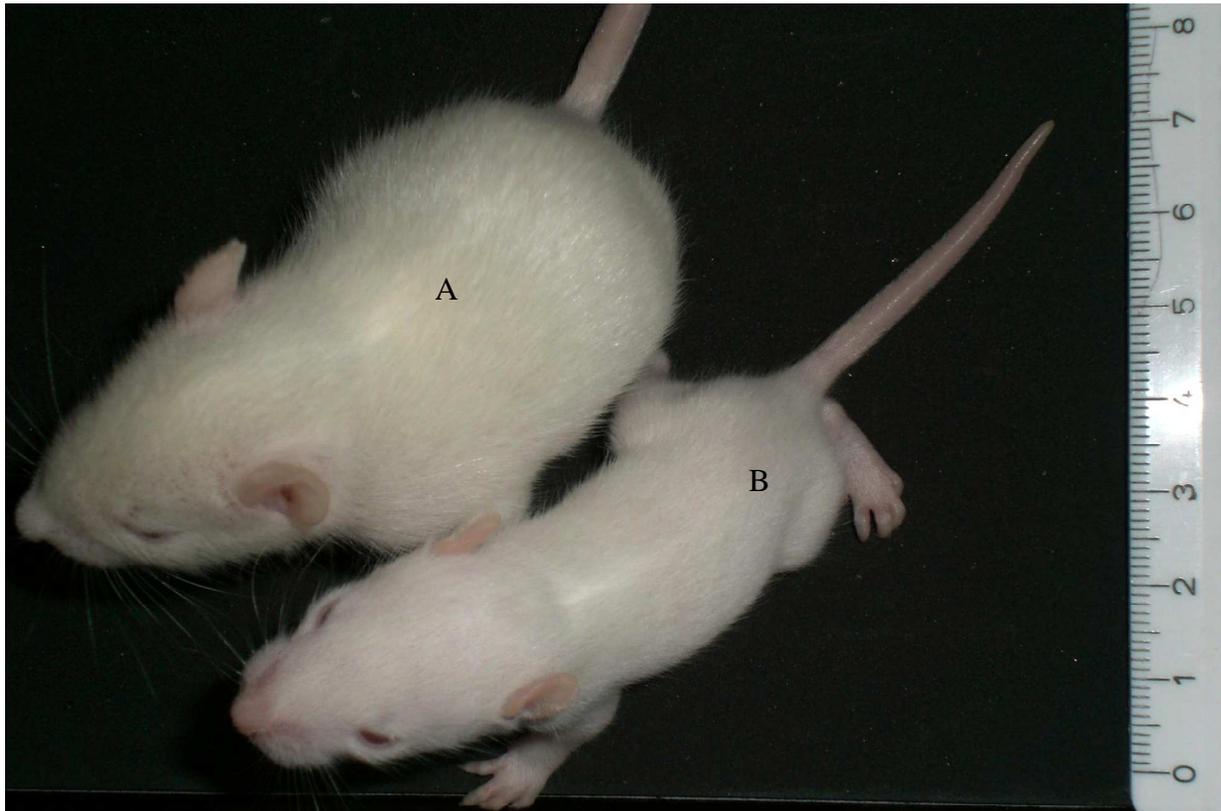


Abbildung 8: unterschiedliche Körpermassenentwicklung der Jungtiere nach 6-wöchiger Fütterung der Muttertiere mit hypercholesterinämischer Diät mit 20% Casein (A) oder Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Boregine TPE (B).

4.4.3. Körpermassenentwicklung der Jungtiere nach der Laktationsperiode

Nach der Laktationsperiode wurden die Jungtiere, die nicht zur Organentnahme verwendet wurden, für weitere 7 Wochen mit Altromin Standarddiät gefüttert. Hierbei sollte untersucht werden, ob sich das stark unterschiedliche Wurfgewicht zwischen den beiden Behandlungsgruppe wieder angleichen kann. Abbildung 9 zeigt, dass auch nach 7 Wochen die mittleren Körpergewichte bei männlichen, als auch bei den weiblichen Nachkommen immer noch signifikant unterschiedlich zwischen der Caseingruppe und der Lupinenproteingruppe waren.

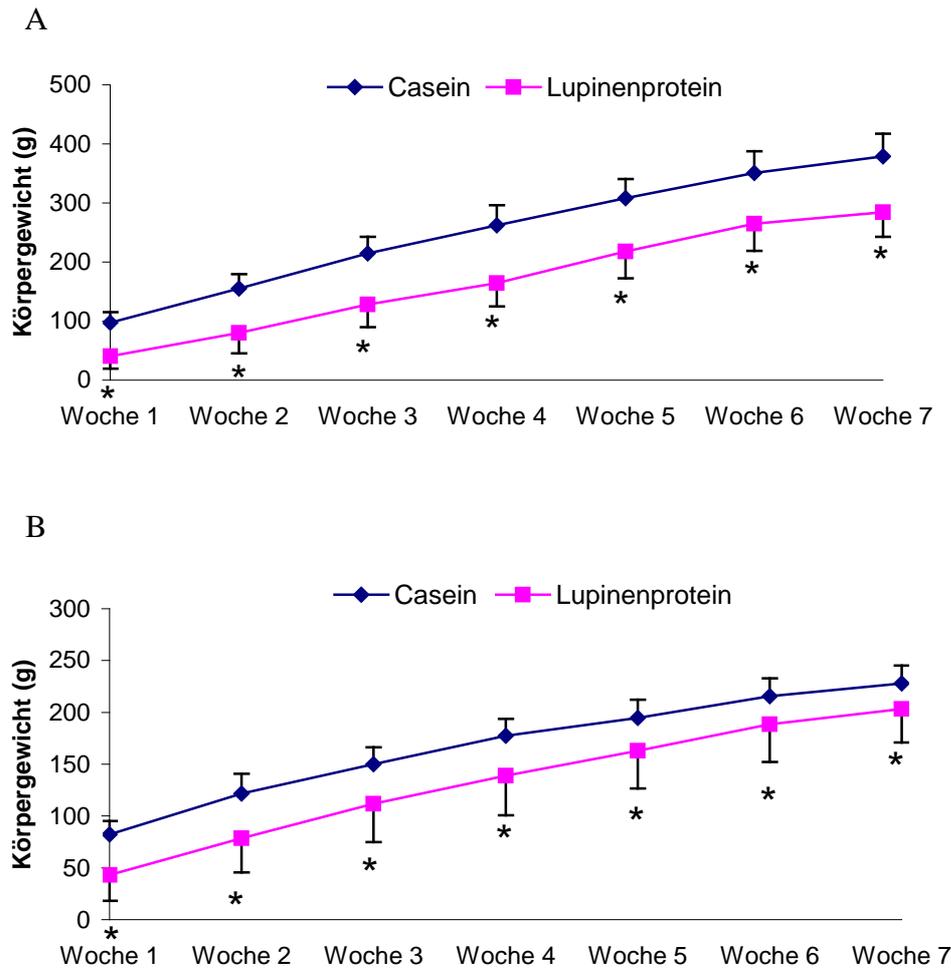


Abbildung 9: Mittlere Körpermasseentwicklung der männlichen (A) und weiblichen (B) Jungtiere innerhalb 7-wöchiger Fütterung mit Standarddiät nach Absetzen vom laktierenden Muttertier.

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein ($p < 0,05$; Student's-t-Test)

4.4.4. Parameter des Lipidstoffwechsels bei den Muttertieren

4.4.4.1. Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen in Plasma, Lipoproteinen und Leber

Die Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen im Plasma, in den Lipoproteinen und in der Leber sind in Tabelle 32 aufgeführt. Es konnte festgestellt werden, dass die Triglyceridkonzentrationen im Plasma und in der Chylomikronen-/VLDL-Fraktion signifikant niedriger in der Lupinenproteingruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe waren. In der Leber jedoch waren die Triglyceridkonzentrationen in der Lupinengruppe signifikant höher, als in der Caseingruppe. Die Cholesterinkonzentration im Plasma, in der LDL-Fraktion und in der Leber waren signifikant niedriger bei den Tieren, die Lupinenprotein erhielten. Die

Cholesterinkonzentration in den HDL war dagegen bei den Tieren der Lupinenproteingruppe um das 3,5-fache höher, als bei den Ratten der Caseingruppe.

Tabelle 32: Konzentration von Triglyceriden und Cholesterin in Plasma, Lipoproteinen und Leber von laktierenden Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Boregine TPE

Parameter	Casein	Lupinenprotein
Triglyceride		
Plasma (mmol/l)	1,11 ± 0,39	0,50 ± 0,13*
Chylomikronen + VLDL (mmol/l)	1,03 ± 0,40	0,47 ± 0,17*
Leber (µmol/g)	49,7 ± 13,7	103,5 ± 15,0*
Cholesterin		
Plasma (mmol/l)	9,86 ± 4,45	1,88 ± 0,31*
LDL (mmol/l)	1,59 ± 0,80	0,40 ± 0,07*
HDL (mmol/l)	0,28 ± 0,15	1,11 ± 0,13*
Leber (µmol/g)	97,6 ± 20,5	58,6 ± 6,1*

VLDL, Very low density lipoprotein; LDL, Low Density Lipoprotein; HDL, High Density Lipoprotein

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein (p<0,05; Student's-t-Test)

4.4.4.2 Freie Fettsäuren im Plasma

Die Konzentration der freien Fettsäuren im Plasma war bei den Tieren, die Lupinenprotein erhielten signifikant niedriger, als bei den Tieren der Kontrollgruppe (Abbildung 10).

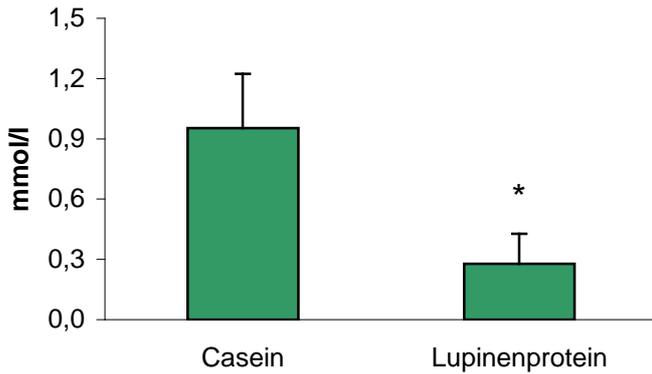


Abbildung 10: Konzentration an freien Fettsäuren im Plasma von laktierenden Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Boregine TPE.

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein ($p < 0,05$; Student's-t-Test)

4.4.4.3. Triglycerid- und Proteinkonzentration in der Milch

Die Triglyceridkonzentration in der Milch der Tiere, die Lupinenprotein erhielten, war signifikant höher (+80%), als bei den Tieren die Casein verzehrten. Die Proteinkonzentration in der Milch der Tiere der Lupinengruppe war dagegen niedriger, als in der Milch von Tieren der Caseingruppe. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse.

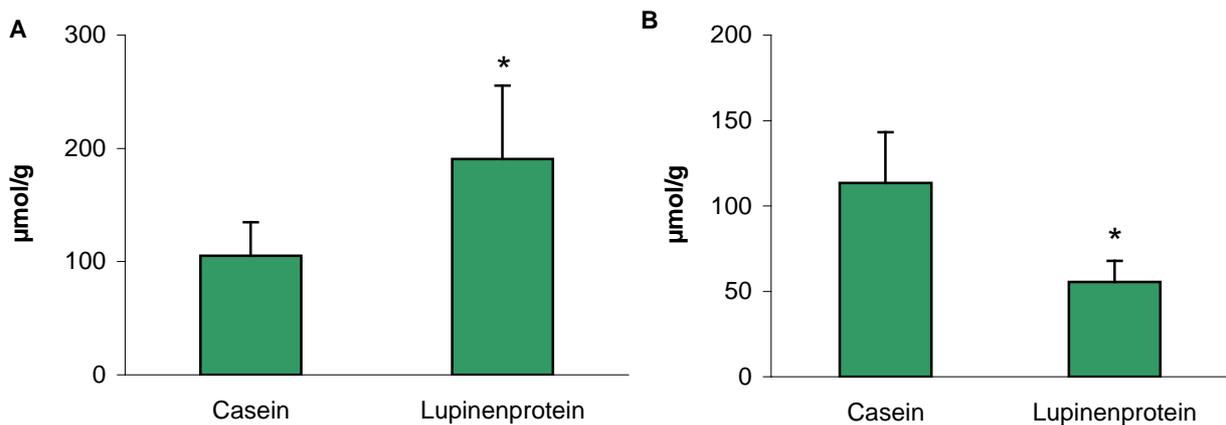


Abbildung 11: Triglycerid- (A) und Proteinkonzentrationen (B) in der Milch laktierender Ratten am 14. Laktationstag nach 5-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Boregine TPE-

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein ($p < 0,05$; Student's-t-Test)

4.4.5. Parameter des Lipidstoffwechsel bei den Nachkommen

Die Triglyceridkonzentrationen im Plasma bei Tieren der Lupinengruppe waren signifikant niedriger, als bei den Tieren der Caseingruppe (Tabelle 33). Die Konzentration an Triglyceriden in der Leber änderte sich nicht zwischen den beiden Gruppen. Dagegen war bei den Tieren der Lupinenproteingruppe die Plasmacholesterinkonzentration signifikant höher, als bei den Tieren der Caseingruppe. Auch in der Leber zeigte sich in der Tendenz eine 38% höhere Cholesterinkonzentration ($p=0,098$).

Tabelle 33: Konzentrationen von Triglyceriden und Cholesterin in Plasma und Leber von Jungtieren am 18. Laktationstag von Muttertieren, die 6 Wochen hypercholesterinämische Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius* Sorte Boregine TPE erhielten.

Parameter	Casein	Lupine
Triglyceride		
Plasma (mmol/l)	2,31 ± 0,63	1,60 ± 0,60*
Leber (µmol/g)	23,3 ± 10,3	18,9 ± 6,4
Cholesterin		
Plasma (mmol/l)	6,82 ± 1,58	12,75 ± 2,75*
Leber (µmol/g)	9,6 ± 5,3	13,3 ± 5,0

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein ($p<0,05$; Student's-t-Test)

4.4.6. Relative mRNA-Konzentration ausgewählter Gene des Lipidstoffwechsels in der Leber der Muttertiere

Die relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und dessen Zielgene, die lipogenen Enzyme FAS und Delta-9-D., war in der Leber der Muttertiere in etwa gleichgroß (Tabelle 34). Auch die mRNA-Konzentrationen der Apolipoproteine A5, B 100, sowie des mikrosomale Triglycerid-Transfer-Protein, des LXR-Rezeptor, der HMG-CoA-Synthase und des FABP wurden durch die Lupineproteinfütterung nicht verändert. Allerdings waren die mRNA-Konzentrationen vom Apo A 1, der HL, der CYP-7A1 und der GSH-Peroxidase signifikant durch Lupinenprotein erhöht.

Tabelle 34: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Cholesterin- und Triglyceridmetabolismus in Lebern von weiblichen Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius*.

Parameter	Casein	Lupinenprotein
SREBP-1c	1,00 ± 0,38	0,93 ± 0,38
FAS	1,00 ± 0,38	0,94 ± 0,44
Delta-9-D.	1,00 ± 0,33	0,81 ± 0,35
Apo A5	1,00 ± 0,46	0,96 ± 0,24
Apo B100	1,00 ± 0,39	0,80 ± 0,33
MTTP	1,00 ± 0,39	0,70 ± 0,26
LXR α	1,00 ± 0,34	1,04 ± 0,48
HMG-CoA-Synthase	1,00 ± 0,38	1,04 ± 0,34
L-FABP	1,00 ± 0,32	0,75 ± 0,22
Apo A1	1,00 ± 0,53	1,58 ± 0,67*
Hepatische Lipase	1,00 ± 0,38	1,43 ± 0,39*
CYP-7A1	1,00 ± 0,59	2,70 ± 1,21*
GSH-Px	1,00 ± 0,36	1,46 ± 0,45*

SREBP-1c sterol regulatory element-binding protein; FAS, Fatty Acid Synthase; Apo A5, apolipoprotein A5; MTTP, mikrosomales Triglycerid-Transferprotein; LXR α, liver X receptor; L-FABP, liver -fatty acid binding protein; Apo A1, apolipoprotein A1; CYP7A1, cholesterol 7α-hydroxylase; GSH-Px-Glutathionperoxidase

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein (p<0,05; Student's-t-Test)

In Abbildung 12 sind die relativen mRNA-Konzentrationen des SREBP-2 und seinen Zielgenen HMG-CoA-R. und LDL-R. dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass in der Leber von Ratten, die Lupinenprotein erhielten, die mRNA der HMG-CoA-R. signifikant und die des SREBP2 (p=0,060) und des LDL-R.. (p=0,094) tendenziell höher war, als bei Ratten die Casein erhielten.

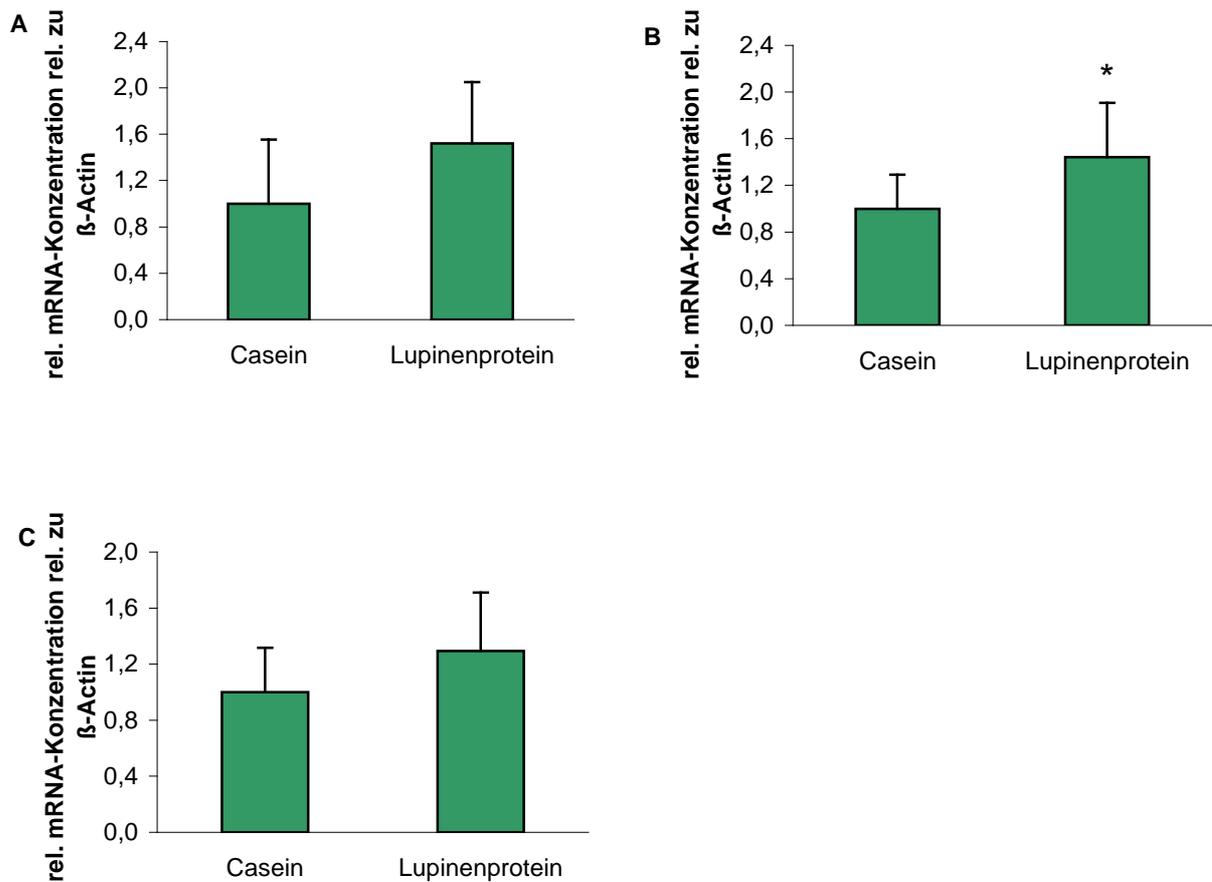
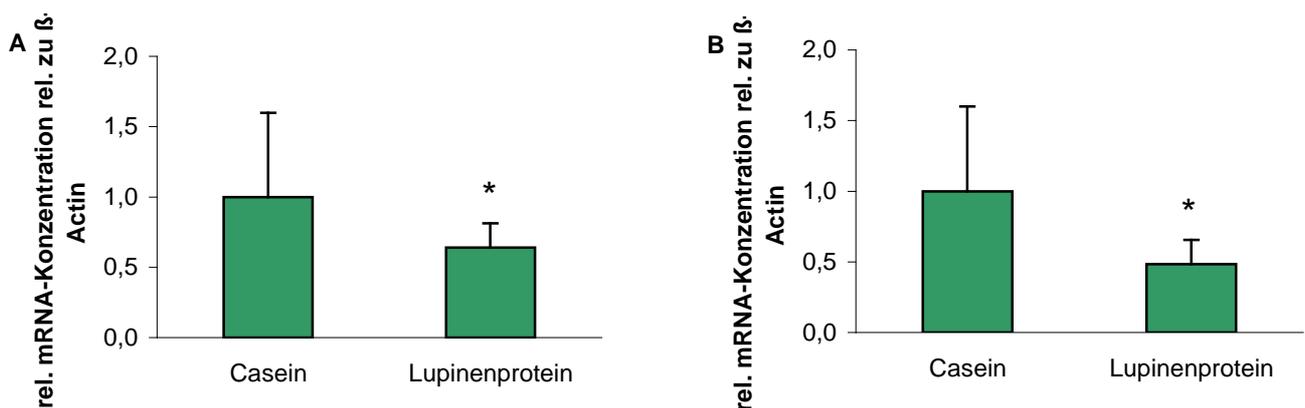


Abbildung 12: Relative hepatische mRNA-Konzentrationen von SREBP2 (A); HMG-CoA-R. (B) und LDL-R. (C) von weiblichen Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius*.

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein ($p < 0,05$; Student's-t-Test)

Auch die mRNA-Konzentrationen des PPAR α und seiner Zielgene ACO und CPT-1 unterschieden sich zwischen den beiden Versuchsgruppen. Die Expression des PPAR α und der ACO waren bei den Tieren, die Lupinenprotein erhielten signifikant und der CPT-1 tendenziell niedriger, als bei Tieren der Caseingruppe (Abbildung 13).



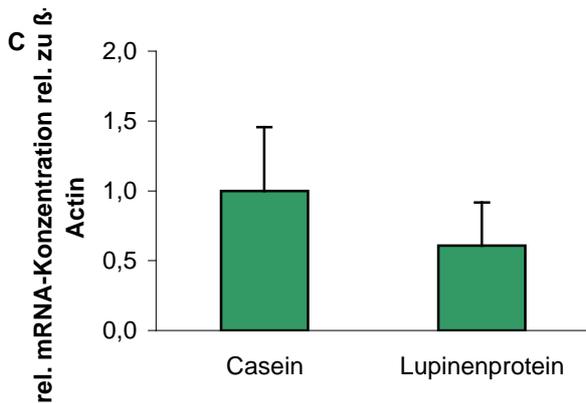


Abbildung 13: Relative hepatische mRNA-Konzentrationen von PPAR α (A); ACO (B) und CPT-1 (C) von weiblichen Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius*.

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein ($p < 0,05$; Student's-t-Test)

4.4.7. Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Lipidstoffwechsels in der Milchdrüse

Für die Untersuchung ausgewählter Gene der Milchlipidsynthese wurden mRNA-Konzentrationen in der Milchdrüse gemessen. Abbildung 14 zeigt, dass die Expression des SREBP-1c und seiner Zielgene FAS und Delta-9-D. bei den Tieren, die Lupinenprotein erhielten höher war, als bei den Tieren, die Casein erhielten, wobei die Signifikanzgrenze nur bei den ersten beiden Genen erreicht wurde.

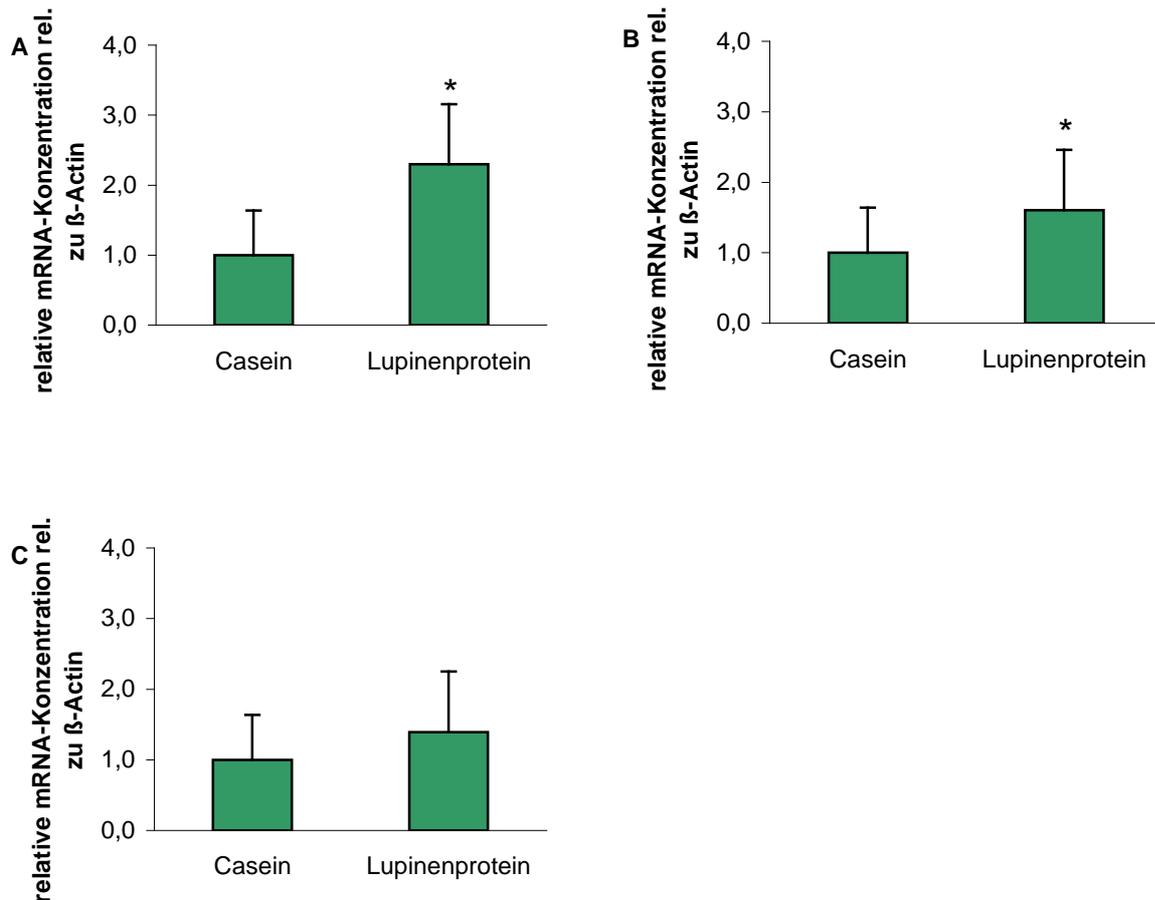


Abbildung 14: Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c (A); FAS (B) und Delta-9-D. (C) in Milchdrüsen weiblicher Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius*.

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein ($p < 0,05$; Student's-t-Test)

In Tabelle 35 sind zusätzlich die mRNA-Konzentrationen von Lipoproteinlipase, FABP, FATP und CD 36 dargestellt. Hier wurden keine Veränderungen durch die Lupinenproteinbehandlung beobachtet.

Tabelle 35: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Triglycerid-metabolismus in Rattenmilchdrüsen von weiblichen Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius*.

Parameter	Casein	Lupine
LPL	1,00 \pm 0,35	0,84 \pm 0,26
FABP	1,00 \pm 0,30	0,91 \pm 0,35
FATP	1,00 \pm 0,32	1,05 \pm 0,21
CD 36	1,00 \pm 0,33	0,85 \pm 0,32

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (n=11); ($p < 0,05$; Fisher's Test)

4.4.8. Proteinkonzentration des LDL-Rezeptors in der Leber der Muttertiere

Zur Absicherung der Expressionsergebnisse des LDL-R.s auf mRNA-Ebene wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Proteinbanden sind in Abbildung 15 dargestellt. Diese zeigen, dass die Fütterung mit Lupinenprotein nicht nur die mRNA-Konzentration erhöhen kann, sondern auch deutlich zu einer höheren Proteinkonzentration des LDL-R.s (Abbildung 16) führt, im Vergleich zu Tieren, die Casein erhielten.

