

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 Studien zur Wirkung von Lupinenprotein  
(*L. angustifolius*) auf den Lipidstoffwechsel und die Atherogenese“**

Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Ernährungswissenschaftlerin Kristin Weiße  
geb. am 13.08.1982 in Leipzig

Gutachter: Prof. Dr. Gabriele Stangl  
Prof. Dr. Andreas Müller  
Prof. Dr. Gerhard Jahreis

Verteidigung am: 13.07.2009

Halle/Saale 2009

Die beste Motivation für das Gelingen neuer Aufgaben  
ist das Wissen, dass jemand an einen glaubt.

## ***Inhaltsverzeichnis***

Abbildungsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>8</b>
2.1. Untersuchung zur Verdaulichkeit von Lupinenprotein (Versuch 1).....	8
2.1.1. Versuchsaufbau .....	8
2.1.1.1. Versuchstiere und Diäten .....	8
2.1.1.2. Charakterisierung der Diät-Proteine.....	10
2.1.2. Probennahme.....	11
2.1.3. Analytik.....	12
2.1.4. Statistik.....	12
2.2. Einfluss von nativem und erhitztem Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel in Abhängigkeit von der Diätzusammensetzung (Versuch 2).....	12
2.2.1. Versuchsaufbau .....	12
2.2.1.1. Versuchstiere und Diäten .....	12
2.2.1.2. Charakterisierung der Diät-Proteine.....	15
2.2.2. Probennahme.....	16
2.2.3. Analytik.....	17
2.2.4. Statistik.....	17
2.3. Einfluss von Lupinenprotein auf die Atherogenese an apoE knockout-Mäusen (Versuch 3) .....	17
2.3.1. Versuchsaufbau .....	17
2.3.1.1. Versuchstiere und Diäten .....	17
2.3.1.2. Charakterisierung der Diät-Proteine.....	19
2.3.2. Probennahme.....	20
2.3.3. Analytik.....	21
2.3.4. Statistik.....	21
2.4. Einfluss von Lupinenprotein auf die Plasmalipide am Tiermodell Schwein (Versuch 4).....	21
2.4.1. Versuchsaufbau .....	21
2.4.1.1. Versuchstiere und Diäten .....	21
2.4.1.2. Charakterisierung der Diät-Proteine.....	23
2.4.2. Probennahme.....	24
2.4.3. Analytik.....	24
2.4.4. Statistik.....	24
2.5. Einfluss von Lupinenprotein auf die Plasmalipide hypercholesterinämischer Probanden (Versuch 5)..	25
2.5.1. Versuchsaufbau .....	25
2.5.1.1. Probandenscreening und –auswahl.....	25
2.5.1.2. Studiendesign .....	26
2.5.1.3. Charakterisierung der Diät-Proteine.....	28
2.5.2. Probennahme.....	28
2.5.3. Analytik.....	29
2.5.4. Statistik.....	29

# Inhaltsverzeichnis

---

2.6.	Analytische Methoden .....	30
2.6.1.	Analysen in Proteinen und Diäten.....	30
2.6.1.1.	Bestimmung der Aminosäurekonzentration in Protein und Diäten .....	30
2.6.1.2.	Bestimmung der Tryptophankonzentration in Protein und Diät .....	31
2.6.1.3.	Bestimmung der Konzentration an Isoflavonen im Protein.....	32
2.6.2.	Analysen in Plasma und Organen.....	32
2.6.2.1.	Bestimmung der Konzentration von Cystein, Homocystein und Glutathion in Plasma und Leber .....	32
2.6.2.2.	Bestimmung der Aminosäurekonzentration im Plasma .....	33
2.6.2.3.	Bestimmung der Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in Plasma, Lipoproteinen und Leber .....	34
2.6.2.4.	Bestimmung der Glukosekonzentration im Plasma.....	36
2.6.2.5.	Bestimmung der Glutathionperoxidaseaktivität in Plasma und Leber .....	36
2.6.2.6.	Bestimmung der Fettsäuresynthese-Aktivität in der Leber .....	37
2.6.2.7.	Bestimmung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität in der Leber .....	38
2.6.2.8.	Untersuchung von Atherosklerose-relevanten Parametern.....	39
2.6.2.9.	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	42
2.6.2.10.	Isolation Mononukleärer Zellen.....	42
2.6.2.11.	Genexpressionsanalyse.....	43
2.6.3.	Analysen in Faeces, Urin und Chymus.....	49
2.6.3.1.	Stickstoffbestimmung in Faeces, Urin und Chymus.....	49
2.6.3.2.	Bestimmung der Triglyceridkonzentration im Faeces .....	49
3.	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>50</b>
3.1.	Untersuchung zur Verdaulichkeit von Lupinenprotein (Versuch 1).....	50
3.1.1.	Körpermassenentwicklung und Futteraufnahme .....	50
3.1.2.	Cholesterinkonzentrationen.....	50
3.1.3.	Triglyceridkonzentrationen und Exkretionen.....	51
3.1.4.	Stickstoffexkretion .....	51
3.2.	Einfluss von nativem und erhitztem Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel in Abhängigkeit von der Diätzusammensetzung (Versuch 2).....	53
3.2.1.	Körpermassenentwicklung und Futteraufnahme .....	53
3.2.2.	Glukosekonzentration .....	53
3.2.3.	Cholesterinkonzentration.....	55
3.2.4.	Triglyceridkonzentrationen .....	57
3.2.5.	Enzymaktivitäten an FSS und G6PDH .....	58
3.2.6.	Genexpression .....	60
3.3.	Einfluss von Lupinenprotein auf die Atherogenese an apoE knockout-Mäusen (Versuch 3) .....	62
3.3.1.	Körpermassenentwicklung und Futteraufnahme .....	62
3.3.2.	Histologische Quantifizierung der Atherosklerose.....	62
3.3.3.	Cholesterinkonzentrationen.....	66
3.3.4.	Triglyceridkonzentrationen .....	66
3.3.5.	Konzentrationen an Cystein, Homocystein und Glutathion in Plasma und Leber .....	67
3.3.6.	Enzymaktivität der Glutathionreduktase .....	68
3.3.7.	Genexpression .....	69
3.4.	Einfluss von Lupinenprotein auf die Plasmalipide am Tiermodell Schwein (Versuch 4).....	70
3.4.1.	Leistungsdaten .....	70
3.4.2.	Glukosekonzentration .....	70
3.4.3.	Cholesterinkonzentration.....	71
3.4.4.	Triglyceridkonzentration .....	72

## Inhaltsverzeichnis

---

3.5.	Einfluss von Lupinenprotein auf die Plasmalipide hypercholesterinämischer Probanden (Versuch 5)..	73
3.5.1.	Probandenkollektiv .....	73
3.5.2.	Auswertung der Ernährungsprotokolle .....	73
3.5.3.	Cholesterinkonzentration.....	75
3.5.4.	Triglyceridkonzentrationen .....	77
3.5.5.	Konzentration an Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten im Plasma.....	78
3.5.6.	Blutglukosekonzentrationen .....	79
3.5.7.	Genexpression .....	80
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>81</b>
4.1.	Aspekte der Versuchsplanung .....	81
4.2.	Eigenschaften des Lupinenproteins .....	87
4.3.	Wirkungen des Lupinenproteins auf den Triglyceridstoffwechsel.....	91
4.4.	Wirkungen des Lupinenproteins auf den Cholesterinstoffwechsel .....	101
4.5.	Einfluss des Lupinenproteins auf die Atherogenese .....	113
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY</b> .....	<b>121</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>129</b>
	Anhang .....	145

**Abbildungsverzeichnis**

ABBILDUNG 1: <i>L. ANGUSTIFOLIUS</i> SOWIE EIN SCHEMA ZU AUFARBEITUNG UND NUTZUNGSMÖGLICHKEIT DES LUPINENKORNS .....	2
ABBILDUNG 2: SCHEMA DER LUPINENPROTEINERHITZUNG MITTELS DAMPFLANZE .....	15
ABBILDUNG 3: APOE KNOCKOUT-MÄUSE.....	18
ABBILDUNG 4: HÄUFIGKEITSVERTEILUNG DER CHOLESTERINKONZENTRATION VON 194 PROBANDEN. EINSCHLUSSKRITERIUM: KONZENTRATIONEN ZWISCHEN 5,7 UND 7,9 MMOL/L.....	26
ABBILDUNG 5: VAKUUMVERPACKTE PROTEINRIEGEL DER HUMANSTUDIE, HERGESTELLT VOM FRAUNHOFER INSTITUT FÜR VERFAHRENSTECHNIK. ....	27
ABBILDUNG 6: STUDIENDESIGN HUMANSTUDIE.....	27
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES HERZLÄNGSSCHNITTES MIT SCHNITTEBENEN .....	40
ABBILDUNG 8: FREIGELEGTE GESAMTAORTA MIT PLAQUES EINER APOE KNOCKOUT-MAUS.....	40
ABBILDUNG 9: LONGITUNAL GEÖFFNETE AORTA. [A] ORIGINALAUFNAHME [B] BEARBEITUNG MIT IMAGE J SOFTWARE. ....	41
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER ISOLATION VON MONONUKLEÄREN ZELLEN VOR UND NACH ZENTRIFUGATION MITTELS HISTOPAQUE-REAGENZ .....	43
ABBILDUNG 11: KÖRPERMASSEENTWICKLUNG VON APOE KNOCKOUT-MÄUSEN, WELCHE ÜBER 16 WOCHEN EINE <i>WESTERN DIET</i> MIT ENTWEDER 10% CASEIN, 10% LUPINENPROTEIN ODER 9,5% CASEIN + 0,5% CYSTEIN AUFNAHMEN (N=10).....	62
ABBILDUNG 12: AUSWERTUNG DER HISTOLOGISCHEN GEFRIERSCHNITTE A: ORIGINALAUFNAHME EINES ERKRANKTEN TIERES MIT VERMESSUNG DER GESAMTQUERSCHNITTSFLÄCHE DER AORTA UND DER EINZELNEN PLAQUEFLÄCHEN, B: THRESHOLD-MASKE ZUR VERMESSUNG DER KOLLAGENANTEILE IN DEN PLAQUES C: ORIGINALAUFNAHME EINES NICHT ERKRANKTEN TIERES OHNE PLAQUEBILDUNG .....	63
ABBILDUNG 13: FÄRBUNGEN VON GEFRIERSCHNITTEN (10 µM) DER AORTENWURZEL VON APOE KNOCKOUT-MÄUSEN, WELCHE ÜBER 16 WOCHEN EINE <i>WESTERN DIET</i> MIT A: 10% CASEIN, B: 10% LUPINENPROTEIN, C: 9,5% CASEIN + 0,5% CYSTEIN ERHIELTEN. [1] HÄMALAUN-EOSIN, VERGRÖßERUNG: 3X [2] TRICHROM-GOLDNER, VERGRÖßERUNG: 3X [3] VON-KOSSA-SILBERFÄRBUNG, VERGRÖßERUNG: 10X [4] ÖLROT-O, VERGRÖßERUNG:10X. ....	65
ABBILDUNG 14: BODY-MASS-INDEX VON PROBANDEN VOR UND NACH INTERVENTION MIT CASEIN ODER LUPINENPROTEIN .....	73
ABBILDUNG 15: AUSWERTUNG DER 3-TAGE-ERNÄHRUNGSPROTOKOLLE VON STUDIENTEILNEHMERN, WELCHE WÄHREND DER RUN-IN-PHASE AN 3 AUF EINANDERFOLGENDEN TAGEN BEI NORMALEN ESSGEWOHNHEITEN GEFÜHRT WURDEN. A) AUFNAHME DER HAUPTKOMPONENTEN, B) BALLASTSTOFF-UND ALKOHOLAUFNAHME.....	75
ABBILDUNG 16: VERTEILUNG DES CHOLESTERINS IN DEN VERSCHIEDENEN LIPOPROTEINEN A) WILD TYP-MAUS B) LDL-REZEPTOR KNOCKOUT-MAUS C) APOE KNOCKOUT-MAUS .....	85
ABBILDUNG 17: REGULATION DER CHOLESTERINHOMÖOSTASE DURCH SREBP.....	103

---

ABBILDUNG 18: AUSGANGSKONZENTRATIONEN UND NETTOÄNDERUNGEN VON CHOLESTERINKONZENTRATIONEN NACH KONSUM VON SOJADIÄTEN (STUDIEN ANDERER AUTOREN; WEIßE UND SCHWARZE KÄSTCHEN) ODER LUPINENPROTEINDIÄT (IM RAHMEN DIESER ARBEIT DURCHGEFÜHRTE HUMANSTUDIE; BLAUE KREISE). .....	110
ABBILDUNG 19: METABOLISMUS VON POSTPRANDIALEN TRLS .....	115
ABBILDUNG 20: PATHOGENESE DER ATHEROSKLEROSE .....	118

**Tabellenverzeichnis**

TABELLE 1: ZUSAMMENSETZUNG DER DIÄTEN AUS VERSUCH 1.....	9
TABELLE 2: VITAMINMISCHUNG DER DIÄTEN AUS VERSUCH 1.....	10
TABELLE 3: MINERALSTOFFMISCHUNG DER DIÄTEN AUS VERSUCH 1.....	10
TABELLE 4: ROHNÄHRSTOFFZUSAMMENSETZUNG DER VERSUCHSPROTEINE AUS VERSUCH 1.....	10
TABELLE 5: AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER DIÄTEN AUS VERSUCH 1.....	11
TABELLE 6: ZUSAMMENSETZUNG DER DIÄTEN AUS VERSUCH 2.....	13
TABELLE 7: AMINOSÄUREZUSATZ FÜR KOHLENHYDRATREICHE DIÄT AUS VERSUCH 2.....	13
TABELLE 8: AMINOSÄUREZUSATZ FÜR FETTREICHE DIÄT AUS VERSUCH 2.....	14
TABELLE 9: VITAMINMISCHUNG ALLER DIÄTEN AUS VERSUCH 2.....	14
TABELLE 10: MINERALSTOFFMISCHUNG ALLER DIÄTEN AUS VERSUCH 2.....	14
TABELLE 11: ROHNÄHRSTOFFZUSAMMENSETZUNG DER VERSUCHSPROTEINE AUS VERSUCH 2.....	16
TABELLE 12: AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER DIÄTEN AUS VERSUCH 2.....	16
TABELLE 13: ZUSAMMENSETZUNG DER <i>WESTERN DIET</i> AUS VERSUCH 3.....	18
TABELLE 14: VITAMINMISCHUNG DER <i>WESTERN DIET</i> AUS VERSUCH 3.....	19
TABELLE 15: MINERALSTOFFMISCHUNG DER <i>WESTERN DIET</i> AUS VERSUCH 3.....	19
TABELLE 16: ROHNÄHRSTOFFZUSAMMENSETZUNG DER VERSUCHSPROTEINE AUS VERSUCH 3.....	19
TABELLE 17: AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER DIÄTEN AUS VERSUCH 3.....	20
TABELLE 18: ZUSAMMENSETZUNG DER DIÄTEN AUS VERSUCH 4.....	22
TABELLE 19: ZUSAMMENSETZUNG DER GRUNDRATION AUS VERSUCH 4.....	22
TABELLE 20: VITAMIN- UND MINERALSTOFFMISCHUNG PRÄMIX 895 AUS VERSUCH 4.....	23
TABELLE 21: ROHNÄHRSTOFFZUSAMMENSETZUNG DER VERSUCHSDIÄTEN AUS VERSUCH 4.....	23
TABELLE 22: AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER DIÄTEN AUS VERSUCH 4.....	24
TABELLE 23: ZUSAMMENSETZUNG DER RIEGEL AUS DER HUMANSTUDIE.....	26
TABELLE 24: ROHNÄHRSTOFFE DER DIÄTPROTEINE AUS DER HUMANSTUDIE.....	28
TABELLE 25: AMINOSÄUREZUSAMMENSETZUNG DER DIÄTRIEGEL AUS DER HUMANSTUDIE.....	28
TABELLE 26: REAGENZIEN FÜR KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER PLASMAAMINOSÄUREN.....	34
TABELLE 27: REAGENZIEN UND DEREN ZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE BESTIMMUNG DER GLUTATHIONPEROXIDASEAKTIVITÄT.....	36

---

TABELLE 28: REAGENZIEN UND DEREN ZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE BESTIMMUNG DER FETTSÄURESYNTHASEAKTIVITÄT .....	38
TABELLE 29: REAGENZIEN UND DEREN ZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE BESTIMMUNG DER GLUKOSE-6-PHOSPHAT-DEHYDROGENSE-AKTIVITÄT .....	38
TABELLE 30: FÄRBEÜBERSICHT DER AORTENSCHNITTE.....	42
TABELLE 31: REAGENZIEN FÜR RNA-GELELEKTROPHORESE .....	44
TABELLE 32: REAGENZIEN FÜR DNA-GELELEKTROPHORESE .....	45
TABELLE 33: PRIMERSEQUENZEN FÜR REAL TIME PCR IN LEBERN VON RATTEN.....	46
TABELLE 34: PRIMERSEQUENZEN FÜR REAL TIME PCR IN LEBERN VON APOE KNOCKOUT-MÄUSEN .....	47
TABELLE 35: PRIMERSEQUENZEN FÜR REAL TIME PCR IN MONONUKLEÄREN ZELLEN VON PROBANDEN.....	48
TABELLE 36: LEISTUNGSPARAMETER VON RATTEN, DIE ÜBER 9 TAGE EINE DIÄT MIT ENTWEDER 20% CASEIN ODER 20% LUPINENPROTEIN ERHIELTEN.....	50
TABELLE 37: CHOLESTERINKONZENTRATIONEN IN PLASMA UND LEBER VON RATTEN, DIE ÜBER 9 TAGE EINE DIÄT MIT ENTWEDER 20% CASEIN ODER 20% LUPINENPROTEIN ERHIELTEN. ....	50
TABELLE 38: TRIGLYCERIDKONZENTRATIONEN IN PLASMA, LEBER UND FAECES SOWIE TRIGLYCERIDEXKRETIION VON RATTEN, DIE ÜBER 9 TAGE EINE DIÄT MIT ENTWEDER 20% CASEIN ODER 20% LUPINENPROTEIN ERHIELTEN. ....	51
TABELLE 39: TÄGLICH AUSGESCHIEDENE URIN- UND FAECESMENGE, STICKSTOFFKONZENTRATIONEN UND -EXKRETIIONEN VON RATTEN, DIE ÜBER 9 TAGE EINE DIÄT MIT ENTWEDER 20% CASEIN ODER 20% LUPINENPROTEIN ERHIELTEN.....	52
TABELLE 40: LEISTUNGSDATEN VON RATTEN, WELCHE ÜBER 13 TAGE ENTWEDER EINE KOHLENHYDRATREICHE ODER EINE FETTREICHE DIÄT MIT ENTWEDER CASEIN, NATIVEM ODER ERHITZTEM LUPINENPROTEIN ERHIELTEN. ....	54
TABELLE 41: CHOLESTERINKONZENTRATION VON RATTEN, WELCHE ÜBER 13 TAGE ENTWEDER EINE KOHLENHYDRATREICHE ODER EINE FETTREICHE DIÄT MIT ENTWEDER CASEIN, NATIVEM ODER ERHITZTEM LUPINENPROTEIN ERHIELTEN. ....	56
TABELLE 42: TRIGLYCERIDKONZENTRATION VON RATTEN, WELCHE ÜBER 13 TAGE ENTWEDER EINE KOHLENHYDRATREICHE ODER EINE FETTREICHE DIÄT MIT ENTWEDER CASEIN, NATIVEM ODER ERHITZTEM LUPINENPROTEIN ERHIELTEN. ....	56
TABELLE 43 : ENZYMAKTIVITÄTEN [NMOL/MG PROTEIN] VON RATTEN, WELCHE ÜBER 13 TAGE ENTWEDER EINE KOHLENHYDRATREICHE ODER EINE FETTREICHE DIÄT MIT ENTWEDER CASEIN, NATIVEM ODER ERHITZTEM LUPINENPROTEIN ERHIELTEN. ....	59
TABELLE 44: GENEXPRESSIONSANALYSEN VON RATTEN, WELCHE ÜBER 13 TAGE ENTWEDER EINE KOHLENHYDRATREICHE ODER EINE FETTREICHE DIÄT MIT ENTWEDER CASEIN, NATIVEM ODER ERHITZTEM LUPINENPROTEIN ERHIELTEN. ....	59
TABELLE 45: HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG VON 10 µM DICKEN GEFRIERSCHNITTEN DER AORTENWURZEL VON APOE KNOCKOUT-MÄUSEN NACH FÄRBUNGEN MITTELS TRICHROM GOLDNER, VON-KOSSA-SILBERFÄRBUNG UND ÖLROT-O.....	64

---

TABELLE 46: CHOLESTERINKONZENTRATIONEN IN PLASMA, VLDL, HDL UND LDL SOWIE IN DER LEBER VON APOE KNOCKOUT-MÄUSEN, DIE ÜBER 16 WOCHEN EINE <i>WESTERN DIET</i> MIT ENTWEDER 10% CASEIN, 10% LUPINENPROTEIN ODER 9.5% CASEIN + 0,5% CYSTEIN ERHIELTEN.....	66
TABELLE 47: TRIGLYCERIDKONZENTRATIONEN IN PLASMA, VLDL, CHYLOMIKRONEN, HDL UND LDL SOWIE IN DER LEBER VON APOE KNOCKOUT-MÄUSEN, DIE ÜBER 16 WOCHEN EINE <i>WESTERN DIET</i> MIT ENTWEDER 10% CASEIN, 10% LUPINENPROTEIN ODER 9.5% CASEIN + 0,5% CYSTEIN ERHIELTEN. ....	67
TABELLE 48: KONZENTRATION AN PLASMA- UND LEBERCYSTEIN, -HOMOCYSTEIN UND-GLUTATHION VON APOE KNOCKOUT-MÄUSEN, WELCHE ÜBER 16 WOCHEN EINE <i>WESTERN DIET</i> MIT 10% CASEIN, LUPINENPROTEIN ODER CASEIN + 0,5% CYSTEIN ERHIELTEN. ....	68
TABELLE 49: GLUTATHIONPEROXIDASEAKTIVITÄT IN PLASMA UND LEBER, VON APOE KNOCKOUT-MÄUSEN, DIE ÜBER 16 WOCHEN EINE <i>WESTERN DIET</i> MIT 10% CASEIN, 10% LUPINENPROTEIN ODER 9,5% CASEIN MIT 0,5% CYSTEIN GEFÜTTERT BEKAMEN. ....	68
TABELLE 50: RELATIVE MRNA-KONZENTRATION IN DER LEBER VON APOE KNOCKOUT-MÄUSEN, DIE ÜBER 16 WOCHEN EINE <i>WESTERN DIET</i> MIT 10% CASEIN, 10% LUPINENPROTEIN ODER 9,5% CASEIN MIT 0,5% CYSTEIN GEFÜTTERT BEKAMEN.....	69
TABELLE 51: LEISTUNGSDATEN VON MÄNNLICHEN FERKELN, WELCHE ÜBER 21 TAGE EINE AD LIBITUM-DIÄT MIT 15% CASEIN, 15% LUPINENPROTEIN DER SORTE BOREGINE ODER 15% LUPINENPROTEIN DER SORTE VITABOR ERHIELTEN .....	70
TABELLE 52: PLASMAGLUKOSEKONZENTRATION VON MÄNNLICHEN FERKELN, WELCHE ÜBER 21 TAGE EINE AD LIBITUM-DIÄT MIT 15% CASEIN, 15% LUPINENPROTEIN DER SORTE BOREGINE ODER 15% LUPINENPROTEIN DER SORTE VITABOR ERHIELTEN.....	71
TABELLE 53: CHOLESTERINKONZENTRATIONEN IN PLASMA UND LIPOPROTEINEN VON MÄNNLICHEN FERKELN, WELCHE ÜBER 21 TAGE EINE AD LIBITUM-DIÄT MIT 15% CASEIN, 15% LUPINENPROTEIN DER SORTE BOREGINE ODER 15% LUPINENPROTEIN DER SORTE VITABOR ERHIELTEN .....	72
TABELLE 54: TRIGLYCERIDKONZENTRATION IN PLASMA UND LIPOPROTEINEN VON MÄNNLICHEN FERKELN, WELCHE ÜBER 21 TAGE EINE AD LIBITUM-DIÄT MIT ENTWEDER 15% CASEIN, 15% LUPINENPROTEIN DER SORTE BOREGINE ODER 15% LUPINENPROTEIN DER SORTE VITABOR ERHIELTEN.....	72
TABELLE 55: CHOLESTERINKONZENTRATIONEN VON PROBANDEN, WELCHE ÜBER 6 WOCHEN TÄGLICH 35 G CASEIN ODER LUPINENPROTEIN ERHIELTEN. ....	77
TABELLE 56: TRIGLYCERIDKONZENTRATIONEN IN PLASMA UND VLDL VON PROBANDEN, WELCHE ÜBER 6 WOCHEN TÄGLICH 35G CASEIN ODER LUPINENPROTEIN ERHIELTEN.....	78
TABELLE 57: KONZENTRATION VON SPEZIFISCHEN AMINOSÄUREN UND AMINOSÄURE-DERIVATEN IM PLASMA VON PROBANDEN, WELCHE ÜBER 6 WOCHEN TÄGLICH 35G CASEIN ODER LUPINENPROTEIN ERHIELTEN. ....	79
TABELLE 58: GLUKOSE-KONZENTRATION VON PROBANDEN, WELCHE ÜBER 6 WOCHEN TÄGLICH 35G CASEIN ODER LUPINENPROTEIN ERHIELTEN. DIE DATEN SIND ZUM EINEN VON ALLEN PROBANDEN, ZUM ANDEREN NACH MÄNNERN UND FRAUEN AUFGETEILT, DARGESTELLT. ....	79
TABELLE 59: RELATIVE MRNA-KONZENTRATIONEN VON SREBP2 UND LDL-REZEPTOR IN MONONUKLEÄREN ZELLEN VON PROBANDEN, WELCHE ÜBER 6 WOCHEN TÄGLICH 35G CASEIN ODER LUPINENPROTEIN ERHIELTEN. ....	80

**Abkürzungsverzeichnis**

a.d.	aqua dest.
ACE	Angiotensin Converting Enzym
ACO	Acyl CoA-Oxidase
AIN	American Institut of Nutrition
Apo-A5	Apolipoprotein A5
ApoE	Apolipoprotein E
AS	Aminosäure
BMI	Body-Mass-Index
BSEP	Bile Salt Export Pump
CETP	Cholesterol Ester Transfer Protein
Chol	Cholesterin
Cyp7A1	Cholesterin-7-alpha-Hydroxylase 1
DEPC	Diethylpyrocarbonat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FM	Feuchtmasse
FSS	Fettsäuresynthase
FXR	Farnesoid X Rezeptor
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GfE	Gesellschaft für Ernährungsphysiologie
GSH	Glutathion
HCl	Salzsäure
HDL	High Density Lipoprotein
HMGS	$\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA-Synthase
HMGR	$\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA-Reduktase
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INSIG	Insulin induziertes Gen
KHK	Koronare Herzkrankheit
KM	Körpermasse
KMZ	Körpermassezunahme
KO-Maus	Knockout-Maus
LDL	Low Density Lipoprotein
LDL-R	Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor
LPL	Lipoproteinlipase

---

LXR	Leber X Rezeptor
MPP	Matrix Gla Protein
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
N	Stickstoff
n.b.	nicht bestimmt
n.s.	nicht signifikant
NAD/H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte/reduzierte Form
NADP/H	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, oxidierte/reduzierte Form
NRC	National Research Council
OPN	Osteopontin
O.S.	organische Substanz
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PPAR alpha	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCAP	SREBP cleavage activating protein
SCD1	Stearoyl-CoA Desaturase 1
SFA	Saturated Fatty Acids
SRE	Sterol Response Elements
SREBP	sterol regulatory element-binding protein
SSD	Sterol Sensing Domain
Std.	Standard
TG	Triglyceride
TM	Trockenmasse
TPE	Totalproteinextrakt
U/min	Umdrehungen pro Minute
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
β-Aktin	beta Aktin

## 1. Einleitung

Dyslipidämien mit erhöhten Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen im Blut zählen zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose. Atherosklerotische Prozesse wiederum bedingen die Entwicklung von komplexen Herz-Kreislauf-Erkrankungen, welche mit über 43% zu den Haupttodesursachen in den westlichen Industrienationen zählen (Statistisches Bundesamt, 2008). Eine wichtige Rolle in der Entstehung von Dyslipidämien spielen dabei die schlechten Ernährungsgewohnheiten des Einzelnen. Insbesondere bei Menschen mit moderat erhöhten, noch nicht medikamentös behandlungsbedürftigen Cholesterinkonzentrationen können Veränderungen in der Ernährung einen positiven Einfluss haben. Nach Empfehlungen des *Adult Treatment Panel of the US National Cholesterol Education Program (NCEP)* lassen sich durch eine reduzierte Aufnahme von gesättigten Fettsäuren in der Nahrung sowie durch eine erhöhte Aufnahme an Ballaststoffen und Pflanzensterolen erhöhte Cholesterinkonzentrationen und damit das Erkrankungsrisiko für Atherosklerose senken. Auch für den Verzehr pflanzlicher Proteine existieren Empfehlungen. Die *Health Claims* der *U.S. Food and Drug Administration* geben für den Verzehr von 25 g Sojaprotein pro Tag eine gesundheitsfördernde Wirkung an (1999). Mehrere Studien zeigten, dass durch die Aufnahme von Sojaprotein die Plasmakonzentrationen an Cholesterin (Anderson et al. 1995, Sirtori et al. 1995, Iritani et al. 1996, Sirtori et al. 1998, Tovar et al. 2002, Koba et al. 2003) und Triglyceriden (Tovar et al. 2002, Ascencio et al. 2004, Shukla et al. 2007) bei Mensch und Tier signifikant gesenkt werden konnten.

Sojabohnen zählen zur Familie der Hülsenfrüchtler (Leguminosae). Weltweit sind Leguminosen aufgrund ihres hohen Nährstoffgehaltes ein wichtiger Bestandteil der Ernährung von Mensch und Tier. Die überwiegende Mehrheit der Leguminosen besitzt einen sehr hohen Eiweißgehalt, da die Pflanzen mit Hilfe von spezifischen Bakterien an ihren Wurzeln den Stickstoff der Luft binden und mit diesem wertvolles Protein synthetisieren (Lengauer et al.). Insbesondere bei veganer Kost sind sie daher in der menschlichen Ernährung unverzichtbar. Ein weiterer Vertreter der Leguminosen ist die Lupine (Abb.1). Das hochwertige Lupinenkorn wird in einigen Gebieten der Erde, z.B. in Südamerika und den Mittelmeerländern, bereits seit mehr als 3000 Jahren als Grundnahrungsmittel genutzt (Gladstones et al. 1998). Körner wilder Formen der Lupinen sind jedoch aufgrund ihres hohen Alkaloidgehaltes giftig und dadurch nur in behandelter Form für den Verzehr geeignet (Rahma et al. 1984). Schon sehr früh wurden daher alkaloid- bzw. bitterstoffarme Pflanzen ausgelesen und für den Anbau weiter vermehrt (D'Agostina et al. 2006). Durch gezielte

Züchtung wurden somit alkaloidarme, sog. Süßlupinen, geschaffen. In südeuropäischen Ländern, wie Portugal und Italien, werden Produkte aus Süßlupinen bereits vielfältig in der Humanernährung eingesetzt. Neben dem weltweit führenden Anbau der Lupinen in Australien mit über 1 Million ha/Jahr, ist Deutschland mit über 33.000 ha/Jahr (2006) in Europa Hauptanbaugebiet. Auch in Deutschland erfreuen sich Produkte aus Lupinen, z.B. als Müsli, Brot oder Fleischersatz („Lopino“ = Lupinen-Tofu), steigender Beliebtheit.