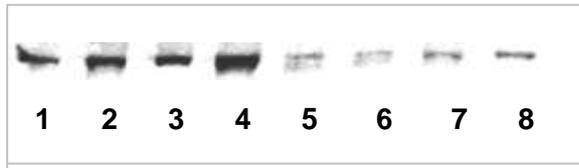


Abbildung 15: Repräsentative Proteinbanden vom LDL-R. in Lebern von Ratten durch Western Blot Analyse. Der aufgetragene Proteingehalt pro Spur beträgt 90 µg in einem 7,5% (w/v) SDS-Polyacrylamidgel. In den einzelnen Spuren sind unter nicht denaturierenden Bedingungen folgende Zelllysate aufgetragen: Spur 1-4: Ratten, die Lupinenprotein erhielten und Spur 5-8: Ratten, die Casein erhielten.
(polyklonaler Anti-LDL-Rezeptor-Antikörper)

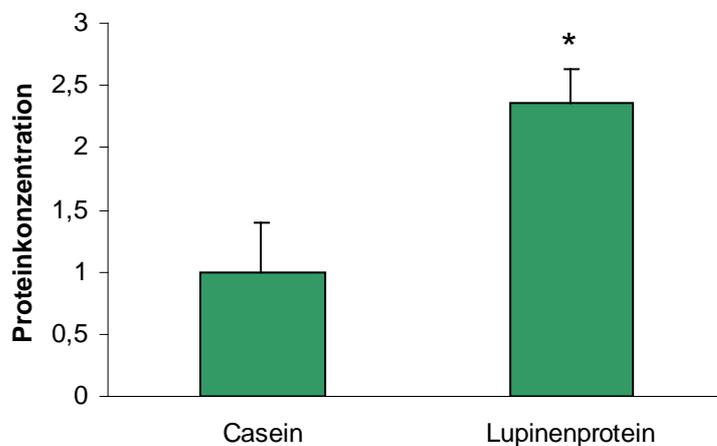


Abbildung 16: Relative Proteinkonzentration des LDL-Rezeptors in der Leber lactierender Ratten nach 6-wöchiger Fütterung von hypercholesterinämischen Diäten mit 20% Casein oder 20% Lupinenprotein aus *L. angustifolius*.

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=11)

* signifikant unterschiedlich von Casein ($p < 0,05$; Student's-t-Test)

Zur weiteren Auswertung wurden Korrelationen zwischen dem relativen Proteingehalt und der relativen mRNA-Konzentration und dem relativen Proteingehalt und der LDL-Cholesterin-Konzentration erstellt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Es konnten keine Beziehungen zwischen mRNA-Konzentration und Proteinkonzentration

festgestellt werden. Generell war die Differenz der mRNA-Konzentrationen zwischen den Gruppen viel geringer, als die der Proteinkonzentration. Dagegen konnte zwischen dem Proteingehalt des LDL-R.s und dem LDL-Cholesterin ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,05$) festgestellt werden. Mit zunehmender LDL-R.-Konzentration, sank die LDL-Cholesterin-Konzentration im Plasma.

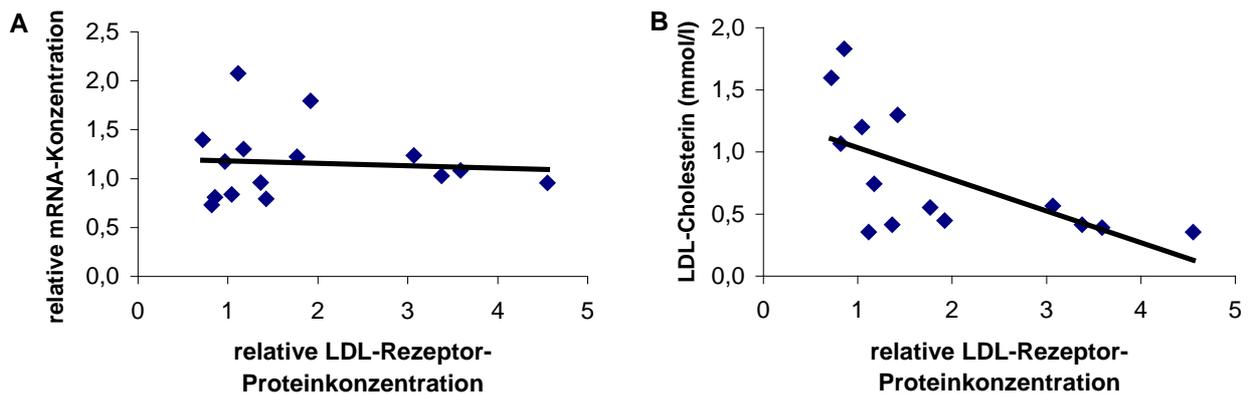


Abbildung 17: Korrelation zwischen relativem Proteingehalt von LDL-Rezeptor und relativer mRNA-Konzentration (A) und LDL-Cholesterin-Konzentration (B) in der Leber der Muttertiere. ($p < 0,05$; Student's-t-Test)

4.5. Einfluss von Aminosäuren auf den Lipidstoffwechsel von humanen Leberzellen (V5)

4.5.1. Zellzahl und Zellvitalität

Eine 24 h Inkubation der HepG2-Zellen mit 5 mM L-Cystein, L-Methionin und L-Arginin hatte weder einen Einfluss auf die Zellzahl, noch auf die Zellvitalität. Auch die Behandlung der Zellen mit 1 mM BSO für 6 h und 10 μ M CuSO₄ für 2 h veränderte weder die Zellzahl noch die Zellvitalität.

4.5.2. Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c und FAS nach Inkubation mit L-Arginin, L-Methionin und L-Cystein

Um herauszufinden welche der eingesetzten Aminosäuren die stärksten Effekte auf den Triglyceridstoffwechsel hat, wurden die mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und dessen Zielgen FAS in Leberzellen nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Arginin, L-Methionin oder L-

Cystein gemessen. Eine Inkubation der Zellen mit L-Arginin beeinflusste weder die SREBP-1c, noch die FAS mRNA-Konzentrationen. Die Behandlung der Zellen mit L-Methionin führte zwar zu signifikant niedrigeren mRNA-Konzentrationen von FAS (-14%), aber die mRNA des SREBP-1c wurde nicht verändert (Abbildung 18). Die Inkubation mit L-Cystein führte hingegen zu deutlich niedrigeren mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c und FAS (-34%; -20%, $p < 0,05$). Aus diesem Grund wurde für weitere Inkubationsversuche die Aminosäure L-Cystein ausgewählt (Abbildung 18).

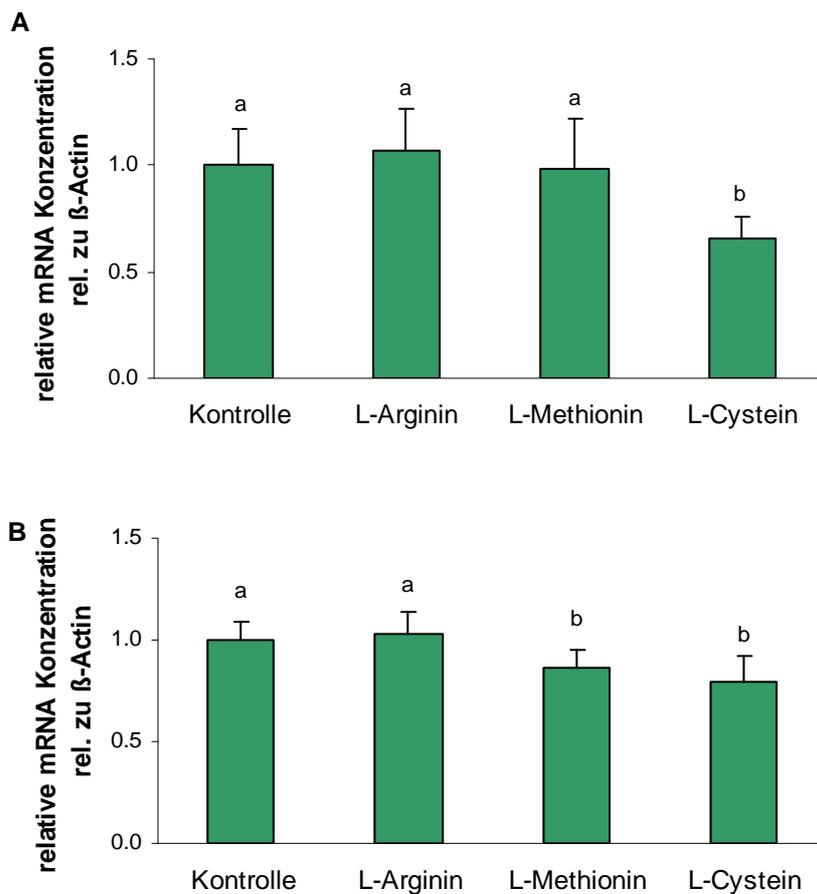


Abbildung 18: Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c (A) und FAS (B) in HepG2-Zellen nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Arginin, L-Methionin, L-Cystein oder Medium allein (Kontrolle).

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=4)

^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$; Fisher's Test), Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

4.5.3. Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und ausgewählter Zielgene nach 2, 6 und 24 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an L-Cystein

Um untersuchen zu können, ab welcher Konzentration L-Cystein auf mRNA-Ebene wirkt, wurden Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit durchgeführt. Dabei wurden die Zellen für 2 h mit 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM und 5 mM L-Cystein inkubiert. Die Ergebnisse in Tabelle 36 zeigen, dass eine 2-stündige Inkubation mit 5 mM die mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, FAS und Delta-9-D. signifikant erniedrigt. Ähnliche Effekte traten auch bei der Behandlung mit 2 mM auf. Die mRNA-Konzentration der FAS war signifikant und die von SREBP-1c und Delta-9-D. tendenziell durch die Inkubation mit L-Cystein erniedrigt. Die weiteren getesteten Konzentrationen zeigten keine Wirkung nach 2 h Inkubation mit L-Cystein im Vergleich zum Kontrollmedium. Eine Inkubation über 6 und 24 h mit 1 mM, 2 mM oder 5 mM L-Cystein hatten keinen Einfluss auf die gemessenen mRNA-Konzentrationen (Tab 36). Lediglich die mRNA-Konzentrationen der Delta-9-D. bei einer 6-stündigen Inkubation mit 2 und 5 mM L-Cystein, der FAS bei 6 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein und der G-6-PDH bei einer 24-stündigen Behandlung mit 2 mM L-Cystein wurden signifikant erniedrigt.

Tabelle 36: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Triglyceridstoffwechsels in HepG2-Zellen nach 2 h, 6 h und 24 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an L-Cystein.

Parameter	Kontrolle	0,1 mM	0,5 mM	1 mM	2 mM	5 mM
<i>2 h</i>						
SREBP-1c	1,00 ± 0,10 ^a	0,89 ± 0,26 ^a	0,98 ± 0,25 ^a	0,89 ± 0,18 ^a	0,64 ± 0,21 ^a	0,57 ± 0,02 ^b
FAS	1,00 ± 0,11 ^a	0,87 ± 0,18 ^a	0,89 ± 0,11 ^a	0,87 ± 0,25 ^a	0,58 ± 0,10 ^b	0,50 ± 0,05 ^b
G-6-PDH	1,00 ± 0,19	0,99 ± 0,26	0,98 ± 0,30	0,91 ± 0,12	0,78 ± 0,17	0,69 ± 0,12
Delta-9-Desaturase	1,00 ± 0,14 ^a	0,99 ± 0,32 ^a	1,01 ± 0,34 ^a	0,91 ± 0,20 ^a	0,68 ± 0,15 ^a	0,46 ± 0,22 ^b
<i>6 h</i>						
SREBP-1c	1,00 ± 0,45	-	-	0,91 ± 0,39	0,91 ± 0,47	0,71 ± 0,15
FAS	1,00 ± 0,48 ^a	-	-	0,92 ± 0,21 ^a	0,55 ± 0,29 ^a	0,72 ± 0,32 ^b
G-6-PDH	1,00 ± 0,41	-	-	1,09 ± 0,24	0,87 ± 0,14	0,72 ± 0,42
Delta-9-Desaturase	1,00 ± 0,34 ^a	-	-	0,74 ± 0,36 ^a	0,26 ± 0,12 ^b	0,61 ± 0,17 ^b

Fortsetzung auf nächster Seite

Fortsetzung aus Tabelle 36

24 h

SREBP-1c	1,00 ± 0,42	-	-	1,07 ± 0,59	1,15 ± 0,26	0,96 ± 0,46
FAS	1,00 ± 0,43	-	-	0,71 ± 0,54	0,46 ± 0,26	0,49 ± 0,15
G-6-PDH	1,00 ± 0,37 ^a	-	-	0,57 ± 0,25 ^a	0,36 ± 0,16 ^b	0,24 ± 0,03 ^b
Delta-9-Desaturase	1,00 ± 0,34	-	-	0,70 ± 0,18	0,81 ± 0,18	0,52 ± 0,30

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, (n=4)

^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's Test)

4.5.4. Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und ausgewählter Zielgene nach 2, 6 und 24 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein

Die HepG2-Zellen, die für 2 h mit 5 mM L-Cystein inkubiert wurden, hatten signifikant (p<0,05) niedrigere mRNA-Konzentrationen an SREBP-1c, FAS und Delta-9-D. als unbehandelte Zellen (Abbildung 19). Die mRNA-Konzentration an G-6-PDH war tendenziell niedriger als in der Kontrollgruppe (p<0,10). Auch nach einer 6-stündigen Inkubation der Zellen mit 5 mM L-Cystein waren die mRNA-Konzentrationen von FAS und Delta-9-D. erniedrigt. Die Downregulation des SREBP-1c konnte statistisch nicht abgesichert werden (p<0,10) und die mRNA-Konzentration der G-6-PDH entsprach der Kontrollgruppe. Bei einer Inkubationsperiode von 24 h ergaben sich keine Unterschiede durch die Behandlung mit L-Cystein. Aus diesem Grund wurde eine optimale Inkubationszeit von 2 h gewählt.

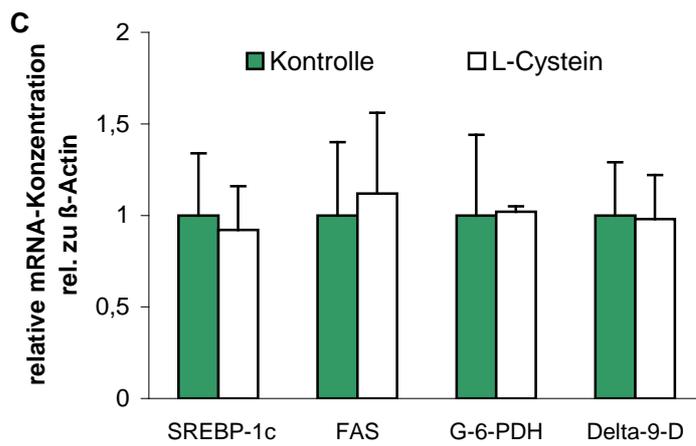
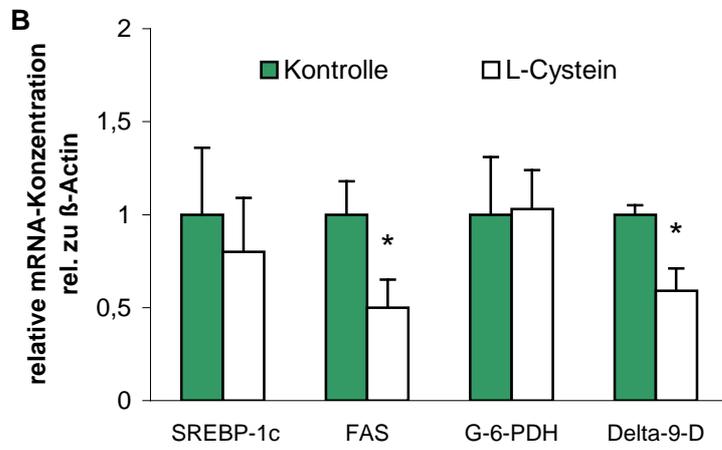
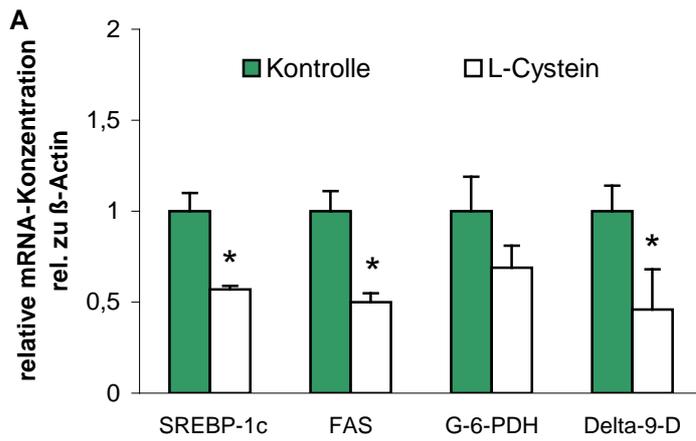


Abbildung 19: Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, FAS, G-6-PDH und Delta-9-D. in HepG2-Zellen nach 2 h (A), 6 h (B) und 24 h (C) Inkubation mit 5 mM L-Cystein oder Medium allein (Kontrolle) .

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=4)

* signifikant zur Kontrolle

($p < 0,05$; Student's t-Test) Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

4.5.5. Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP2 und ausgewählter Zielgene nach 2h Inkubation mit 5 mM L-Cystein

In Tabelle 37 sind die relativen mRNA-Konzentrationen von SREBP2, LDL-R. und HMG-CoA-R. nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass L-Cystein in diesem Konzentrationsbereich keinen Einfluss auf die mRNA-Expression dieser Gene ausübte.

Tabelle 37: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene d. Cholesterinstoffwechsels in HepG2 Zellen nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein oder Medium allein (Kontrolle).

Parameter	Kontrolle	5 mM L-Cystein
SREBP2	1,00 \pm 0,16	0,82 \pm 0,34
LDL-Rezeptor	1,00 \pm 0,04	1.12 \pm 0,26
HMG-CoA-R.	1,00 \pm 0,27	0,87 \pm 0,28

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=4)

Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

($p < 0,05$; Student's t-Test)

4.5.6. Triglyceridkonzentration in HepG2-Zellen und im Inkubationsmedium nach 24 h Behandlung mit L-Cystein

Die Ergebnisse in Abbildung 20 zeigen die Triglyceridkonzentration in HepG2-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 5 mM L-Cystein. Die Triglyceridkonzentration in den Zellen nahm durch die Behandlung mit L-Cystein signifikant ab ($p < 0,05$). Die Konzentration an Triglyceriden im Inkubationsmedium war insgesamt sehr gering und unterschied sich nicht zwischen der Behandlung und der Kontrolle.

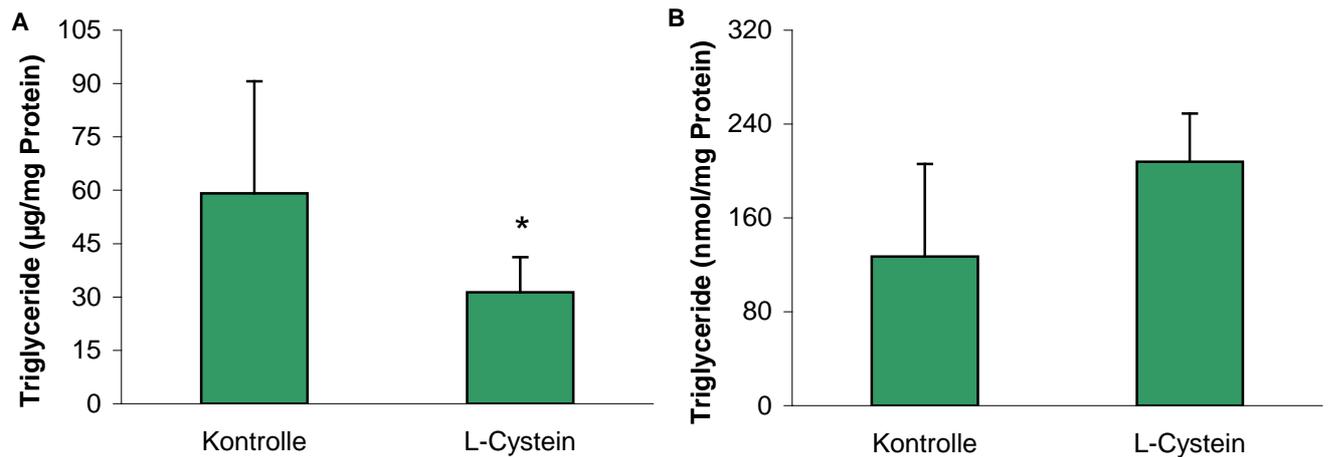


Abbildung 20 Triglyceridkonzentration in HepG2-Zellen (A) und im Zellüberstand (B) nach 24 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein oder Medium allein (Kontrolle).

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=4)

* signifikant zur Kontrolle

($p < 0,05$; Student's t-Test) Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

4.5.7. Cholesterinkonzentration in HepG2-Zellen nach 24 h Behandlung mit L-Cystein

In Abbildung 21 sind die Cholesterinkonzentrationen in Hep-G2-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 5 mM L-Cystein gezeigt. Die Cholesterinkonzentration wurde durch L-Cystein nicht beeinflusst.

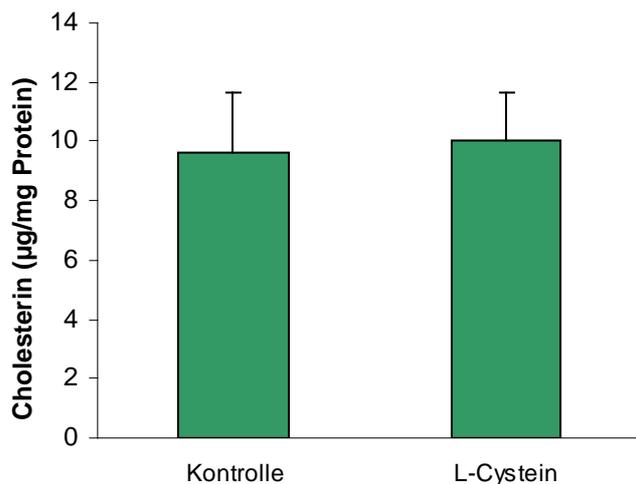


Abbildung 21: Cholesterinkonzentration in HepG2-Zellen nach 24 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein oder Medium allein (Kontrolle).

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=4)

($p < 0,05$; Student's t-Test) Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

4.5.8. Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und ausgewählter Zielgene nach 2 und 6 h Inkubation mit L-Cystein und BSO

Die Ergebnisse in Abbildung 22 zeigen, dass die Zellen, die für 2 h mit 5 mM L-Cystein allein behandelt wurden, erneut niedrigere mRNA-Konzentrationen an SREBP-1c, FAS, G-6-PDH und Delta-9-D. hatten, als unbehandelte Zellen. Die Behandlung der Zellen mit 1 mM BSO allein erhöhte die mRNA-Konzentration der Delta-9-D. im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hingegen blieben die mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, FAS und G-6-PDH unverändert. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit L-Cystein und BSO hob den down-regulatorischen Effekt des L-Cystein wieder auf. Die mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, FAS, G-6-PDH und Delta-9-D. unterschieden sich nun nicht mehr von denen der Kontrollzellen.

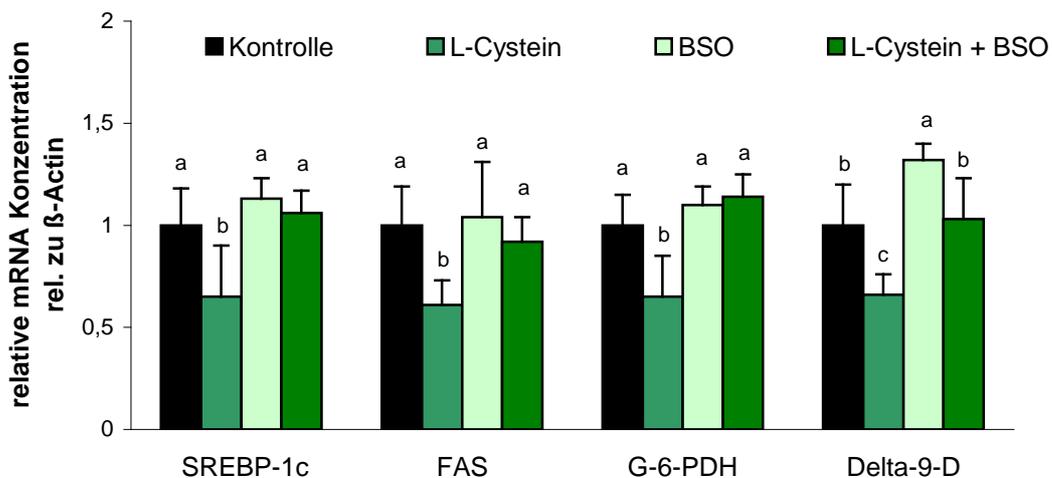


Abbildung 22: Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, FAS, G-6-PDH und Delta-9-D. in HepG2-Zellen nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein, 1 mM BSO, Koinkubation von 5 mM L-Cystein + 1 mM BSO oder Medium allein (Kontrolle).

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=4)

^{a,b,c} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$; Fisher's Test) Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

Tabelle 38 zeigt die Ergebnisse nach 6-stündiger Inkubation mit L-Cystein, BSO oder Koinkubation von beiden. Dabei waren die mRNA-Konzentrationen der Delta-9-D, SREBP-1c und FAS signifikant niedriger durch L-Cystein Behandlung, als bei der Kontrolle. Die mRNA-Konzentration der G-6-PDH wurde nicht verändert. Eine 6 h Inkubation mit BSO allein hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Konzentrationen der untersuchten Gene und eine

L-Cystein + BSO-Koinkubation hob den Effekt des L-Cysteins auf, dabei entsprachen alle Werte denen der Kontrollgruppe.

Tabelle 38: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Triglyceridstoffwechsels in HepG2-Zellen nach 6 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein, 1 mM BSO oder 5 mM L-Cystein + 1 mM BSO.

Parameter	Kontrolle	L-Cystein 5 mM	BSO 1 mM	L-Cystein 5 mM + BSO 1 mM
SREBP-1c	1,00 ± 0,21 ^{ab}	0,70 ± 0,17 ^b	1,16 ± 0,13 ^a	0,93 ± 0,18 ^{ab}
FAS	1,00 ± 0,12 ^a	0,60 ± 0,24 ^b	0,98 ± 0,13 ^{ab}	1,06 ± 0,29 ^a
G-6-PDH	1,00 ± 0,18	0,92 ± 0,25	1,02 ± 0,29	1,34 ± 0,28
Delta-9-D.	1,00 ± 0,06 ^a	0,66 ± 0,12 ^b	0,92 ± 0,17 ^{ab}	1,08 ± 0,18 ^a

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, (n=4)

^{a,b} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's Test) Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

4.5.9. Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP2 und ausgewählter Zielgene nach 2 und 6 h Inkubation mit L-Cystein und BSO

Die Ergebnisse in Tabelle 39 zeigen, dass weder eine 2- noch eine 6-stündige Inkubation mit L-Cystein, BSO oder eine L-Cystein + BSO-Koinkubation einen Einfluss auf die relativen mRNA-Konzentrationen von SREBP2, HMG-CoA-R. oder LDL-R. haben.

Tabelle 39: Relative mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene des Cholesterinstoffwechsels in HepG2-Zellen nach 2 und 6 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein, 1 mM BSO oder 5 mM L-Cystein + 1 mM BSO.

Parameter	Kontrolle	5 mM L-Cystein	1 mM BSO	5 mM L-Cystein + 1 mM BSO
<i>2 h</i>				
SREBP2	1,00 ± 0,24	1,00 ± 0,15	0,92 ± 0,10	0,82 ± 0,28
HMG-CoA-R.	1,00 ± 0,01	0,92 ± 0,18	0,90 ± 0,29	0,94 ± 0,18
LDL-R.	1,00 ± 0,27	0,91 ± 0,33	0,95 ± 0,29	0,84 ± 0,00
<i>6 h</i>				
SREBP2	1,00 ± 0,16	0,82 ± 0,34	1,04 ± 0,25	1,03 ± 0,10
HMG-CoA-R.	1,00 ± 0,27	0,87 ± 0,28	1,14 ± 0,14	1,15 ± 0,31
LDL-R.	1,00 ± 0,04	1,12 ± 0,19	1,26 ± 0,28	1,09 ± 0,17

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, (n=4)

Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

(p<0,05; Fisher's Test)

4.5.10. Gesamtglutathion- und Cysteinkonzentration nach 6 h Inkubation mit L-Cystein und BSO

In Tabelle 40 sind die Konzentrationen von Cystein und Gesamt-GSH in HepG2-Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit 5 mM L-Cystein, 1 mM BSO und Koinkubation von 5 mM L-Cystein oder 1 mM BSO gezeigt. Die höchste GSH-konzentration wurde in 5 mM L-Cystein-behandelten Zellen und die niedrigste in BSO-behandelten Zellen festgestellt. BSO und L-Cystein koinkubierte Zellen wiesen zwar eine doppelt so hohe GSH-konzentration auf wie BSO allein, aber insgesamt lagen die Konzentrationen deutlich unter der Kontrolle. Die Cysteinkonzentration war in den mit L-Cystein-behandelten Zellen am höchsten und in der BSO-Gruppe am niedrigsten.

Tabelle 40: Gesamt-GSH- und Cysteinkonzentrationen in HepG2-Zellen nach 6 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein, 1 mM BSO und 5 mM L-Cystein + 1 mM BSO.

Parameter	Kontrolle	L-Cystein 5 mM	BSO 1 mM	L-Cystein 5 mM + BSO 1 mM
Glutathion nmol/mg Protein	1,09 ± 0,16 ^b	1,60 ± 0,65 ^a	0,25 ± 0,11 ^c	0,57 ± 0,20 ^c
Cystein nmol/mg Protein	3,15 ± 1,47 ^b	5,08 ± 0,74 ^a	2,25 ± 1,10 ^b	2,55 ± 0,61 ^b

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung, (n=4)

^{a,b,c} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben innerhalb einer Zeile unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0,05; Fisher's Test)

4.5.11. Relative mRNA-Konzentrationen des SREBP-1c und ausgewählter Zielgene nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein und 10 µM CuSO₄

Die Zellen, die mit 5 mM L-Cystein allein behandelt wurden, hatten signifikant niedrigere mRNA-Konzentrationen an SREBP-1c und Delta-9-D. (Abbildung 23). Die mRNA-Konzentration von FAS und G-6-PDH war tendenziell niedriger als in den Kontrollzellen. Die mRNA-Konzentration von G-6-PDH wurde durch die Inkubation nicht verändert. HepG2-Zellen, die mit CuSO₄ allein behandelt wurden, hatten signifikant höhere mRNA-Konzentrationen an SREBP-1c, FAS, Delta-9-D. und G-6-PDH verglichen mit den unbehandelten Zellen. Zellen, die gleichzeitig mit L-Cystein und CuSO₄ inkubiert wurden, wiesen niedrigere mRNA-Konzentrationen an SREBP-1c, FAS, Delta-9-D. und G-6-PDH auf, als Zellen, die allein mit CuSO₄ behandelt wurden. Die mRNA-Konzentrationen an SREBP-1c, FAS und G-6-PDH entsprachen denen der Kontrollzellen. Die mRNA-Konzentration der Delta-9-D. war jedoch gegenüber der Kontrolle erhöht.

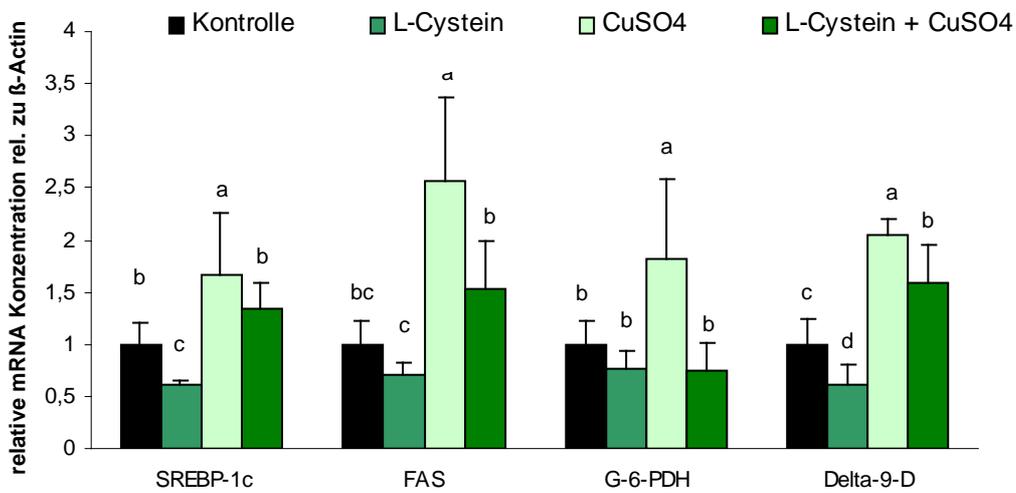


Abbildung 23: Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, FAS, G-6-PDH und Delta-9-D. in HepG2-Zellen nach 2 h Inkubation mit 5 mM L-Cystein, 10 μ M CuSO₄, Koinkubation von 5 mM L-Cystein plus 10 mM CuSO₄ oder mit Medium allein (Kontrolle).

Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung, (n=4)

^{a,b,c,d} Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ($p < 0,05$; Fisher's Test) Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt.

5. Diskussion

Die Inzidenz ernährungsbedingter Erkrankungen, vor allem von Herz-Kreislaufkrankungen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Der Bedarf und die Nachfrage nach innovativen therapeutischen Ansätzen zur Prävention und Aufklärung ernährungsbedingter Erkrankungen ist dementsprechend groß. Hohe Serum-Cholesterinkonzentrationen, v.a. in der LDL-Lipoproteinfraktion gelten als Hauptrisikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen. Nahrungsbestandteile sind in der Lage, hohe Cholesterin- oder Triglycerid-Level im Plasma und in den Lipoproteinen zu modifizieren. Die Inzidenz der Atherosklerose kann diätetisch beeinflusst werden und dabei haben auch pflanzliche Proteine begünstigende Effekte. Allerdings sind die Mechanismen bisher zum Teil noch unklar. Die Wirkung verschiedener Pflanzenproteine auf den Lipidstoffwechsel wurde bereits mehrfach untersucht.

Nahrungsproteine haben unterschiedliche Wirkungen auf den Lipidmetabolismus. Zahlreiche Tierstudien haben gezeigt, dass pflanzliche Proteine wie Soja (Forsythe et al. 1980) verglichen mit tierischen Proteinen – meist als Casein eingesetzt - Plasma-Cholesterin in Ratten, Schweinen, Kaninchen und Primaten senken können. Eine Hypothese dabei ist, dass pflanzliche Proteine im Vergleich zu tierischen Proteinen, einen höheren Anteil an phosphorylierten Aminosäuren haben, welche direkt mit der Gallensäureabsorption interferieren. Dieser Effekt beruht auf Unterschieden in der Aminosäurezusammensetzung pflanzlicher und tierischer Proteine. Pflanzliche Proteine enthalten durchschnittlich mehr nicht-essenzielle Aminosäuren wie Glycin, Alanin, Serin und Arginin (Kritchevsky et al. 1990, Krajcovicova-Kudlackova et al. 2005). Diese bewirken eine verstärkte Glucagonsekretion (Bassett et al. 1982). Glucagon erhöht in den Hepatozyten die cAMP-Spiegel, welche die Synthese der Enzyme, die für die Lipogenese und Cholesterinsynthese kodieren, herabregulieren (Exton 1987, Lijnen et al. 1989).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass auch von Lupinenprotein hypolipämisches Potential ausgeht. Um die hypolipämischen Wirkungen verschiedener Lupinenproteine zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Studien an Ratten und eine Zellkulturstudie durchgeführt. Dabei sollten lipidmodulierende Eigenschaften von unterschiedlichen Lupinenproteinen näher charakterisiert und aufgeklärt werden und welche möglichen Wirkungen von isolierten Aminosäuren als bioaktive Komponenten des Lupinenproteins auf den Lipidstoffwechsel ausgehen.

5.1. Versuchsaufbau

Für die zu untersuchenden Fragestellungen war eine optimale Versuchsplanung von großer Bedeutung. Daher war es wichtig zu klären, welche Spezies bzw. welches Zellkulturmodell ideal geeignet ist. Bisher gibt es wenige Studien, die sich mit der ernährungstherapeutischen Wirkung von Lupinenprotein beschäftigen. Die vorliegenden Untersuchungen orientierten sich im Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung an aktuellen Untersuchungen von Sirtori et al. (2004) und Spielmann et al. (2007). In diesen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass bei Einsatz hoher Dosen an isoliertem Lupinenprotein aus *Lupinus albus* die Triglyceridkonzentration in der Leber und in VLDL, sowie die Cholesterinkonzentrationen im Plasma, in den VLDL und LDL gesenkt werden konnten. Weitere aktuelle Studien unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der Einsatz von Lupinenprotein auch beim Menschen die LDL-Cholesterin-Konzentration senken kann (Weiße et al. 2009a).

In allen tierexperimentellen Studien wurden Ratten als Versuchstiere eingesetzt. Ratten gelten als etabliertes Modelltier für Fütterungsstudien mit diätetischen Proteinen (Iritani et al. 1996, Ascenio et al. 2004, Gudbrandsen et al. 2005) und für Grundlagenanalysen des Lipidstoffwechsels. Alle Tiere erhielten eine Diät - reich an gesättigten Fetten - und zusätzlich wurde Schweineschmalz als Fettzulage eingesetzt (Ueshima et al. 2005, Wang et al. 2006, Norata et al. 2007). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass nur eine begrenzte Homologie im Lipidstoffwechsel zwischen Mensch und Nager besteht (Shrago et al. 1971, Swierczynski et al. 2000, Letexier et al. 2003, Mahley et al. 2006). Besonders die Cholesterinverteilung in den Lipoproteinen ist mit dem Menschen nicht uneingeschränkt vergleichbar. So sind die HDL-Cholesterin-Konzentrationen insbesondere bei Ratten im Vergleich zum Gesamtcholesterin verhältnismäßig hoch (Tsutsumi et al. 2001). Grund hierfür ist das bei den Ratten fehlende cholesterin-ester-transfer-protein (CETP). Weiterhin ist zu beachten, dass Ratten keine Gallenblase besitzen und daher die Gallenflüssigkeit direkt von der Leber in das Duodenum abgegeben wird (Kiris et al. 2006). Für Grundlagenanalysen ist das Nagermodeill Ratte jedoch gut geeignet und die Ergebnisse lassen sich größtenteils auf den Menschen übertragen. Außerdem bieten eine problemlose standardisierte Versuchshaltung und -durchführung große Prävalenzen gegenüber Humanstudien.

Als Parameter des Lipidmetabolismus wurden bei den tierexperimentellen Studien die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in Plasma, Lipoproteinen und Leber, die Gallensäureexkretion und die hepatische Expression ausgewählter Gene der Lipidhomöostase untersucht. In allen Untersuchungen wurden die Ratten vor der Organentnahme nicht genüchert, da einige Studien belegen, dass sich unter Fastenbedingungen die Expression

lipogener Enzyme meist schon nach relativ kurzer Fütterungsperiode von wenigen Tagen erniedrigte (Horton et al. 1998, Shimano et al. 1999). Der Effekt von diätetischen Proteinen auf den Lipidmetabolismus von Ratten manifestierte sich bereits nach einem verhältnismäßig kurzen Zeitraum - von ca. 2 Wochen (Iritani et al. 1986, Sugiyama et al. 1996, Sugiyama et al. 1997 und Ascencio et al. 2004). Die Tiere wurden in den ersten Versuchen (V1-V3) kontrolliert gefüttert, um mögliche Effekte durch unterschiedliche Futteraufnahme zu vermeiden. Zu Beginn jeder tierexperimentellen Studie wurde außerdem das Aminosäuremuster der jeweiligen Lupinenproteinfraktion bestimmt. Es kann damit sichergestellt werden, dass die essentiellen Aminosäuren optimal angeglichen wurden, weil bekannt ist, dass das Aminosäuremuster pflanzlicher Proteine insbesondere des Lupinenproteins je nach Sorte, Art, Standort und Erntejahr Schwankungen unterliegt. Eigene Voruntersuchungen (Daten sind nicht gezeigt) haben ergeben, dass sich innerhalb der verschiedenen Sorten bei *lupinus angustifolius* bis zu 4% Schwankungen im Protein-/Aminosäuregehalt ergaben und in der Nährstoffanalyse zwischen den Arten *lupinus albus* und *angustifolius* sogar bis zu 10% Unterschiede im Protein-/Aminosäuregehalt auftraten. Auch die Gesellschaft zur Förderung der Lupine e.V. bestätigt diese Ergebnisse – dort heißt es, dass standortbedingt der Aminosäuregehalt sogar bis zu 8% innerhalb einer Sorte schwanken kann (2007).

Für Untersuchungen zu den möglichen bioaktiven Komponenten des Lupinenproteins wurde ein Zellkulturmodell gewählt. Die HepG2-Zelllinie ist ein akzeptiertes und etabliertes Modell für Untersuchungen zum Lipidstoffwechsel, insbesondere für Expressionsstudien SREBP-regulierter Gene (Mochizuki et al. 2009, Shimomura et al. 1997, Vallett et al. 1996). Zellkulturversuche sind im Vergleich zu Human- oder Tierstudien weniger aufwendig, weniger langwierig und preisgünstiger. Ergebnisse aus Zellkulturstudien zeichnen sich außerdem durch gute Reproduzierbarkeit aus, allerdings ist eine uneingeschränkte Übertragung auf *in vivo*-Modelle nicht immer möglich. Jedoch können Zellkulturstudien als Vorversuche für Tier- oder Humanstudien genutzt werden. Für die hier zu untersuchende Fragestellung eignete sich die HepG2-Zelllinie optimal.

5.2. Wirkungen von Lupinenprotein auf den Cholesterinmetabolismus

Es gibt bereits verschiedene Studien, die belegen, dass neben erhöhten Triglyceridkonzentrationen, hohe Konzentrationen an LDL-Cholesterin und niedrige HDL-Cholesterinkonzentrationen zur Entstehung von Atherosklerose und KHK beitragen (Gotto et

al., 1998, Grundy et al. 1998, Law et al., 2004). Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Lupinenprotein in der Lage ist, Cholesterinkonzentrationen insbesondere LDL/HDL-Ratios in hypercholesterinämischen Ratten, Kaninchen und Schweinen signifikant zu senken (Sirtori et al., 2004, Marchesi et al. 2008, Martins et al., 2005). Ziel dieser Arbeit war es unter anderem herauszufinden, welche hypocholesterinämischen Effekte vom Lupinenprotein per se ausgehen und welche Ursachen diese Effekte haben.

Die Ergebnisse aus der ersten Studie zeigten, dass sich weder die Plasmatriglycerid- noch die Plasmacholesterinkonzentrationen veränderten. Auch in der Leber wurden keine Veränderungen der Triglycerid- und Cholesterinkonzentrationen festgestellt. Leistungsparameter, wie Körpergewicht, Körpermassenzunahme und Lebergewicht wurden ebenfalls nicht beeinflusst. In dieser einfaktoriellen Studie erhielten die Tiere nur eine marginale Zulage an Lupinenprotein – entweder 10 oder 50 g Lupinenprotein pro kg Diät. In vorangegangenen Studien wurde den Tieren zum Teil eine semisynthetische Diät, die 200 g/kg Lupinenprotein enthielt, verabreicht (Spielmann et al. 2007). Möglicherweise könnte der Einsatz von größeren Zulagen an Lupinenprotein einen lipidsenkenden Effekt haben. Verschiedene Studien belegen, dass sich hypolipämische Effekte erst einstellen oder verstärken, wenn zusätzlich hypercholesterinämisch gefüttert wird (Lindholm et al. 1993, Martins et al. 2005, Terpstra et al. 1982 und 1991, Kayshita et al. 1997, Kayashima et al. 2005). Ähnliche Beobachtungen machten auch Mawatari et al. (2003) bei einem Vergleich zwischen einer normocholesterinämischen Diät und einer hypercholesterinämischen Diät (plus 0,5% Cholesterin und 0,15% Choleat), dabei war das Gesamt- und LDL-Cholesterin erhöht und das HDL-Cholesterin durch Fütterung der hypercholesterinämischen Diät erniedrigt. In dieser ersten Untersuchung wurde kein zusätzliches Cholesterin oder Choleat eingesetzt. Das könnte ebenfalls die ausbleibenden Lipidveränderungen erklären.

Verschiedene diätetische Proteine haben unterschiedliche Wirkungen auf den Lipidmetabolismus. Zahlreiche Tierstudien haben gezeigt, dass tierische Proteine, beispielsweise Casein, Plasma-Cholesterin in Ratten, Schweinen, Kaninchen und Primaten erhöhen, verglichen mit pflanzlichen Proteinen wie Soja (Forsythe et al. 1988). In der ersten Studie (V1) wurde als Basisprotein 150 g/kg Casein verwendet. Deshalb stellte sich die Frage, ob ein anderes tierisches Basisprotein optimaler zur Zielsetzung passen würde. Deshalb wurde in einer zweiten Studie (V2) 150 g/kg Eialbumin als Basisprotein eingesetzt, um sicherzustellen, dass sowohl Kontroll- als auch Behandlungsgruppe nicht durch unterschiedliche Zulagen an Casein beeinflusst werden. Studien mit Sojaprotein zeigten, dass

ein schrittweiser Austausch von Casein gegen Sojaprotein bei hypercholesterinämischen Ratten, die mit einer cholesterinfreien Diät gefüttert wurden, zu einer signifikanten Erniedrigung von Plasma-Cholesterin, LDL-Cholesterin und Plasma-Triglyceriden führte (Chen et al. 2003). Die unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung im Casein könnte möglicherweise für diesen Effekt verantwortlich sein. Casein enthält höhere Gehalte an Glutaminsäure, Methionin, Phenylalanin und Tyrosin. Weiterhin führte die Fütterung von Casein an Ratten zu einer verminderten VLDL-Aufnahme, was einen hypercholesterinämischen Effekt erklären könnte (Madani et al. 2003). Sirtori et al. 2004 setzten bei der Fütterung von Lupinenprotein aus *Lupinus albus* zusätzlich 1 g/100 g Cholesterin und 0,5 g/100 g Choleat ein, um eine hypercholesterinämische Nahrungssituation zu imitieren. Durch die zusätzliche Supplementierung der Diät mit Choleat und Cholesterin konnte ein erhöhtes Basallevel an Cholesterin im Blut eingestellt werden. Dabei zeigte sich, dass eine zusätzliche Fütterung von Cholesterin und Choleat die Lebergewichte unabhängig von der Proteinzulage erhöhte. Diese Ergebnisse stimmen mit den Erkenntnissen aus einer Studie mit Lupine bei Hühnern überein (Viveros et al. 2007).

Im weiteren Verlauf unserer Untersuchungen konnte sowohl in **V2**, **V3** und **V4** eine Modifikation der Cholesterinverteilung in den Lipoproteinen beobachtet werden. So wurden verhältnismäßig hohe LDL-Cholesterinkonzentrationen im Vergleich zu HDL-Cholesterin beobachtet. Normalerweise ist eine solche Lipoproteinverteilung typisch für den Menschen, jedoch wird durch Zulage von Cholesterin und Choleat in der Diät die normale Verteilung des Cholesterins in den Lipoproteinen verschoben – von überwiegend HDL-Cholesterin zu vermehrtem VLDL- und LDL-Cholesterin (van Eck et al. 2004).

In V2 konnte ein hypocholesterinämischer Effekt des Lupinenproteins auf die VLDL-Lipoproteinfraktion und die Chylomikronen nur in hypercholesterinämisch gefütterten, nicht aber in normocholesterinämisch gefütterten Ratten beobachtet werden. Diese Ergebnisse widersprechen den beobachteten Effekten bei Sirtori et al. (2004). Hier wurde eine signifikante Erniedrigung sowohl des Plasma-Cholesterins, als auch des LDL-Cholesterins gefunden. Allerdings wurde in der vorliegenden Studie die LDL-Cholesterin-Konzentration tendenziell durch Fütterung des Lupinenproteins erniedrigt und das HDL-Cholesterin tendenziell erhöht. Dadurch verschob sich das LDL zu HDL-Verhältnis zugunsten der Lupine bei Cholesterinzulage. Diese Beobachtungen machten bereits verschiedene andere Arbeitsgruppen an unterschiedlichen Tiermodellen (Sirtori et al. 2004, Marchesi et al. 2008, Martins et al. 2005). Interessanterweise konnte des Weiteren beobachtet werden, dass die Cholesterinkonzentration in der Leber bei Ratten, welche die hypercholesterinämische Diät

erhielten, durch Zulage von Lupinenprotein signifikant erhöht wurde, obwohl die Cholesterinkonzentration in den LDL erniedrigt war. Es ist jedoch schwierig, diese Ergebnisse mit denen von Sirtori et al. (2004) zu vergleichen, weil in seiner Studie das Lipoprotein-Cholesterin als LDL-Cholesterin plus VLDL-Cholesterin angegeben wurde. Es wurde sich natürlich auch mit der Tatsache auseinandergesetzt, dass bei Fütterung hoher Cholesterindosen, die Lipoproteinfraktion mit einer Dichte von 1,006 – 1,063 kg/l nicht nur LDL-, sondern auch HDL-Partikel enthält, welche vorzugsweise in der Fraktion mit einer Dichte von 1,006 – 1,030 kg/l vorliegen, während in normolipämisch gefütterten Tieren das meiste LDL-Cholesterin in der Fraktion mit einer Dichte von 1,030 – 1,063 kg/l vorkommt (Lasser et al. 1973). Aufgrund dieser Tatsache, dass die Charakterisierung der Lipoproteine auf Basis ihrer Dichte nur begrenzt gültig ist, wurde in weiteren Untersuchungen die Konzentration der Apolipoproteine gemessen, um beurteilen zu können, ob der Proteineffekt auf atherogene und auf nichtatherogene Lipoproteine zutrifft. Lipoproteinklassen sind mit spezifischen Apolipoproteinen ausgestattet. Neben strukturgebenden Funktionen haben die Apolipoproteine entscheidende Bedeutung für den Lipidmetabolismus. Es konnte beobachtet werden, dass die Fütterung einer hypercholesterinämischen Diät die Apolipoprotein-konzentration in den VLDL erhöhte und in den LDL z.T. erniedrigte. Die unterschiedliche Proteinzulage hatte keinen Einfluss auf die Konzentration der Apolipoproteine.

Um der Frage nachzugehen, warum die Cholesterinkonzentration in der Leber erhöht war, wurde die Gallensäurekonzentration und die Gallensäureexkretion bestimmt. Gallensäuren sind als Abbauprodukte des Cholesterins bedeutsam an der Regulation der Cholesterinbiosynthese beteiligt (Ott et al. 1981). Durch Zulage von Cholesterin in der Diät erhöhte sich die Gallensäurekonzentration unabhängig vom Diätprotein. Die Gallensäureausscheidung jedoch wurde durch Fütterung von Lupinenprotein signifikant erniedrigt, wenn zusätzlich Cholesterin und Choleat gefüttert wurde. Das erklärt vermutlich auch den ausbleibenden Effekt auf die Plasmacholesterinkonzentration. Die Ergebnisse sprechen möglicherweise entweder für eine vermehrte Rückresorption von Cholesterin oder verlangsamten bzw. verringerten Abbau von Cholesterin zu Gallensäuren. Um mögliche Mechanismen aufzuklären, warum nun Lupinenprotein aus *Lupinus albus* den Cholesteringehalt in der Leber und in den Lipoproteinen verändert, wurden die mRNA-Konzentrationen von Genen gemessen, die in die Cholesterinbiosynthese, die Cholesterinaufnahme, den reversen Gallensäuretransport und die Gallensäuresynthese involviert sind. Dabei gilt der LDL-Rezeptor als Hauptregulator für zirkulierendes Cholesterin (Meddings et al. 1986), indem er cholesterinreiche Lipoproteine aus dem Blut aufnimmt (Jeon

et al. 2005). Sirtori et al. (2004) haben beobachtet, dass Protein aus weißer Lupinensaat hypocholesterinämisch wirkt, was möglicherweise aus einer vermehrten Stimulation des LDL-Rezeptors resultiert. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass die mRNA-Konzentration des LDL-Rezeptors durch die Verfütterung von Lupinenprotein nicht beeinflusst wurde. Auch die mRNA-Konzentrationen der HMG-CoA-Reduktase unterschieden sich nicht durch Fütterung von Lupinenprotein. Die Genexpression des LDL-Rezeptors und der HMG-CoA-Reduktase sind durch SREBP2 reguliert (Valett et al. 1996, Horton et al. 1998, Horton et al. 2002). SREBP2 gehört wie SREBP-1c und 1a zur Familie membranständiger Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von mehr als 30 Genen des Lipidstoffwechsels regulieren (Brown und Goldstein 1997, Horton et al. 1999, Sakakura et al. 2001). SREBP2 wird vorwiegend in der Leber expremiert und liegt zunächst als *precursor* Protein im endoplasmatischen Retikulum als inaktive Form gebunden an das SREBP *cleavage-activating protein* (SCAP) vor. Bei Gegenwart hoher Cholesterinkonzentrationen wird Cholesterin direkt an SCAP gebunden. Nach Konformationsänderung des SCAP (Brown et al. 2002, Radhakrishnan et al. 2004) wird die proteolytische Spaltung des SREBP2 gehemmt, die Transkription der SREBP2-Zielgene und folglich die Cholesterinbiosynthese verringert. Ratten, welche die hypercholesterinämische Diät erhielten, hatten über 35% signifikant niedrigere mRNA-Konzentrationen an HMG-CoA-Reduktase, als die normolipämisch gefütterten Tiere. Die mRNA-Konzentrationen von SREBP2 und LDL-Rezeptor wurden durch die Cholesterin- und Choleatzulage tendenziell gesenkt. Studien von Engelking et al. 2005 haben ebenfalls gezeigt, dass durch erhöhte Cholesterinzulage in der Diät von Mäusen sowohl die mRNA-Konzentrationen, als auch die Proteinkonzentrationen von SREBP2, LDL-Rezeptor und HMG-CoA-Reduktase erniedrigt wurden. Die Fütterung von Lupinenpotein hatte keinen Einfluss auf die Genexpression des SREBP2, des LDL-Rezeptors und der HMG-CoA-Reduktase. Damit steht dieser Effekt in Kontrast zu einer Studie von Shukla et al. 2007, in welcher sich die Expeession von SREBP2 und seinen Zielgenen LDL-Rezeptor und HMG-CoA-Reduktase stark erniedrigte durch Fütterung von Sojaprotein an normolipämische Ratten, verglichen mit Ratten die Casein supplementierten. Im weiteren Versuchsverlauf wurden weitere Gene, die in den Cholesterinmetabolismus involviert sind, gemessen. Dabei wurden die mRNA-Konzentrationen von Lecithin:Cholesterol Acyltransferase (LCAT), Acyl-CoA Cholesterol Acyltransferase (ACAT) und Apolipoprotein A1 (Apo A1) nicht durch Lupinenprotein beeinflusst. Allerdings konnte beobachtet werden, dass Lupinenprotein einen signifikant upregulierenden Effekt auf die mRNA-Konzentrationen von Lipoprotein Lipase (LPL) und ATP-binding Cassette

Transporter (ABC-A1) hat. Beide Gene sind Zielgene des Liver X Receptor (LXR- α). Daher könnte ein Anstieg der relativen mRNA-Konzentration dieser Gene möglicherweise eine LXR- α -Aktivierung reflektieren. Der LXR- α gilt als wichtiger nukleärer Regulator für Gene des Gallensäuremetabolismus, der Fettsäuresynthese, des Lipideffluxes und des Glucosestoffwechsels (Pawar et al. 2003). Des Weiteren wurde LXR- α als positiver Regulator der Cyp-7A1 – dem ersten und limitierenden Enzym der Gallensäurebiosynthese – identifiziert (Chiang et al. 2001). Cyp-7A1 wandelt dabei das Leber-Cholesterin in 7- α -hydroxylierte Gallensäuren um. Die Ratten, die eine hypercholesterinämische Diät erhielten, hatten signifikant höhere Cholesterol 7 α -Hydroxylase (Cyp7A1) mRNA-Konzentrationen verglichen mit den normocholesterinämisch gefütterten Tieren. Der ausbleibende Effekt des Lupinenproteins auf die mRNA-Konzentration der Cyp7A1 zusammen mit der erhöhten Konzentration an Cholesterin in der Leber deuten allerdings nicht auf eine Stimulation der Gallensäureneubildung hin. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um den Mechanismus der erniedrigten Gallensäureausscheidung durch Lupinenproteinfütterung aufzuklären. Die erhöhte Konzentration an Cholesterin in der Leber von hypercholesterinämischen Ratten gepaart mit bekannten Faktoren der Lupinenallergie beim Menschen – entweder als Lupinenallergie oder Kreuzreaktivitäten mit anderen Leguminosen z.B. Erdnüssen (Crespo et al. 2001, Magni et al. 2005), könnten jedoch den positiven Effekt des Lupinenproteins limitieren.

Auch in **V3** wurde der Cholesterinstoffwechsel in verschiedenster Weise durch die Fütterung von Proteinisolaten aus *Lupinus angustifolius* beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass das HDL-Cholesterin tendenziell in Vitabor und der α -/ β -Conglutin-Fraktion der Boregine erhöht war. Damit wurden die Ergebnisse aus den vorangegangenen Untersuchungen mit *Lupinus albus* bestätigt. Auch Studien von Sirtori et al. 2004 fanden durch Fütterung von Lupinenprotein ebenfalls eine tendenzielle HDL-Cholesterin-Erhöhung um 30%. Möglicherweise könnte diese Erhöhung durch vermehrte Expression des Apo A1 begründet sein. Apo A1 ist als Bestandteil des HDL in der Lage, Cholesterin aus der Peripherie zur Leber zurückzutransportieren. Erhöhte Apo A1-Konzentrationen korrelieren mit einem erniedrigten Atheroskleroserisiko (Pownall et al. 2006). Dieser Fragestellung könnte neben der Expressionsanalyse des Apo A1 in Leber und Darmmucosa, auch durch Messung der mRNA-Konzentrationen von Class B Type 1 Scavenger Receptor (SR-B1) und ABC-A1 in weiterführenden Untersuchungen nachgegangen werden. Beide Transporter tragen wesentlich zur Biogenese des HDL-Cholesterin bei und sind in den reversen Cholesterintransport zur Leber involviert.