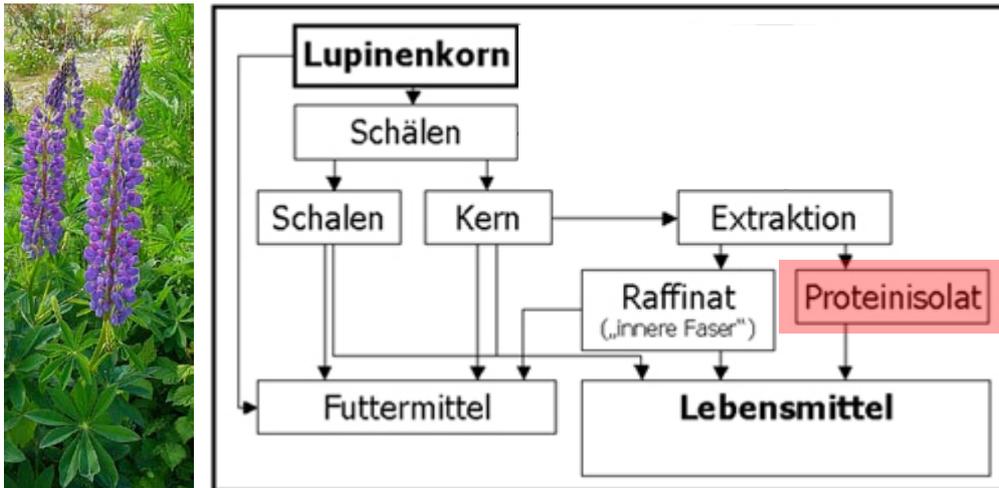


Abbildung 1: *L. angustifolius* sowie ein Schema zu Aufarbeitung und Nutzungsmöglichkeit des Lupinenkorns (www.produkte-aus-lupine.de)

Hauptvertreter europäischer Süßlupinen sind weiß blühende (*Lupinus albus*), gelb blühende (*Lupinus luteus*) oder blau blühende Lupinen (*Lupinus angustifolius*). Lupinen zeichnen sich durch einen, mit Soja vergleichbaren hohen Proteingehalt aus (30-40%). Dieses Protein besitzt aufgrund seiner günstigen Aminosäurezusammensetzung eine hohe Biologische Wertigkeit. Die Gehalte an wertmindernden Inhaltsstoffen, wie z.B. Trypsininhibitoren, sind in Lupinen im Vergleich zu Soja gering. Auch der Gehalt an Isoflavonen ist in Lupinen sehr niedrig (Muzquiz et al. 1998, Katagiri et al. 2000, Sirtori et al. 2004, Wait et al. 2005, Bettzieche et al. 2008 a). Aufgrund der hohen genetischen Vielfalt der Lupinen bedurfte es bis dato keinerlei gentechnischen Eingriffe in der Zucht (Goldscheider et al. 2009). Im Gegensatz dazu führt der Einsatz von gentechnisch veränderten Sojaprodukten in der Nahrung häufig zu kontroversen Diskussionen bei den Verbrauchern.

Aufgrund der engen botanischen Verwandtschaft von Lupinen- und Sojapflanzen lag die Vermutung nahe, dass auch Protein von Lupinensamen gesundheitsfördernde Wirkungen haben könnte. Aktuelle Studien dazu zeigten, dass Proteine der Lupine Cholesterinkonzentrationen im Plasma von hypercholesterinämischen Ratten (Sirtori et al. 2004, Bettzieche et al. 2008 b), Kaninchen (Marchesi et al. 2008) und Schweinen (Martins et

al. 2005) signifikant gesenkt haben. Zudem wurde beobachtet, dass durch Lupinenprotein auch Triglyceridkonzentrationen im Plasma von Ratten gesenkt werden konnten (Spielmann et al. 2007, Bettzieche et al. 2008 a). Als Ursache für diese hypolipämischen Wirkungen wurde die Beeinflussung der Expression zellulärer Transkriptionsfaktoren wie *sterol regulatory element binding protein* (SREBP) und deren Zielgenen nachgewiesen. SREBPs sind maßgeblich an der Regulation des Lipidstoffwechsels beteiligt und aktivieren eine Vielzahl von Genen, die einen unmittelbaren Einfluss auf die Lipidhomöostase im Organismus ausüben (Brown & Goldstein 1997, Horton & Shimomura 1999, Edwards et al. 2000, Sakakura et al. 2001). SREBP 1c reguliert die Expression von Genen des Triglyceridmetabolismus, welche z.B. für die Biosynthese von Fettsäuren verantwortlich sind (Shimano et al. 1999). SREBP 2 reguliert dabei Gene des Cholesterinstoffwechsels, welche z.B. die Biosynthese und die intestinale Aufnahme des Sterols steuern (Vallett et al. 1996, Horton et al. 2002).

Es existieren bis dato einige Studien an Tiermodellen, die zeigen, dass Lupinenprotein eine positive Wirkung auf die Plasmalipidkonzentrationen ausüben kann. Hypercholesterinämien bzw. Hypertriglyceridämien als Risikofaktoren für Atherosklerose können durch Protein der Lupine verbessert werden. Ob Lupinenprotein auch einen direkten Einfluss auf die Atherogenese im tierischen Organismus ausüben kann, ist bislang kaum untersucht worden. Auch zum Einsatz von Lupinenprotein im menschlichen Organismus existieren nahezu keine Untersuchungen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkungsweise von Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel weiter zu charakterisieren. Dabei sollten zum einen Aussagen zur Verdaulichkeit des Proteins getroffen werden, zum anderen sollte untersucht werden, wie die Wirksamkeit des Lupinenproteins durch industrielle Verarbeitung oder verschiedene Diätkomponenten beeinflusst wird. Des Weiteren sollte erstmals an einem knockout-Modell untersucht werden, ob Lupinenprotein die Atherogenese beeinflussen kann. Um festzustellen, ob die gewonnen Erkenntnisse aus den Tierstudien zur hypolipämischen Wirkung von Lupinenprotein auch auf den Menschen übertragbar sind, wurde schließlich eine umfangreiche Interventionsstudie an Probanden geplant. Insgesamt sollten im Rahmen dieser Arbeit 5 Versuche an 4 verschiedenen Versuchsmodellen durchgeführt werden. Es ist bekannt, dass die Zusammensetzung von Lupinenprotein, und damit dessen potentielle Wirkung, in Abhängigkeit von der Sorte sowie von Klima- und Bodenverhältnissen relativ großen Schwankungen unterliegen kann. Um die zu erzielenden Effekte bei den

unterschiedlichen Spezies gut miteinander vergleichen zu können, wurde daher in allen 5 Versuchen Protein der blauen Lupine der Sorte Boregine eingesetzt.

In 2 Versuchen am Modelltier Ratte sollte zunächst die Verdaulichkeit des Lupinenproteins sowie dessen Beeinflussbarkeit untersucht werden. Die Verdaulichkeit eines Proteins kann das Wachstum eines Tieres und damit direkt dessen Energie- und Lipidstoffwechsel beeinflussen. Der Stickstoff des Proteins ist dabei eine entscheidende Einflussgröße. Wird ein großer Teil des mit dem Nahrungsprotein aufgenommenen Stickstoffs wieder mit Faeces ausgeschieden, ist die Verdaulichkeit des Proteins als gering zu beurteilen. Da in Studien zur Wirksamkeit von Proteinen auf den Lipidstoffwechsel meist Vergleiche zu Kontrollproteinen (z.B. Casein) gezogen werden, ist es zur Einschätzung potentieller Unterschiede von Bedeutung, ob eine ähnliche Verdaulichkeit der Testproteine vorliegt. Insbesondere Proteine von Leguminosen sollten aufgrund eventuell enthaltener antinutritiver Inhaltsstoffe auf deren Verdaulichkeit untersucht werden. In früheren Versuchen an Ratten wurde gezeigt, dass eine Diät mit Lupinenmehl zu einer geringeren Wachstumsentwicklung der Tiere und zu einer höheren N-Exkretion im Urin führte, als eine Diät mit Laktalbumin (Rubio et al. 1995). In einem ersten Versuch im Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Körpermassezunahme sowie die N-Ausscheidung in Urin und Faeces bei Aufnahme von entweder 20% Lupinenproteindiät oder 20% Caseindiät analysiert werden.

Ein weiterer Aspekt, der zur Beurteilung der Wirksamkeit eines Proteins eine große Bedeutung hat, ist dessen Verarbeitung. Im Hinblick auf einen industriellen Einsatz in Lebensmitteln ist Lupinenprotein einer Vielzahl von chemischen und physikalischen Einflüssen ausgesetzt. Viele dieser Faktoren können die Bioaktivität des Proteins maßgeblich beeinflussen. So sind die bei der Isolation und Aufbereitung des Proteinisolates auftretenden Bedingungen ebenso bedeutend, wie die Verarbeitung des Lebensmittels. Die thermischen Behandlungen des Proteins sind dabei von großer Bedeutung, denn ab 60°C nehmen Denaturierung und damit Strukturveränderungen des Proteins rasch zu. Dennoch sind Hitzebehandlungen von Lebensmitteln u.a. zur Abtötung mikrobieller Keime für einwandfreie hygienische Bedingungen unabdingbar. Daher sollte in einem zweiten Versuch, ebenfalls an Ratten, untersucht werden, ob sich die Wirkung von nativen und erhitzten Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel unterscheidet. Neben der Verarbeitung des Lupinenproteins sollte ein weiterer Aspekt untersucht werden, nämlich ob verschiedene Kostformen die Wirksamkeit des Proteins beeinflussen. Es wurde am Rattenmodell bereits gezeigt, dass Lupinenprotein unter hyperlipämischen Bedingungen effektiver wirkt, als unter normolipämischen (Bettzieche et al. 2008 a). Da in der menschlichen Ernährung der westlichen Industrienationen

nicht nur eine zu hohe Aufnahme an Fetten zu verzeichnen ist, sondern auch eine übermäßige Zufuhr an zumeist einfachen Kohlenhydraten, wurden in jenem Versuchsmodell das native und erhitzte Lupinenprotein im Vergleich zu Casein sowohl in einer kohlenhydratreichen, als auch in einer fettreichen Diät verfüttert. Die kohlenhydratreiche Diät enthielt dabei 20% Glukose sowie 20% Fruktose, die fettreiche Diät 30% Fett. Für den Konsum einer *high fructose* Diät ist beschrieben, dass u.a. Plasma- und Leberkonzentrationen an Cholesterin und Triglyceriden negativ beeinflusst werden (Abdulla et al. 2009).

In einer weiteren Studie sollte untersucht werden, ob durch Lupinenprotein die Atherogenese beeinflusst werden kann. Die Mehrzahl der Studien mit Lupinenprotein konzentrierte sich bis dato auf die potentielle Regulation von Dyslipidämien (Sirtori et al. 2004, Spielmann et al. 2007, Bettzieche et al. 2008 a und 2008 b) als Risikofaktor der Atherosklerose. Ob das Lupinenprotein neben seinem Einfluss auf den Lipidkonzentrationen auch die Entstehung bzw. Entwicklung der Atherosklerose als solche beeinflussen kann, ist noch nicht ausreichend untersucht. In Versuchen mit Kaninchen wurde gezeigt, dass durch die Fütterung von Sojaprotein im Vergleich zu Casein Größe und Ausdehnung von atherosklerotischen Läsionen signifikant gesenkt bzw. die Zusammensetzung der Plaques positiv verändert werden konnten (Castiglioni et al. 2003). In einer Studie nach Marchesi et al. (2008) konnte ebenfalls an Kaninchen durch Proteinisolat der weißen Lupine die Progression der Atherosklerose in der *arteria carotis* im Vergleich zu Casein gesenkt werden. Die Ursachen dieser atheroprotektiven Wirkung sind bislang jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Ein weiteres, weit verbreitetes Versuchsmodell zur Untersuchung der Atherosklerose sind apoE knockout-Mäuse. Hier ähneln Ausmaß und Verlauf der Plaqueentwicklung sehr stark der im menschlichen Organismus (Zhang et al. 1992, Nakashima et al. 1994). Studien an diesem Versuchsmodell haben ergeben, dass Ausmaß und Zusammensetzung der Läsionen durch Sojaprotein positiv beeinflusst werden konnten (Nagarajan et al. 2007). Studien mit Lupinenprotein an apoE knockout-Mäusen fehlen bislang. Es sollte daher im Rahmen dieser Arbeit in einem dritten Versuch untersucht werden, ob Protein der *L. angustifolius* an apoE knockout-Mäusen einen Einfluss auf die Atherosklerose ausübt. Es sollte außerdem untersucht werden, welche Bestandteile des Lupinenproteins für dessen potentielle Wirkungen verantwortlich sein könnten. Es ist bekannt, dass auch einzelne Aminosäuren hypolipämisch und antiatherogen wirken (Sanchez et al. 1991, Potter et al. 1995, Lin et al. 2004, Lin and Yin 2008), auch wenn nicht abschließend geklärt ist, welche Aminosäuren genau diese Wirkungen verursachen. Da hypolipämisch wirkende Proteine wie Sojaprotein

(Shukla et al. 2007), Fischprotein (Shukla et al. 2006) und auch Lupinenprotein (Spielmann et al. 2007, Bettzieche et al. 2008) höhere Konzentrationen der Aminosäure Cystein enthalten, als Casein, sollte außerdem getestet, ob eine Zulage an Cystein zur Caseindiät Wirkungen auf die Atherogenese ausübt.

Die bislang beobachteten Effekte von Lupinenprotein bei Nagern geben einen guten Einblick, welche Wirkungen das Protein im tierischen Organismus ausübt. Nager haben als Labortiere den Vorteil, dass sie sehr gut unter standardisierten Versuchsbedingungen gehalten und gefüttert werden können. Dennoch unterscheiden sie sich in wesentlichen Stoffwechselwegen vom Menschen (Shrago et al. 1971, Swierczynski et al. 2000, Letexier et al. 2003, Mahley et al. 2006). Insbesondere bei der Verteilung des Cholesterins in den Lipoproteinen gibt es große Unterschiede. Die üblicherweise niedrige LDL- und hohe HDL-Cholesterinkonzentration bei Ratten bzw. Mäusen schützen die Tiere in der Regel vor Dyslipidämien bzw. Atherosklerose. Im Menschen hingegen sind die Cholesterinkonzentrationen in den LDL höher als die in den HDL. Um die LDL-Cholesterinkonzentrationen der Tiere anzuheben, wurde in den Studien mit Ratten und Mäusen Cholesterin bzw. Natrium-Choleat mit der Diät gefüttert. Damit sollte eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen möglich sein. Dennoch können die Wirkungen auf die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen durch Lupinenprotein im Nager nicht in exakt gleicher Weise auch auf den Mensch übertragen werden, zumal exzessive Mengen an Cholesterin und Gallensäuren in der menschlichen Ernährung nicht vorkommen. Bevor das Protein direkt am Menschen eingesetzt werden konnte, sollten die erworbenen Kenntnisse am Nager an einem Tiermodell bestätigt werden, welches noch besser mit dem humanen Stoffwechsel vergleichbar ist.

Dafür ist das Schwein ein gut geeignetes Modell. Neben hoher genetischer Ähnlichkeit zum Menschen (ca. 90% aller exprimierten Sequenzen zwischen Mensch und Schwein sind gleich) hat das Schwein auch viele physiologische Parallelen (Körpermasse, Verdauungssystem, Herz-Kreislauf-System). Die Verteilung des Cholesterins in den Lipoproteinen stimmt ebenfalls gut mit dem Menschen überein (Carey, 1997). Da es an Schweinen bislang nur vereinzelt Studien mit Lupinensamen gab (Martins et al. 2005), sollte in einem vierten Versuch Protein von *L. angustifolius* der Sorte Boregine und der Sorte Vitabor eingesetzt und deren Wirkungen auf den Lipidstoffwechsel untersucht werden. Beide Proteine zeigten sich in früheren Studien als besonders wirkungsvoll (Bettzieche et al. 2008 b).

In einer 5. Studie sollte Lupinenprotein schließlich direkt am Menschen eingesetzt werden. Da insbesondere erhöhtes LDL-Cholesterin einen Hauptrisikofaktor für die Entwicklung

stoffwechselbedingter Krankheiten wie Atherosklerose darstellt, war es primäres Ziel dieser Studie zu testen, ob Lupinenprotein einen günstigen Effekt auf die LDL-Cholesterinkonzentrationen ausüben kann. Frühere Humanstudien haben gezeigt, dass Sojaprotein im Vergleich zu Casein die Cholesterinkonzentrationen im Plasma von Probanden senken konnte (Anderson et al. 1995, Sirtori et al. 2007, Sirtori et al. 2009). Daher sollte nun erstmals untersucht werden, ob auch die Aufnahme von Lupinenprotein im Vergleich zu Casein die Cholesterinkonzentrationen im Plasma von Probanden beeinflussen kann. Die verabreichte Lupinenproteinmenge erfolgte in Anlehnung an die *Health Claims* der *Food and Drug Administration*, welche für einen Konsum von 25 g Sojaprotein / Tag einen gesundheitsfördernden Effekt angibt. Da in der Literatur zu Lupinenprotein Vergleichswerte am Menschen fehlen, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit 35 g / d eine etwas höhere Menge eingesetzt, um einen möglichst deutlichen Effekt erzielen zu können. Um zu untersuchen, ob eine potenzielle Beeinflussung der Lipidkonzentrationen in Analogie zu diversen Tierstudien (Spielmann et al. 2007, Bettzieche et al. 2008 a) auch im menschlichen Organismus mit einer Änderung der relativen mRNA-Konzentrationen von SREBP 2 und LDL-Rezeptor einhergeht, wurden deren Expressionen in mononukleären Blutzellen bestimmt.

## 2. Material und Methoden

Die in den Versuchen eingesetzten Proteinisolate der blauen Lupine (*Lupinus angustifolius*) der Sorte Boregine bzw. der Sorte Vitabor wurden vom Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik (Freising, Deutschland) aus entölter Lupine extrahiert (Wäsche et al. 2001). Die Proteinisolate wurden entweder als Totalproteinextrakt (TPE) oder als eine Conglutin- $\gamma$ -reiche Teilfraktion eingesetzt. Der Gehalt an Alkaloiden im Protein, hauptsächlich Lupanin, Angustifolin und 13- $\alpha$ -Hydroxylupanin, betrug 0,0016%. Als Kontrollprotein wurde Casein unverändert eingesetzt (Meggle, Wasserburg, Deutschland). Die Rohnährstoffe der Proteine wurden nach den allgemeinen Bestimmungen des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (Naumann et al. 1993) bestimmt. Die Messung des Tryptophangehaltes (Fontaine et al. 1998) der eingesetzten Proteine erfolgte analog der Beschreibung unter 2.6.1.2. und diente als Berechnungsgrundlage für die Tryptophankonzentration in den Diäten. Die Bestimmung des Gehaltes an den Isoflavonen Genistein, Genistin und Daidzein in den Proteinen erfolgte per HPLC (Sung et al. 2004, siehe 2.6.1.3.). Für alle in den vorliegenden Versuchen eingesetzten Proteine lagen die Konzentration an Isoflavonen unterhalb der Nachweisgrenze von 2,22  $\mu\text{mol/kg}$  für Genistein, 1,18  $\mu\text{mol/kg}$  für Daidzein und 1,39  $\mu\text{mol/kg}$  für Genistin. Die Analyse der Aminosäuren in den Diäten erfolgte nach Bassler & Bucholz (1993), wie unter 2.6.1.1. beschrieben. Die Rohnährstoffe der eingesetzten Proteine sowie die Aminosäurezusammensetzung der Versuchsdäten sind jeweils unter „Charakterisierung der Diät-Proteine“ in den entsprechenden Versuchsbeschreibungen dargestellt.

### 2.1. *Untersuchung zur Verdaulichkeit von Lupinenprotein (Versuch 1)*

#### 2.1.1. Versuchsaufbau

##### 2.1.1.1. Versuchstiere und Diäten

Für die Untersuchungen zur Verdaulichkeit von Lupinenprotein wurden 14 männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) eingesetzt. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere etwa 7-8 Wochen alt, die mittlere Körpermasse betrug  $238 \pm 18$  g. Die Ratten wurden zufällig auf zwei Gruppen mit jeweils 7 Tieren aufgeteilt. Die erste Gruppe erhielt Casein als Kontrolle, die zweite Gruppe die Conglutin- $\gamma$ -reiche Teilfraktion aus isoliertem Lupinenprotein der Sorte Boregine. Beide Diäten enthielten 20% Protein, 10% Fett sowie Vitamine und Mineralstoffe nach den Empfehlungen des *American Institute of*

*Nutrition* (AIN, Reeves et al. 1993). Die eingewogenen Vitamine und Mineralstoffe wurden auf 200 g (entspricht 5% der Gesamtdiät) mit Zucker ergänzt und der Trockenmischung beigelegt. Außerdem erfolgte eine Zulage von 1% Cholesterin und 0,5% Natrium-Choleat, um das Lipoproteinprofil der Ratten einem humanen Verteilungsmuster anzugleichen. Die Zusammensetzung der Versuchsdieten ist in Tabelle 1 dargestellt. Alle Zutaten der Trockenmischung wurden gut vermengt und anschließend mit dem Fett und etwas Wasser zu einem Teig verknetet. Nach Gefrieren über Nacht bei -20°C wurden die Diäten gefriergetrocknet.

Zu Beginn der insgesamt 9-tägigen Fütterungsperiode durchliefen die Tiere zunächst eine Eingewöhnungsphase von 4 Tagen, währenddessen von Standardfutter (Nagerfutter 1324, Altromin, Lage, Deutschland) auf Diät umgestellt wurde. Die Unterbringung erfolgte in gewöhnlichen Makrolonkäfigen. Anschließend erfolgte die Unterbringung über 5 Tage in Stoffwechsellkäfigen, in denen Urin und Kot der Tiere aufgefangen werden konnten. Die Haltung der Tiere erfolgte nach den Richtlinien für Haltung und Pflege von Labortieren bei  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  Raumtemperatur, 50-60% Luftfeuchte und einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Ratten erhielten für adäquates Wachstum 16 g Futter pro Tag, Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung. Die Futtermittelaufnahme wurde täglich, die Gewichtsentwicklung wöchentlich dokumentiert.

**Tabelle 1: Zusammensetzung der Diäten aus Versuch 1**

Komponente	Caseindiät	Lupinenproteindiät
	-----[g/kg Diät]-----	
Casein	200	-
Lupinenprotein	-	200
Stärke	375	375
Zucker	200	200
Schweineschmalz	100	100
Cholesterin	10	10
Na-Choleat	5	5
Zellulose	50	50
DL-Methionin-Zusatz <sup>1</sup>	10	10
Vitamin- und Mineralstoffmischung <sup>2</sup>	50	50

<sup>1</sup> Der proteinabhängige Methioninzusatz ergibt sich aus den benötigten Mengen an Methionin zur Deckung des Bedarfs an S-haltigen Aminosäuren gemäß AIN. Die eingewogene Menge an Methionin wurde jeweils auf 10 g mit Zucker ergänzt und der Trockenmischung beigelegt.

<sup>2</sup> Die Zusammensetzung ist in den Tabellen 2 und 3 dargestellt

**Tabelle 2: Vitaminmischung der Diäten aus Versuch 1**

<b>Vitamine (Konzentration)</b>	<b>Bedarf/kg</b>	<b>Einwaage [g/kg Diät]</b>
Vitamin A (5000 IE/g)	4000 IU	0,8
Vitamin D3 (500.000 IE/g)	1000 IU	0,002
Vitamin K (51%)	0,75 mg	0,00147
Thiamin B1 (100 %)	5,0 mg	0,005
Riboflavin B2 (80%)	6,0 mg	0,0075
Pyridoxine B6 (100%)	6,0 mg	0,006
Nicotinsäure (99%)	30,0 mg	0,0303
Folsäure (100%)	2,0 mg	0,002
Ca-Pantothenat (100%)	15,0 mg	0,015
Biotin (2%)	0,2 mg	0,01
Vitamin B12 (0,1%)	0,025 mg	0,025
Cholinchlorid (50%)	1000 mg	2,0
Vitamin E-Acetat (50%)	75 IU	0,1439

**Tabelle 3: Mineralstoffmischung der Diäten aus Versuch 1**

<b>Mineralstoff</b>	<b>Bedarf [mg/kg]</b>	<b>Mineralstoffquelle</b>	<b>Anteil der Elemente</b>	<b>Einwaage [g/kg Diät]</b>
Ca	5000	Calciumcarbonat	38% Ca	8,023
		Dicalcium-	25% Ca	7,805
P	1561	Phosphat	20% P	
Mg	507	Magnesiumoxid	50% Mg	1,014
K	3600	Kaliumsulfat	45% K	8,000
Na	1019	NaCl	39,3% Na	2,593
Cl	1571	"	60,2% Cl	
Fe	35	Eisensulfat	30% Fe	0,117
Zn	30	Zinkoxid	79% Zn	0,038
Mn	10	Manganoxid	62% Mn	0,016
Cu	6	Kupfersulfat	25% Cu	0,024
Se	0,15	Natriumselenit	45% Se	0,00033
Jod	0,2	Calciumjodat	62% J	0,00032

### 2.1.1.2. Charakterisierung der Diät-Proteine

Die Rohnährstoffe der eingesetzten Proteine Casein und Lupinenprotein der Sorte Boregine sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Aminosäurezusammensetzung der Versuchsdiäten ist in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 4: Rohnährstoffzusammensetzung der Versuchsproteine aus Versuch 1**

<b>Protein</b>	<b>Trockenmasse [% an O.S.]</b>	<b>Rohasche -----[g/kg Trockenmasse]-----</b>	<b>Rohprotein</b>	<b>Rohfett</b>	<b>Rohfaser</b>
Casein	90,1	51,0	948,6	2,2	8,9
Lupinenprotein	93,6	37,4	976,0	7,5	8,6

O.S. = Originalsubstanz

**Tabelle 5: Aminosäurezusammensetzung der Diäten aus Versuch 1**

	<b>Caseindiät</b>	<b>Lupinenproteindiät</b>
	-----[g/kg Diät]-----	
Alanin	5,5	5,4
Arginin	6,8	20,2
Asparaginsäure	13,4	17,9
Cystein	0,8	2,4
Glutaminsäure	42,9	42,3
Glycin	3,6	7,3
Isoleucin	9,3	7,6
Leucin	17,6	12,8
Lysin	15,7	7,9
Methionin	7,8	5,7
Phenylalanin	9,8	7,1
Prolin	20,8	6,8
Serin	10,9	8,3
Threonin	8,1	5,5
Tryptophan	1,9	1,9
Tyrosin	11,6	6,6
Valin	5,5	5,4

### 2.1.2. Probennahme

Die Tiere wurden nach Ethernarkose dekapitiert, nachdem sie 2 h vor Tötung eine letzte Futterration von 3 g erhielten. Das Vollblut wurde in heparinisierten Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgefangen und anschließend zur Plasmagewinnung 10 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Die Lagerung des Plasmas erfolgte bei -20°C. Die Lebern der Tiere wurden entnommen, gewogen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte abhängig von den späteren Analysen bei -20 bzw. -80°C. Des Weiteren wurde vom im Dünndarm enthaltenen Chymus eine Probe entnommen und bei -20°C eingefroren und gelagert. Urin und Faecesproben der Tiere wurden täglich gesammelt. Zwecks Bindung des freien Ammoniaks wurden täglich jeweils 3 ml 2 N Schwefelsäure in die Urinauffanggefäße gegeben (Hartmuth-Hoene, 1988). Zu Versuchsende wurde das Gesamtvolumen an Urin bzw. die Gesamtmenge an Faeces bestimmt.

### 2.1.3. Analytik

Neben den ermittelten Leistungsparametern wie Körpermasse (KM), Körpermassezunahme (KMZ) sowie absoluter und relativer Lebermasse wurden in diesem Versuch die Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Leber bestimmt. Weiterhin erfolgte die Analytik der Triglyceridkonzentrationen in Plasma, Leber und Faeces (siehe 2.6.2.3. bzw. 2.6.3.2.). Zur Beurteilung der scheinbaren Verdaulichkeit der Proteine sowie deren Verstoffwechslung wurden die Stickstoffkonzentrationen in Urin, Faeces und Chymus analysiert (siehe 2.6.3.1.).

### 2.1.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit MINITAB-Software (Minitab, State Collage, PA, USA). Die Daten wurden über ONE-WAY ANOVA mit dem Student's t-Test verrechnet. Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 5\%$  ( $P \leq 0,05$ ) wurden als statistisch signifikante bewertet.

## 2.2. *Einfluss von nativem und erhitztem Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel in Abhängigkeit von der Diätzusammensetzung (Versuch 2)*

### 2.2.1. Versuchsaufbau

#### 2.2.1.1. Versuchstiere und Diäten

In diesem Versuch wurden 60 männliche wachsende Sprague-Dawley-Ratten mit einem mittleren Anfangsgewicht von  $204 \pm 8$  g in einem zweifaktoriellen Versuchsmodell eingesetzt. Als Einflussfaktoren wurden die Proteinart und die Diätzusammensetzung untersucht. Im Hinblick auf potentielle lebensmitteltechnologische Verarbeitungen des Lupinenproteins sollte die Wirkung von nativem gegenüber erhitztem Lupinenprotein der Sorte Boregine als Conglutin- $\gamma$ -reiche Teilfraktion im Vergleich zu Casein untersucht werden. Außerdem sollte die Wirkung des Proteins als Bestandteil einer kohlenhydratreichen oder einer fettreichen Diät verglichen werden. Somit ergaben sich in der Summe 6 unterschiedliche Gruppen zu je 10 Tieren, welche zufällig in die entsprechenden Gruppen aufgeteilt wurden. Die Tiere wurden bedarfsdeckend über 13 d gefüttert. Aufgrund des unterschiedlichen Energiegehaltes der beiden Diätenvarianten ergab sich für eine isokalorische Fütterung eine unterschiedlichen Fütterungsmenge von 17 g/Tier/d (kohlenhydratreiche Diät) bzw. mit 13,6 g/Tier/d (fettreiche Diät). Um insgesamt eine gleiche absolute Proteinaufnahme der Tiere

sicherzustellen, musste der Proteingehalt in den Diätvarianten variiert werden. Mit der kohlenhydratreichen Diät wurden demnach 20% Protein verabreicht, mit der fettreichen Variante 25%. Neben dem Protein und den unterschiedliche Mengen an Fett (8 bzw. 29,5%) bzw. Kohlenhydraten (60 bzw. 30,5%) enthielten die Diäten weiterhin 1,0 bzw. 1,25% Cholesterin, 0,5 bzw. 0,625% Na-Choleat sowie Vitamine und Mineralstoffe gemäß AIN. Die Zusammensetzung der Diäten ist in Tabelle 6 dargestellt. Zum Decken des Bedarfs an essentiellen Aminosäuren (AS) wurde ein Aminosäurezusatz (Tabelle 7 und 8) für die jeweiligen Diätgruppen zugefügt.

Die Tiere wurden während des Versuchszeitraumes einzeln in Makrolon-Käfigen bei  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  Raumtemperatur und 50-60% Luftfeuchte sowie einem 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Wasser stand ad libitum zur Verfügung, die Fütterung erfolgte 2 x täglich. Die Futteraufnahme der Tiere wurde täglich, die Gewichtsentwicklung wöchentlich dokumentiert.

**Tabelle 6: Zusammensetzung der Diäten aus Versuch 2**

Komponente	Kohlenhydratreiche Diät	Fettreiche Diät
	-----[g/kg Diät]-----	
Protein (Casein, LupNat oder LupErh) <sup>1</sup>	200	250
Fruktose	200	-
Zucker	200	-
Stärke	200	305
Schweineschmalz	80	295
Cholesterin	10	12,50
Na-Choleat	5	6,25
Aminosäure-Zusatz <sup>2</sup>	10	12,50
Zellulose	45	56,30
Vitamin- und Mineralstoff -Mischung <sup>3</sup>	50	62,50

<sup>1</sup> LupNat = Lupinenprotein nativ, LupErh = Lupinenprotein erhitzt

<sup>2</sup> Die Zusammensetzung des Aminosäure-Zusatzes ist in Tabelle 7 und 8 dargestellt.

<sup>3</sup> Der Vitamin- und Mineralstoffmischung ist in den Tabellen 9 und 10 dargestellt.