Während Proteine der Sorten Probor und Boregine die Cholesterinkonzentrationen in Plasma und in den Lipoproteinfraktionen nicht beeinflussten, senkte der Totalproteinextrakt der Sorte Vitabor das LDL-Cholesterin um 37%, verglichen mit Casein. Diese Ergebnisse stimmen mit aktuellen Beobachtungen des hypocholesterinämischen Effekts in **V2** durch *Lupinus albus* überein (Sirtori et al. 2004). Die Untersuchungen von Sirtori et al. (2004) deuten darauf hin, dass Proteine aus *Lupinus albus* in der Lage sind, die LDL-Rezeptor-Aktivität zu stimulieren und damit die Aufnahme zirkulierender LDL-Partikel vom Plasma in die peripheren Zellen steigt. Allerdings war die mRNA-Expression des LDL-Rezeptors in der Leber tendenziell niedriger in Vitabor gefütterten Ratten, verglichen mit Casein. Daher ist es unwahrscheinlich, dass der beobachtete cholesterinsenkende Effekt in den LDL bei Supplementierung der Lupinenproteins aus der Sorte Vitabor durch eine erhöhte Aufnahme von Cholesterin in die Zelle begründet ist. Möglicherweise ist dieser cholesterinsenkende Befund eher ein sekundärer Effekt. So könnte bereits die Absorption des exogenen Cholesterins im Darm durch Lupinenprotein erniedrigt sein. Ursächlich dafür könnte eine erhöhte Viskosität des Chymus durch das Lupinenprotein sein. So fanden Viveros et al. (2007) in einer Studie an Hühnern bereits heraus, dass die Fütterung von Lupinensaat eine Erhöhung der intestinalen Viskosität im Jejunum zur Folge hat. Deshalb sind möglicherweise die hepatischen Cholesterinkonzentrationen in dieser Studie reduziert. Eine weitere Hypothese für die erniedrigten Cholesterinkonzentrationen in Leber und in der LDL-Fraktion ist, dass möglicherweise eine erhöhte Gallensäurebindungskapazität von Lupinen ausgeht. *In vitro* Studien haben gezeigt, dass isoliertes Protein aus Lupine imstande ist, mehr Gallensäuren im Darm zu binden, als Cholestyramin, welches pharmazeutisch als Gallensäurebinder eingesetzt wird (Yoshie-Stark et al. 2004). Zur exakten Aufklärung dieser Mechanismen sind weiterführende *in vitro* Studien an geeigneten Zellmodellen und Untersuchungen an Labortieren nötig.

Es wurde deshalb einer anderen These nachgegangen und daraufhin die mRNA-Expression der HMG-CoA-Reduktase gemessen. Aufgrund der deutlichen Downregulation dieses Gens um 76% in Vitabor gefütterten Tieren, kann davon ausgegangen werden, dass die erniedrigte Menge an HMG-CoA-Reduktase für den LDL-Cholesterin-senkenden Effekt verantwortlich sein könnte. Es ist bereits bekannt, dass die Synthese von endogenem Cholesterin hauptsächlich durch die Transkription der HMG-CoA-Reduktase reguliert wird (Gomez-Perez et al. 1992). Dabei gilt die HMG-CoA-Reduktase als das Schlüsselenzym der endogenen Cholesterinbiosynthese und wird durch den Transkriptionsfaktor SREBP2 reguliert, indem SREBP2 an DNA-Elemente in der Promoterregion der HMG-CoA-

Reduktase bindet (Espenshade et al. 2007). LDL-Cholesterin gilt als kausaler Faktor von Koronaren Herzerkrankungen (KHK) und wird derzeit pharmakologisch am effektivsten mit HMG-CoA-Reduktase-Hemmern oder Statinen gesenkt (Gomez-Perez et al. 1992, Scharnagl et al. 2004). Deshalb erscheint es plausibel, dass die beobachtete Senkung des LDL-Cholesterins in Vitabor gefütterten Ratten der Downregulation von Schlüsselenzymen der Cholesterin-Biosynthese zugrunde liegt. In weiteren Untersuchungen sollten in Dosis-Wirkungs-Studien höhere Gehalte an Lupinenprotein - bis zu 20% - eingesetzt werden, um nachzuweisen, ob daraufhin möglicherweise stärkere Effekte auf die Cholesterinkonzentrationen auftreten. Interessanterweise konnte in dieser Studie beobachtet werden, dass die Expression von Genen, die in die Gallensäurebiosynthese und in den Transfer von endogenem Cholesterin in Gallensäuren involviert sind, durch Vitabor im Vergleich zu Casein signifikant gesenkt wurde. So waren die mRNA-Konzentrationen der Cyp-7A1 - dem limitierenden Enzym bei der Umwandlung von Cholesterin zu Gallensäuren - (Chiang et al. 2001), des Farnesoid x Receptor (FXR) - einem Transkriptionsfaktor, welcher die Expression von Gallensäuretransportern modifiziert - (Makishima et al. 1999) und des ATP-binding cassette hetero-dimeric transporters (ABC-G5) - einem Gen, welches in den Transfer von Cholesterin in Gallensäuren involviert ist - (Yu et al. 2002), herabreguliert. Weiterhin ist bekannt, dass Gallensäurekonzentrationen durch einen Feedback-Mechanismus reguliert sind, wobei die Aktivierung des FXR die Transkription der Cyp-7A1 unterdrückt (Makishima et al. 2005). Allerdings konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Lupinenprotein der Sorte Vitabor sowohl die mRNA-Konzentration des FXR, als auch die der Cyp-7A1 senken konnte. Es sind daher weitere Untersuchungen notwendig, um erklären zu können, durch welchen Mechanismus Lupinenprotein der Sorte Vitabor aus *Lupinus angustifolius* die mRNA-Expression des FXR und der Cyp-7A1 erniedrigen konnte. So könnte man weiterführende FXR-Expressionsanalysen in Darm und Leber durchführen, denn aktuelle Studien zeigten, dass die FXR-vermittelte Inhibierung der Gallensäuresynthese eine gemeinsame Aktion des FXR in Darm und Leber voraussetzen (Kim et al. 2007). Eine aktuelle Studie hat kürzlich entdeckt, dass 20 weitere Gene als Regulatoren der zellulären Cholesterinhomöostase fungieren (Bartz et al. 2009). So bindet beispielsweise das TMEM97 als Target-Gen des SREBP2 an das LDL-Cholesterintransport-regulierende Protein Niemann-Pick C1 (NPC1). Dadurch ergaben sich neue Hypothesen und Fragestellungen, z.B. wie das Cholesterin die Lysosomen verlässt. Gleichzeitig ist nach wie vor wenig bekannt über die molekulare Interaktion der neu identifizierten Cholesterinstoffwechsel-regulierenden Gene. Deshalb sollte in weiteren Studien untersucht werden, wie es durch diese neuen Gene zu einer

Beeinflussung des Blut-Cholesterin-Levels kommt und welche Rolle Lupinenprotein bei diesen Regulationsmechanismen spielt.

Ein weiteres interessantes Ergebnis war wie bereits erwähnt, die beobachtete Genabregulation von Cyp-7A1 und ABC-G5 in der Leber Vitabor-gefütterter Ratten. Denn eigentlich würde diese Downregulation in einer Zunahme der hepatischen Cholesterinkonzentrationen resultieren. In dieser Studie wurden die hepatischen Cholesterinkonzentrationen jedoch nicht durch die Fütterung von Vitabor modifiziert, verglichen mit Casein-gefütterten Tieren. Möglicherweise war eine verminderte Cholesterinsynthese in der Leber verantwortlich für die unveränderten hepatischen Cholesterinkonzentrationen, trotz reduzierter mRNA-Konzentrationen an Cyp-7A1 und ABC-G5. Andere Ergebnisse dieser Studie zeigten wiederum, dass Ratten, die Protein der Sorte Boregine erhielten, niedrigere Cholesterinkonzentrationen in der Leber hatten, verglichen mit Casein, obwohl die Konzentrationen an Cholesterin im Plasma und in den Lipoproteinfraktionen unverändert waren. Dieser beobachtete Effekt kann nicht durch ein verändertes Transkriptionsniveau der Gene, die in die Cholesterinbiosynthese und Cholesterinaufnahme in periphere Zellen oder die Gallensäuresynthese involviert sind, erklärt werden. Denn weder die mRNA-Expression von SREBP2-Zielgenen, noch die mRNA-Transkription der Cyp-7A1 wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verändert. Es kann angenommen werden, dass dieser außergewöhnliche Einzeleffekt weder mit positiven, noch mit nachteiligen gesundheitlichen Folgeerscheinungen verbunden ist. Des Weiteren kann man davon ausgehen, dass die verschiedenen lipidmodulierenden Effekte der unterschiedlichen Lupinenproteinsorten aus *Lupinus angustifolius* nicht in einer unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzung begründet sind, weil alle hier eingesetzten Lupinenproteinisolate ähnliche Aminosäurestrukturen aufwiesen. Daher kann man annehmen, dass die hypolipämischen Effekte der Sorten Vitabor und der α -/ β -Conglutin-Fraktion der Boregine durch andere nutritive Faktoren des Proteins induziert wurden. Diese Faktoren sind bis dato noch nicht identifiziert und werden Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Möglicherweise könnten spezifische Tripeptide, die aus endogenen diätetischen Polypeptiden im Darm hydrolysiert wurden oder biochemischen Phytoöstrogenen (isoflavonunabhängig) eine Rolle spielen.

Anders als in den vorangegangenen Studien zeigten sich in Studie **V4** sehr deutliche Veränderungen im Cholesterinstoffwechsel durch Lupinenproteinfütterung. Das lässt darauf schließen, dass vor allem während der Trächtigkeit und Laktation die Cholesterinhomöostase maßgeblich beeinflusst wird. So war eine interessante Beobachtung dieser Studie, dass die

Fütterung von Lupinenprotein deutlich die Konzentration an Cholesterin im Plasma (-81%), in den VLDL (-96%), in den LDL (-75%) und in der Leber (-40%) erniedrigte, während die HDL-Cholesterin-Konzentration um das 4-fache angestiegen war, im Vergleich zu Ratten, die Casein erhielten. Die Cholesterinhomöostase ist durch die zelluläre *de novo* Synthese, die intestinale Resorption, die Speicherung und die biliäre Exkretion geprägt. Dabei gilt SREBP2 als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Regulation des Cholesterinspiegels durch Aktivierung der Expression von Genen, die für die Cholesterinsynthese kodieren. In dieser Studie waren die hepatischen mRNA-Konzentrationen des SREBP2 und seiner Zielgene HMG-CoA-Reduktase und LDL-Rezeptor tendenziell durch Lupinenprotein erhöht, verglichen mit Casein gefütterten Ratten. Bisher veröffentlichten Daten zu den hypocholesterinämischen Wirkungen von Sojaprotein basieren in Zell- und tierexperimentellen Studien meist auf einer Erhöhung der mRNA-Expression des LDL-Rezeptors oder dessen Aktivität (Lovati et al. 1987, Sirtori et al. 1984, Lovati et al. 1991, Manzoni et al. 1998, Lovati et al. 2000). Interessanterweise konnte ebenfalls eine 1,6-fache Steigerung des LDL-Rezeptor-Proteins in der Leber der laktierenden Muttertiere beobachtet werden, die Lupinenprotein verzehrten, obwohl auf mRNA-Ebene die Konzentration des LDL-Rezeptors nur geringfügig höher war (+29%). Damit zeigen die vorliegenden Daten, dass wie auch in anderen aktuellen Studien mit hypercholesterinämischen wachsenden Ratten, während der Trächtigkeit und Laktation die erhöhte Synthese des LDL-Rezeptors möglicherweise eine gesteigerte Aufnahme des zirkulierenden LDL-Cholesterins zur Folge hat und deshalb sinken die Cholesterinkonzentrationen im Plasma. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden aus der Studie von Sirtori et al. (2004) überein, welcher beobachtete, dass Proteinsaat aus weißer Lupine durch eine Stimulation des LDL-Rezeptors, hypocholesterinämisch wirkt. Die hier beobachtete Heraufregulation der mRNA-Expression der HMG-CoA-Reduktase in der Leber von Ratten, die Lupinenprotein erhielten, könnte ebenfalls zu einer verstärkten hepatischen Cholesterinsynthese beitragen. In dieser Studie waren jedoch die Cholesterinkonzentrationen in der Leber erniedrigt. Bisher ist bekannt, dass Prozesse, welche die Ausscheidung von Cholesterin beeinflussen, maßgeblich an einer Erniedrigung der hepatischen Cholesterinkonzentration beteiligt sind. Im Normalfall wird überschüssiges Cholesterin über den Abbau zu Gallensäuren aus der Leber eliminiert. Dabei gilt die Cyp-7A1 als das Schlüsselenzym bei der Synthese von Cholesterin zu Gallensäuren (Vlahcevic et al. 1999). Da die relative mRNA-Konzentration an Cyp-7A1 in der Leber der laktierenden Muttertiere, die Lupinenprotein erhielten, 2,7mal höher war, als in Ratten, die das Kontrollprotein verzehrten, kann geschlussfolgert werden, dass die erniedrigte hepatische

Cholesterinkonzentration in Lupinenprotein-gefütterten Tieren primär durch eine Erhöhung der Exkretion von Cholesterin über Gallensäuren hervorgerufen wurde. Studien haben gezeigt, dass Peptide im Sojaprotein eine höhere Affinität zu Gallensalzen aufweisen und so an der Wiederaufnahme in den enterohepatischen Kreislauf hindern (Higaki et al. 2006). Demnach könnte man auch die Vermutung anstellen, dass der hypolipämische Effekt durch eine Inhibierung der Proteinreabsorption der Lupine hervorgerufen wurde. Weitere Untersuchungen zum Cholesteringehalt im Fäzes stehen noch aus. Diese Schlussfolgerung könnte auch der Grund für die registrierte Senkung des VLDL-Cholesterins sein. Eine Messung der Gallensäuren im Fäzes der laktierenden Tiere könnte diese Vermutung unterstützen, allerdings benötigt man für die Bestimmung der fäkalen Gallensäuren spezielle Stoffwechsellkäfige ohne Einstreu. Nun ist es aber bekannt, dass laktierende Ratten, die in Käfigen ohne Einstreu gehalten werden, gelegentlich ihren Nachwuchs fressen und deshalb wurde hier die übliche Aufzucht gewählt (Ferreira et al. 1986).

Eine weitere interessante Beobachtung dieser Studie war die deutlich höhere HDL-Cholesterin-Konzentration in den Ratten, die Lupinenprotein verzehrten, im Vergleich zu Casein. Die physiologische Aufgabe des HDL ist der Rücktransport von überschüssigem Cholesterin aus der Peripherie zurück zur Leber. Apo-A1 gilt als eines der 2 Hauptbestandteile des HDL und die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die mRNA-Expression des Apo A1 in der Leber von Lupinenprotein-gefütterten Ratten signifikant höher war, als in der Kontrollgruppe. Diese beiden Effekte sind äußerst positiv zu bewerten, da niedrige Apo A1/ HDL-Konzentrationen im Plasma einen begünstigenden Faktor für KHK darstellen (Fruchart et al. 1994). Es gibt also eine inverse Beziehung zwischen HDL-Cholesterin, Apo A1-Konzentration und dem Risiko an Atherosklerose zu erkranken. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Mütter die Lupinenproteindiät erhielten, deutlich niedrigere Konzentrationen an Chylomikronen im Plasma hatten, als die Tiere der Kontrollgruppe. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Triglyceridkonzentrationen um 74% und die Konzentration an Cholesterin um 86% in den Chylomikronen dieser Ratten verringert war. Eine Möglichkeit könnte die reduzierte Futtermittelaufnahme der Tiere in der Lupine-Gruppe sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass Lupinenprotein vermutlich die Aufnahme von Chylomikronen-assoziierten Lipiden in periphere Gewebe erhöht. Die gemessene Heraufregulation der hepatischen Lipase-Expression bekräftigt diese Hypothese. Auch ist es möglich, dass Lupinenprotein die Absorption von Lipiden aus dem Darm beeinflusst. Deshalb ist es notwendig, in weiteren Untersuchungen den Transport und die Resorption von Lipiden

aus dem Darmlumen in das intestinale Gewebe durch Messung der mRNA intestinaler Transporter und Proteine aufzuklären.

Auf der Suche nach dem Nahrungsbestandteil, der für die verschiedenen lipidmodulierenden Effekte durch die *Lupinus angustifolius* verantwortlich ist, wurden auch verschiedene proteinassoziierte Faktoren, wie Isoflavone, Peptide und einzelne Aminosäuren diskutiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass Isoflavone nicht für die lipidsenkenden Eigenschaften verantwortlich sind, da ihr Gehalt in Lupinenproteinen-Isolaten extrem niedrig ist. Es kann vermutet werden, dass Aminosäuren, Peptidhydrolysate der diätetischen Polypeptide im Darm oder bioaktive Substanzen eine entscheidende Rolle für diesen Effekt spielen. Bis jetzt sind diese Faktoren noch nicht identifiziert und weitere Studien sind notwendig, um den oder die lipidmodulierenden Nahrungsbestandteile des Lupinenproteins zu identifizieren. Abgesehen von den Peptiden könnte auch die Aminosäurezusammensetzung per se für die Effekte auf den Lipidstoffwechsel verantwortlich sein. So konnten bereits verschiedene Studien zeigen, dass ein hohes Arginin zu Lysin-Verhältnis und ein niedriges Methionin zu Glycin-Verhältnis hypocholesterinämische Effekte haben (Kritchevsky et al. 1982, Morita et al. 1997, Gudbrandsen et al. 2005). In dieser Studie war das Arginin zu Lysin-Verhältnis im Lupinenprotein 2,43 verglichen mit 0,43 im Casein. Das Methionin zu Glycin-Verhältnis war im Lupinenprotein 1,22 verglichen mit 2,97 im Casein. Es kann vermutet werden, dass niedrige Methionin- und hohe Argininkonzentrationen durch Beeinflussung des enterohepatischen Kreislaufs und Beeinflussung der mRNA-Expression des LDL-Rezeptors cholesterinsenkend wirken (Gudbrandsen et al. 2005). So kann angenommen werden, dass der hypocholesterinämische Effekt des Lupinenproteins unter anderem durch die Aminosäurezusammensetzung verursacht wurde.

5.3. Wirkungen des Lupinenproteins auf den Triglyceridmetabolismus

Eine diätetische Beeinflussung der Plasmatriglyceride ist aufgrund der wachsenden Häufigkeit von Herz-Kreislauf-Erkrankungen von immenser Bedeutung. Die Senkung der Triglyceridkonzentrationen gilt als positiver Aspekt für die Protektion von KHK und Atherosklerose, denn neben erhöhten LDL- und erniedrigten HDL-Cholesterinkonzentrationen (Gotto et al. 1998, Grundy et al. 1998, Greene et al. 2005, Jacobson et al. 2007) zählen auch hohe Triglyceridkonzentrationen zu den Risikofaktoren. Die nahrungsbedingte Beeinflussung der Triglyceride ist daher von zentraler Bedeutung. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Nagern konnten bereits zeigen, dass durch

Aufnahme pflanzlicher Proteine aus Soja oder Lupine die Plasmatriglyceridkonzentrationen gesenkt werden konnten (Shukla et al. 2007, Spielmann et al. 2007).

In Studie V2 konnte erstmals gezeigt werden, dass Lupinenprotein aus *Lupinus albus* in der Lage ist, Triglyceride in den VLDL und in der Leber signifikant zu erniedrigen. Allerdings konnte im Plasma nur eine tendenzielle Erniedrigung der Triglyceride beobachtet werden. Nichts desto trotz kann bestätigt werden, dass Lupinenprotein in hypercholesterinämischen Ratten einen hypotriglyceridämischen Effekt hat. Das belegen auch Untersuchungen von Sirtori et al. (2004), wo Lupinenprotein in der Lage war, zirkulierende Triglyceride in hypercholesterinämischen Ratten zu erniedrigen. Möglicherweise könnte der Einsatz von höheren Gehalten an Lupinenprotein bis zu 200 g/kg Diät die Triglyceridkonzentrationen, vor allem im Plasma, mehr senken, als die hier eingesetzte Zulage von 50 g/ kg Diät. Jedoch kann nicht unbegrenzt Protein eingesetzt werden, da es sonst zu allergischen Reaktionen kommen kann (Jäger et al. 2002). Die beobachteten triglyceridsenkenden Effekte in Leber und VLDL stimmen mit den Ergebnissen aus vorangegangenen Untersuchungen von Spielmann et al. (2007) überein. Die erhobenen Daten aus Genexpressionsanalysen deuten stark darauf hin, dass der triglyceridsenkende Effekt des Lupinenproteins möglicherweise in Zusammenhang steht mit der Veränderung der mRNA-Transkription von Genen, die in die *de novo*-Synthese von Fettsäuren und die Triglyceridsynthese involviert sind. Daher wurde die Expression von ausgewählten lipogenen Enzymen und von Genen des Triglyceridabbaus gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die relative mRNA-Konzentration des SREBP-1c durch die Fütterung von Lupinenprotein signifikant erniedrigte. SREBP-1c gilt als Schlüsselregulator der Fettsäure- und Triglyceridsynthese. Dabei aktiviert es Gene, die für lipogene Enzyme kodieren (Shimano et al. 1999) und ferner ist es auch an der Regulation der VLDL-Synthese und Glukogenese beteiligt. Weiterhin wurden signifikant reduzierte mRNA-Konzentrationen der SREBP-1c-regulierten Gene FAS, Delta-9-D., GPAT und G-6-PDH gemessen. Die FAS gilt als Multienzymkomplex, der als Schlüsselenzym die *de novo*-Fettsäuresynthese reguliert (Chirala et al. 2004). Die Delta-9-D. unterliegt ebenfalls der Regulation des SREBP-1c und ist an der Steuerung der Triglycerideigensynthese durch Einfügen einer Doppelbindung beteiligt und wandelt so gesättigte in ungesättigte Fettsäuren um (Flowers et al. 2008). Auch die G-6-PDH ist ein lipogenes Enzym, das neben der Regulation durch SREBP-1c auch hormonell oder nahrungsbedingt beeinflussbar ist (Kletzien et al. 1994). Die GPAT kommt in 2 Formen vor, mitochondrial und mikrosomal (Cao et al. 2006, Coleman et al. 2005, Ganesh et al. 1999) – vorliegende Untersuchungen befassten sich ausschließlich mit der mitochondrialen GPAT.

So wird GPAT ebenfalls transkriptionell durch SREBP-1c reguliert und gilt als Schlüsselenzym für die Biosynthese von Triglyceriden, Phospholipiden und Cholesterinestern (Jianguo et al. 2007). Auch wenn nicht die reife Form des SREBP-1c im Kern experimentell bestimmt wurde, deuten diese Befunde doch stark auf eine verminderte Lipogenese mittels SREBP-1c hin. Interessanterweise war die Downregulation von FAS, Delta-9-D, GPAT und G-6-PDH in der Leber von hypercholesterinämischen Ratten stärker als in normocholesterinämisch gefütterten Ratten. Dies könnte ein Grund für den ausbleibenden triglyceridsenkenden Effekt in normocholesterinämischen Ratten sein. Dieser beobachtete Effekt des Lupinenproteins auf SREBP-1c-regulierte Gene entspricht bereits veröffentlichten Ergebnissen über Wirkungen des Sojaproteins (Iritani et al. 1996, Nagasawa et al. 2003, Ascencio et al. 2004, Tachibana et al. 2005, Shukla et al. 2007). Soja und Lupine gehören zur gleichen Pflanzenfamilie und haben eine ähnliche Proteinzusammensetzung. Lupinen ähneln auch im Protein- und Aminosäuregehalt stark den Sojabohnen (Mellenthin et al. 1999). Einige essentielle Aminosäuren, wie Lysin, Methionin, Tryptophan und das semiessentielle Cystein sind im Lupinenprotein in geringerer Konzentration vorhanden. Die Argininkonzentration ist hingegen im Lupinenprotein höher als bei Soja (Duranti et al. 1979, Friedmann et al. 2001, Mariotti et al. 2002). Da auch im eingesetzten Referenzprotein Casein die Konzentrationen an Cystein und Arginin geringer und die Methioninkonzentration höher als im Lupinenprotein ist, wurden die limitierenden Aminosäuren in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht der Ratten zusätzlich supplementiert. Um das Aminosäuremuster so ursprünglich wie möglich zu erhalten, wurden keine weiteren Aminosäuren zugesetzt.

Hauptunterschied zwischen Soja und Lupine sind die Isoflavongehalte. Proteinisolate aus *Lupinus albus* enthalten wenig Isoflavone verglichen mit Sojaprotein. Die hier eingesetzten Lupinenproteinisolate sind sogar praktisch isoflavonfrei. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Konzentrationen an Genistein, Daidzein und Genistin unter der Nachweisgrenze von 2,22 $\mu\text{mol/kg}$ lagen. Aufgrund dieser Tatsache kann man darauf schließen, dass der Effekt dieser Leguminosen auf den Triglyceridmetabolismus primär durch das Protein per se und weniger durch die Isoflavongehalte begründet ist. Ergebnisse aus aktuellen Studien von Ascencio et al. (2004) deuten darauf hin, dass Sojaprotein die SREBP-1c-Expression durch Modulierung der Insulin-Konzentration und Erhöhung der Insulin/Glucagon-Ratio im Plasma downregulieren kann. Erhöhte Insulinkonzentrationen im Plasma könnten den Impuls für eine erhöhte Lipogenese geben. Allerdings wurden in der hier vorliegenden Studie keine Unterschiede in der Plasmainsulin- oder Glucagonkonzentration beobachtet. Es ist natürlich bekannt, dass eine einmalige Messung dieser

Hormonkonzentration nicht so beweiskräftig ist, wie es, unter Berücksichtigung der Nüchternplasmakonzentrationen von Insulin und Glucagon, eine Messung zu definierten Zeitpunkten während der Fütterung gewesen wäre. Die Fähigkeit von Lupinenproteinen, die mRNA-Konzentration von Genen, die in den Fettsäuremetabolismus und der Triglyceridsynthese involviert sind, herabzuregulieren, unterstützen den plausiblen Mechanismus des triglyceridsenkenden Effektes. Ein anderer möglicher Mechanismus, der für die triglyceridsenkende Wirkung des Lupinenproteins verantwortlich sein könnte, ist die beobachtete Steigerung der mRNA-Expression der Lipoproteinlipase (LPL), der hepatischen Lipase (HL) und Apo-A5, was bedeutet dass möglicherweise auch Abbaupfade der Triglyceride durch Hydrolyse beeinflusst werden. Zusätzlich wurde festgestellt, dass dieser Effekt in hypercholesterinämisch gefütterten Ratten stärker war, als in normocholesterinämisch gefütterten Tieren. Jedes dieser drei Gene ist in die Triglyceridhydrolyse involviert. Die LPL gilt als das zentrale Enzym des plasmatischen Triglyceridabbaus und hydrolysiert dabei Triglyceride aus zirkulierenden Chylomikronen und VLDL. Die LPL ist durch ihre lipolytische Funktion in der Lage, Plasmatriglyceridspiegel zu senken. In Studien von Shimada et al. (1993) und Zsigmond et al. (1994) wurde bereits bei einer nichtorganspezifischen Überexpression der LPL der triglyceridsenkende, sowie ein HDL-Cholesterin-steigernder Effekt nachgewiesen. Obwohl die LPL hauptsächlich als extrahepatisches Enzym betrachtet wird, kann darüber spekuliert werden, ob der beobachtete Effekt einer gesteigerten mRNA-Expression auch in anderen Geweben auftreten könnte. Neben ihrer klassischen Funktion kann die LPL auch nichtkatalytische Brückenfunktionen ausüben, die es erlauben, gleichzeitig an Lipoproteine und spezifische Zelloberflächenproteine, wie periphere LDL- und VLDL-Rezeptoren zu binden (Goldstein et al. 1996). Auch die HL, deren mRNA-Konzentration ebenfalls durch Lupinenprotein erhöht wurde, fungiert ähnlich wie die LPL als lipolytisches Enzym, welches Triglyceride und Phospholipide in zirkulierende Lipoproteine spaltet und somit zur Triglyceridsenkung beitragen kann. Ähnlich wie die LPL agiert diese Enzym als Ligand, welches die Lipoproteinaufnahme über Zelloberflächenrezeptoren in die Peripherie reguliert (Santamarina-Fojo et al. 2004). *In vitro* Studien an isolierten Rattenhepatocyten haben gezeigt, dass die hepatische Lipase die Bindung oder die Aufnahme von Chylomikronen, VLDL, LDL (Krapp et al. 1996) und HDL (Diard et al. 1994, Marques-Vidal et al. 1994) erhöhen kann. In der hier vorgestellten Studie waren die HDL-Cholesterin-Konzentrationen tendenziell durch Lupinenprotein erhöht.

Ein weiteres interessantes Ergebnis ist, dass Lupinenprotein in der Lage ist, die mRNA-Expression von Apo A5 zu erhöhen. Apo A5 ist ein relativ neu entdecktes Apolipoprotein, welches überwiegend in der Leber exprimiert wird und gilt als wichtiger bestimmender Faktor für Plasmatriglyceridspiegel. Apo A5 beschleunigt den VLDL-Abbau durch Aktivierung intravaskulärer Triglyceridhydrolyse über die Bindungssteigerung von Lipoproteinen und Proteoglykanen in der Gefäßwand, durch Aktivierung von Proteoglykan-gebundener Lipoproteinlipase (Merkel et al. 2005) und durch Erhöhung der VLDL-Entfernung aus dem Plasma (Fruchart-Najib et al. 2004, Schaap et al. 2004, Merkel et al. 2005). Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass Lupinenprotein nicht nur die mRNA von Genen die in die Fettsäuresynthese involviert sind, erniedrigt, sondern auch den Triglyceridabbau im Plasma beschleunigt durch Expressionserhöhung der Gene, die für die Triglyceridhydrolyse und die –aufnahme verantwortlich sind. Auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht bekannt sind, wie Lupinenprotein die mRNA-Konzentration dieser Gene erhöht – ist es doch möglich, dass die Erhöhung der Apo A5-Expression durch eine Erniedrigung des SREBP-1c reguliert ist. Dafür sprechen bereits veröffentlichte Daten, die zeigen dass SREBP-1c die mRNA-Konzentration des Apo A5 erniedrigen kann, indem es direkt oder indirekt an die funktionelle E-Box im Promoter binden kann (Jakel et al. 2004). Weiterhin ist bekannt, dass eine PPAR α -Aktivierung mit einer Erhöhung der mRNA-Expression der Apo A5 einhergeht (Prieur et al. 2003, Vu-Dac et al. 2003). Allerdings kann man in der vorliegenden Studie die Erhöhung der Apo A5-mRNA-Konzentration durch eine PPAR α -Aktivierung als potentiellen Grund ausschließen. Denn die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die mRNA-Konzentrationen PPAR α -regulierter Gene, wie CPT-1, Cyp4A1 und ACO nicht durch Lupinenprotein beeinflusst wurden.

Auch wurde sich innerhalb der Versuchsreihen mit der Hypothese auseinandergesetzt, inwieweit oxidativer Stress bzw. antioxidativer Schutz durch die Supplementierung von Lupinenprotein einen Einfluss auf die Lipidregulation haben können. So induziert beispielsweise Homocystein bei ER-Stress durch Aktivierung der SREBPs die Lipidsynthese. Torres et al. (2006) haben herausgefunden, dass durch den niedrigen Methioningehalt in Sojaprotein und dementsprechend auch durch die niedrige Homocysteinkonzentration, das Risiko an einer KHK zu erkranken, gesenkt werden kann. Homocystein kann durch die Aktivierung des Unfolded Protein Response (UPR) die proteolytische Spaltung von SREBP-1c und SREBP2 induzieren und somit die Genexpression von Genen, die für die Cholesterin- und Triglyceridsynthese kodieren, erhöhen (Werstuck et al. 2001). Somit kommt es zu einer Lipidanreicherung in der Peripherie. Cystein wird aus Serin, Methionin über Homocystein in

der Leber gebildet. Glutathion (GSH) wird aus Glutaminsäure, Glycin und Cystein gebildet, gilt als Antioxidans und kann möglicherweise die Biosynthese von Cholesterin und Triglyceriden hemmen. In dieser Studie wurden daher die Konzentrationen an Homocystein, Cystein und Gesamt-GSH im Plasma bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Konzentrationen an Homocystein und Cystein nicht verändert haben. Allerdings konnte ein signifikanter Anstieg der Gesamt-GSHkonzentration festgestellt werden. Das könnte darauf hindeuten, dass Lupinenprotein einen erhöhten antioxidativen Status besitzt und über eine vermehrte Bildung von GSH lipidsenkendes Potential entwickelt.

Die Ergebnisse von Studie **V3** zeigen weiterhin, dass isoliertes Protein von verschiedenen kultivierten Sorten der *Lupinus angustifolius* auch unterschiedliche Wirkungen auf die Lipidkonzentration im Plasma, in den Lipoproteinen und in der Leber haben kann. Dabei gingen die positivsten Wirkungen auf die zirkulierenden Triglyceride vom Totalproteinextrakt (TPE) der Sorte Vitabor und der α -/ β -Conglutin-Fraktion der Boregine aus. Diese beiden Isolate senkten die Triglyceride in den VLDL um 40 bzw. 29% verglichen mit Casein. Auch die Plasmatriglyceride wurden durch beide Isolate signifikant gesenkt. Möglicherweise wurden die Triglyceride vermehrt über den Fäzes ausgeschieden und bedingen daher die geringere Plasmakonzentration. Frühere Studien an Soja wiesen vergleichbare Ergebnisse auf. Fukui et al. (2004) konnten erstmals an Ratten zeigen, dass die Senkung der Plasmatriglyceridkonzentration u.a. durch eine erhöhte Exkretion der freien Fettsäuren erfolgte. Vermutlich hemmen Protein- oder Peptidbestandteile die Pankreaslipase und vermindern somit die Triglyceridhydrolyse. Allerdings blieben die Konzentrationen der Triglyceride in der Leber unverändert. Dies steht in Kontrast zu aktuellen Studien unserer Arbeitsgruppe (**V2**), in denen Proteine aus *Lupinus albus* die Triglyceridkonzentrationen in der Leber senken konnten (Spielmann et al. 2007). Der Grund für den ausbleibenden triglyceridsenkenden Effekt der Lupinenproteine auf die hepatischen Triglyceride ist bis dato noch nicht geklärt, aber es wird davon ausgegangen, dass die Herabregulierung der Triglyceridsynthese unter den experimentellen Bedingungen in den gegenwärtigen Studien unserer Arbeitsgruppe (**V2**) mit *Lupinus albus* stärker war (Spielmann et al. 2007). In einer dieser Studien mit *Lupinus albus* wurden die Ratten mit 200 g Protein/ kg Diät Protein gefüttert, verglichen mit der vorliegenden Studie, wo nur 50 g Protein/ kg Diät verabreicht wurden. Ergebnisse in Spielmann et al. (2007) zeigen, dass die Triglyceridkonzentration in der VLDL-Fraktion um 81% gesenkt wurde. In der hier vorliegenden Studie konnten ähnliche Effekte beobachtet werden – die VLDL-Triglyceridkonzentration waren durch Boregine und Vitabor zwischen 30 und 40% gesenkt. In einer vorangegangenen Studie unserer

Arbeitsgruppe wurden die Triglyceride in den VLDL sogar um 52% durch Lupinenprotein aus *Lupinus albus* reduziert (V2). Daher kann man davon ausgehen, dass die Reduzierung der hepatischen Triglyceridsynthese in dieser Studie mit ausgewählten Proteinisolaten aus *Lupinus angustifolius* nicht stark genug war, um auch die Triglyceride in der Leber nach nur 17 Tagen Fütterung signifikant zu reduzieren. Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Untersuchung war, dass beide Isolate – aus Vitabor und die α -/ β -Conglutin-Fraktion aus Boregine die mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c, FAS und Delta-9-D. bis zu 78% senken konnten. Die Fähigkeit dieser beiden Proteinisolate, die mRNA-Expression der Gene, die in die Triglyceridsynthese involviert sind, deutlich zu erniedrigen, unterstützt die These für den möglichen Mechanismus des triglyceridsenkenden Effekts. Dieses Ergebnis stimmt mit aktuellen Daten unserer Arbeitsgruppe (V2) überein, in denen die Fütterung von Lupinenprotein aus *Lupinus albus* verglichen mit Casein zu erniedrigten Konzentrationen an zirkulierenden Triglyceriden und niedrigeren mRNA-Konzentrationen der Gene, die an der Triglyceridsynthese beteiligt sind, führt (Spielmann et al. 2007). Obwohl man sich dessen bewusst ist, dass Expressionsdaten nicht automatisch Protein- oder Aktivitätsniveaus reflektieren, ist es dennoch bewiesen, dass die Genexpression des SREBP-1c ein Schlüsselschritt in der Regulation der Aktivität und daher letztendlich bestimmend für die hepatische Lipogenese ist (Shimano et al. 2001).

Des Weiteren wurde während dieser Untersuchung beobachtet, dass die mRNA-Konzentrationen von Apo A5 und HL nicht durch die verschiedenen Lupinenproteinisolate beeinflusst wurden, verglichen mit Casein. Beide Gene sind maßgeblich am VLDL-Abbau beteiligt und aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass Protein aus *Lupinus albus* in der Lage ist, die mRNA-Expression dieser Gene zu erhöhen. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann man davon ausgehen, dass der beobachtete triglyceridsenkende Effekt in Vitabor und der α -/ β -Conglutin-Fraktion der Boregine hauptsächlich auf einer Inhibierung der Triglyceridsynthese und nicht auf einer Stimulierung der Triglycerid-Hydrolyse basiert. Damit wird die Hypothese gestützt, dass Proteinisolate von verschiedenen Spezies und Sorten der Lupine keine einheitlichen Effekte auf den Lipidstoffwechsel im Tiermodell liefern. Es konnte festgestellt werden, dass der Einsatz von einzelnen Teilfraktionen des Lupinenproteins stärkere Effekte auf den Lipidstoffwechsel bei Ratten hat, als der Einsatz eines TPE. Neuere Studien haben gezeigt, dass Peptide oder einzelne Aminosäuren beim intestinalen Verdau freigesetzt werden und somit ihre positiv lipidmodulierenden Wirkungen entfalten (Sirtori et al. 2009). Weiterhin wurde auch in dieser Studie der Fragestellung nachgegangen, ob und welche Rolle das Insulin bei der Regulation

der Lipidhomöostase durch Lupinenprotein spielt. So gibt es bereits Studien, die zeigten, dass beispielsweise Sojaprotein in der Lage ist, die Insulin-Glucagon-Ratio zu reduzieren und in Folge dessen, die Transkription des SREBP-1c downreguliert wurde. Gleichzeitig wurden dadurch auch die mRNA-Konzentrationen lipogener Enzyme erniedrigt (Tovar et al. 2006).

Eine andere Studie beschreibt, dass Conglutin γ - ein Protein, welches in Lupinensaat enthalten ist, in der Lage ist, Insulin zu binden und somit ähnlich wie beispielsweise das Metformin – einem oralen Antidiabetikum - den Nüchtern-Insulinspiegel senken und damit die Insulinresistenz verbessern kann (Magni et al. 2004). Deshalb wurden in dieser Studie drei insulinsensitive Gene im Skelettmuskel gemessen, um herauszufinden, ob Lupinenprotein über die Insulinregulation lipidmodulierend wirken kann. Insulin hemmt die Lipolyse aus Triglyceriden und stimuliert die Triglyceridsynthese in Leber, Fettgewebe, Herz- und Skelettmuskel. So gilt der Glucose Transporter-4 (Glut-4 Transporter) als insulinabhängiger Transporter, der in Fett- und Muskelzellen exprimiert wird. Insulin erhöht durch Aktivierung dieser Carrier-Proteine die zelluläre Permeabilität für Glucose. In Skelettmuskelzellen begünstigt das Insulin die Speicherung der Glucose in Form von Glykogen. Der Insulin-Rezeptor ist als transmembranöser Rezeptor in der Lage, Insulin zu binden und durch Auslösung verschiedener Phosphorylierungskaskaden seine Wirkung zu entfalten. Letztendlich wird so durch Erhöhung des Glut-4-Transporters der Plasmaglucoosespiegel erniedrigt und die Aufnahme in periphere Zellen gefördert, sowie die Speicherung von Glykogen in Muskel und Leber ermöglicht. Die intrazelluläre Protein-Tyrosin-Phosphatase 1b (PTP 1b) greift maßgeblich in die Regulation des Insulinrezeptors ein. Eine Dephosphorylierung des Insulinrezeptors bei fehlendem Insulinsignal wird durch PTP 1b begünstigt, damit sinkt auch der Glucose-Uptake. Studien an HepG2-Zellen haben gezeigt, dass eine Überexpression von PTP 1b die Phosphorylierung des Insulinrezeptors hemmen kann und in Folge dessen, die Apolipoprotein B100-Sekretion erhöht wurde, was wiederum eine Induzierung der VLDL-Produktion bewirkt. Damit spielt auch die Regulation der PTP 1b eine entscheidende Rolle in der hepatischen Lipoproteinsekretion (Qui et al. 2004). Allerdings konnten bei der Messung der mRNA dieser insulinsensitiven Gene im Skelettmuskel keine Unterschiede durch Lupinenprotein festgestellt werden. Daher scheinen die positiven Veränderungen im Triglyceridmetabolismus und die Veränderungen der lipogenen Enzyme nicht durch eine Modifizierung der Insulinkaskade hervorgerufen zu sein.

In Studie **V4** wurden die Haupteffekte auf den Triglyceridmetabolismus bei Lupinenprotein gefütterten Tieren beobachtet. Die Muttertiere hatten signifikant höhere Konzentrationen an Triglyceriden in der Leber (+108%) und in der Milch (+81%) und

tendenziell höhere Triglycerid-Konzentrationen in den VLDL (+50%). Diese beobachteten Effekte, also die Akkumulation der hepatischen Triglyceride und die erhöhten Konzentrationen an Triglyceriden in den VLDL, stehen in Kontrast zu kürzlich veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe, welche zeigen, dass Lupinenprotein die Konzentration an Plasma- und Lebertriglyceriden erniedrigt (**V2, V3**) (Spielmann et al. 2007). In diesen Studien scheint der triglyceridsenkende Effekt hauptsächlich durch eine Downregulation von hepatischen Genen, die in die Lipogenese involviert sind, entstanden zu sein. In der vorliegenden Studie hatte die Fütterung von Lupinenprotein keinerlei Einfluss auf die hepatische mRNA-Expression von SREBP-1c, FAS und Delta-9-D.. Natürlich ist bekannt, dass Expressionsanalysen allein nicht ausreichen, um Protein- oder Aktivitätsmengen widerzuspiegeln. Das finale synthetisierte Protein kann unter anderem auch durch Ubiquitinierung oder Phosphorylierung modifiziert werden (Jump et al. 2005). Als Ausblick sind Untersuchungen zur Enzymaktivität und zur Quantifizierung der Proteine (Western Blot-Analyse) notwendig. Dennoch gilt die Genexpression des SREBP-1c als Schlüsselregulationsschritt für die Aktivität und bestimmt somit maßgeblich die hepatische Lipogenese (Shimano et al. 2001, Hasty et al. 2000). Demnach kann man schlussfolgern, dass die Triglyceridanreicherung in der Leber der lactierenden Ratten, die Lupinenprotein verzehrten, nicht durch eine Stimulierung der *de novo* Synthese von Fettsäuren und Triglyceriden verursacht wurde. Weiterhin können die gesenkten Triglyceridkonzentrationen im Plasma und in der VLDL-Fraktion nicht durch eine SREBP-1c assoziierte verringerte Triglyceridsynthese entstanden sein. Möglicherweise ist auch hier der PPAR α maßgeblich beteiligt. Durch die Downregulation des PPAR α könnte über eine Senkung der Fettsäureoxidation die hepatische Triglyceridkonzentration ansteigen, obgleich nur ein marginaler Teil an Triglyceriden aus der *de novo* Synthese entsteht (Aigus et al. 1991). Denn abgesehen von den Veränderungen in der Triglyceridsynthese, könnten auch Veränderungen bei der hepatischen Fettsäureoxidation verantwortlich für die beobachtete Triglyceridakkumulation sein. Der PPAR α gehört zu den nukleären Hormonrezeptoren, welche vorwiegend in Leber, Niere, Herz- und Skelettmuskel exprimiert werden. Dabei reguliert er zentrale Prozesse im Lipidmetabolismus, vor allem die Katalyse des Fettsäureabbaus (Mandard et al. 2004). In dieser Studie war die mRNA-Expression des PPAR α (-36%) und seiner Zielgene ACO (-52%) und CPT-1 (-39%) in den Ratten erniedrigt, die Lupinenprotein erhielten, verglichen mit Casein. Daher kann man schlussfolgern, dass die reduzierte Expression dieser Gene in eine verminderte hepatischen Fettsäureoxidation resultiert. Dieser Aspekt könnte wiederum auch den Anstieg der Triglyceridkonzentration in

der Leber und in der VLDL-Fraktion erklären. Der PPAR α agiert als „nutritional state sensor“ durch Transkriptionsstimulierung von Genen, die in die transmembranöse Fettsäureaufnahme, die zelluläre Fettsäurebildung, sowie die mitochondriale und die peroxisomale Fettsäureoxidation involviert sind (Mandard et al. 2004).

5.4. Wirkungen des Lupinenproteins auf die Körpermasse während der Laktation und Stillzeit

Eine zunächst sehr interessante Beobachtung war der unterschiedliche Wachstumsverlauf der Mütter und Jungtiere. So zeigte sich bereits nach der 3. Fütterungswoche der trächtigen Tiere, dass Lupinenprotein gefütterte Tiere ein niedrigeres Körpergewicht aufwiesen, als Tiere der Kontrollgruppe. Am Ende der Fütterungsperiode hatten die Tiere, die Lupinenprotein erhielten, sogar ein 20% niedrigeres Körpergewicht im Vergleich zu den Tieren, die Casein verzehrten. Ein Grund dafür ist die niedrigere Futtermittelaufnahme der Muttertiere, die Lupinenprotein erhielten. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die Wachstumsretardierung durch das Fehlen von essentiellen Aminosäuren hervorgerufen wurde. Es wurden beiden Versuchsgruppen entsprechend NRC-Empfehlungen Methionin und Lysin zusätzlich supplementiert, um den Bedarf an essentiellen Aminosäuren zu decken. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass das Lebergewicht der Jungtiere der Lupinengruppe signifikant niedriger war, als bei der Casein-Gruppe. Untersuchungen mit Sojaprotein haben ähnliche Effekte an Ratten aufgezeigt. So berichteten auch die Arbeitsgruppen um Terpstra et al. (1983), Iritani et al. (1986), Beynen et al. (1993), Sugiyama et al. (1996) und Peluso et al. (2000) dass durch die Supplementierung von Sojaprotein in der Diät das relative Lebergewicht der Tiere signifikant niedriger war, als durch Fütterung mit Casein oder Fischprotein. Auch die Körpermasse der Jungtiere in der Lupinen-Gruppe war niedriger als bei den Casein-gefütterten Tieren. Die Wurfanzahl unterschied sich hingegen nicht. Am Tag der Probennahme war die Körpermasse der Muttertiere der Caseingruppe doppelt so hoch, verglichen mit den Lupinenprotein-gefütterten Tieren. Um zu beurteilen, ob sich die Gewichtsunterschiede der Jungtiere nach Absetzen vom Muttertier wieder angleichen können, wurden die Jungen 7 Wochen mit einer Standarddiät gefüttert. Auch nach dieser Fütterungsperiode hatten sowohl männliche, als auch weibliche Nachkommen der Lupinengruppe ein signifikant niedrigeres Körpergewicht. Obwohl der Grund für diese Wachstumsretardierung nicht ermittelt werden konnte, ist es jedoch möglich, dass der Milchspendereflex oder der Milchertrag bei den Lupinenprotein-gefütterten Müttern

erniedrigt waren. Es ist bereits bekannt, dass ein geringes Körpergewicht der Nachkommen maßgeblich durch die Milchmenge beeinflusst wird (Flint et al. 1998). Bereits einige vorangegangene Tierstudien haben gezeigt, dass die prä- bzw. postnatale Ernährung maßgebliche und langfristige Auswirkungen auf das Wachstum und den Stoffwechsel der Nachkommen haben – fetal programming (Ozanne 2001, Holemans et al. 2003). Die Fütterung von Lupinenprotein scheint hier in besonderem Maße in die physiologischen Stoffwechselprozesse einzugreifen. Des Weiteren kann davon ausgegangen werden, dass die verbleibenden Alkaloide im Lupinenprotein nicht für die reduzierte Futteraufnahme und die Wachstumsretardierung der Nachkommen verantwortlich sind, da der Alkaloidgehalt im Lupinenprotein relativ gering war (3,2 mg/kg). So konnte in einer Studie an Ratten gezeigt werden, dass die Nahrungsaufnahme von *Lupinus angustifolius* mit einer Alkaloidkonzentration von 330 mg/kg keine negativen Auswirkungen auf Futteraufnahme, Gewicht oder andere Parameter hatte (Robbins et al. 1996). Inwieweit diese Ergebnisse einen Schluss darauf zulassen, ob Lupinenprotein während der Schwangerschaft und Stillzeit auch beim Menschen regulatorisch eingreift, sollte Bestandteil weiterführender Untersuchungen sein. Nur so kann gewährleistet werden, dass die Beobachtungen geprüft und entsprechend auf den Menschen transferiert werden können.

5.5. Wirkungen des Lupinenproteins auf die Milchfettsynthese

Triglyceride in der Muttermilch werden vorwiegend aus der *de novo* Synthese gewonnen und anschließend in der Milchdrüse verestert. Sie entstehen des Weiteren durch Aufnahme von langkettigen Fettsäuren und durch freie Fettsäuren (non esterified fatty acids, NEFA). Die NEFA im Plasma werden durch Hydrolyse der Triglyceride aus den Adipozyten gewonnen und gelangen so über Fettsäuretransporter in die Milchdrüse. NEFA, welche durch lipolytische Stimulation vom Fettgewebe ins Plasma abgegeben werden, aktivieren direkt den PPAR α (Desvergne et al. 1999, Hihi et al. 2002). In der vorliegenden Studie hatten die Tiere, die Lupinenprotein erhielten, deutlich niedrigere Plasma-NEFA-Konzentrationen (-71%) im Vergleich zu Ratten, die Casein verzehrten. Dies ist möglicherweise ein Grund für die verminderte Aktivierung des PPAR α . Möglich ist auch, dass die Herabregulation des PPAR α in kausalem Zusammenhang mit dem veränderten Hormonhaushalt während der Laktation steht, denn während Trächtigkeit und Laktation besteht bei Nagern eine verminderte hepatische Fettsäureoxidation (Gutgesell et al. 2009). Die erniedrigten Plasma-NEFA-Konzentrationen in den laktierenden Tieren, die Lupinenprotein verzehrten, könnten einerseits

durch eine erhöhte Aufnahme von zirkulierenden NEFA aus dem Plasma ins periphere Gewebe oder andererseits durch eine verringerte Lipolyse im Fettgewebe entstanden sein. Normalerweise sind nur die ersten beiden Trimester der Trächtigkeit durch eine gesteigerte Lipogenese im Fettgewebe beeinflusst. Erst im letzten Trimester und während der Laktation ist die Triglyceridsynthese vermindert und die Lipolyse erhöht (Herrera et al. 2000). Außerdem ist während der Laktation der Verbrauch an metabolischen Substraten, wie Fettsäuren und Glucose für die Milchsynthese in der Milchdrüse erhöht und der Verbrauch an Substraten für die Oxidation in Leber und Skelettmuskel erniedrigt (Williamson et al. 1986). So steigt beispielsweise die Konzentration der LPL in der Milchdrüse an und nimmt gleichzeitig in der Leber ab. Daraus resultierend werden der Milchdrüse in besonderem Maße Fettsäuren aus den Lipoproteinen für die *de novo* Triglyceridsynthese bereitgestellt. Bisher konnte keine plausible Erklärung für die erniedrigten NEFA-Konzentrationen im Plasma von Lupinenprotein-gefütterten Ratten gefunden werden, aber man kann vermuten, dass eine vermehrte Aufnahme der NEFA in die Milchdrüse nicht dafür verantwortlich sein kann, weil die mRNA-Konzentrationen von LPL, FATP, CD36 und FABP, welche für die intrazelluläre Aufnahme von Fettsäuren in die Milchdrüse verantwortlich sind, nicht verändert waren, verglichen mit den Ratten, die Casein supplementierten. Möglicherweise sind die Veränderungen aber auch erst auf Proteinebene sichtbar. Ein interessantes Ergebnis war jedoch, dass die hepatische mRNA-Konzentration der hepatischen Lipase in Lupinenprotein-gefütterten Ratten erhöht war. Weiterhin wurde eine erhöhte Triglyceridkonzentration in der Milch der Lupinenprotein-gefütterten Ratten beobachtet. Dies liegt vermutlich nicht an einer erhöhten plasmatischen Fettsäureaufnahme, sondern an einer erhöhten Lipogenese. Unterstützt wird diese These durch die gemessenen erhöhten mRNA-Konzentrationen von Genen, die für Enzyme kodieren, die in *de novo* Synthese von Fettsäuren involviert sind. So hatten die laktierenden Mütter, die Lupinenprotein erhielten, in der Milchdrüse erhöhte mRNA-Konzentrationen an FAS (+60%), Delta-9-D. (+39%) und SREBP-1c (+130%), verglichen mit Casein gefütterten Ratten. Dieser Effekt steht im Gegensatz zu den hepatischen Proteineffekten und zu Beobachtungen aus vorangegangenen Studien mit wachsenden und adulten Ratten (V2), welche erniedrigte mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c und dessen Zielgenen zeigten (Spielmann et al. 2007).

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Milch von Lupinenprotein-gefütterten Ratten einen um 81% höheren Triglyceridgehalt hatte, im Vergleich zu Casein. Es ist bekannt, dass die Anzahl der säugenden Jungen die Menge und die Zusammensetzung der Milch beeinflussen (Yagil et al. 1976). Um diesen beeinflussenden Faktor zu eliminieren, wurde der

Wurf auf je 10 Jungen/ Muttertier in dieser Studie standardisiert. Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass laktierende Ratten, die eine proteinarme Diät (8% Casein) erhielten, fettreichere Milch (+38%) produzierten, als Ratten der Kontrollgruppe, die eine mit 27% Casein supplementierte Diät erhielten (Crnic et al. 1978). Die gefütterte Diät der vorliegenden Studie enthielt 200 g/kg Protein. Zusätzlich wurde sie mit Methionin und Lysin supplementiert, um die Anforderungen an essentiellen Aminosäuren bei trächtigen und laktierenden Ratten zu erfüllen. Daher kann man davon ausgehen, dass die Qualität des Lupinenproteins nicht für den erhöhten Triglyceridgehalt in der Milch von Lupinenprotein-gefütterten Ratten verantwortlich ist, verglichen mit der Kontrollgruppe. Im letzten Trimester der Trächtigkeit schaltet der Organismus auf katabole Stoffwechselprozesse um, d.h. die Triglyceridsynthese wird erniedrigt und die Lipolyse erhöht (Herrera et al. 1991, Herrera et al. 2000). In der Leber kommt es zu einer Erhöhung der Triglyceridsynthese, zu einer gesteigerten VLDL-Produktion und einer verringerten Fettsäureoxidation. Diese metabolischen Veränderungen sind essentiell, um während der Laktationsperiode ausreichend Lipide zur Milchproduktion bereitzustellen. Möglicherweise sind also die erhöhten Triglyceridkonzentrationen in der Milch durch die verminderte hepatische Fettsäureoxidation und die erhöhte Fettsäuresynthese zu erklären. Für diese Vermutung sprechen die beobachteten mRNA-Expressionsergebnisse in der Leber der laktierenden Muttertiere. So konnte eine signifikante Reduzierung der mRNA-Konzentration von PPAR α und der ACO, sowie eine tendenzielle Erniedrigung der CPT-1 durch Fütterung von Lupinenprotein festgestellt werden. ACO gilt als Schlüsselenzym der peroxisomalen β -Oxidation langkettiger Fettsäuren (Kunau et al. 1995) und CPT-1 als eines der Schlüsselenzyme der mitochondrialen β -Oxidation (Le et al. 2000, McGarry und Brown 2000, Bartlett und Eaton 2004). Daher könnte man vermuten, dass die erhöhte Triglyceridkonzentration in der Milch von Lupinenprotein-gefütterten Ratten durch eine verminderte hepatische β -Oxidation und einer erhöhten VLDL-Produktion während der Laktation durch die verminderte Expression des PPAR α reguliert wurde. In diesem Zusammenhang könnte man weitere Ursachen wie Wachstumshormone oder Östrogene für eine gesteigerte Triglyceridkonzentration in der Milch über eine PPAR α -Regulation diskutieren.

Zusammenfassend konnte anhand dieser Studie zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Fütterung von hohen Gehalten an Lupinenprotein in laktierenden hypercholesterinämischen Ratten nicht nur die Triglyceridkonzentration in der Milch, sondern auch die mRNA-Konzentrationen an lipogenen Enzymen in der Milchdrüse erhöht. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass Lupinenprotein, welches während Trächtigkeit und

Laktation gefüttert wurde, stark differenzierte Effekte auf den Lipidmetabolismus im Vergleich zu adulten und wachsenden Ratten ausübt. Trotz bemerkenswerter positiver Effekte auf die LDL- und HDL-Cholesterinkonzentration darf nicht außer Acht gelassen werden, dass zum einen die durch Lupinenprotein triglyceriderhöhenden Effekte in der Leber und die Wachstumsretardierung bei den Nachkommen nachteilige Wirkungen sind. Dies kann möglicherweise den Einsatz von hohen Lupinenproteinkonzentrationen während Schwangerschaft und Stillzeit limitieren.

5.6. Cystein als mögliche bioaktive Komponente des Lupinenproteins

Das Ziel der fünften Studie (V5) war es, herauszufinden, ob proteinassoziierte Aminosäuren die entscheidenden Substanzen sind, welche die lipidmodulierende Eigenschaften der Lupinenproteine erzeugen. Darüber hinaus lassen neuere Daten vermuten, dass SREBP-1c durch den oxidativen bzw. antioxidativen Status der Zelle beeinflusst wird. Verschiedene Studien haben bereits gezeigt, dass Aminosäuren lipidsenkende Eigenschaften haben (Seidel et al. 1960). So konnten bereits früher hypocholesterinämische Effekte durch schwefelhaltige Aminosäuren festgestellt werden.