**Tabelle 7: Aminosäurezusatz für kohlenhydratreiche Diät aus Versuch 2**

	Caseindiät	Diät mit nativem Lupinenprotein	Diät mit erhitztem Lupinenprotein
	-----[g/kg Diät]-----		
Threonin	-	0,56	0,56
Valin	-	1,44	1,44
Lysin	-	1,80	1,80
Methionin	3,64	6,20	6,20
Summe AS	3,64	10,00	10,00
Zucker	6,36	-	-
AS-Zusatz insgesamt	10,00	10,00	10,00

**Tabelle 8: Aminosäurezusatz für fettreiche Diät aus Versuch 2**

	Caseindiät	Diät mit nativem Lupinenprotein	Diät mit erhitztem Lupinenprotein
	-----[g/kg Diät]-----		
Threonin	-	0,70	0,70
Valin	-	1,80	1,80
Lysin	-	2,25	2,25
Methionin	3,15	7,75	7,75
Summe AS	3,64	12,50	12,50
Zucker	9,35	-	-
AS-Zusatz insgesamt	12,50	12,50	12,50

**Tabelle 9: Vitaminmischung aller Diäten aus Versuch 2**

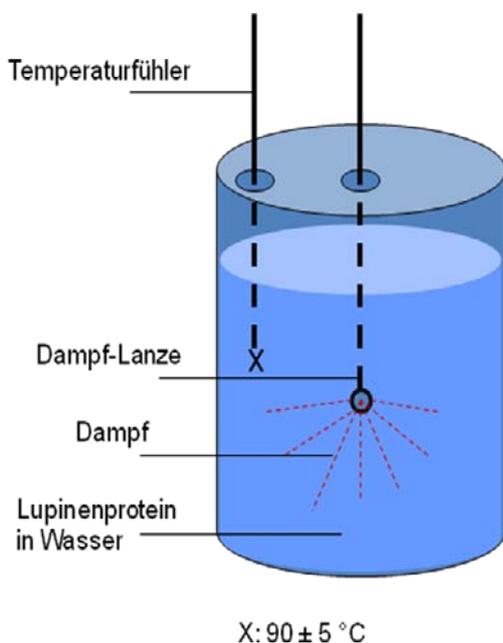
Vitamine (Konzentration)	Bedarf/kg	Einwaage [g/kg Diät]
Vitamin A (5000 IE/g)	5000 IU	1,0
Vitamin D3 (500.000 IE/g)	1000 IU	0,0020
Vitamin K (51%)	0,75 mg	0,0015
Thiamin B1 (100 %)	5,0 mg	0,0050
Riboflavin B2 (80%)	6,0 mg	0,0075
Pyridoxine B6 (100%)	6,0 mg	0,0060
Nicotinsäure (99%)	30,0 mg	0,0303
Folsäure (100%)	2,0 mg	0,0020
Ca-Pantothenat (100%)	15,0 mg	0,0150
Biotin (2%)	0,2 mg	0,0100
Vitamin B12 (0,1%)	0,025 mg	0,0250
Cholinchlorid (50%)	1000 mg	2,0
Vitamin E-Acetat (50%)	75 IU	0,1439

**Tabelle 10: Mineralstoffmischung aller Diäten aus Versuch 2**

Mineralstoff	Bedarf [mg/kg]	Mineralstoffquelle	Anteil der Elemente	Einwaage [g/kg]
Ca	5000	Calciumcarbonat	38% Ca	8,023
		Dicalcium-	25% Ca	7,805
P	1561	Phosphat	20% P	
Mg	507	Magnesiumoxid	50% Mg	1,014
K	3600	Kaliumsulfat	45% K	8,000
Na	1019	NaCl	39,3% Na	2,593
Cl	1571	"	60,2% Cl	
Fe	35	Eisensulfat	30% Fe	0,117
Zn	30	Zinkoxid	79% Zn	0,038
Mn	10	Manganoxid	62% Mn	0,016
Cu	6	Kupfersulfat	25% Cu	0,024
Se	0,15	Natriumselenit	45% Se	0,00033
Jod	0,2	Calciumjodat	62% J	0,00032

### 2.2.1.2. Charakterisierung der Diät-Proteine

Das Proteinisolat der blauen Lupine der Sorte Boregine wurde standardmäßig isoliert. Ein Teil davon wurde ohne weitere Behandlung als „native“ Variante im Versuch eingesetzt. Der andere Teil, die „erhitzte“ Variante, wurde zusätzlich thermisch denaturiert. Dafür wurde das Lupinenprotein in einem abgeschlossenen Gefäß in Wasser suspendiert und anschließend mittels Dampfzelle erhitzt (siehe Abb. 2). Über die Lanze wurde gesättigter Dampf mit einer Temperatur von 120°C unter Druck in die Lösung eingedüst. Nach Erreichen von 85-95°C am Messpunkt (X) wurde die Temperatur für 30 min gehalten.



**Abbildung 2: Schema der Lupinenproteinerhitzung mittels Dampfzelle (Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik)**

Durch Differential Scanning Calorimetry wurden die Denaturierungstemperaturen des Proteins bestimmt. Dabei ergaben sich für die Conglutin- $\gamma$ -reiche Teilfraktion des Lupinenproteins Boregine drei verschiedene Fraktionen, die bei unterschiedlichen Temperaturen denaturierten. Proteinfraktion 1 denaturierte bei 72°C, Proteinfraktion 2 bei 88°C und Proteinfraktion 3 bei über 100°C. Da die dritte Fraktion nur zu einem geringen Anteil im Gesamtprotein enthalten war, wurde der Großteil des Proteins durch das oben beschriebene Verfahren bei 85 - 95°C denaturiert.

Als Kontrollprotein wurde Casein unverändert eingesetzt. Die Rohnährstoffzusammensetzung der eingesetzten Proteine ist in Tabelle 11, die Aminosäurezusammensetzung der Diäten in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 11: Rohnährstoffzusammensetzung der Versuchsproteine aus Versuch 2**

Protein	Trockenmasse	Rohasche	Rohprotein	Rohfett	Rohfaser
	[% der O.S.]	-----[g/kg Trockenmasse]-----			
Casein	90,1	51,0	948,6	2,2	8,9
Lupine nativ	97,0	45,8	950,1	7,7	5,2
Lupine erhitzt	97,0	47,6	948,4	14,9	4,8

O.S. = Originalsubstanz

**Tabelle 12: Aminosäurezusammensetzung der Diäten aus Versuch 2**

	Kohlenhydratreiche Diät			Fettreiche Diät		
	Casein	natives Lupinen- protein	erhitztes Lupinen- protein	Casein	natives Lupinen- protein	erhitztes Lupinen- protein
	-----[g/kg Diät]-----					
Alanin	7,1	5,6	5,6	10,2	7,8	7,8
Arginin	8,6	21,4	21,1	12,7	29,1	29,9
Asparaginsäure	17,1	18,5	18,7	24,3	25,9	26,3
Cystein	0,9	2,5	2,6	1,3	3,3	3,7
Glutaminsäure	54,0	43,9	44,9	78,0	62,0	64,7
Glycin	4,6	7,5	7,5	6,3	10,5	10,6
Isoleucin	11,5	7,7	7,8	16,6	10,9	11,1
Leucin	22,0	13,3	13,4	32,0	18,8	19,1
Lysin	19,7	9,6	9,6	28,3	12,8	13,2
Methionin	9,6	6,1	6,5	10,5	8,0	8,0
Phenylalanin	12,3	7,4	7,6	17,7	10,7	10,7
Prolin	24,5	6,9	7,8	41,0	10,8	10,8
Serin	13,8	8,8	8,8	20,1	12,2	12,5
Threonin	10,2	6,3	6,3	14,7	8,9	8,9
Tryptophan	1,9	1,9	1,9	2,7	2,7	2,7
Tyrosin	14,2	7,5	8,0	20,3	10,9	11,1
Valin	7,1	5,6	5,6	10,2	7,8	7,8

### 2.2.2. Probennahme

Die Tiere wurden über Nacht genüchert, mit Ether betäubt und anschließend dekapitiert. Das Vollblut wurde in heparinisierten Monovetten aufgefangen und anschließend zur Plasmagewinnung 10 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Die Lagerung des Plasmas

erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die Isolation der Lipoproteine erfolgte am Schlachttag, wie unter 2.6.2.3. beschrieben. Die anschließende Lagerung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die Leber der Tiere wurde entnommen, gewogen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte abhängig von den späteren Analysen bei  $-20$  bzw.  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3. Analytik

In diesem Versuch wurden die Konzentrationen an Cholesterin und Triglyceriden in Plasma, Lipoproteinen und Leber bestimmt (siehe 2.6.2.3.). Die relative mRNA-Konzentration relevanter Gene des Cholesterin- bzw. Triglyceridstoffwechsels wurde per RT-PCR (siehe 2.6.2.11.) in der Leber bestimmt. Außerdem erfolgte die Bestimmung der Konzentration an Nüchternblutglukose (siehe 2.6.2.4.) sowie der Aktivitäten der Enzyme der Fettsäuresynthase (siehe 2.6.2.6) und der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (siehe 2.6.2.7.) im Leberzytosol. Für die Gewinnung der Leberzytosolfraktion wurden 200-300 mg Leber im 4-fachen Volumen an Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) homogenisiert und 10 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 1000 U/min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde bei  $15.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Abschließend erfolgte eine 1-stündige Zentrifugation bei  $105.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$ . Der abgenommene Überstand wurde als Leberzytosolfraktion verwendet.

### 2.2.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit MINITAB-Software. Die Daten wurden mittels TWO-WAY ANOVA verrechnet. Es wurde dabei der Einfluss der beiden Faktoren Protein (Casein, Lupinenprotein nativ oder Lupinenprotein erhitzt) und Diät (fett- oder kohlenhydratreich) sowie deren Interaktion beurteilt. Bei signifikant unterschiedlichen Mittelwerten ( $P \leq 0,05$ ) erfolgte ein multipler Mittelwertsvergleich mit dem Fisher`s-Test.

## 2.3. *Einfluss von Lupinenprotein auf die Atherogenese an apoE knockout-Mäusen (Versuch 3)*

### 2.3.1. Versuchsaufbau

#### 2.3.1.1. Versuchstiere und Diäten

In diesem Versuchsmodell sollte die potentielle Beeinflussung der Atheroskleroseentwicklung durch Lupinenprotein Vergleich zu Casein untersucht werden. Dafür wurden 30 männliche, etwa 8 Wochen alte, apoE knockout (KO) Mäuse (B6.129P2-Apo<sup>e</sup><sup>tm1Unc</sup>/J mice; Charles River

Laboratories, Belgien; Abb.3) mit einem mittleren Anfangsgewicht von  $24,0 \pm 1,5$  g eingesetzt. Diese wurden mit je 10 Tieren zufällig auf 3 Gruppen aufgeteilt und über 16 Wochen gefüttert. Die in den 3 Gruppen verabreichten Diäten enthielten jeweils 200 g/kg Protein, wobei sich dieses aus 100 g/kg Testeiweiß und 100 g/kg Eialbumin zur Deckung des Bedarfs an essentiellen Aminosäuren zusammensetzte. Eine Gruppe erhielt als Testeiweiß 100 g/kg Lupinenprotein der Sorte Boregine als Conglutin- $\gamma$ -reiche Teilfraktion („Lupinenprotein-Diät“). Eine zweite Gruppe erhielt 95 g/kg Casein und 5 g/kg Cystein („Cystein-Diät“), um einen speziellen Effekt von erhöhter Cysteinzulage zu untersuchen. Die Kontrollgruppe erhielt 100 g/kg Casein. Zur Beschleunigung der Atheroskleroseentstehung erhielten alle Mäuse eine semi-synthetische *Western diet* mit 210 g/kg gesättigtem Fett in Form von Schweineschmalz und 1,5 g/kg Cholesterin (Sigma Aldrich). Die ausführliche Zusammensetzung der Diäten ist in Tabelle 13 dargestellt. Vitamine und Mineralstoffe wurden nach den Bedarfsempfehlungen des National Research Council (NRC, 1995) zugesetzt.

Die Tiere wurden paarweise in Makrolon-Käfigen bei einer mittleren Raumtemperatur von  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , einer Luftfeuchte von 50-60% und einem 12h-Hell-Dunkel-Rhythmus untergebracht.

Da es sich bei den apoE-KO-Mäusen um gentechnisch veränderte Organismen handelte, wurden diese in Versuchsterräumen der Sicherheitsstufe 1 (Biozentrum, Universität Halle-Wittenberg) untergebracht. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung, die Futterraufnahme sowie die Körpermasseentwicklung wurden wöchentlich dokumentiert.



Abbildung 3: apoE KO-Mäuse

Tabelle 13: Zusammensetzung der *Western diet* aus Versuch 3

Komponente	Caseindiät	Lupinen proteindiät	Caseindiät + 0,5% Cystein
	-----[g/kg Diät]-----		
Casein	100	-	95
Lupinenprotein	-	100	-
L-Cystein	-	-	5
Eialbumin	100	100	100
Stärke	278,5	278,5	278,5
Zucker	200	200	200
Schweineschmalz	210	210	210
Cholesterin	1,5	1,5	1,5
Zellulose	50	50	50
Vitamin- und Mineralstoff Mischung <sup>1</sup>	60	60	60

<sup>1</sup> Die Vitamin- und Mineralstoffmischung ist in den Tabellen 14 und 15 dargestellt.

**Tabelle 14: Vitaminmischung der *Western diet* aus Versuch 3**

<b>Vitamine (Konzentration)</b>	<b>Bedarf/kg</b>	<b>Einwaage [g/kg Diät]</b>
Vitamin A (5000 IE/g)	0,72 mg	0,4800
VitaminD3 (500.000 IE/g)	0,025 mg	0,0020
Vitamin K (51%)	1,0 mg	0,00196
Thiamin B1 (100 %)	5,0 mg	0,0050
Riboflavin B2 (80%)	7,0 mg	0,00875
Pyridoxine B6 (100 %)	8,0 mg	0,0080
Nicotinsäure (99%)	15,0 mg	0,01515
Folsäure (100%)	0,5 mg	0,0005
Ca-Pantothenat (100%)	16,0 mg	0,0160
Biotin (2%)	0,2 mg	0,0100
Vitamin B12 (0,1%)	0,010 mg	0,0100
Cholinchlorid (50 %)	2000 mg	4,0
Vitamin E-Acetat (50 %)	22 mg	0,06556

**Tabelle 15: Mineralstoffmischung der *Western diet* aus Versuch 3**

<b>Mineralstoff</b>	<b>Bedarf/kg</b>	<b>Mineralstoffquelle</b>	<b>Anteil der Elemente</b>	<b>Einwaage [g/kg Diät]</b>
Ca	5,0 g	Calciumcarbonat	38% Ca	3,30
		Dicalcium-	25% Ca	15,00
P	3,0 g	Phosphat	20% P	
Mg	0,5 g	Magnesiumoxid	50% Mg	1,00
K	2,0 g	Kaliumsulfat	45% K	4,44
Na	0,5 g	NaCl	39,3% Na	1,27
Cl	0,5 g		60,2% Cl	
Fe	35 mg	Eisensulfat	30% Fe	0,1167
Zn	10 mg	Zinkoxid	79% Zn	0,0127
Mn	10 mg	Manganoxid	62% Mn	0,0161
Cu	6 mg	Kupfersulfat	25% Cu	0,0240
Se	150 µg	Natriumselenit	45% Se	0,00033
Jod	150 µg	Calciumjodat	62% J	0,00024
Molybdän	150 µg	Ammoniummolybat	54% Md	0,00028

### 2.3.1.2. Charakterisierung der Diät-Proteine

Die Rohnährstoffe der verwendeten Diätproteine Lupinenprotein der Sorte Boregine sowie Casein sind in Tabelle 16 dargestellt. Das Aminosäuremuster der verfütterten Diäten ist in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 16: Rohnährstoffzusammensetzung der Versuchsproteine aus Versuch 3**

<b>Protein</b>	<b>Trockenmasse [% an O.S.]</b>	<b>Rohasche</b>	<b>Rohprotein</b>	<b>Rohfett</b>	<b>Rohfaser</b>
		-----[g/kg Trockenmasse]-----			
Casein	90,1	51,0	948,6	2,2	8,9
Lupinenprotein	93,6	37,4	976,0	7,5	8,6

O.S. = Originalsubstanz

**Tabelle 17: Aminosäurezusammensetzung der Diäten aus Versuch 3**

	Caseindiät	Lupinenprotein- diät	Caseindiät + 0,5% Cystein
	-----[g/kg Diät]-----		
Alanin	8,0	8,7	10,0
Arginin	9,1	17,0	10,9
Asparaginsäure	16,2	20,2	20,9
Cystein	2,7	3,9	5,7
Glutaminsäure	35,1	37,9	50,1
Glycin	5,0	7,4	6,1
Isoleucin	9,3	9,4	12,6
Leucin	16,2	15,3	22,6
Lysin	13,6	11,0	19,4
Methionin	6,1	4,0	8,0
Phenylalanin	10,4	10,0	14,0
Prolin	13,5	7,5	21,4
Serin	11,0	10,7	15,0
Threonin	7,9	7,4	11,0
Tryptophan	2,2	2,2	2,2
Tyrosin	11,9	10,5	16,2
Valin	8,0	8,7	10,0

### 2.3.2. Probennahme

Die nicht genücherten Mäuse wurden im Alter von 24 Wochen mit Ether betäubt und anschließend dekapitiert. Das Vollblut wurde in EDTA-Tubes aufgefangen und anschließend zur Plasmagewinnung 10 min bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert. Die Lagerung des Plasmas erfolgte bei -20°C. Die Leber wurde entnommen, gewogen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die anschließende Lagerung erfolgte in Abhängigkeit der späteren Analysen bei -20 bzw. -80°C. Die Lipoproteinisolierung erfolgte am Schlachttag gemäß der Beschreibung unter 2.6.2.3., deren Lagerung erfolgte bei -20°C. Für die spätere Charakterisierung der Atherosklerose wurde von allen Tieren das Herz und der aufsteigende Teil des Aortenbogens freipräpariert. Das Herz wurde entfernt, mit NaCl gespült, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Bei einem Tier pro Gruppe wurde die gesamte Aorta freipräpariert, gespült und in 4% Paraformaldehyd bei 4°C gelagert (siehe 2.6.2.8.).

### 2.3.3. Analytik

Die Analytik dieses Versuches befasste sich hauptsächlich mit der histologischen Untersuchung der atherosklerotischen Plaques an der Aortenwurzel. In diesem Zusammenhang wurden gemäß 2.6.2.8. die Größe der Ablagerungen gemessen, sowie deren Zusammensetzung aus Kollagen, Kalk und Fett. Des Weiteren wurden die Konzentrationen an Cholesterin und Triglyceriden in Plasma, Lipoproteinen und Leber analog 2.6.2.3. bestimmt sowie die Konzentrationen an Cystein, Homocystein und Glutathion in Plasma und Leber (siehe 2.6.2.1.). Außerdem erfolgte die Enzymaktivitätsmessung der Glutathionperoxidase in Plasma und Leber (siehe 2.6.2.5). Die relative mRNA-Konzentration stoffwechselrelevanter Gene in der Leber wurde per RT-PCR bestimmt (siehe 2.6.2.11).