Man kann darüber spekulieren, ob Cystein eine dieser Aminosäuren sein könnte, weil in einigen Studien beobachtet wurde, dass lipidsenkende Proteine einen auffällig höheren Gehalt an Cystein, einem Baustein des antioxidativen GSH, hatten, als Casein (Shukla et al. 2006, Yang et al. 2007). Untersuchungen an Ratten haben gezeigt, dass der Einsatz einer hypercholesterinämischen Diät mit GSH zu einer Erhöhung der HDL-Cholesterinkonzentration führte und die Plasmacholesterinkonzentration, sowie die hepatische Triglycerid- und Cholesterinkonzentration senken konnte (Sugiyama et al. 1987). Oda et al. (2006) vermuteten, dass dieser Effekt durch die Aktivierung der Cyp-7A1 und HMG-CoA-R. durch das GSH hervorgerufen wurde. Es sollte daher getestet werden, ob Cystein bzw. daraus synthetisiertes GSH die Expression SREBP-1c abhängiger Gene beeinflusst. Balb/cA Mäuse, die mit 5 verschiedenen cysteinhaltigen Substanzen gefüttert wurden, hatten signifikant niedrigere Aktivitäten an lipogenen Enzymen, wie dem Malic-Enzym oder der FAS (Lin et al. 2004). Für die vorliegende Studie wurden HepG2-Zellen als Versuchsmodell eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass isoliert eingesetztes L-Cystein das Transkriptionsniveau des SREBP-1c und seiner lipogenen Zielgene in HepG2-Zellen senken kann. Weiterhin demonstrieren diese Resultate, dass eine erniedrigte Expression dieser Gene durch eine Verbesserung des GSH-Status verursacht wurde, da gezeigt werden konnte, dass die SREBP-1c-mRNA-

Senkung komplett aufgehoben wurde, wenn die enzymatische GSH-Synthese durch Zugabe des Inhibitors BSO gehemmt wurde. Die Beobachtung, dass zugegebenes prooxidatives CuSO_4 die genannten Gene deutlich erhöhte, während eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit L-Cystein diesen Effekt abschwächte, deutet darauf hin, dass eine Veränderung des zellulären Redoxstatus möglicherweise das Transkriptionsniveau von Genen, die in den Lipidmetabolismus involviert sind, verändern kann. Studien haben gezeigt, dass bei Einsatz von CuSO_4 , antioxidative Enzyme wie Katalase und Guaiacol-Peroxidase aktiviert werden (Jouili et al. 2003). Gleichzeitig zeigen einige Untersuchungen, dass oxidativer Stress die Transaktivierung der SREBPs und damit die Expression von lipogenen Enzymen stimuliert (Waris et al. 2007, Kaplowitz et al. 2006). Die Annahme, dass Cystein in die Lipidsynthese über die Veränderung des antioxidativen Potentials eingreifen kann, wird durch verschiedene Studienergebnisse belegt. Dort konnte gezeigt werden, dass antioxidatives S-Ethyl-Cystein und S-Methyl-Cystein die Hyperlipidämie in diabetischen Mäusen merklich verringern kann (Hsu et al. 2004). N-Acetyl-Cystein, S-Ethyl-Cystein und S-Propyl-Cystein können das hepatische Lipidniveau durch Senkung der Aktivität und der Transkription von lipogenen Enzymen in hyperlipämischen Mäusen reduzieren (Lin et al. 2004). Homocystein-induzierter Stress hingegen führte zu einer Dysregulation des endogenen Lipidtransfers, erhöhte die hepatische Biosynthese und die Aufnahme von Cholesterin und Triglyceriden (Werstuck et al. 2001). Des Weiteren haben Studien an Wildtyp-Mäusen gezeigt, dass durch Zugabe von Cystein in das Trinkwasser der Mäuse die Aktivität der FAS reduziert wurde (Lin et al. 2004). Möglicherweise könnte in weiterführenden Studien geklärt werden, ob Cystein direkt modulierend in die Lipogenese eingreift, indem es die Expression des triglyceridkatabolen Enzyms LPL erhöht. Diese Vermutungen werden von der Tatsache unterstützt, dass der Sulfhydryl-Redox-Status die Aktivität von Enzymen, die an der Fettsäure- und Glycerolipidsynthese beteiligt sind, modulieren kann. So konnte festgestellt werden, dass in Hühnern die hepatische FAS (Walters et al. 1986) und in Ratten die ATP-Citrat-Lyase (Osterlund et al. 1980) durch den hepatischen GSH-Status reguliert werden. Des Weiteren haben kürzlich erschienene Daten unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die Verfütterung von Cystein die Plaques-Calcifizierung in Mäusen um 50% vermindern konnte (Weiße et al. 2010).

In der vorliegenden Studie (**V5**) konnte erstmalig gezeigt werden, dass GSH für den Cystein-modulierenden Effekt auf SREBP-1c verantwortlich zu sein scheint. Natürlich kann man durch eine veränderte Genexpression nicht zwangsläufig auf eine Änderung der Proteinkonzentrationen schließen. Es ist jedoch erwiesen, dass die Genexpression des

SREBP-1c einen Schlüsselschritt für die Aktivitätsregulierung der hepatischen Lipogenese darstellt (Shimano et al. 2001, Hasty et al. 2000). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen außerdem, dass Zellen, die mit L-Cystein behandelt wurden, niedrigere Triglyceridkonzentrationen aufwiesen. Das könnte darauf hindeuten, dass L-Cystein nicht nur durch die Expression des SREBP-1c, sondern generell die Lipogenese reduziert. Um herauszufinden, ob die Downregulation des SREBP-1c ausschließlich ein Effekt des Cysteins ist, wurden auch Zellen mit L-Arginin und L-Methionin als Vorläufer des L-Cysteins inkubiert. Gleichzeitig wurde damit der Fragestellung nachgegangen, ob auch Arginin für die bioaktive Effekte der Lupinenproteine und der genregulierenden Wirkung verantwortlich sein könnte (Jobgen et al., 2009). So gibt es bereits Studien, die zeigen konnten, dass Arginin über die Syntheseregulation des Stickstoffmonoxids zudem die Atherosklerose in Mäusen und Kaninchen senken kann (Böger et al., 1995, Aji et al. 1997). Weiterhin konnten Studien zeigen, dass ein erhöhtes Arginin zu Lysin-Verhältnis im Sojaprotein hypolipämisch im Vergleich zum Casein wirkt (Kritchevsky et al., 1982). Lupinenprotein weist ebenfalls ein erhöhtes Arginin zu Lysin-Verhältnis auf. Alle Typ E-Fractionen der Lupinen enthielten verhältnismäßig viel Arginin. Eine Inkubation der Zellen mit L-Arginin beeinflusste allerdings weder die mRNA-Konzentration des SREBP-1c, noch die Konzentration an FAS. Methionin hingegen kommt im Lupinenprotein in geringerer Konzentration als im Casein vor und es kann daher möglicherweise zu einer verminderten Synthese des atherogenen Homocysteins führen.

Glutathion gilt als eines der wichtigsten Antioxidantien in Säugetierzellen. Dabei ist die Leber der primäre Ort für die *de novo* Synthese und für die Verteilung zu den peripheren Organen (Sen 1997, Ookhtens et al. 1997). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Verfügbarkeit des Cysteins oft limitierend für die Synthese des Glutathions ist (Mosharov et al. 2001). Es konnte in dieser Studie festgestellt werden, dass der beobachtete regulierende Effekt des L-Cysteins auf die Genexpression von lipogenen Enzymen vorwiegend bei hohen L-Cystein-Konzentrationen auftritt. Es ist bereits bekannt, dass die GSH-Synthese in der Leber höchst sensitiv auf intensive Cystein-Supplementierung mittels ausgewählter Proteine reagiert (Mariotti et al. 2004). Deshalb kann angenommen werden, dass der Einsatz von physiologischen Cystein-Konzentrationen *in vivo* die GSH-Biosynthese beeinflussen kann und demzufolge auch lipidmodulierend wirkt. Bekannt ist außerdem, dass oxidativer Stress Atherosklerose induzieren kann. Das bedeutet, dass Cystein zur Verbesserung des antioxidativen Status innerhalb der Zelle geführt haben könnte. Cystein könnte durch Verbesserung des intrazellulären Redoxstatus über eine Regeneration des GSH die

Transkriptionsaktivität verschiedener redoxsensitiver Gene modulieren (Liu et al. 2005). Studien haben gezeigt, dass der Einsatz von cysteinhaltigen Substanzen zum einen durch eine erhöhte mRNA-Expression der Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) den GSH-Verlust begrenzen und damit oxidativen Stress reduzieren kann und zum anderen die Induktion von proinflammatorischen Interleukin-6 und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) unterdrückt (Chen et al. 2007). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass allein die Hälfte an endogenem Cystein, welches für die GSH-Synthese benötigt wird, durch den Methionin-Stoffwechsel bereitgestellt wird, auch bei bereits vorhandenen physiologischen Konzentrationen (Mosharov et al. 2001). Die Behandlung der Zellen in dieser Studie mit L-Methionin führte zwar zu signifikant niedrigeren mRNA-Konzentrationen von FAS (-14%), aber die mRNA des SREBP-1c wurde nicht verändert. Möglicherweise übt Methionin diesen Einfluss durch die Umwandlung in Cystein aus. Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Studie war, dass der herabregulierende Effekt des L-Cysteins auf die Expression lipogener Enzyme stark zeitabhängig war. So konnte festgestellt werden, dass die Herabregulierung des SREBP-1c und seiner Zielgene am stärksten bei einer 2-stündigen Inkubation mit L-Cystein auftrat, während dieser Effekt nach einer 24-stündigen Inkubation mit L-Cystein wieder verschwand. Eine mögliche Begründung für den ausbleibenden Effekt nach der 24h-Inkubation mit L-Cystein könnte sein, dass Cystein durch einen schnellen oxidativen Abbau in Cystein-Sulfinate zerlegt wurde. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diese Vermutungen zu bestätigen. Frühere Studien haben gezeigt, dass auch die Aminosäure Taurin eine entscheidende Rolle im Cholesterin- und Triglyceridmetabolismus spielt. Taurin dient der Gallensäurekonjugation und führt zu einer erhöhten Ausscheidung von Gallensäuren über den Fäzes. So konnte festgestellt werden, dass Taurin maßgeblich den endogenen Cholesterinabbau und die mRNA-Konzentration der Cyp7-A1 erhöhen, und die Konzentration im Plasma und Leber bei Ratten erniedrigen kann (Yokogoshi et al. 2002, Oda et al. 2002). Oda et al. (2002) haben beobachtet, dass im besonderen Maße schwefelhaltige Aminosäuren (SAAs) an der Regulation der Lipidhomöostase beteiligt sind. So haben SAAs einen HDL-Cholesterin-erhöhenden Effekt und einen VLDL-senkenden Effekt. Für diesen positiven Effekt wird die relative Verfügbarkeit aller enthaltenen Aminosäuren diskutiert. Allerdings ist bis jetzt noch nicht geklärt, in welchem Umfang SAAs den Lipidmetabolismus auf Genexpressionsebene beeinflussen. Taurin wird vom Körper selbst aus Cystein und Methionin synthetisiert. Brosnan und Brosnan (2006) haben gezeigt, dass durch Supplementierung von Cystein die Taurin-Konzentration ansteigt. Die Ursache der Steigerung wird durch den Einfluss von Cystein auf Schlüsselenzyme des Cystein-Taurin-Stoffwechsels

vermutet. Cystein könnte also möglicherweise als Precursor von Taurin maßgeblich an der Senkung der Cholesterinkonzentration beteiligt sein. Auch haben Untersuchungen an HepG2-Zellen gezeigt, dass Taurin den LDL-R. aktivieren kann. In der vorliegenden Studie hatte die Behandlung der HepG2-Zellen mit L-Cystein weder einen Einfluss auf die Cholesterinkonzentration in den Zellen, noch auch auf die mRNA-Konzentrationen von SREBP2, HMG-CoA-R. und LDL-R.. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Studien von Lin et al. (2007), welche gezeigt haben, dass N-Acetyl-Cystein, S-Ethyl-Cystein und S-Propyl-Cystein als eingesetzte Antioxidantien in hyperlipidämischen Mäusen nicht nur triglyceridsenkend wirken, sondern auch in die Cholesterin-Biosynthese eingreifen. SREBP2 ist der bestimmende Modulator für die Kontrolle der endogenen Cholesterinhomöostase und reguliert somit im Gegensatz zu SREBP-1c direkt das intrazelluläre Lipidniveau (Shimano et al. 2001). In der vorliegenden Studie wurden die HepG2-Zellen mit cholesterinfreiem Medium inkubiert, was möglicherweise der Grund sein könnte, dass SREBP2 direkt auf das L-Cystein anspricht. In früheren Studien (Seidel et al. 1960) führten sowohl Cystein-, als auch Methioninsupplementierung bei Ratten unter hyperlipidämischen Bedingungen zu einer Senkung der Serum-Cholesterinkonzentration. Unter normocholesterinämischer Diät wurden jedoch keine Unterschiede festgestellt. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, bei denen die Zellen neben L-Cystein auch mit variierenden Cholesterin-Konzentrationen behandelt werden.

5.7. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen konnten zeigen, dass Lupinenprotein einen lipidmodulierenden Einfluss ausübt. Damit konnten Beobachtungen aus früheren Studien bestätigt werden. Einige der möglichen Mechanismen konnten durch die vorliegenden Studien näher identifiziert werden. So kann davon ausgegangen werden, dass der triglyceridsenkende Effekt von Lupinenprotein durch eine Inhibierung des SREBP-1c und demzufolge aus einer verminderten *de novo* Fettsäuresynthese eintritt und des Weiteren Cystein einer der nutritiven Faktoren in Lupinenprotein zu sein scheint, der lipidsenkend wirkt. Aktuelle Studien unserer Arbeitsgruppe (Weiße et a. 2009) haben gezeigt, dass der Einsatz einer cysteinreichen Diät bei ApoE-knockout-Mäusen die Calcifizierungen der atherosklerotischen Plaques reduzieren kann. Demnach könnte möglicherweise cysteinreiches Lupinenprotein zur Vorbeugung atherosklerotischer Läsionen bzw. zur Verzögerung der Progression der Erkrankung eingesetzt werden.

Um die Ergebnisse aus den tier- und zellexperimentellen Studien auf den Menschen übertragen zu können, sind weiterführende Studien, insbesondere Humanstudien notwendig. Da ein Teilziel dieser Studie darin bestand, nutritiv wertvolle Substanzen aus Lupinen für die Humanernährung zu finden, ist es besonders wichtig, dass verschiedenartige Untersuchungen am Menschen durchgeführt werden. Bei der Versuchsdurchführung beschränken sich die Analysen allerdings durch begrenzte Probenverfügbarkeit hauptsächlich auf Blutuntersuchungen. Zu beachten sind außerdem die Individualität der Spezies Mensch, Zeit und Kostenfaktoren, sowie die Compliance der Studienteilnehmer. Außerdem können am Tiermodell weitaus größere Proteinmengen zugeführt werden, als beim Menschen, weil der Mensch höchst sensitiv und allergisch auf pflanzliche Proteine reagieren kann. Ein weiterer Faktor ist, dass die Menge an einsetzbarem Lupinenprotein durch die traditionellen Verzehrsgewohnheiten limitiert ist. Je nach Fragestellungen könnten auch andere Versuchs- bzw. Tiermodelle eingesetzt werden. Besonders geeignet ist hierfür das Schwein. Zum einen muss das Schwein nicht durch Zulage von Cholesterin und Choleat an das humane Lipoproteinverteilungsmuster angeglichen werden. Zum anderen haben Schweine bezüglich des Lipidstoffwechsels eine außerordentliche Homologie zum Menschen (Gerrity et al. 2001, Rohe et al. 2003, Luci et al. 2007) und sind daher besonders für Untersuchungen ernährungsbedingter pathologischer Prozesse wie Diabetes, Adipostas und KHK geeignet (Ding et al. 2000, Sundvold et al. 2001, Cheong et al. 2005, Pfeffer et al. 2005). Anhand dieser bereits vorliegenden Studien könnte das Schwein Gegenstand weiterführender Untersuchungen und ernährungsphysiologischer Fragestellungen sein. Bestandteil weiterer Untersuchungen kann auch die Aufklärung von Grundlagenmechanismen über die Senkung der Triglyceride durch Messung der Triglyceridkonzentration im Fäzes sein. Die Frage die es ebenfalls noch in weiterführenden Studien zu klären gilt, ist, welcher der nutritiven Faktoren, die den GSH-Status verbessern können, auch die humanen Lipidparameter verändern können. Weiterhin könnte man in tierexperimentellen Untersuchungen oder in Zellkulturstudien variierende Cystein-Konzentrationen einsetzen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen insgesamt, dass von Lupinenprotein stark variierende und multiple Effekte auf den Lipidmetabolismus bei Ratten und in HepG2-Zellen ausgehen. Die Beobachtungen und gewonnenen Erkenntnisse über cholesterin- und triglyceridsenkende Eigenschaften von Lupinenproteinen könnten einen potentiellen Beitrag für Strategiefindungen zur Senkung des Atheroskleroserisikos, liefern. Pflanzenproteine, insbesondere Soja und Lupine werden zunehmend als Zutat von funktionellen Lebensmitteln

eingesetzt. Daher sollte in weiteren Untersuchungen nachgewiesen werden, ob von Lupinenproteinen nachhaltige gesundheitsfördernde Wirkungen ausgehen und medizinischer Nutzen gezogen werden kann.

6. Zusammenfassung

Imbalanzen des Lipidstoffwechsels, charakterisiert durch erhöhte Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen im Blut zählen zu den Hauptrisikofaktoren bei der Entwicklung koronarer Herzkrankheiten. Der Entstehung einer Atherosklerose liegen eine Vielzahl von kardiovaskulären Erkrankungen zugrunde, deren Folgen, wie Schlaganfall und Herzinfarkt zur häufigsten Todesursache der westlichen Industrieländer zählen. Die Inzidenz ernährungsbedingter Erkrankungen, vor allem von Herz-Kreislaufkrankungen hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Der Bedarf und die Nachfrage nach innovativen therapeutischen Ansätzen zur Prävention und Aufklärung dieser Erkrankungen ist dementsprechend hoch. Es ist bereits bekannt, dass Pflanzenproteine positive Wirkungen auf den Cholesterin- und Triglyceridspiegel haben. Seit mehreren Jahren ist bereits bekannt, dass Leguminosen cholesterinsenkende Eigenschaften haben. Verschiedene Studien haben für Sojaprotein und auch bereits für Lupinenprotein positive Wirkungen auf die Plasmalipidkonzentrationen beschrieben. Da bisher allerdings nur wenige Studien existieren, welche die präzisen Stoffwechselwege beschreiben, sollten im Rahmen dieser Arbeit die Mechanismen, wodurch Lupinenprotein lipidsenkende und kardioprotektive Wirkungen ausübt und welche mögliche bioaktive Komponente dafür verantwortlich ist, näher charakterisiert werden. Daher wurden verschiedene experimentelle Untersuchungen am Modelltier Ratte und Zellkulturstudien durchgeführt.

In einer ersten Untersuchung wurde Ratten eine normocholesterinämische Diät, die Lupinenprotein aus *Lupinus angustifolius* enthielt, verabreicht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich weder die Cholesterin- noch die Triglyceridkonzentrationen im Plasma und in den Lipoproteinen durch Fütterung von Lupinenprotein veränderten. Auch andere Studien an Nagern konnten bereits beobachten, dass Lupinenprotein nur unter hypercholesterinämischen Bedingungen lipidsenkend wirken kann.

Um festzustellen, ob Lupinenprotein unter hyperlipämischen Bedingungen die Lipidkonzentrationen in den Plasmalipoproteinen und in der Leber, sowie die hepatischen Konzentrationen von ausgewählten Genen des Lipidstoffwechsels beeinflussen kann, wurden in einer weiteren Untersuchung Ratten mit einer Diät, die entweder Lupinenprotein aus *Lupinus albus* oder Casein enthielt, kontrolliert gefüttert. Dabei wurden die Diäten entweder mit einer Cholesterin/ Choleat-Mischung (hypercholesterinämisch) oder ohne Zulage (normocholesterinämisch) supplementiert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass

isoliertes Lupinenprotein aus *Lupinus albus* im Vergleich zu Casein die Triglyceridkonzentrationen in den Plasma-Lipoproteinen und in der Leber der hypercholesterinämisch gefütterten Ratten senken kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die hepatischen mRNA-Konzentrationen triglyceridanaboler Gene höher in Lupinenprotein-gefütterten Ratten war, als bei den Kontrolltieren. Zurückzuführen sein könnte dies auf die Downregulation der Gene, die in die Triglyceridsynthese involviert sind und auf eine Erhöhung der mRNA der Gene, die für den Triglyceridabbau verantwortlich sind. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Effekte bei hypercholesterinämischen Ratten stärker ausgeprägt waren, als bei normocholesterinämischen Tieren. Die hypercholesterinämisch-gefütterten Tiere, die Lupinenprotein erhielten, hatten höhere hepatische Cholesterinkonzentrationen und niedrigere LDL-Cholesterin-Konzentrationen, als Casein-gefütterte Ratten. Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass die Fütterung von Lupinenprotein keinen Effekt auf die Cholesterin-Konzentration in den VLDL+ Chylomikronen und den HDL-Fraktionen, sowie auf die hepatischen mRNA-Konzentrationen von Genen des Cholesterin- und Gallensäurestoffwechsels ausübte. Die erhöhte Konzentration an Cholesterin in der Leber und die erniedrigten Cholesterinkonzentrationen in der LDL-Fraktion in Lupinenprotein-gefütterten Ratten verglichen mit Casein kann anhand der bisher untersuchten mRNA-Daten nicht erklärt werden. Mögliche Mechanismen sollten deshalb in weiterführenden Studien untersucht werden. Die beobachtete Reduzierung der zirkulierenden Triglyceride und des LDL-Cholesterins in Ratten, die Lupinenprotein erhielten, verglichen mit Casein-gefütterten Tieren, weisen auf mögliche gesundheitsfördernde Vorteile des Lupinenproteins hin.

In einer weiteren Studie wurde untersucht, in wieweit auch Lupinenprotein der blauen Lupine (*Lupinus angustifolius*) die Plasmalipide von Ratten beeinflussen kann. Dafür wurde hypercholesterinämischen Ratten verschiedene Sorten der Lupine (Probor, Vitabor und Boregine), sowie eine α -/ β -Conglutin-Fraktion der Boregine im Vergleich zu Casein verabreicht. Die Ratten, die mit dem Totalproteinextrakt von Vitabor bzw. α -/ β -Conglutin-Fraktion der Boregine gefüttert wurden, hatten signifikant erniedrigte Plasma- und VLDL-Triglyceridkonzentrationen, verglichen mit Ratten, die Casein erhielten. Der Totalproteinextrakt von Vitabor war ebenfalls in der Lage, die Cholesterinkonzentrationen in den LDL um 37% zu senken. Dabei scheinen die lipidsenkenden Effekte der Sorte Vitabor ebenfalls aus der reduzierten hepatischen Genexpression von Genen, die in die Triglycerid- und Cholesterinsynthese involviert sind, zu resultieren. Die unterschiedlichen Wirkungen der verschiedenen Lupinensorten der *Lupinus angustifolius* scheinen nicht durch Isoflavone oder

die Aminosäurezusammensetzung hervorgerufen zu sein. Zusammenfassend lässt sich zu dieser Studie sagen, dass auch Protein aus *Lupinus angustifolius* lipidmodifizierendes Potential besitzt.

Die bisher durchgeführten Studien zum Lupinenprotein beschäftigten sich ausschließlich mit wachsenden und adulten Ratten. Daher sollte in einer weiteren Studie die Wirkung von Lupinenprotein aus *Lupinus angustifolius* auf den Lipidstoffwechsel trächtiger und laktierender Ratten untersucht werden. Dafür wurden weibliche Ratten während der Verpaarung, Trächtigkeit und 18 Tage der Laktation mit einer hypercholesterinämischen Diät, die entweder Lupinenprotein oder Casein erhielt, gefüttert. Es konnte gezeigt werden, dass Mütter der Lupinenproteindiät signifikant niedrigere Triglyceridkonzentrationen im Plasma und höhere Triglyceridkonzentrationen in Leber und Milch aufwiesen, als Casein-gefütterte Tiere. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass durch Fütterung von Lupinenprotein die Cholesterinkonzentrationen im Plasma, VLDL, LDL und Leber signifikant erniedrigt und in den HDL erhöht waren. Lupinenprotein induzierte eine 2,6-fache Steigerung der hepatischen LDL-Rezeptor-Konzentration, senkte die hepatischen mRNA-Konzentrationen von Genen der Fettsäureoxidation und erhöhte die mRNA-Konzentrationen lipogener Enzyme in der Milchdrüse und somit auch den Milchfettgehalt. Damit konnte in dieser Studie erstmals gezeigt werden, dass Lupinenprotein auch während Trächtigkeit und Stillzeit nachhaltig den Lipidstoffwechsel durch Beeinflussung der Transkription von lipidkatabolen und lipidanabolen Genen, sowie Genen des Cholesterinstoffwechsels, modifizieren kann.

Um zu identifizieren, ob Cystein als proteinassoziierte Komponente, die im Lupinenprotein in relativ hoher Konzentration vorkommt, für die lipidsenkenden Wirkungen von Lupinenprotein verantwortlich ist, wurde eine Zellkulturstudie an HepG2-Zellen durchgeführt. Es konnte in dieser Studie erstmals gezeigt werden, dass eine Inkubation der Zellen mit L-Cystein die mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c und seinen Zielgenen um bis zu 50% erniedrigen konnte. Zellen, die mit L-Cystein behandelt wurden, hatten signifikant niedrigere Triglyceridkonzentrationen und erhöhte Glutathionkonzentrationen, verglichen mit der Kontrolle. In den Zellen, die gleichzeitig L-Cystein und BSO, einem Inhibitor der Glutathionsynthese, inkubiert wurden, konnte keine Veränderung der Genexpression beobachtet werden. Prooxidatives Kupfersulfat führte zu einer Erhöhung der mRNA-Konzentrationen von SREBP-1c und seinen Zielgenen. Gleichzeitige Inkubation der Zellen mit L-Cystein führte zu einer Erniedrigung der Genexpression verglichen mit den Kontrollzellen. Insgesamt lässt sich sagen, dass in dieser Studie erstmalig gezeigt werden konnte, dass eine Inkubation von HepG2-Zellen mit L-Cystein die mRNA-Expression

SREBP-1c-regulierter lipogener Enzyme hemmt. Dieser Effekt wurde möglicherweise durch erhöhte intrazelluläre GSH-Konzentrationen vermittelt. Dieser Mechanismus könnte zur Aufklärung des Triglycerid-senkenden Effekts Cystein-reicher Proteine beitragen und somit als Grundlage für neue Strategien zur Vorbeugung von Hypertriglyceridämien dienen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Lupinenprotein aus *Lupinus albus* und *Lupinus angustifolius* den Lipidstoffwechsel bei wachsenden, adulten und laktierenden Ratten in verschiedenster Weise modifizieren kann. Mögliche Stoffwechselwege konnten dabei unter Verwendung eines Tiermodells und anhand von Zellkulturstudien identifiziert werden. Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurden einige Wirkmechanismen des Lupinenproteins näher charakterisiert. So scheinen für die hypolipämischen Effekte ursächlich eine verminderte *de novo* Fettsäuresynthese, sowie eine vermehrte Lipidausscheidung mitverantwortlich zu sein. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Fütterung von hohen Gehalten an Lupinenprotein in laktierenden hypercholesterinämischen Ratten nicht nur die Triglyceridkonzentration in der Milch, sondern auch die mRNA-Konzentrationen an lipogenen Enzymen in der Milchdrüse erhöht. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Lupinenprotein, welches während Trächtigkeit und Laktation verabreicht wurde, stark differenzierte Effekte auf den Lipidmetabolismus hatte, verglichen mit adulten und wachsenden Ratten. Die Beobachtungen und gewonnenen Erkenntnisse über cholesterin- und triglyceridsenkende Eigenschaften von Lupinenproteinen könnten einen potentiellen Beitrag für Strategiefindungen zur Senkung des Risikos an Atherosklerose zu erkranken, liefern. Da Pflanzenproteine insbesondere Lupine zunehmend als Zutat von funktionellen Lebensmitteln eingesetzt werden, sollte in weiteren Untersuchungen nachgewiesen werden, ob von Lupinenproteinen nachhaltige gesundheitsfördernde Wirkungen ausgehen und medizinischer Nutzen gezogen werden kann.

7. Summary

Imbalances of lipid metabolism which are characterised by increased plasma cholesterol and triglycerid concentrations, are known to be the main risk factors for the development of coronare heart diseases. The development of atherosclerosis is induced by multiple factors, resulting in stroke and heart attack, which are known to be the main reasons for mortality in the western countries. The incidence of nutritional induced diseases with special regard to coronare heart diseases has increased very strong during the last years. This fact is followed by the high demand of innovative therapeutic interventions to prevent such diseases, accordingly. It is already known since several years that vegetable proteins, like from legumes as soja or lupin, have a positive influence on cholesterol and triglyceride metabolism. Until now, there are available only a limited number of studies which are describing the exact pathway for the lowering of lipid parameters. The aim of the present studies was to investigate the possible mechanisms resulting in lipid lowering and cardioprotective effects of lupin protein and to investigate which bioactive components might be responsible for these interactions. Within these studies, different study designs with rats or cell culture models were chosen.

In first study rats were fed with a normocholesterolemic diet containing either lupin protein or casein. It was shown that neither concentrations of cholesterol nor concentrations of triglyceride in plasma and lipoproteins were modified by feeding lupin protein. Another studies with rodents observed that lupin protein is able to decrease lipid exclusively under hypercholesteremic conditions.

To determine the effect of lupin protein under hyperlipidemic conditions on concentrations of lipids in liver and plasma lipoproteins and hepatic mRNA concentrations of genes involved in lipid metabolism, in another study rats were fed diets containing either lupin protein or casein. The diets were supplemented with or without a cholesterol – choleate mixture. Results of this study showed that lupin protein compared with casein lowered concentrations of triglyceride in plasma lipoproteins and liver of hypercholesteremic rats. Furthermore it could be shown that hepatic mRNA concentrations of genes involved in fatty acid synthesis were higher in rats fed lupin protein than in rats fed casein. A reason for this could be the downregulation of genes involved in lipid metabolism and the upregulation of genes involved in triglyceride hydrolysis. It was observed that the hypolipidemic effects were stronger in hyperlipidemic rats than in normolipidemic rats. Hypercholesteremic rats fed lupin protein had increased levels of hepatic concentration of cholesterol and lower levels of LDL-cholesterol compared

to rats fed casein. Furthermore, the results showed that feeding of lupin protein had no effect on cholesterol concentration in VLDL + chylomikrones and HDL and hepatic concentrations of genes involved in cholesterol and bile acid metabolism. The increase of cholesterol concentration in liver and the lower levels of LDL-cholesterol in rats fed lupin protein could not be explained on the basis of mRNA-data. Potential mechanisms should be clarified in further studies. Observed reduction of circulating triglyceride and LDL-cholesterol in rats fed lupin protein indicate for health benefits of lupin protein.

Another study investigated the effects of lupin protein from blue lupin on plasma lipids of rats. Hypercholesteremic rats were fed different cultivars of blue lupin (Probor, Vitabor and Boregine) and α / β -conglutin from Boregine compared to rats fed casein. These rats were fed with TPE from Vitabor and alpha-/beta-conglutin had lower triglyceride concentrations in the plasma and very-low-density lipoprotein (VLDL) than the rats fed with casein. The TPE from Vitabor was also able to decrease LDL-cholesterol about 37%. The antilipidemic effects of Vitabor could result from reduced expression of the genes involved in triglyceride and cholesterol synthesis. The varied effects of different cultivars of blue lupin are not mediated by isoflavones or amino acid composition. In conclusion this study demonstrated that also protein from blue lupin is capable to modify lipid parameters.

Recent Studies with lupin protein concerned exclusively with nonlactating growing and adult rats. The aim of this study was to elucidate the effects of lupin protein on lipid metabolism of pregnant and lactating rats. Female rats were fed during mating, pregnancy and 18 days of lactation a hypercholesterinemic diet included lupin protein or casein as control. It was shown that rats fed lupin protein had lower triglyceride concentrations in plasma and higher concentrations in liver and milk than rats fed casein. The cholesterol concentration in plasma, VLDL, LDL and liver were lower and the concentration of HDL cholesterol was higher in dams fed the lupin protein. Lupin protein induced a 2,6-fold higher concentration of LDL receptor in liver, reduced hepatic concentrations of genes involved in fatty acid oxidation and increased lipogenic enzymes in mammary gland and milk fat content. For this reason it was shown for the first time, that lupin protein is capable to modified lipid metabolism during pregnancy and lactation due influencing transcription levels of genes involved in fatty acid oxidation and synthesis and cholesterol homeostasis.

To identify, whether the high concentrations of cysteine as protein-associated amino acid in lupin protein are responsible for lipid lowering effects of lupin protein, a cell culture with HepG2-cells was conducted. This study showed for first time that exposure cells with l-cysteine reduced the concentrations of SREBP-1c and its target genes. Cells treated with l-

cysteine had lower triglyceride concentrations and higher glutathione concentrations than control cells. In cells which were concurrently treated with l-cysteine and BSO, an inhibitor of glutathione synthesis, an alteration of the gene expression was not observed. Pro-oxidant CuSO₄ was capable to up-regulate gene expression of SREBP-1c and its target genes in l-cysteine treated cells compared to control cells. Cells concurrently treated with l-cysteine and CuSO₄ decreased expression of genes involved in triglycerid metabolism compared to control cells. In summary this study showed for first time that l-cysteine rapidly down-regulated transcription of genes involved in fatty acid biosynthesis. This effects are possibly mediated by an improved intercellular glutathione status. This mechanism could contribute to elucidate lipid lowering effects of proteins, rich in cysteine, and therefore serve for new strategies for prevention of dyslipidemia.

In conclusion studies showed that lupin protein from white and blue lupin is capable to modify lipid metabolism of growing, adults and lactating rats. Possible metabolic pathways were identified with using animal models and cell cultures. By the results of this work some mode of action of lupin protein were characterized. Depressed *de novo* fatty acid synthesis and increased lipid excretion are maybe responsible for hypolipidemic action of lupin protein. Furthermore it was shown for the first time that feeding of high amounts of lupin protein to lactating hypercholesteremic rats elevate concentrations of triglyceride in milk as well as mRNA-concentrations of lipogenic enzymes in mammary gland. Interestingly, it was shown that protein from lupin which was fed during pregnancy and lactation had various effects on lipid metabolism compared to growing and adults rats. The observations and insights about cholesterol- and triglyceride-lowering properties of lupin protein could help to find some strategies to decreased the risks of atherosclerosis. Plant proteins particularly lupin will field as ingredient in functional food. The aim of further investigations is to verify health benefits and medical use from lupin protein.

8. Literaturverzeichnis

Adams MR, Golden DL, Anthony MS, Register TC, Williams JK. The inhibitory effect of soy protein isolate on atherosclerosis in mice does not require the presence of LDL receptors or alteration of plasma lipoproteins. *J Nutr.* 2002 Jan;132(1):43-9.

Ait Yahia D, Madani S, Prost J, Bouchenak M, Belleville J. Fish protein improves blood pressure but alters HDL2 and HDL3 composition and tissue lipoprotein lipase activities in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Nutr.* 2005 Feb;44(1):10-7. Epub 2004 Mar 10.

Aji W, Ravalli S, Szabolcs M, Jiang XC, Sciacca RR, Michler RE, Cannon PJ. L-arginine prevents xanthoma development and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *Circulation.* 1997 Jan 21;95(2):430-7.

Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* 1995 Aug 3;333(5):276-82.

Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* 1995 Aug 3;333(5):276-82.

Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gómez-Pérez FJ, Hernández-Pando R, Tovar AR. Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J Nutr.* 2004 Mar;134(3):522-9.

Babiak J, Rudel LL. Lipoproteins and atherosclerosis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1987 Aug;1(3):515-50.

Badimon JJ, Fuster V, Badimon L. Role of high density lipoproteins in the regression of atherosclerosis. *Circulation.* 1992 Dec;86(6 Suppl):III86-94.

Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet.* 2005 Oct 8;366(9493):1267-78. Epub 2005 Sep 27. Erratum in: *Lancet.* 2008 Jun 21;371(9630):2084. *Lancet.* 2005 Oct 15-21;366(9494):1358.

Bakhit RM, Klein BP, Essex-Sorlie D, Ham JO, Erdman JW Jr, Potter SM. Intake of 25 g of soybean protein with or without soybean fiber alters plasma lipids in men with elevated cholesterol concentrations. *J Nutr.* 1994 Feb;124(2):213-22.

Barber MC, Vallance AJ, Kennedy HT, Travers MT. Induction of transcripts derived from promoter III of the acetyl-CoA carboxylase-alpha gene in mammary gland is associated with recruitment of SREBP-1 to a region of the proximal promoter defined by a DNase I hypersensitive site. *Biochem J.* 2003 Oct 15;375(Pt 2):489-501.

Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem.* 2004 Feb;271(3):462-9.

- Bartz F, Kern L, Erz D, Zhu M, Gilbert D, Meinhof T, Wirkner U, Erfle H, Muckenthaler M, Pepperkok R, Runz H. Identification of cholesterol-regulating genes by targeted RNAi screening. *Cell Metab.* 2009 Jul;10(1):63-75.
- Bassett JM, Madill D, Burks AH, Pinches RA. Glucagon and insulin release in the lamb before and after birth: effects of amino acids in vitro and in vivo. *J Dev Physiol.* 1982 Dec;4(6):379-89.
- Bergeron N, Deshaies Y, Jacques H. Dietary fish protein modulates high density lipoprotein cholesterol and lipoprotein lipase activity in rabbits. *J Nutr.* 1992 Aug;122(8):1731-7.
- Beynen AC, Sugano M. Dietary protein as a regulator of lipid metabolism: state of the art and new perspectives. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1990 Oct;36 Suppl 2:S185-8. Review.
- Beynen AC. Comparison of the mechanisms proposed to explain the hypocholesterolemic effect of soybean protein versus casein in experimental animals. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1990 Oct;36 Suppl 2:S87-93. Review.
- Blagrove RJ, Frenkel MJ, Gillespie JM. The electrophoresis of the high-tyrosine proteins of keratins on cellulose acetate strips. *Comp Biochem Physiol B.* 1975 Apr 15;50(4):571-2.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Mügge A, Kienke S, Brandes R, Dwenger A, Frölich JC. Supplementation of hypercholesterolaemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis.* 1995 Oct;117(2):273-84.
- Brandsch C, Shukla A, Hirche F, Stangl GI, Eder K. Effect of proteins from beef, pork, and turkey meat on plasma and liver lipids of rats compared with casein and soy protein. *Nutrition.* 2006 Nov-Dec;22(11-12):1162-70. Epub 2006 Sep 15.
- Brosnan JT, Brosnan ME. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J Nutr.* 2006 Jun;136(6 Suppl):1636S-1640S. Review.
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997 May 2;89(3):331-40.
- Cao J, Li JL, Li D, Tobin JF, Gimeno RE. Molecular identification of microsomal acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Dec 26;103(52):19695-700. Epub 2006 Dec 14.
- Carroll KK, Kurowska EM. Soy consumption and cholesterol reduction: review of animal and human studies. *J Nutr.* 1995 Mar;125(3 Suppl):594S-597S.
- Chen JR, Chiou SF, Suetsuna K, Yang HY, Yang SC. Lipid metabolism in hypercholesterolemic rats affected by feeding cholesterol-free diets containing different amounts of non-dialyzed soybean protein fraction. *Nutrition.* 2003 Jul-Aug;19(7-8):676-80.
- Chiang JY, Kimmel R, Stroup D. Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene.* 2001 Jan 10;262(1-2):257-65.

- Chirala SS, Wakil SJ. Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids*. 2004 Nov;39(11):1045-53.
- Cho SJ, Juillerat MA, Lee CH. Cholesterol lowering mechanism of soybean protein hydrolysate. *J Agric Food Chem*. 2007 Dec 26;55(26):10599-604. Epub 2007 Dec 4.
- Colell A, García-Ruiz C, Morales A, Ballesta A, Ookhtens M, Rodés J, Kaplowitz N, Fernandez-Checa JC. Transport of reduced glutathione in hepatic mitochondria and mitoplasts from ethanol-treated rats: effect of membrane physical properties and S-adenosyl-L-methionine. *Hepatology*. 1997 Sep;26(3):699-708.
- Coleman RA. How do I fatten thee? Let me count the ways... *Cell Metab*. 2007 Feb;5(2):87-9.
- Crnich LS, Chase HP. Models of infantile undernutrition in rats: effects on milk. *J Nutr*. 1978 Nov;108(11):1755-60.
- Descovich GC, Ceredi C, Gaddi A, Benassi MS, Mannino G, Colombo L, Cattin L, Fontana G, Senin U, Mannarino E, Caruzzo C, Bertelli E, Fragiaco C, Nosedà G, Sirtori M, Sirtori CR. Multicentre study of soybean protein diet for outpatient hyper-cholesterolaemic patients. *Lancet*. 1980 Oct 4;2(8197):709-12.
- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. 1999 Oct;20(5):649-88. Review.
- Diard P, Malewiak MI, Lagrange D, Griglio S. Hepatic lipase may act as a ligand in the uptake of artificial chylomicron remnant-like particles by isolated rat hepatocytes. *Biochem J*. 1994 May 1;299 (Pt 3):889-94.
- Dongowski G, Huth M, Gebhardt E, Flamme W. Dietary fiber-rich barley products beneficially affect the intestinal tract of rats. *J Nutr*. 2002 Dec;132(12):3704-14.
- Duranti M, Cerletti P. Amino acid composition of seed proteins of *Lupinus albus*. *J Agric Food Chem*. 1979 Sep-Oct;27(5):977-8.
- Engelking LJ, Liang G, Hammer RE, Takaishi K, Kuriyama H, Evers BM, Li WP, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins. *J Clin Invest*. 2005 Sep;115(9):2489-98. Epub 2005 Aug 11.
- Espenshade PJ. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. *J Cell Sci*. 2006 Mar 15;119(Pt 6):973-6. Review.
- Exton JH. Mechanisms of hormonal regulation of hepatic glucose metabolism. *Diabetes Metab Rev*. 1987 Jan;3(1):163-83.
- Feher MD, Betteridge DJ. Lipids, lipoproteins, and coronary heart disease: implications for antihypertensive therapy. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1989 Jun;3 Suppl 1:333-40.

Ferreira A, Hansen S. Sensory control of maternal aggression in *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol*. 1986 Jun;100(2):173-7.

Foretz M, Guichard C, Ferré P, Foulfelle F. Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct 26;96(22):12737-42.

Forsythe WA 3rd. Dietary proteins, cholesterol and thyroxine: a proposed mechanism. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1990 Oct;36 Suppl 2:S101-4.

Forsythe WA, Miller ER, Hill GM, Romsos DR, Simpson RC. Effects of dietary protein and fat sources on plasma cholesterol parameters, LCAT activity and amino acid levels and on tissue lipid content of growing pigs. *J Nutr*. 1980 Dec;110(12):2467

Forsythe WA, Miller ER, Hill GM, Romsos DR, Simpson RC. Effects of dietary protein and fat sources on plasma cholesterol parameters, LCAT activity and amino acid levels and on tissue lipid content of growing pigs. *J Nutr*. 1980 Dec;110(12):2467-79.

Friedman M, Brandon DL (2001) Nutritional and health benefits of soy proteins. *J Agric Food Chem*. 49, 1069-86.

Fruchart JC, De Geteire C, Delfly B, Castro GR. Apolipoprotein A-I-containing particles and reverse cholesterol transport: evidence for connection between cholesterol efflux and atherosclerosis risk. *Atherosclerosis*. 1994 Oct;110 Suppl:S35-9.

Fukui K, Kojima M, Tachibana N, Kohno M, Takamatsu K, Hirotsuka M, Kito M. Effects of soybean beta-conglycinin on hepatic lipid metabolism and fecal lipid excretion in normal adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004 May;68(5):1153-5.

Fukui K, Tachibana N, Wanezaki S, Tsuzaki S, Takamatsu K, Yamamoto T, Hashimoto Y, Shimoda T. Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *J Agric Food Chem*. 2002 Sep 25;50(20):5717-21.

Gómez-Pérez FJ, Bustamante F, Vergara A, Villaseñor J, Wong B, Rull JA. A controlled trial of pravastatin vs probucol in the treatment of primary hypercholesterolemia. *Rev Invest Clin*. 1992 Jan-Mar;44(1):53-61.

Gómez-Pérez FJ, Bustamante F, Vergara A, Villaseñor J, Wong B, Rull JA. A controlled trial of pravastatin vs probucol in the treatment of primary hypercholesterolemia. *Rev Invest Clin*. 1992 Jan-Mar;44(1):53-61.

Gotto AM Jr. Impact of multiple risk factors on coronary artery disease: beyond total cholesterol. Introduction. *Am J Cardiol*. 1998 Nov 5;82(9A):1Q-2Q.

Gotto AM Jr. Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 1998 Nov 5;82(9A):22Q-25Q.

Greene CM, Zern TL, Wood RJ, Shrestha S, Aggarwal D, Sharman MJ, Volek JS, Fernandez ML. Maintenance of the LDL cholesterol:HDL cholesterol ratio in an elderly population given a dietary cholesterol challenge. *J Nutr.* 2005 Dec;135(12):2793-8.

Grundey SM, Arky R, Bray GA, Brown WV, Ernst ND, Kwiterovich PO Jr, Mattson F, Weidman WH, Schonfeld G, Strong JP, et al. Coronary risk factor statement for the American public. A statement of the nutrition committee. *Circulation.* 1985 Nov;72(5):1135A-1139A.

Grundey SM. Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol.* 1998 Feb 26;81(4A):18B-25B.

Gudbrandsen OA, Wergedahl H, Liaset B, Espe M, Berge RK. Dietary proteins with high isoflavone content or low methionine-glycine and lysine-arginine ratios are hypocholesterolaemic and lower the plasma homocysteine level in male Zucker fa/fa rats. *Br J Nutr.* 2005 Sep;94(3):321-30.

Gutgesell A, Ringseis R, Brandsch C, Stangl GI, Hirche F, Eder K. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and enzymes of carnitine biosynthesis in the liver are down-regulated during lactation in rats. *Metabolism.* 2009 Feb;58(2):226-32.

Hasty AH, Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Perrey S, Yoshikawa T, Osuga J, Okazaki H, Tamura Y, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Nagai R, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 is regulated by glucose at the transcriptional level. *J Biol Chem.* 2000 Oct 6;275(40):31069-77.

Herrera E, Lasunción MA, Gomez-Coronado D, Aranda P, López-Luna P, Maier I. Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1988 Jun;158(6 Pt 2):1575-83.

Herrera E, Lasunción MA, Huerta L, Martín-Hidalgo A. Plasma leptin levels in rat mother and offspring during pregnancy and lactation. *Biol Neonate.* 2000 Nov;78(4):315-20.

Herrera E, Lasunción MA, Palacín M, Zorzano A, Bonet B. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes.* 1991 Dec;40 Suppl 2:83-8. Review.

Herrera E. Lipid metabolism in pregnancy and its consequences in the fetus and newborn. *Endocrine.* 2002 Oct;19(1):43-55.

Heyden S, Schneider KA, Fodor GJ. Coronary heart disease in hypertensives: a need to reduce cholesterol. *Int J Epidemiol.* 1988 Dec;17(4):784-8.

Higaki N, Sato K, Suda H, Suzuka T, Komori T, Saeki T, Nakamura Y, Ohtsuki K, Iwami K, Kanamoto R. Evidence for the existence of a soybean resistant protein that captures bile acid and stimulates its fecal excretion. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006 Dec;70(12):2844-52. Epub 2006 Dec 7.

Hihi AK, Michalik L, Wahli W. PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol Life Sci.* 2002 May;59(5):790-8. Review.

- Holemans K, Aerts L, Van Assche FA. Fetal growth restriction and consequences for the offspring in animal models. *J Soc Gynecol Investig.* 2003 Oct;10(7):392-9.
- Horton JD, Bashmakov Y, Shimomura I, Shimano H. Regulation of sterol regulatory element binding proteins in livers of fasted and refed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 May 26;95(11):5987-92.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002 May;109(9):1125-31.
- Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: transcriptional mediators of lipid homeostasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2002;67:491-8.
- Horton JD, Shimomura I. Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol.* 1999 Apr;10(2):143-50.
- Hsu CC, Huang CN, Hung YC, Yin MC. Five cysteine-containing compounds have antioxidative activity in Balb/cA mice. *J Nutr.* 2004 Jan;134(1):149-52.
- Iritani N, Hosomi H, Fukuda H, Tada K, Ikeda H. Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *J Nutr.* 1996 Feb;126(2):380-8.
- Iritani N, Nagashima K, Fukuda H, Katsurada A, Tanaka T. Effects of dietary proteins on lipogenic enzymes in rat liver. *J Nutr.* 1986 Feb;116(2):190-7.
- Iwata T, Kimura Y, Tsutsumi K, Furukawa Y, Kimura S. The effect of various phospholipids on plasma lipoproteins and liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1993 Feb;39(1):63-71.
- Jacobson TA, Miller M, Schaefer EJ. Hypertriglyceridemia and cardiovascular risk reduction. *Clin Ther.* 2007 May;29(5):763-77.
- Jäger L., Wüthrich B. (2002) *Nahrungsmittelallergien und –intoleranzen*, Urban und Fischer, 2.Auflage, Kap. 3.2.3., S. 12.
- Jakel H, Nowak M, Moitrot E, Dehondt H, Hum DW, Pennacchio LA, Fruchart-Najib J, Fruchart JC. The liver X receptor ligand T0901317 down-regulates APOA5 gene expression through activation of SREBP-1c. *J Biol Chem.* 2004 Oct 29;279(44):45462-9. Epub 2004 Aug 17.
- Javitt NB. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *FASEB J.* 1990 Feb 1;4(2):161-8.
- Jeon H, Blacklow SC. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem.* 2005;74:535-62.
- Jimenez-Lopez JM, Wu D, Cederbaum AI. Synergistic toxicity induced by prolonged glutathione depletion and inhibition of nuclear factor-kappaB signaling in liver cells. *Toxicol In Vitro.* 2008 Feb;22(1):106-15. Epub 2007 Aug 31.

Jobgen W, Fu WJ, Gao H, Li P, Meininger CJ, Smith SB, Spencer TE, Wu G. High fat feeding and dietary L-arginine supplementation differentially regulate gene expression in rat white adipose tissue. *Amino Acids*. 2009 May;37(1):187-98. Epub 2009 Feb 12.

Jouili H, el Ferjani E. Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. *C R Biol*. 2003 Jul;326(7):639-44.

Kaplowitz N, Ji C. Unfolding new mechanisms of alcoholic liver disease in the endoplasmic reticulum. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 Oct;21 Suppl 3:S7-9. Review.

Katagiri Y, Ibrahim RK, Tahara S. HPLC analysis of white lupin isoflavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2000 Jun;64(6):1118-25.

Kayashima T, Okazaki Y, Katayama Dietary lectin lowers serum cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2005 Oct;51(5):343-8.

Kayashima T, Okazaki Y, Katayama T, Hori K. Dietary lectin lowers serum cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2005 Oct;51(5):343-8.

Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M, Yamazaki M, Kato N. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility. *J Nutr*. 1997 Jul;127(7):1395-400.

Kayashita J, Shimaoka I, Nakajoh M, Yamazaki M, Kato N. Consumption of buckwheat protein lowers plasma cholesterol and raises fecal neutral sterols in cholesterol-fed rats because of its low digestibility. *J Nutr*. 1997 Jul;127(7):1395-400.

Kim I, Ahn SH, Inagaki T, Choi M, Ito S, Guo GL, Kliewer SA, Gonzalez FJ. Differential regulation of bile acid homeostasis by the farnesoid X receptor in liver and intestine. *J Lipid Res*. 2007 Dec;48(12):2664-72. Epub 2007 Aug 24.

Kim JB, Sarraf P, Wright M, Yao KM, Mueller E, Solanes G, Lowell BB, Spiegelman BM. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J Clin Invest*. 1998 Jan 1;101(1):1-9.

Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A, LeBoeuf RC. Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr*. 1998 Jun;128(6):954-9.

Kletzien RF, Harris PK, Foellmi LA (1994) Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. *FASEB J*. 8, 174-81.

Koba K, Liu JW, Bobik E Jr, Mills DE, Sugano M, Huang YS. Effect of phytate in soy protein on the serum and liver cholesterol levels and liver fatty acid profile in rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003 Jan;67(1):15-22.

Kohno M, Hirotsuka M, Kito M, Matsuzawa Y. Decreases in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean beta-conglycinin. *J Atheroscler Thromb*. 2006 Oct;13(5):247-55.

Kottke TE, Gatewood LC, Wu SC, Park HA. Preventing heart disease: is treating the high risk sufficient? *J Clin Epidemiol*. 1988;41(11):1083-93.

Kottke TE. Reducing community risk of heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 1988 Oct;12(4):1113-6.

Krajcovicova-Kudlackova M, Babinska K, Valachovicova M. Health benefits and risks of plant proteins. *Bratisl Lek Listy*. 2005;106(6-7):231-4.

Krapp A, Ahle S, Kersting S, Hua Y, Kneser K, Nielsen M, Gliemann J, Beisiegel U. Hepatic lipase mediates the uptake of chylomicrons and beta-VLDL into cells via the LDL receptor-related protein (LRP). *J Lipid Res*. 1996 May;37(5):926-36.

Kritchevsky D, Tepper SA, Czarnecki SK, Klurfeld DM. Atherogenicity of animal and vegetable protein. Influence of the lysine to arginine ratio. *Atherosclerosis*. 1982 Feb;41(2-3):429-31.

Kritchevsky D. Protein and atherosclerosis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1990 Oct;36 Suppl 2:S81-6.

Kunau WH, Dommes V, Schulz H. beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res*. 1995;34(4):267-342. Review.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5

Lasser NL, Roheim PS, Edelstein D, Eder HA. Serum lipoproteins of normal and cholesterol-fed rats. *J Lipid Res*. 1973 Jan;14(1):1-8.

Law MR, Wald NJ, Morris JK. The performance of blood pressure and other cardiovascular risk factors as screening tests for ischaemic heart disease and stroke. *J Med Screen*. 2004;11(1):3-7.

Lichtenstein AH, Jalbert SM, Adlercreutz H, Goldin BR, Rasmussen H, Schaefer EJ, Ausman LM. Lipoprotein response to diets high in soy or animal protein with and without isoflavones in moderately hypercholesterolemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002 Nov 1;22(11):1852-8.

Lijnen P, Fagard R, Staessen J, Amery A. Possible biochemical mechanisms involved in the antihypertensive drug-induced changes in serum lipoproteins. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 1989 Jan;11(1):17-23.

Lin CC, Yin MC, Hsu CC, Lin MP. Effect of five cysteine-containing compounds on three lipogenic enzymes in Balb/cA mice consuming a high saturated fat diet. *Lipids*. 2004 Sep;39(9):843-8.

Lin HL, Hollenberg PF. The inactivation of cytochrome P450 3A5 by 17alpha-ethynylestradiol is cytochrome b5-dependent: metabolic activation of the ethynyl moiety leads to the formation of

glutathione conjugates, a heme adduct, and covalent binding to the apoprotein. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Apr;321(1):276-87. Epub 2007 Jan 24.

Lin HL, Liu TY, Chau GY, Lui WY, Chi CW. Comparison of 2-methoxyestradiol-induced, docetaxel-induced, and paclitaxel-induced apoptosis in hepatoma cells and its correlation with reactive oxygen species. *Cancer.* 2000 Sep 1;89(5):

Lindholm M, Eklund A. The effects of dietary protein on the fatty acid composition and delta 6 desaturase activity of rat hepatic microsomes. *Lipids.* 1991 Feb;26(2):107-10.

Lindholm M, Sjöblom L, Nordborg C, Ostlund-Lindqvist AM, Eklund A. Comparison of dietary casein and soybean protein effects on plasma lipid and gastrin levels, hepatic delta 6-desaturase activity and coronary arteriosclerosis in male Sprague-Dawley rats. A 9-month study. *Ann Nutr Metab.* 1993;37(6):302-10.

Liu H, Colavitti R, Rovira II, Finkel T. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res.* 2005 Nov 11;97(10):967-74.

Lovati MR, Manzoni C, Canavesi A, Sirtori M, Vaccarino V, Marchi M, Gaddi G, Sirtori CR. Soybean protein diet increases low density lipoprotein receptor activity in mononuclear cells from hypercholesterolemic patients. *J Clin Invest.* 1987 Nov;80(5):1498-502.

Lovati MR, Manzoni C, Corsini A, Granata A, Frattini R, Fumagalli R, Sirtori CR. Low density lipoprotein receptor activity is modulated by soybean globulins in cell culture. *J Nutr.* 1992 Oct;122(10):1971-8.

Lovati MR, Manzoni C, Corsini A, Granata A, Fumagalli R, Sirtori CR. 7S globulin from soybean is metabolized in human cell cultures by a specific uptake and degradation system. *J Nutr.* 1996 Nov;126(11):2831-42.

Lovati MR, Manzoni C, Gianazza E, Arnoldi A, Kurowska E, Carroll KK, Sirtori CR. Soy protein peptides regulate cholesterol homeostasis in Hep G2 cells. *J Nutr.* 2000 Oct;130(10):2543-9.

Luci S, Giemsa B, Kluge H, Eder K. Clofibrate causes an upregulation of PPAR- α target genes but does not alter expression of SREBP target genes in liver and adipose tissue of pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Jul;293(1):R70-7. Epub 2007 Mar 15.

Madani S, Lopez S, Blond JP, Prost J, Belleville J. Highly purified soybean protein is not hypocholesterolemic in rats but stimulates cholesterol synthesis and excretion and reduces polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *J Nutr.* 1998 Jul;128(7):1084-91.

Madani S, Prost J, Narce M, Belleville J. VLDL metabolism in rats is affected by the concentration and source of dietary protein. *J Nutr.* 2003 Dec;133(12):4102-6.

Magni C, Sessa F, Accardo E, Vanoni M, Morazzoni P, Scarafoni A, Duranti M. Conglutin gamma, a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. *J Nutr Biochem.* 2004 Nov;15(11):646-50.

Makishima M, Okamoto AY, Repa JJ, Tu H, Learned RM, Luk A, Hull MV, Lustig KD, Mangelsdorf DJ, Shan B. Identification of a nuclear receptor for bile acids. *Science*. 1999 May 21;284(5418):1362-5.

Makishima M. Nuclear receptors as targets for drug development: regulation of cholesterol and bile acid metabolism by nuclear receptors. *J Pharmacol Sci*. 2005 Feb;97(2):177-83. Epub 2005 Feb 11.

Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci*. 2004 Feb;61(4):393-416.