### 2.3.4. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit MINITAB-Software. Die Daten wurden über ONE-WAY ANOVA verrechnet. Bei statistisch signifikanten Unterschieden der Mittelwerte ( $P \leq 0,05$ ) erfolgte ein multipler Mittelwertsvergleich mit dem Fisher`s-Test.

## 2.4. *Einfluss von Lupinenprotein auf die Plasmalipide am Tiermodell Schwein (Versuch 4)*

### 2.4.1. Versuchsaufbau

#### 2.4.1.1. Versuchstiere und Diäten

Für diesen Versuch wurden 33 ca. 5 Wochen alte männliche Ferkel der F1-Generation [Deutsche Landrasse x Edelschwein] direkt nach dem Absetzen vom Muttertier im Versuch eingesetzt. Zur Eingewöhnung erhielten die Tiere 2 Wochen eine „Starter Diät“ ohne Proteinzusatz, welche eine altersgerechte Bedarfsdeckung an essentiellen Nährstoffen gewährleistete. Nach diesen 2 Wochen wurden die Tiere nüchtern gewogen. Bei einem mittleren Körpergewicht von  $10,7 \pm 1,9$  kg wurden die Tiere zufällig in 3 Gruppen zu je 11 Tieren aufgeteilt. Zwei Gruppen erhielten Diäten mit Lupinenproteinen, eine Gruppe Casein als Kontrolle. Als Lupinenproteine wurden Totalproteinextrakte der Sorte Boregine und der Sorte Vitabor eingesetzt. Alle Diäten enthielten jeweils 15% Protein sowie einen adäquaten Anteil Grundration. Zur Deckung des Bedarfs an essentiellen Aminosäuren wurden proteinspezifisch Aminosäuren zugegeben. Die genaue Zusammensetzung der Diäten ist in

Tabelle 18 dargestellt. Die eingesetzte Grundration enthielt neben diversen Kohlenhydraten 3% Fett (Bergafat HTL-306). Cholesterin sowie Na-Choleat wurden in der Diät nicht zusätzlich zugesetzt. Die Zusammensetzung der Grundration ist in Tabelle 19 dargestellt. Die Vitamin- und Mineralstoffmischung Prämix 895 (BASU, Bad Sulza) entsprach den Empfehlungen der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE, 2006) und ist in Tabelle 20 dargestellt.

Die in der zweiwöchigen Eingewöhnungsphase noch zu zweit gehaltenen Tiere wurden zur Versuchsfütterung einzeln in Flat-deck-Boxen eingestallt. Die mittlere Raumtemperatur betrug  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , die mittlere Luftfeuchte  $55 \pm 5\%$ . Das Lichtregime wurde im 12h-Hell-Dunkel-Rhythmus von 6.00 bis 18.00 Uhr geregelt. Die Futter- und Wasseraufnahme der Tiere erfolgte ad libitum. Die Gewichtsentwicklung und die Futteraufnahme der Tiere wurden wöchentlich dokumentiert. Die Haltungsbedingungen erfolgten nach tierschutzrechtlichen Bestimmungen.

**Tabelle 18: Zusammensetzung der Diäten aus Versuch 4**

Komponenten	Caseindiät	Lupinenproteindiät	
		Sorte Boregine	Sorte Vitabor
-----[g/kg Diät]-----			
Casein	150	-	-
Boregine	-	150	-
Vitabor	-	-	150
Grundration	850	838	837
Lysin HCl	-	7,0	7,5
DL-Methionin	-	2,5	2,3
L-Threonin	-	1,8	2,2
L-Tryptophan	-	0,7	0,7

**Tabelle 19: Zusammensetzung der Grundration aus Versuch 4**

Komponente	Grundration
	[g/kg]
Weizen	584,5
Gerste	100,0
Maisstärke	200,0
Zellulosepulver	50,0
Bergafat HTL-306	30,0
Monocalciumphosphat	15,0
Kalk	11,0
Salz	4,5
Vitamine und Mineralstoffe (Prämix 895) <sup>1</sup>	5,0

<sup>1</sup> Die Vitamin- und Mineralstoffmischung ist in Tabelle 20 dargestellt.

**Tabelle 20: Vitamin- und Mineralstoffmischung Prämix 895 aus Versuch 4**

<b>Vitamine</b>	<b>Maßeinheiten</b>	<b>Einwaage /kg Futter</b>
Vitamin A	IE	15000
Vitamin D	IE	2000
Vitamin E	Mg	100
Vitamin K	Mg	2
Thiamin B1	Mg	1,5
Riboflavin B2	Mg	4
Pyridoxin B6	Mg	2
Vitamin B12	µg	20
Biotin	Mg	0,125
Folsäure	Mg	1
Nikotinsäure	Mg	20
Pantothensäure	Mg	10
Cholinchlorid	Mg	400
Eisen	Mg	120
Mangan	Mg	60
Zink	Mg	110
Kupfer	Mg	120
Jod	Mg	1,995
Selen	Mg	0,4
Kobalt	Mg	0,75

### 2.4.1.2. Charakterisierung der Diät-Proteine

Die Rohnährstoffe der eingesetzten Proteine sind in Tabelle 21 dargestellt, die Aminosäurekonzentrationen der Versuchsdiäten in Tabelle 22.

**Tabelle 21: Rohnährstoffzusammensetzung der Versuchsdiäten aus Versuch 4**

<b>Protein</b>	<b>Trockenmasse</b>	<b>Rohasche</b>	<b>Rohprotein</b>	<b>Rohfett</b>	<b>Rohfaser</b>
	[% an O.S.]	-----[g/kg Trockenmasse]-----			
Casein	90,1	n.b.	948,6	n.b.	n.b.
Lupinenprotein					
Sorte Boregine	95,4	n.b.	974,8	n.b.	n.b.
Sorte Vitabor	95,6	n.b.	890,4	n.b.	n.b.

O.S. = Originalsubstanz

**Tabelle 22: Aminosäurezusammensetzung der Diäten aus Versuch 4**

	Caseindiät	Lupinenproteindiät	
		Sorte Boregine	Sorte Vitabor
	-----[g/kg Diät]-----		
Alanin	6,7	6,8	6,6
Arginin	8,3	18,2	17,3
Asparaginsäure	13,8	17,7	18,3
Cystein	2,6	3,3	3,5
Glutaminsäure	51,3	51,4	50,3
Glycin	5,5	8,1	8,0
Isoleucin	8,0	6,9	7,4
Leucin	17,3	14,3	14,6
Lysin	13,1	9,7	12,0
Methionin	4,8	2,5	3,2
Phenylalanin	10,2	8,6	9,0
Prolin	22,8	13,3	12,6
Serin	11,5	10,4	10,6
Threonin	8,1	7,2	8,1
Tryptophan	1,4	1,4	1,4
Tyrosin	7,9	5,8	6,1
Valin	9,8	6,7	6,7

#### 2.4.2. Probennahme

Den genücherten Tieren wurden zu Beginn und am Ende der 3-wöchigen Fütterungsphase vom Tierarzt in der *fossa jugularis* Blut abgenommen. Dieses wurde in EDTA-Tubes aufgefangen und anschließend zur Plasmagewinnung 10 min bei 1500 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Lagerung des Plasmas erfolgte bei -20°C. Die Gewinnung der Lipoproteine erfolgte am Schlachttag (siehe 2.6.2.3.), deren Lagerung erfolgte -20°C.

#### 2.4.3. Analytik

Um die Effekte der gefütterten Testproteine zu untersuchen, wurden die Konzentrationen an Cholesterin und Triglyceriden in Plasma und Lipoproteinen bestimmt (analog 2.6.2.3.).

#### 2.4.4. Statistik

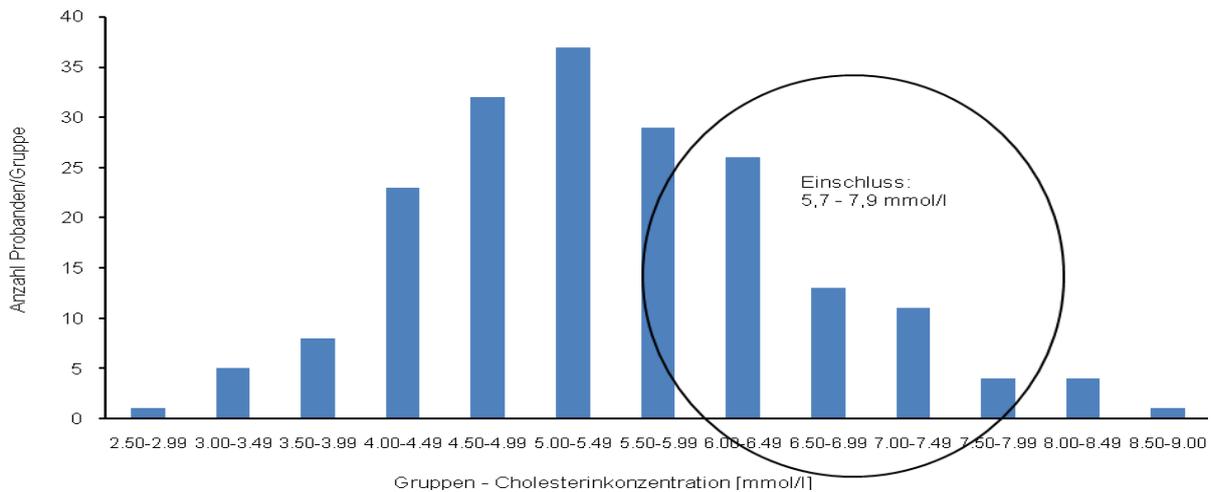
Die statistische Auswertung erfolgte mit MINITAB-Software. Die Daten wurden über ONE-WAY ANOVA verrechnet. Bei statistisch signifikanten Unterschieden der Mittelwerte ( $P \leq 0,05$ ) erfolgte ein multipler Mittelwertsvergleich mit dem Fisher`s-Test.

## **2.5. Einfluss von Lupinenprotein auf die Plasmalipide hypercholesterinämischer Probanden (Versuch 5)**

### **2.5.1. Versuchsaufbau**

#### **2.5.1.1. Probandenscreening und –auswahl**

Das Probandenscreening erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Blutspendedienst der Martin-Luther-Universität Halle/Saale. 194 aktive Blutspender zwischen 21 und 70 Jahren wurden angesprochen und über das Studienvorhaben informiert (Anhang 1). Nach schriftlicher Einverständniserklärung (Anhang 2) wurde eine erste Blutprobe zwecks Screening der Probanden gewonnen. Um einen potentiell lipidsenkenden Effekt des Testproteins optimal nachweisen zu können, wurden als Haupteinschlusskriterium moderat erhöhte Plasmacholesterinkonzentrationen zwischen 5,7 und 7,9 mmol/l festgelegt (Abb. 4). Als Ausschlusskriterien galten die Einnahme von lipidsenkenden Medikamenten, ebenso wie Diabetes mellitus Typ I und II und diverse Herz-Kreislaufkrankungen, die medikamentös behandelt wurden. Außerdem wurden Probanden ausgeschlossen, die allergische Reaktionen gegen Leguminosen, wie z.B. Soja oder Erdnuss, oder tierische (z.B. Milch) Proteine zeigten. Zudem nicht in die Studie aufgenommen wurden Probanden, die regelmäßig blutfettsenkende Nahrungsmittel wie z.B. becel-Margarine verzehrten. All diese Angaben wurden mit Hilfe eines Screeningfragebogens (Anhang 3) erfasst. Es wurden nur die Probanden in die Studie aufgenommen, die alle o.g. Kriterien erfüllten, letztendlich waren das von 194 Blutspendern 56 Personen. Diese hatten als Probandenkollektiv ein mittleres Alter von  $43,9 \pm 11,8$  Jahren und einen mittleren Body-Mass-Index ( $\text{BMI} = \text{Körpermasse [kg]} / \text{Körpergröße [m]}^2$ ) von  $25,9 \pm 4,5 \text{ kg/m}^2$ . Die 56 Probanden bestanden aus 25 Männern und 31 Frauen. Die Studie wurde von der ansässigen Ethik-Kommission der Universität Halle geprüft und genehmigt.



**Abbildung 4: Häufigkeitsverteilung der Cholesterinkonzentration von 194 Probanden. Einschlusskriterium: Konzentrationen zwischen 5,7 und 7,9 mmol/l.**

### 2.5.1.2. Studiendesign

Die Studie wurde als eine randomisierte Doppelt-Blind-Studie im Paralleldesign durchgeführt. Dafür wurden 56 Probanden computerrandomisiert auf 2 Gruppen aufgeteilt. Die Behandlungsgruppe erhielt 35 g Lupinenprotein der Sorte Boregine als Conglutin- $\gamma$ -reiche Teilfraktion, die Kontrollgruppe 35 g Casein pro Tag. Die Proteine wurden vom Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik in einen Riegel eingebacken und konnten in dieser Form konsumiert werden (Abb.5). Die Zusammensetzung der Riegel ist in Tabelle 23 dargestellt. Die Probanden wurden angewiesen, den Riegel anstelle eines isokalorischen Snacks (z.B. als Zwischenmahlzeit), wenn möglich zusammen mit einem Getränk zu verzehren. Die üblichen Ernährungsgewohnheiten sollten jedoch unverändert bleiben.

**Tabelle 23: Zusammensetzung der Riegel aus der Humanstudie**

	<b>Riegel -ohne Protein-</b>	<b>Proteinriegel -mit Casein-</b>	<b>Proteinriegel -mit Lupinenprotein-</b>
Weizenmehl [g]	15	15	15
Honig [g]	40	40	40
Backpulver [g]	1	1	1
Haselnussaroma [g]	6	6	6
Casein [g]	-	35	-
Lupinenprotein [g]	-	-	35



Abbildung 5: Vakuumverpackte Proteinriegel, hergestellt vom Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik.

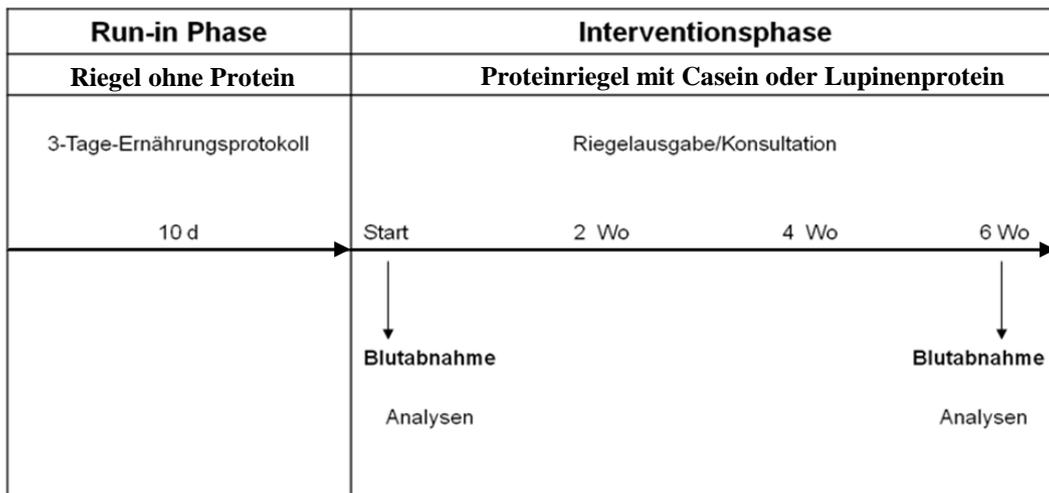


Abbildung 6: Studiendesign

Die Studie begann mit einer 10-tägige Run-In-Phase (Abb. 6). In diesen 10 Tagen verzehrten die Probanden eine Portion Riegel pro Tag ohne Proteinzulage. Diese Phase wurde vorangestellt, um eine bessere Integration des Riegels in die übliche Ernährung der Probanden zu gewährleisten. Innerhalb dieser 10 Tage führten die Studienteilnehmer ein 3-Tage-Ernährungsprotokoll (Anhang 4 und 5). Diese Protokolle wurden mit PRODI nutritional software (4.5/03 expert, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart) ausgewertet. An die Run-In-Phase schloss sich eine 6-wöchige Interventionsphase an. Die Teilnehmer verzehrten nun täglich die Proteinriegel mit Casein oder Lupinenprotein. Die Riegelausgabe sowie Konsultationen zur Studie erfolgten 14-tägig. Bei diesen Konsultationen konnten Fragen und Probleme der Probanden geklärt, sowie der persönliche Kontakt aufrecht erhalten werden. Nach Abschluss der Versuchsphase erhielten die Probanden eine Aufwandsentschädigung von 100 €. Die anonymisierten Ergebnisse der Studie wurde den Teilnehmern im Rahmen einer Informationsveranstaltung vorgestellt, bei Bedarf konnten auch individuelle Einzelwerte erfragt werden.

### 2.5.1.3. Charakterisierung der Diät-Proteine

Das Lupinenprotein der Sorte Boregine sowie Casein wurden vom Fraunhofer Institut in die Proteinriegel eingebracht, vakuumverpackt und verblindet.

Die Rohnährstoffe der Diätproteine sind in Tabelle 24 dargestellt. Die Aminosäurezusammensetzung der Riegel ist in Tabelle 25 dargestellt.

**Tabelle 24: Rohnährstoffe der Diätproteine aus der Humanstudie**

<b>Protein</b>	<b>Trockenmasse</b> [% der O.S.]	<b>Rohasche</b>	<b>Rohprotein</b>	<b>Rohfett</b>	<b>Rohfaser</b>
		-----[g/kg Trockenmasse]-----			
Casein	90,1	51,0	948,6	2,2	8,9
Lupinenprotein	93,6	37,4	976,0	7,5	8,6

O.S. = Originalsubstanz

**Tabelle 25: Aminosäurezusammensetzung der Diätriegel aus der Humanstudie**

	<b>Riegel ohne Protein</b>	<b>Caseinriegel</b>	<b>Lupinenproteinriegel</b>
	-----[g/kg]-----		
Alanin	1,3	11,0	11,0
Arginin	1,5	9,0	26,4
Asparaginsäure	2,4	26,7	35,7
Cystein	0,9	2,5	4,6
Glutaminsäure	12,6	85,5	87,2
Glycin	1,5	7,2	14,1
Isoleucin	1,3	16,5	13,5
Leucin	2,7	34,0	25,5
Lysin	0,5	16,2	7,0
Methionin	0,4	8,8	1,4
Phenylalanin	2,4	19,0	14,4
Prolin	3,5	44,6	17,8
Serin	1,8	21,8	17,9
Threonin	1,1	15,6	11,3
Tryptophan	0,3	3,3	3,3
Tyrosin	1,4	16,2	10,4
Valin	2,0	20,1	11,5

### 2.5.2. Probennahme

Die Blutentnahmen wurden zu Beginn und am Ende der Interventionsphase von autorisiertem Fachpersonal des Blutspendedienstes durchgeführt. Es wurden jeweils 9 ml Blut in heparinisierten Monovetten abgenommen. Davon wurden 4 ml frisches Blut für die Isolation

der mononukleären Zellen mittels Reagenz-Kit Histopaque® 1077 (Sigma) abgenommen und gemäß 2.6.2.10. aufgearbeitet. Der Rest wurde zur Plasmagewinnung 10 min bei 3000 U/min und 4°C zentrifugiert. Die Isolation der Lipoproteinfraktionen erfolgte am Tag der Blutentnahme wie unter 2.6.2.3. beschrieben. Alle Proben wurden anschließend in Abhängigkeit von den späteren Analysen bei -20 bzw. -80°C gelagert.

### 2.5.3. Analytik

In diesem Versuch wurden die Konzentrationen an Cholesterin und Triglyceriden in Plasma und Lipoproteinen bestimmt (siehe 2.6.2.3), zusätzlich die Konzentrationen an Plasmaglukose (2.6.2.4.) und Plasmaamino­säuren (2.6.2.2). Außerdem wurden die relativen mRNA-Konzentrationen stoffwechselrelevanter Gene in den mononukleären Zellen untersucht.

Die Isolation der RNA aus den mononukleären Zellen wurde gemäß der Beschreibung unter 2.6.2.11. unter Berücksichtigung der nachfolgend beschriebenen Volumenänderungen durchgeführt. Das isolierte Zellpellet wurde in 250 µl TRIZOL lysiert. Dazu wurden 50 µl Chloroform gegeben, gemischt und zentrifugiert. Die anschließende Präzipitation der RNA erfolgte unter Zugabe von 125 µl Isopropanol. Der Waschs­chritt erfolgte in 250 µl Ethanol. Die RNA wurde anschließend in 25 µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert. Die weitere Vorgehensweise zur Analyse der Genexpressionen erfolgte analog den unter 2.6.2.11 beschriebenen Schritten.

### 2.5.4. Statistik

Die gesamte statistische Auswertung erfolgte mit MINITAB statistical software. Um Veränderungen innerhalb einer Behandlungsgruppe von Beginn der Intervention (*baseline*) zum Ende der Intervention nach 6 Wochen zu beurteilen, wurde ein gepaarter t-Test durchgeführt. Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zu bestimmten Zeitpunkten wurden bei normalverteilten Parametern wie z.B. der Cholesterinkonzentration mit dem Student`s t-Test analysiert. Bei nicht normalverteilten Parametern wie z.B. der Triglyceridkonzentration wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt, Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $\leq 5\%$  wurden als statistisch signifikant beurteilt.

## 2.6. Analytische Methoden

### 2.6.1. Analysen in Proteinen und Diäten

#### 2.6.1.1. Bestimmung der Aminosäurekonzentration in Protein und Diäten

Die Analyse der Aminosäuren in Protein oder Diät erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie in einem Aminosäureanalyser (Eppendorf, LC3000, Hamburg, Deutschland) nach Bassler et al. 1993. Für die Analyse der Aminosäurezusammensetzung wurden die Proben wie folgt behandelt: 100 mg reines Protein bzw. 250 mg gemahlene Diät wurden in Pyrex-Flaschen eingewogen, mit 5 ml kalter Oxidationslösung (0,5 ml Wasserstoffperoxid, 4,5 ml phenolhaltiger Ameisensäure und 25 mg Phenol) versetzt und 24 h im Eisbad bei 4°C inkubiert. Die Oxidation wurde anschließend durch Zugabe von 0,9 g Natriumdisulfid abgebrochen. Nun wurden 50 ml Hydrolysemischung (492 ml Salzsäure, 1 g Phenol in insg. 1 l Wasser) zu den Proben gegeben, diese wurden mit offenem Deckel bei 110°C 24 h im Trockenschrank getrocknet. Nach Abkühlen der Proben im Eisbad wurden diese mit Citratpuffer (0,2 M, pH 2,2) quantitativ in ein 250 ml Becherglas überführt. Unter weiterer Kühlung wurden 40 ml Natronlauge unter Rühren zugegeben, anschließend wurde bei 25°C der pH-Wert mit Natronlauge auf genau 2,2 eingestellt. Dann wurden dem Ansatz 2 ml interner Standard zugesetzt und mit o.g. Citratpuffer auf 200 ml aufgefüllt. Etwa 70 ml davon wurden nach nochmaliger pH-Wert Kontrolle durch einen Membranfilter filtriert. 50 µl des Filtrats wurden abschließend in den Aminosäure-Analyser appliziert. Das Eluat wurde mit Ninhydrin-Reagenz versetzt, anschließend wurde die Extinktion der blau-violett gefärbten Lösung bei 570 nm photometrisch gemessen. Als interner Standard wurde Norleucin verwendet, als Kalibrationslösung eine kommerzielle Aminosäure-Standardlösung (je 2,5 µM, AA-S-18, Sigma). Die Quantifizierung des Aminosäuregehaltes ( $W_{\text{Aminosäure}}$ ) erfolgte nach folgender Formel

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

$F_{\text{AS}}$  = Fläche des Aminosäure-Peaks in der Probelösung

$F_{\text{Std.}}$  = Fläche des Aminosäure-Peaks in der Kalibrierlösung

0,2 = Konzentration der Kalibrierlösung in  $10^{-3}$  mol/l

$E_w$  = Einwaage des Probenmaterials in g/ml

$M$  = Molmasse der zu bestimmenden Aminosäure

$F_{\text{Nor/Std. bzw. Pr.}}$  = Fläche des Norleucin-Peaks in der Kalibrierlösung bzw. in Probelösung

$F_{\text{Std.}}$  = Fläche des Norleucin-Peaks in der Probenlösung

### 2.6.1.2. Bestimmung der Tryptophankonzentration in Protein und Diät

Die Tryptophanbestimmung erfolgte in Anlehnung an Fontaine et al. (1998) und Eder et al. (2001). Die Analyse erfolgte mittels HPLC (1100 Serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), bestehend aus Vakuumentgaser, quartärer Gradientenpumpe, Autosampler, Säule (LiChrospher 100, RP 18,250 x 4 mm, 5 µm), Säulenthmostat (35°C) und Fluoreszenzdetektor).

Hierfür wurden 100 mg reines Protein bzw. 250 mg gemahlene Diät mit 8,4 g Bariumhydroxid und 12 ml Wasser versetzt und mit Magnetrührern gründlich vermischt, so dass eine homogene Suspension entstand. Diese wurde anschließend 4 h bei 110°C im Autoklav hydrolysiert. Zum Abkühlen der Proben wurden diese mit 30 ml Wasser und 2 ml internem Standard (2,5 mM  $\alpha$ -Methyl-DL-Tryptophan; M-8377, Sigma) versetzt und 15 min in Eis auf dem Magnetrührer gemischt. Dann wurden vorsichtig 5 ml 0,5 M Phosphorsäure und 7,5 ml 6 M HCl zugegeben und mit 1 M HCl auf pH 3 eingestellt. Der Ansatz wurde anschließend mit Reinstwasser auf 100 ml aufgefüllt und durch einen Faltenfilter filtriert. 0,5 ml des Filtrats wurden dann mit 2 ml 30%-igem Methanol verdünnt, durch einen 0,45-µm-Membranfilter filtriert und abschließend in ein HPLC-Vial überführt. Das Injektionsvolumen auf die Säule betrug 10 µl, die Flußrate wurde mit 1,2 ml/min festgelegt. Als Laufpuffer wurde 0,01 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit 8% Methanol verwendet. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Excitationswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 355 nm. Als Kalibrationslösung wurde eine 2,5 mM Tryptophanstammlösung verwendet. Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach folgenden Formeln

$$\text{RF}_{\text{Trp}} = \frac{\text{FW}_{\text{Trp K}} * \text{C}_{\text{IS}}}{\text{FW}_{\text{IS K}} * \text{C}_{\text{Trp}}} \quad \text{Tryptophan (\%)} = \frac{\text{FW}_{\text{Trp}} * \text{m}_{\text{IS}} * 100}{\text{FW}_{\text{IS}} * \text{Ew} * \text{RF}_{\text{Trp}}}$$

$\text{RF}_{\text{Trp}}$  = Responsefaktor des Tryptophans

$\text{FW}_{\text{Trp K}}$  = Fläche des Tryptophan-Peaks in der Kalibrierlösung

$\text{FW}_{\text{IS K}}$  = Fläche des internen-Standard-Peaks in der Kalibrierlösung

$\text{C}_{\text{Trp}}$  = Konzentration des Tryptophans in mg/100 ml Kalibrierlösung

$\text{C}_{\text{IS}}$  = Konzentration des internen Standards in mg/100 ml Kalibrierlösung

$\text{FW}_{\text{Trp}}$  = Fläche des Tryptophan-Peaks in der Probenlösung

$\text{FW}_{\text{IS}}$  = Fläche des internen-Standard-Peaks in der Probenlösung

$\text{m}_{\text{IS}}$  = mg des internen Standards in Stammlösung

$\text{Ew}$  = Einwaage des Probenmaterials in mg

### **2.6.1.3. Bestimmung der Konzentration an Isoflavonen im Protein**

Die Konzentration an den Isoflavonen Genistein, Genistin und Daidzein in den Lupinenproteinisolaten wurde per HPLC (1100 Serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), bestehend aus Vakuumentgaser, quartärer Gradientenpumpe, Autosampler, Säule (ODS Hypersil, 250x4 mm), Säulenthmostat (40°C) und Fluoreszenzdetektor) nach Sung et al. 2004 bestimmt.

Hierfür wurden in Doppelbestimmung je 50 mg reines Protein mit 1,5 ml Methanol/Dichlormethan (1:1, v/v) versetzt. Dieses Gemisch wurde 30 s auf Eis mit dem Ultraturrax homogenisiert. Nachdem sich das Probenmaterial abgesetzt hatte, wurde der klare Überstand in ein Eppendorf-Tube überführt und 5 min bei Raumtemperatur und 13000 U/min zentrifugiert. Ca. 800 µl Überstand wurden anschließend in einem neuen Tube 2 - 2,5 h in der Vakuumzentrifuge (RC 1022, Jouan, Frankreich) getrocknet. Das zurückgebliebene Pellet wurde in 200 µl 60%-igem Ethanol für 5 min bei 25°C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gelöst und anschließend 5 min bei 13000 U/min und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. 150 µl des klaren Überstandes wurden in HPLC-Vials überführt und analysiert. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl, die Flußrate wurde mit 0,8 ml/min festgelegt. Ein Probenzyklus dauerte 20 min, wobei alle 5 min zwischen Laufmittel A [10% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure] und Laufmittel B [80% Acetonitril in 0,1% Trifluoressigsäure] gewechselt wurde. Die Isoflavone wurden bei 260 nm detektiert. Die Quantifizierung erfolgte mit einem Standardgemisch (0,2 mg/ml Genistin, 0,1 mg/ml Daidzein (Sigma) und 1 mg/ml Genistein (Fluka)).

## **2.6.2. Analysen in Plasma und Organen**

### **2.6.2.1. Bestimmung der Konzentration von Cystein, Homocystein und Glutathion in Plasma und Leber**

Das totale Homocystein, Cystein und Glutathion im Plasma wurde analog Vester und Rasmussen (1991) mittels HPLC (1100 Serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), bestehend aus Vakuumentgaser, quartärer Gradientenpumpe, Autosampler, Säule (LiChrospher 100 RP-18e; 250x4 mm<sup>2</sup>, 5 µm, Hewlett Packard, Waldbronn, Deutschland), Säulenthmostat (30°C) und Fluoreszenzdetektor) bestimmt.

Hierfür wurden zu 30 µl Plasma 10 µl interner Standard [200 µM Mercaptopropionylglycin in Boratpuffer 1 (100 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH = 10,5)] gegeben und gut gemischt. Da mit der hier angewandten Methode ausschließlich freie Aminosäuren gemessen werden

können, wurden zunächst alle Disulfidbrücken aufgespalten. Dafür wurden 4 µl Reduktionslösung (10% Tri-n-Butylphosphat in Dimethylformamid) zu den Proben hinzugegeben, gevortext und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die im Plasma befindlichen hochmolekularen Proteine durch Zugabe von 25 µl Perchlorsäure (0,6 M, 1 mM EDTA) 10 min ausgefällt und mit einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt bei RT und 13000 U/min abgetrennt. 20 µl des Überstandes wurden nun mit 40 µl Boratpuffer 2 (2 M Borsäure, 5 mM EDTA, pH 10,5) und 20 µl Derivatisierungsreagenz [SBDF, 1 mg/ml Boratpuffer 3 (2 M Borsäure, pH 9,5)] zur Ausbildung hydrophober säulenkompatibler Eigenschaften versetzt. Nach kräftigem Mischen wurde der Ansatz 60 min bei 60°C inkubiert, anschließend im Eisbad abgekühlt und 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde nun in HPLC-Vials überführt und analysiert.

Für die Messung der Aminosäuren Homocystein, Cystein und Glutathion in der Leber wurden ca. 100 mg Leber in eiskaltem PBS mittels Potter homogenisiert. Die Leberhomogenate wurden anschließend analog den Plasmaproben aufbereitet und auf die HPLC-säule injiziert.

Als mobile Phase diente ein 0,1 M Acetatpuffer mit 2% (v/v) Methanol, pH 4,0 sowie ein 0,1 M Phosphatpuffer mit 3% (v/v) Methanol, pH 6,0. Als Injektionsvolumen wurden 10 µl aufgetragen, die Flußrate wurde mit 1,1 ml/min festgelegt. Die Excitationswellenlänge betrug 385 nm, die Emissionswellenlänge 515 nm. Die Quantifizierung erfolgte mit kommerziellem Homocystein-Kalibrationsplasma (Level 2).

### **2.6.2.2. Bestimmung der Aminosäurekonzentration im Plasma**

Die Messung der Konzentration der Aminosäuren im Plasma erfolgte in Anlehnung an Schuster et al. (1988) und Teerlink et al. (1994) mittels HPLC (1100 Serie (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), bestehend aus Vakuumentgaser, quartärer Gradientenpumpe, Autosampler, Säule (Hypersil ODS, Partikelgröße 5 µm, 4 mm x 250 mm; Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland), Säulenthermostat (42°C) und Fluoreszenzdetektor). Die freien Aminosäuren des Plasmas reagieren bei dieser Messmethode mit ortho-Phthaldialdehyd (OPA) und Mercaptopropionsäure im alkalischen Medium zu einem fluoreszierenden Isoindolderivat.