Mantell G. Lipid lowering drugs in atherosclerosis--the HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Exp Hypertens A*. 1989;11(5-6):927-41.

Manzoni C, Duranti M, Eberini I, Scharnag H, März W, Castiglioni S, Lovati MR. Subcellular localization of soybean 7S globulin in HepG2 cells and LDL receptor up-regulation by its alpha' constituent subunit. *J Nutr*. 2003 Jul;133(7):2149-55.

Marchesi M, Parolini C, Diani E, Rigamonti E, Cornelli L, Arnoldi A, Sirtori CR, Chiesa G. Hypolipidaemic and anti-atherosclerotic effects of lupin proteins in a rabbit model. *Br J Nutr*. 2008 Mar 4:1-4.

Mariotti F, Pueyo ME, Tomé D, Mahé S. The bioavailability and postprandial utilisation of sweet lupin (*Lupinus albus*)-flour protein is similar to that of purified soyabean protein in human subjects: a study using intrinsically ¹⁵N-labelled proteins. *Br J Nutr*. 2002 Apr;87(4):315-23.

Mariotti F, Simbelie KL, Makarios-Lahham L, Huneau JF, Laplaize B, Tomé D, Even PC. Acute ingestion of dietary proteins improves post-exercise liver glutathione in rats in a dose-dependent relationship with their cysteine content. *J Nutr*. 2004 Jan;134(1):128-31.

Marlett JA, Fischer MH. A poorly fermented gel from psyllium seed husk increases excreta moisture and bile acid excretion in rats. *J Nutr*. 2002 Sep;132(9):2638-43.

Marques-Vidal P, Azéma C, Collet X, Vieu C, Chap H, Perret B. Hepatic lipase promotes the uptake of HDL esterified cholesterol by the perfused rat liver: a study using reconstituted HDL particles of defined phospholipid composition. *J Lipid Res*. 1994 Mar;35(3):373-84.

Martins JM, Riottot M, de Abreu MC, Viegas-Crespo AM, Lança MJ, Almeida JA, Freire JB, Bento OP. Cholesterol-lowering effects of dietary blue lupin (*Lupinus angustifolius* L.) in intact and ileorectal anastomosed pigs. *J Lipid Res*. 2005 Jul;46(7):1539-47. Epub 2005 Apr 16.

Mawatari S, Ohnishi Y, Kaji Y, Maruyama T, Murakami K, Tsutsui K, Fujino T. High-cholesterol diets induce changes in lipid composition of rat erythrocyte membrane including decrease in cholesterol, increase in alpha-tocopherol and changes in fatty acids of phospholipids. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2003 Jul;67(7):1457-64.

McGarry JD, Brown NF. Reconstitution of purified, active and malonyl-CoA-sensitive rat liver carnitine palmitoyltransferase I: relationship between membrane environment and malonyl-CoA sensitivity. *Biochem J*. 2000 Jul 1;349(Pt 1):179-87.

Mead JR, Irvine SA, Ramji DP. Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med*. 2002 Dec;80(12):753-69. Epub 2002 Oct 24.

Meddings JB, Dietschy JM. Regulation of plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol: interpretation of data on low-density lipoprotein turnover in man. *Circulation*. 1986 Oct;74(4):805-14.

Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:711-60.

Mellenthin O, Galensa R. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products. *J Agric Food Chem*. 1999 Feb;47(2):594-602.

Mentlein R, Butte W. Hydrolysis of phthalate esters by purified rat and human liver carboxylesterases. *Biochem Pharmacol*. 1989 Sep 15;38(18):3126-8.

Merkel M, Loeffler B, Kluger M, Fabig N, Geppert G, Pennacchio LA, Laatsch A, Heeren J. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. *J Biol Chem*. 2005 Jun 3;280(22):21553-60. Epub 2005 Mar 17.

Miller NE. High-density lipoprotein: a major risk factor for coronary atherosclerosis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1987 Aug;1(3):603-22.

Mochizuki Y, Maebuchi M, Kohno M, Hirotsuka M, Wadahama H, Moriyama T, Kawada T, Urade R. Changes in lipid metabolism by soy beta-conglycinin-derived peptides in HepG2 cells. *J Agric Food Chem*. 2009 Feb 25;57(4):1473-80.

Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R. The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry*. 2000 Oct 24;39(42):13005-11.

Mullen E, Brown RM, Osborne TF, Shay NF. Soy isoflavones affect sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and SREBP-regulated genes in HepG2 cells. *J Nutr*. 2004 Nov;134(11):2942-7.

Muoio DM, Seefeld K, Witters LA, Coleman RA. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J*. 1999 Mar 15;338 (Pt 3):783-91.

Murata M, Sano Y, Ishihara K, Uchida M. Dietary fish oil and *Undaria pinnatifida* (wakame) synergistically decrease rat serum and liver triacylglycerol. *J Nutr*. 2002 Apr;132(4):742-7.

Nagasawa A, Fukui K, Kojima M, Kishida K, Maeda N, Nagaretani H, Hibuse T, Nishizawa H, Kihara S, Waki M, Takamatsu K, Funahashi T, Matsuzawa Y. Divergent effects of soy protein diet on the expression of adipocytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Nov 28;311(4):909-14.

Ni W, Tsuda Y, Sakono M, Imaizumi K. Dietary soy protein isolate, compared with casein, reduces atherosclerotic lesion area in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr*. 1998 Nov;128(11):1884-9.

Norum KR, Berg T, Helgerud P, Drevon CA. Transport of cholesterol. *Physiol Rev*. 1983 Oct;63(4):1343-419.

Oboh HA, Muzquiz M, Burbano C, Cuadrado C, Pedrosa MM, Ayet G, Osagie AU. Anti-nutritional constituents of six underutilized legumes grown in Nigeria. *J Chromatogr A*. 1998 Oct 9;823(1-2):307-12.

Oda H. Functions of sulfur-containing amino acids in lipid metabolism. *J Nutr*. 2006 Jun;136(6 Suppl):1666S-1669S. Review.

Osterlund BR, Packer MK, Bridger WA. Characterization of a stabilizing factor of rat liver and of the nature of its interaction with ATP-citrate lyase. *Arch Biochem Biophys*. 1980 Dec;205(2):489-98.

Ott DB, Lachance PA. Biochemical controls of liver cholesterol biosynthesis. *Am J Clin Nutr*. 1981 Oct;34(10):2295-306.

Ozanne SE. Metabolic programming in animals. *Br Med Bull*. 2001;60:143-52.

Pawar A, Botolin D, Mangelsdorf DJ, Jump DB. The role of liver X receptor-alpha in the fatty acid regulation of hepatic gene expression. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):40736-43. Epub 2003 Aug 13.

Peluso MR, Winters TA, Shanahan MF, Banz WJ. A cooperative interaction between soy protein and its isoflavone-enriched fraction lowers hepatic lipids in male obese Zucker rats and reduces blood platelet sensitivity in male Sprague-Dawley rats. *J Nutr*. 2000 Sep;130(9):2333-42.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002 May 1;30(9):e36.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.

Ponnampalam EN, Sinclair AJ, Hosking BJ, Egan AR. Effects of dietary lipid type on muscle fatty acid composition, carcass leanness, and meat toughness in lambs. *J Anim Sci*. 2002 Mar;80(3):628-36.

Potter SM, Bakhit RM, Essex-Sorlie DL, Weingartner KE, Chapman KM, Nelson RA, Prabhudesai M, Savage WD, Nelson AI, Winter LW, et al. Depression of plasma cholesterol in

men by consumption of baked products containing soy protein. *Am J Clin Nutr.* 1993 Oct;58(4):501-6.

Potter SM, Pertile J, Berber-Jimenez MD. Soy protein concentrate and isolated soy protein similarly lower blood serum cholesterol but differently affect thyroid hormones in hamsters. *J Nutr.* 1996 Aug;126(8):2007-11.

Potter SM. Soy protein and cardiovascular disease: the impact of bioactive components in soy. *Nutr Rev.* 1998 Aug;56(8):231-5.

Potter SM. Soy protein and serum lipids. *Curr Opin Lipidol.* 1996 Aug;7(4):260-4.

Pownall HJ, Ehnholm C. The unique role of apolipoprotein A-I in HDL remodeling and metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2006 Jun;17(3):209-13.

Prieur X, Coste H, Rodriguez JC. The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. *J Biol Chem.* 2003 Jul 11;278(28):25468-80. Epub 2003 Apr 22.

Qiu W, Avramoglu RK, Dubé N, Chong TM, Naples M, Au C, Sidiropoulos KG, Lewis GF, Cohn JS, Tremblay ML, Adeli K. Hepatic PTP-1B expression regulates the assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins: evidence from protein tyrosine phosphatase-1B overexpression, knockout, and RNAi studies. *Diabetes.* 2004 Dec;53(12):3057-66.

Radhakrishnan A, Sun LP, Kwon HJ, Brown MS, Goldstein JL. Direct binding of cholesterol to the purified membrane region of SCAP: mechanism for a sterol-sensing domain. *Mol Cell.* 2004 Jul 23;15(2):259-68.

Rivabene R, Napolitano M, Cantafora A, Bravo E. Redox-dependent modulation of lipid synthesis induced by oleic acid in the human intestinal epithelial cell line Caco-2. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001 Mar;226(3):191-8.

Roder K, Zhang L, Schweizer M. SREBP-1c mediates the retinoid-dependent increase in fatty acid synthase promoter activity in HepG2. *FEBS Lett.* 2007 Jun 12;581(14):2715-20. Epub 2007 May 21.

Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H, Suzuki S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Aug 10;286(1):176-83. Erratum in: *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Sep 14;287(1):311.

Santamarina-Fojo S, González-Navarro H, Freeman L, Wagner E, Nong Z. Hepatic lipase, lipoprotein metabolism, and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Oct;24(10):1750-4. Epub 2004 Jul 29.

Schaap FG, Rensen PC, Voshol PJ, Vrans C, van der Vliet HN, Chamuleau RA, Havekes LM, Groen AK, van Dijk KW. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density

lipoprotein-triglyceride (VLDL-TG) production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. *J Biol Chem.* 2004 Jul 2;279(27):27941-7. Epub 2004 Apr 16.

Scharnagl H, Winkler K, Mantz S, Baumstark MW, Wieland H, März W. Inhibition of HMG-CoA reductase with cerivastatin lowers dense low density lipoproteins in patients with elevated fasting glucose, impaired glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2004 May;112(5):269-77.

Schweizer M, Roder K, Zhang L, Wolf SS. Transcription factors acting on the promoter of the rat fatty acid synthase gene. *Biochem Soc Trans.* 2002 Nov;30(Pt 6):1070-2.

Scow RO, Chernick SS, Fleck TR. Lipoprotein lipase and uptake of triacylglycerol, cholesterol and phosphatidylcholine from chylomicrons by mammary and adipose tissue of lactating rats in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1977 May 25;487(2):297-306.

Seidel JC, Nath N, Harper AE. Diet and cholesterolemia. V. Effects of sulfur-containing amino acids and protein. *J Lipid Res.* 1960 Oct;1:474-81.

Sen CK, Khanna S, Reznick AZ, Roy S, Packer L. Glutathione regulation of tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappa B activation in skeletal muscle-derived L6 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Aug 28;237(3):645-9.

Shaw J, Roberts G, Grimshaw K, White S, Hourihane J. Lupin allergy in peanut-allergic children and teenagers. *Allergy.* 2008 Mar;63(3):370-3. Epub 2007 Nov 19.

Shibata S, Oda K, Onodera-Masuoka N, Matsubara S, Kikuchi-Hayakawa H, Ishikawa F, Iwabuchi A, Sansawa H. Hypocholesterolemic effect of indigestible fraction of *Chlorella regularis* in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2001 Dec;47(6):373-7.

Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest.* 1996 Oct 1;98(7):1575-84.

Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem.* 1999 Dec 10;274(50):35832-9.

Shimano H. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res.* 2001 Nov;40(6):439-52.

Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest.* 1997 Mar 1;99(5):838-45.

Shin ES, Lee HH, Cho SY, Park HW, Lee SJ, Lee TR. Genistein downregulates SREBP-1 regulated gene expression by inhibiting site-1 protease expression in HepG2 cells. *J Nutr.* 2007 May;137(5):1127-31.

Sirtori CR, Eberini I, Arnoldi A (2007) Hypocholesterolaemic effects of soya proteins: results of recent studies are predictable from the anderson meta-analysis data. *Br J Nutr.* 97,816-22. Review.

Sirtori CR, Eberini I, Arnoldi A. Hypocholesterolaemic effects of soya proteins: results of recent studies are predictable from the anderson meta-analysis data. *Br J Nutr.* 2007 May;97(5):816-22.

Sirtori CR, Fumagalli R (2006) LDL-cholesterol lowering or HDL-cholesterol raising for cardiovascular prevention. A lesson from cholesterol turnover studies and others. *Atherosclerosis* 186, 1-11. Review.

Sirtori CR, Galli C, Anderson JW, Arnoldi A (2009) Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins. *Atherosclerosis*, 203, 8-17.

Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Castiglioni S, Duranti M, Magni C, Morandi S, D'Agostina A, Arnoldi A. Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. *J Nutr.* 2004 Jan;134(1):18-23.

Sirtori CR, Manzoni C, Lovati MR. Mechanisms of lipid-lowering agents. *Cardiology.* 1991;78(3):226-35.

Smith JL, Lear SR, Forte TM, Ko W, Massimi M, Erickson SK. Effect of pregnancy and lactation on lipoprotein and cholesterol metabolism in the rat. *J Lipid Res.* 1998 Nov;39(11):2237-49.

Spielmann J, Noatsch A, Brandsch C, Stangl GI, Eder K (2008) Effects of various dietary arginine and lysine concentrations on plasma and liver cholesterol concentrations in rats. *Ann Nutr Metab.* 53, 223-33.

Spielmann J, Shukla A, Brandsch C, Hirche F, Stangl GI, Eder K (2007) Dietary lupin protein lowers triglyceride concentrations in liver and plasma in rats by reducing hepatic gene expression of sterol regulatory element-binding protein-1c. *Ann Nutr Metab* 51, 387-392.

Sugiyama K, Mochizuki C, Muramatsu K. Comparative effects of choline chloride and phosphatidylcholine on plasma and liver lipid levels in rats fed a choline-deficient high cholesterol diet. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 1987 Oct;33(5):369-76.

Sugiyama K, Shimada Y, Iwai K, Morita T. Differential effects of dietary casein and soybean protein isolate on lipopolysaccharide-induced hepatitis in D-galactosamine-sensitized rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002 Oct;66(10):2232-5.

Sugiyama K, Yamakawa A, Kumazawa A, Saeki S. Methionine content of dietary proteins affects the molecular species composition of plasma phosphatidylcholine in rats fed a cholesterol-free diet. *J Nutr.* 1997 Apr;127(4):600-7.

Tachibana N, Matsumoto I, Fukui K, Arai S, Kato H, Abe K, Takamatsu K. Intake of soy protein isolate alters hepatic gene expression in rats. *J Agric Food Chem.* 2005 May 18;53(10):4253-7.

Terpstra AH, Holmes JC, Nicolosi RJ. The hypocholesterolemic effect of dietary soybean protein vs. casein in hamsters fed cholesterol-free or cholesterol-enriched semipurified diets. *J Nutr.* 1991 Jul;121(7):944-7.

Terpstra AH, van Tintelen G, West CE. The hypocholesterolemic effect of dietary soy protein in rats. *J Nutr.* 1982 Apr;112(4):810-7.

Terpstra AH, West CE, Fennis JT, Schouten JA, van der Veen EA. Hypocholesterolemic effect of dietary soy protein versus casein in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Am J Clin Nutr.* 1984 Jan;39(1):1-7.

Tiedink HG, Katan MB. Variability in lipoprotein concentrations in serum after prolonged storage at -20 degrees C. *Clin Chim Acta.* 1989 Feb 28;180(2):147-55.

Torres N, Torre-Villalvazo I, Tovar AR. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J Nutr Biochem.* 2006 Jun;17(6):365-73. Epub 2005 Dec 5.

Tovar AR, Ascencio C, Torres N. Soy protein, casein, and zein regulate histidase gene expression by modulating serum glucagon. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2002 Nov;283(5):E1016-22.

Ueshima K, Akihisa-Umeno H, Nagayoshi A, Takakura S, Matsuo M, Mutoh S. Implipide, a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor, reduces progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice fed a Western-type diet: involvement of the inhibition of postprandial triglyceride elevation. *Biol Pharm Bull.* 2005 Feb;28(2):247-52.

Vallett SM, Sanchez HB, Rosenfeld JM, Osborne TF. A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J Biol Chem.* 1996 May 24;271(21):12247-53.

van Barneveld RJ. Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. *Nutr Res Rev.* 1999 Dec;12(2):203-30.

Van Eck M, Bos IS, Hildebrand RB, Van Rij BT, Van Berkel TJ. Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development. *Am J Pathol.* 2004 Sep;165(3):785-94.

Vega GL, Grundy SM. Hypercholesterolemia with cholesterol-enriched LDL and normal levels of LDL-apolipoprotein B. Effects of the step I diet and bile acid sequestrants on the cholesterol content of LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 Apr;16(4):517-22.

Vega GL, Grundy SM. Hypoalphalipoproteinemia (low high density lipoprotein) as a risk factor for coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* 1996 Aug;7(4):209-16.

Velasquez MT, Bhathena SJ. Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci.* 2007 Feb 26;4(2):72-82.

- Vester B, Rasmussen K. High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1991 Sep;29(9):549-54.
- Vistica DT, Skehan P, Scudiero D, Monks A, Pittman A, Boyd MR. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.* 1991 May 15;51(10):2515-20.
- Viveros A, Centeno C, Arija I, Brenes A. Cholesterol-lowering effects of dietary lupin (*Lupinus albus* var *multolupa*) in chicken diets. *Poult Sci.* 2007 Dec;86(12):2631-8.
- Vlahcevic ZR, Pandak WM, Stravitz RT. Regulation of bile acid biosynthesis. *Gastroenterol Clin North Am.* 1999 Mar;28(1):1-25, v.
- Vu-Dac N, Gervois P, Jakel H, Nowak M, Bauge E, Dehondt H, Staels B, Pennacchio LA, Rubin EM, Fruchart-Najib J, Fruchart JC. Apolipoprotein A5, a crucial determinant of plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor alpha activators. *J Biol Chem.* 2003 May 16;278(20):17982-5. Epub 2003 Mar 12.
- Wait R, Gianazza E, Brambilla D, Eberini I, Morandi S, Arnoldi A, Sirtori CR. Analysis of *Lupinus albus* storage proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2005 Jun 1;53(11):4599-606.
- Walters DW, Gilbert HF. Thiol/disulfide redox equilibrium and kinetic behavior of chicken liver fatty acid synthase. *J Biol Chem.* 1986 Oct 5;261(28):13135-43.
- Wang WJ, Baez JM, Maurer R, Dansky HM, Cohen DE. Homozygous disruption of *Pctp* modulates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res.* 2006 Nov;47(11):2400-7. Epub 2006 Aug 28.
- Wang X, Sato R, Brown MS, Hua X, Goldstein JL. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell.* 1994 Apr 8;77(1):53-62
- Waris G, Felmlee DJ, Negro F, Siddiqui A. Hepatitis C virus induces proteolytic cleavage of sterol regulatory element binding proteins and stimulates their phosphorylation via oxidative stress. *J Virol.* 2007 Aug;81(15):8122-30. Epub 2007 May 16.
- Weisse K, Brandsch C, Hirche F, Eder K, Stangl GI. Lupin protein isolate and cysteine-supplemented casein reduce calcification of atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *Br J Nutr.* 2010 Jan;103(2):180-8. Epub 2009 Aug 27.
- Weisse K, Brandsch C, Zernsdorf B, Nkengfack Nembongwe GS, Hofmann K, Eder K, Stangl GI. Lupin protein compared to casein lowers the LDL cholesterol:HDL cholesterol-ratio of hypercholesterolemic adults. *Eur J Nutr.* 2010 Mar;49(2):65-71. Epub 2009 Aug 13.
- Werstuck GH, Lentz SR, Dayal S, Hossain GS, Sood SK, Shi YY, Zhou J, Maeda N, Krisans SK, Malinow MR, Austin RC. Homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress causes

dysregulation of the cholesterol and triglyceride biosynthetic pathways. *J Clin Invest.* 2001 May;107(10):1263-73.

Williamson DH. Regulation of metabolism during lactation in the rat. *Reprod Nutr Dev.* 1986;26(2B):597-603. Review.

Xiao CW, Mei J, Wood CM. Effect of soy proteins and isoflavones on lipid metabolism and involved gene expression. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:2660-73.

Yagil R, Etzion Z, Berlyne GM. Changes in rat milk quantity and quality due to variations in litter size and high ambient temperature. *Lab Anim Sci.* 1976 Feb;26(1):33-7.

Yahia DA, Madani S, Prost E, Prost J, Bouchenak M, Belleville J. Tissue antioxidant status differs in spontaneously hypertensive rats fed fish protein or casein. *J Nutr.* 2003 Feb;133(2):479-82.

Yang L, Kumagai T, Kawamura H, Watanabe T, Kubota M, Fujimura S, Watanabe R, Kadowaki M. Effects of rice proteins from two cultivars, Koshihikari and Shunyo, on cholesterol and triglyceride metabolism in growing and adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007 Mar;71(3):694-703. Epub 2007 Mar 7.

Yokogoshi H, Oda H. Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *Amino Acids.* 2002;23(4):433-9.

Yoshie-Stark Y, Bez J, Wada Y, Wäsche A. Functional properties, lipoxygenase activity, and health aspects of *Lupinus albus* protein isolates. *J Agric Food Chem.* 2004 Dec 15;52(25):7681-9.

Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, Hobbs HH. Disruption of *Abcg5* and *Abcg8* in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99(25):16237-42. Epub 2002 Nov 20.

Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Overexpression of *ABCG5* and *ABCG8* promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest.* 2002 Sep;110(5):671-80.

Zhan S, Ho SC. Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile. *Am J Clin Nutr.* 2005 Feb;81(2):397-408.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Bettzieche
Vorname	Anja
Geburtsdatum/ -ort	07.12.77 in Halle
Familienstand	ledig, 1 Kind

Schulbildung

1984-1990	POS „Hans Beimler“ in Halle
1990-1996	Wilhelm von Humboldt Gymnasium in Halle
Juni 1996	Abitur

Ausbildung

1996-1999	Ausbildung zur Groß- und Außenhandelskauffrau in der Melle GmbH Landsberg
Februar 1999	kaufmännische Abschlussprüfung

Berufstätigkeit

1999 - 2000	kaufmännische Angestellte bei der Melle GmbH
seit März 2008	Ernährungscoach bei der KKH-Allianz

Akademische Ausbildung

2000 - 2005	Studium der Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg Abschluss als Diplom-Ernährungswissenschaftlerin
-------------	--

Thema der Diplomarbeit: „Einfluss oxidierter Linolsäure auf schilddrüsenpezifische Parameter in Thyreozyten“

2006 - 2008	Promotion am Institut für Ernährungswissenschaften im Fach „Humanernährung“
-------------	---

Thema der Promotionsarbeit: „Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel“

Publikationsliste

Publikationen im Rahmen der vorliegenden Arbeit

Bettzieche A, Brandsch C, Eder K, Stangl GI. Lupin protein acts hypocholesterolemic and increases milk fat content in lactating rats by influencing the expression of genes involved in cholesterol homeostasis and triglyceride synthesis. *Mol Nutr Food Res*. 2009 Sep;53(9):1134-42.

Bettzieche A, Brandsch C, Schmidt M, Weisse K, Eder K, Stangl GI. Differing effect of protein isolates from different cultivars of blue lupin on plasma lipoproteins of hypercholesterolemic rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008 Dec;72(12):3114-21. Epub 2008 Dec 7.

Bettzieche A, Brandsch C, Hirche F, Eder K, Stangl GI. L-cysteine down-regulates SREBP-1c-regulated lipogenic enzymes expression via glutathione in HepG2 cells. *Ann Nutr Metab*. 2008;52(3):196-203. Epub 2008 Jun 11.

Bettzieche A, Brandsch C, Weisse K, Hirche F, Eder K, Stangl GI. Lupin protein influences the expression of hepatic genes involved in fatty acid synthesis and triacylglycerol hydrolysis of adult rats. *Br J Nutr*. 2008 May;99(5):952-62. Epub 2007 Dec 21.

Weitere Publikationen

Luci S, Bettzieche A, Brandsch C, Eder K. Research paper effects of 13-HPODE on expression of genes involved in thyroid hormone synthesis, iodide uptake and formation of hydrogen peroxide in porcine thyrocytes. *Int J Vitam Nutr Res*. 2006 Nov;76(6):398-406.

Shukla A, Bettzieche A, Hirche F, Brandsch C, Stangl GI, Eder K. Dietary fish protein alters blood lipid concentrations and hepatic genes involved in cholesterol homeostasis in the rat model. *Br J Nutr*. 2006 Oct;96(4):674-82.

Shukla A, Brandsch C, Bettzieche A, Hirche F, Stangl GI, Eder K. Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes. *J Nutr Biochem*. 2007 May;18(5):313-21. Epub 2006 Sep 7.

Posterbeiträge

Dipl. troph. Anja Bettzieche, C. Brandsch, F. Hirche, K. Eder. Wirkung von Cystein auf die Expression von SREBP-1c-regulierten Genen der Lipogenese in HepG2 Zellen. *DGE Kongress 2008 in Bonn, G.I. Stangl, Halle/Saale*

Dr. rer. nat. Corinna Brandsch, A. Bettzieche, A. Shukla. Wirkung von isoflavonarmem Sojaprotein auf die Expression der Transkriptionsfaktoren SREBP1 und 2 sowie dessen Zielgene bei Ratten. *DGE-Kongress 2006 in Hohenheim, G. Stangl, K. Eder, Halle/Saale*

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss von Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel“ selbstständig angefertigt und diese nicht bereits für eine Promotion oder ähnliche Zwecke an einer anderen Universität eingereicht habe. Weiterhin versichere ich, dass ich die zur Erstellung der Dissertationsschrift verwendeten wissenschaftlichen Arbeiten und Hilfsmittel genau und vollständig angegeben habe.

Angersdorf, 16.06.2010

Anja Bettzieche

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich von ganzem Herzen allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Frau Prof. Dr. Gabriele Stangl gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des hochinteressanten Themas, die immer sehr freundliche und gute Betreuung während meiner gesamten Doktorandenzeit, die fruchtbaren und unterstützenden Konsultationen, die kritische Durchsicht der Manuskripte und die konstruktiven Tipps bei der Anfertigung der Dissertation. Danke für die fachliche Unterstützung, Inspiration und Ausdauer!

Herrn Prof. Dr. Klaus Eder danke ich für die gute Zusammenarbeit, die kreativen Diskussionen und fachlichen Hinweise und die Gewährung der sehr guten experimentellen Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Corinna Brandsch bedanken. Ihr stets kompetenter Rat und ihre Hilfe kam mir in vielen Angelegenheiten zugute. Jede Phase meiner Arbeit wurde von ihr intensiv, professionell und warmherzig begleitet. Ihre wegweisenden und kreativen Ideen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke ihr für die hilfreiche Unterstützung in jeder „Lebenslage“, die aufmunternden Worte und die Geduld.

Für die unermüdliche und professionelle Einführung in die „Wunderwelt“ der HPLC und seine stets geduldigen und konstruktiven Hilfestellungen und Ideen danke ich besonders Herrn Dr. Frank Hirche.

Herrn Dr. Robert Ringseis danke ich für das kritische Lesen des Manuskriptes, das immer offene Ohr und die richtige Motivation zur rechten Zeit.

Ein besonderer Dank geht auch an Herrn Dr. Gerhard Woitow für die fachliche und praktische Unterstützung bei den Probennahmen für den Laktationsversuch.

Mein Dank gilt auch Frau Ingeburg Kaiser und Frau Almute Schibelius-Aßmann für die praktischen Tipps und Tricks im Laboralltag und die tatkräftige Mithilfe bei der Probenentnahme in allen tierexperimentellen Untersuchungen. Frau Ingeborg Günther danke ich für die Messungen der Aminosäurekonzentrationen in den Proteinen und Diäten.

Meinem „Lieblinglupinchen“ Frau Dr. Kristin Weiße danke ich für die gemeinsame Doktorandenzeit, die freundschaftliche Zusammenarbeit, das geduldige Ertragen mancher „Laborkrisen“ und die Cappuccino-Sessions. Danke auch an meine Büromitbewohnerin Frau Dr. Carmen Birkenfeld und Frau Dr. Maren Fischer für die schöne und humorvolle Zeit in unserem „Frauenknast“.

Der Diplomandin Manja Schmidt danke ich für die engagierte Beteiligung bei der Durchführung und Bearbeitung der Versuche.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Mitdoktoranden sowie an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Institutes für die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung des Forschungsprojekts.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern bin ich unglaublich dankbar für all ihre Liebe, Kraft und Unterstützung. Ihr habt mir oft in schwierigen Situationen ein Stück Eurer Lebenserfahrung mit auf den Weg gegeben. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Abschließend möchte ich mich bei meinem Freund für all die motivierenden Worte bedanken. Danke auch für den liebevollen und aufmunternden Umgang während meiner gesamten Promotionszeit. Danke, dass Du immer an mich geglaubt hast!

Und.... sorry mein Julius, dass Du Mama in letzter Zeit etwas entbehren musstest. Danke, dass es Dich gibt!