200 µl Plasma wurden hierfür mit 50 µl 10%-iger Sulfosalicylsäure (SSA) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die ausgefallenen hochmolekularen Plasmaproteine 10 min bei 12000 U/min und 4°C abzentrifugiert. 20 µl des gewonnenen Überstandes wurden mit 80 µl Reinstwasser und 20 µl 200 µM Novalin als Internem Standard in ein HPLC-Vial überführt, gemischt und im Probenschlitten in der HPLC-Anlage platziert.

Über ein Injektionsprogramm automatisch geregelt, wurden nun 2  $\mu\text{l}$  Probe mit 4  $\mu\text{l}$  Derivatisierungsreagenz (Reagenzien siehe Tabelle 26) für 2 min inkubiert und anschließend mit 3,3  $\mu\text{l}$  Neutralisationspuffer versetzt. Anschließend wurden 10  $\mu\text{l}$  auf die HPLC-Säule injiziert. Als Laufmittel wurden A und B verwendet. Nach jeder Probe wurde die Injektionsnadel mit Reinstwasser gespült. Die Messung des Fluoreszenzsignals erfolgte mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Exzitationswellenlänge von 337 nm und einer Emissionswellenlänge von 454 nm.

Als Standard diente ein kommerziell erhältliches Aminosäuregemisch (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), welches zusätzlich durch folgende Aminosäuren ergänzt wurde: 50  $\mu\text{M}$  Asparagin, 500  $\mu\text{M}$  Glutamin, 100  $\mu\text{M}$  Citrullin, 150  $\mu\text{M}$  Taurin, 50  $\mu\text{M}$  Tryptophan und 100  $\mu\text{M}$  Ornithin.

**Tabelle 26: Reagenzien für Konzentrationsbestimmung der Plasmaamino­säuren**

<b>Reagenz</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Derivatisierungsreagenz	5% OPA, 95% 100 mM Borsäure, pH 10
OPA	0,5% ortho-Phthaldialdehyd (w/v); 10% Methanol (v/v); 90% 100 mM Borsäure (v/v) pH 10; 0,5% Mercaptopropionsäure
Neutralisationspuffer	400 mM Kaliumhydrogenphosphat; 1% Triethylamin
Laufmittel A	60 mM Natriumacetat, 0,6% Tetrahydrofuran (THF) pH 8,0
Laufmittel B	Acetonitril / 0,1 M Natriumacetat in Wasser / Methanol (14/4/1)

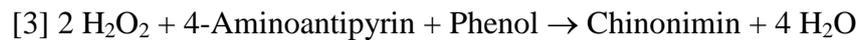
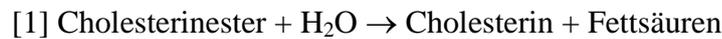
### **2.6.2.3. Bestimmung der Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in Plasma, Lipoproteinen und Leber**

Für die Analyse in den Lipoproteinen erfolgte die schrittweise Auftrennung der einzelnen Fraktionen nach den Dichten von Chylomikronen:  $\rho < 0,95 \text{ kg/l}$ , VLDL:  $0,95 < \rho < 1,006 \text{ kg/l}$ , LDL:  $1,006 < \rho < 1,063 \text{ kg/l}$  und HDL:  $\rho > 1,063 \text{ kg/l}$  mittels Ultrazentrifugation (Mikro-Ultrazentrifuge, Sorvall Products, Bad Homburg, Deutschland) bei  $900\,000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min (Chylomikronen), 1 h (VLDL) bzw. 1,5 h (LDL). Der verbleibende Rest nach der Abnahme der LDL-Fraktion wurde als HDL-Fraktion definiert. Da bei Mäusen nur etwa 300-500  $\mu\text{l}$  Gesamtplasma isoliert werden konnte, wurden für deren Lipoproteingewinnung die Plasmen von je 2 Tieren gepoolt. Die Dichten wurden mit NaCl und KBr eingestellt.

Die Lipide der Leber wurden mit 4 ml n-Hexan/Isopropanol (3:2; v/v) aus ca. 400 mg Leber durch eine 18-stündige Schüttelinkubation extrahiert (Hara et al. 1978). Anschließend wurden aliquote Mengen des gewonnenen Überstandes verdampft. Zur Überführung in eine wässrige Phase wurden die Proben anschließend mit Triton-X/Chloroform (1:1; w/w) versetzt (De Hoff et al. 1978), wovon das Chloroform abschließend ebenfalls abgedampft wurde.

Die Messung der Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in Plasma, Lipoproteinen und Leberextrakten wurde mit kommerziellen enzymatischen Testkits durchgeführt (DiaSys Diagnostic Systems, Holzheim, Deutschland).

*Cholesterin:* Nach enzymatischer Hydrolyse der Cholesterinester [1] durch die Cholesterinesterase erfolgte anschließend eine Oxidation [2] durch die Cholesterinoxidase. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reagierte mit 4-Aminoantipyrin und Phenol zu Chinonimin [3], welches als Indikator kolorimetrisch bei 500 nm gemessen wurde.



*Triglyceride:* Die Bestimmung der Triglyceride erfolgt nach enzymatischer Spaltung durch die Lipoproteinlipase [1]. Über zwei Zwischenreaktionen durch die Glycerokinase [2] und Glycerin-3-phosphatoxidase [3] entsteht Wasserstoffperoxid. Dieses wird in einem letzten Schritt mit 4-Aminoantipyrin und 4-Chlorphenol unter katalytischer Wirkung von Peroxidase [4] zum Indikator Chinonimin umgesetzt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 550 nm.



Zur Quantifizierung wurden spezifische Kalibratoren für Plasma (HV-Kalibrator, DiaSys, Holzheim, Deutschland) und Leber (50 mg Cholesterin/100 ml Hexan) verwendet. Proben und Standards wurden mit jeweils 750  $\mu\text{l}$  Reagenz versetzt, gemischt und bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Alle Extinktionsmessungen ( $\Delta E$ ) erfolgten gegen den Reagenzienleerwert im Spektrophotometer Ultrospec 2000 (Pharmacia, Cambridge, England). Die Berechnung der Konzentration an Cholesterin bzw. Triglyceriden erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration [mmol/l]} = \frac{\Delta E \text{ Probe}}{\Delta E \text{ Kalibrator}} * \text{Konzentration Kalibrator [mmol/l]}.$$

### 2.6.2.4. Bestimmung der Glukosekonzentration im Plasma

Die Analyse der Blutglukose erfolgte in frischem Plasma mit einem handelsüblichen Reagenz-Kit (Ecoline S + Diasys Diagnostic Systems GmbH, Nr. 12531 99 90 335) nach den angegebenen Herstellerinformationen. Die Reaktion beruht auf der Oxidation von Glukose durch die Glukosedehydrogenase unter Bildung von NADH:



Die resultierende Extinktionsänderung ( $\Delta E$ ) wurde spektralphotometrisch (Spektrophotometer Ultrospec 2000) bei 340 nm über 3 min gemessen. Hierfür wurden 10  $\mu\text{l}$  Plasma mit 1000  $\mu\text{l}$  Gebrauchsreagenz versetzt [4 Teile Reagenz A (enthält Glukosedehydrogenase) und 1 Teil Reagenz B (enthält NAD)]. Zur Quantifizierung wurde eine kommerzielle Standardlösung verwendet (100mg/dl; Ecoline S + Diasys Diagnostic Systems GmbH, Nr. 12500 99 90 030). Die Berechnung der Glukosekonzentration erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Konzentration [mg/dl]} = \frac{\Delta E \text{ Probe}}{\Delta E \text{ Kalibrator}} * \text{Konzentration Standard [mg/dl]}$$

### 2.6.2.5. Bestimmung der Glutathionperoxidaseaktivität in Plasma und Leber

Die Bestimmung der Glutathionperoxidaseaktivität in Plasma und Leberzytosol (Herstellung siehe 2.2.3.) erfolgte in Anlehnung an Paglia und Valentin (1967) sowie Orville und Levander et al. (1983). Die spektralphotometrische Messung beruht auf der Umsetzung von NADPH zu  $\text{NADH}^+$  durch Butyl-Hydroperoxid (verwendete Reagenzien siehe Tabelle 27).

**Tabelle 27: Reagenzien und deren Zusammensetzung für die Bestimmung der Glutathionperoxidaseaktivität**

Reagenz	Zusammensetzung
K-Puffer	0,25 M Kaliumphosphatpuffer, 25 mM EDTA, pH 7,4: (aus Puffer A und Puffer B), mit 5 U/ml Glutathionreduktase (GSH-reductase from baker`s yeast; Sigma)
Puffer A	0,25 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$ mit 25 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}$
Puffer B	0,25 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ mit 25 mM $\text{Na}_2\text{EDTA}$
Glutathion	40 mM (Sigma), pH 7,0
KH-Puffer	154 mM NaCl, 6,2 mM KCl, 15,4 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,5 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 32,1 mM $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM Glukose

Reaktionsansatz	200 µl K-Puffer 50 µl 40 mM Glutathion 450 µl KH-Puffer 220 µl Reinstwasser 50 µl Probe	<i>Inkubation 10 min</i>
	10 µl 20 mM NADPH	<i>Inkubation 2 min</i>
Reaktionsstart	20 µl 15 mM i-butyl-Hydro-peroxid	<i>Extinktionsmessung</i>

Der oben dargestellte Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 25°C inkubiert. Die Proben wurden dabei 1:100 (Leberzytosol) bzw. 1:10 (Plasma) verdünnt eingesetzt. Anschließend folgte die Zugabe von 10 µl 20 mM NADPH (Sigma) gelöst in 0,1% NaHCO<sub>3</sub>. Dieser Ansatz wurde erneut für 2 min bei 25 ° inkubiert. Der eigentliche Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von 20 µl 15 mM i-butyl-Hydroperoxid (Reinheit 70%, Fluka, Buchs, Schweiz). Nach sofortigem Mischen erfolgte die erste photometrische Messung bei 340 nm gegen Luft (Spektrophotometer Ultrospec 2000), anschließend nach jeder weiteren Minute über insgesamt 4 min.

Anhand der Extinktionsänderungen pro Minute wurde die Enzymaktivität nach u.g. Formel berechnet. Die spezifische Enzymaktivität wurde in Units pro µmol umgesetzten NADPH/min/l Plasma bzw. in Units pro µmol umgesetzten NADPH/min/mg Protein in der Leber angegeben. Die Proteinkonzentrationsbestimmung in der Leber erfolgte nach *Bradford* analog 2.6.2.9.

$$\text{Aktivität (U/l)} = V * 1000 * \Delta E / (\epsilon * d * v * t)$$

V = Ansatzvolumen

ΔE = Extinktionsänderung

ε = Extinktionskoeffizient NADPH

d = Küvettenschichtdicke

v = Probenvolumen

t = Zeit

### 2.6.2.6. Bestimmung der Fettsäuresynthase-Aktivität in der Leber

Die Bestimmung der Aktivität der Fettsäuresynthase (FSS) erfolgte nach Nepokroeff et al. (1975). Das Messprinzip beruht hierbei auf der Bildung von n-Carbonsäuren aus Malonyl-CoA und Acetyl-CoA verbunden mit der Oxidation von NADPH/H<sup>+</sup> zu NADP<sup>+</sup> durch die sich im Leberzytosol befindliche Fettsäuresynthase. NADP<sup>+</sup> entsteht proportional zur Menge an FSS, die resultierende Abnahme der Extinktion wurde bei 340 nm spektralphotometrisch bestimmt.

**Tabelle 28: Reagenzien und deren Zusammensetzung für die Bestimmung der Fettsäuresynthaseaktivität**

<b>Reagenz</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Präinkubationsmedium	500 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0; 5 mM DTT
Testmedium 1	700 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0; 0,14 mM NADPH <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> , 1,4 mM EDTA, 1,4 mM DTT
Testmedium 2	0,33 mM Acetyl-CoA, in Reinstwasser
Testmedium 3	1,0 mM Malonyl-CoA, in Reinstwasser

Reaktionsansatz	20 µl Probe	
	80 µl Präinkubationsmedium	<i>Inkubation 30 min</i>
	700 µl Testmedium 1	
	100 µl Testmedium 2	
	100 µl Testmedium 3 bzw.	
	100 µl Reinstwasser	<i>Extinktionsmessung</i>

Für den Reaktionsbeginn wurden 20 µl Leberzytosolfraction (Herstellung siehe unter 2.2.3.) mit 80 µl Präinkubationsmedium (Tabelle 28) 30 min bei 37°C präinkubiert (siehe Darstellung oben). Die 100 µl Reaktionsansatz wurden anschließend mit 700 µl Testmedium 1, 100 µl Testmedium 2 und 100 µl Testmedium 3 versetzt, gemischt und bei 25°C über 1 min spektralphotometrisch gemessen. Zu jeder Probe wurde zudem ein Leerwert bestimmt, bei dem die 100 µl Testmedium 3 durch 100 µl Reinstwasser ersetzt wurden.

Die spezifische Aktivität des Enzyms wurde in nmol/mg Protein angegeben, die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach *Bradford* (siehe 2.6.2.9.).

### **2.6.2.7. Bestimmung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität in der Leber**

Für die Bestimmung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität in der Leberzytosolfraction (Aufbereitung siehe unter 2.2.3) wurde eine Methode nach Deutsch et al. (1983) angewandt. Grundlage dieser Messung ist die Umsetzung von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphogluconolacton durch die Glukose-6-Phosphatdehydrogenase. Dabei wird NADP<sup>+</sup> zu NADPH/H<sup>+</sup> reduziert und die dadurch erzeugte Extinktionsänderung gemessen.

**Tabelle 29: Reagenzien und deren Zusammensetzung für die Bestimmung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität**

<b>Reagenz</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Testmedium	50 mM Tris, pH 7,5; 0,4 mM NADP <sup>+</sup> , 6,3 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 3,3 mM Glukose-6-Phosphat, 5,0 mM Maleinimid

---

Reaktionsansatz	50 µl Probe 950 µl Testmedium bzw. 950 µl Reinstwasser	<i>Extinktionsmessung</i>
-----------------	--	---------------------------

Hierfür wurden 50 µl einer 1:10 verdünnten Leberzytosolprobe (v/v, mit 0,1 M Phosphatpuffer) mit 950 µl Testmedium versetzt, gemischt und über 2 min bei 25°C und 339 nm im Spekol gemessen. Zu jeder Probe wurde ein Leerwert mitbestimmt, bei dem das Testmedium durch 950 µl Reinstwasser ersetzt wurde. Die spezifische Aktivität des Enzyms wurde in nmol/mg Protein (Bestimmung nach *Bradford*, siehe 2.6.2.9) angegeben.

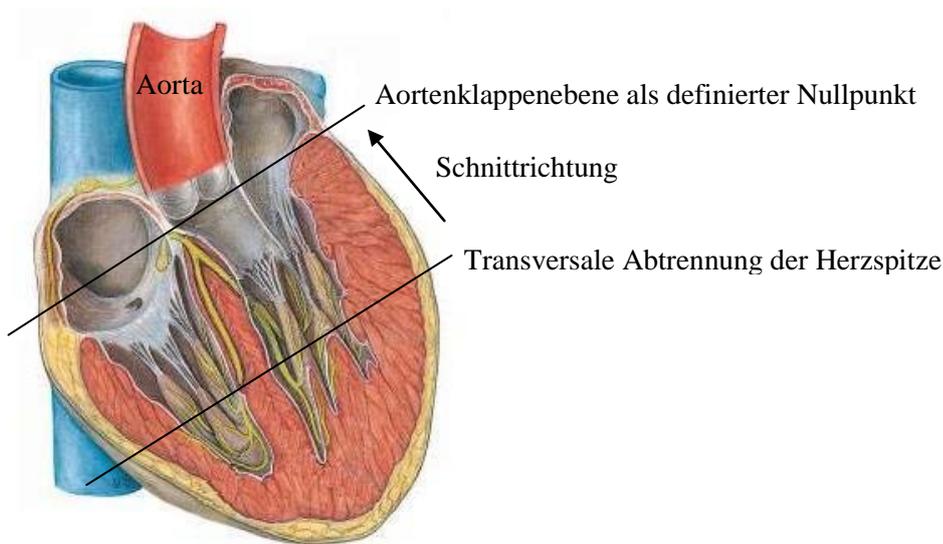
### 2.6.2.8. Untersuchung von Atherosklerose-relevanten Parametern

#### *Präparationen*

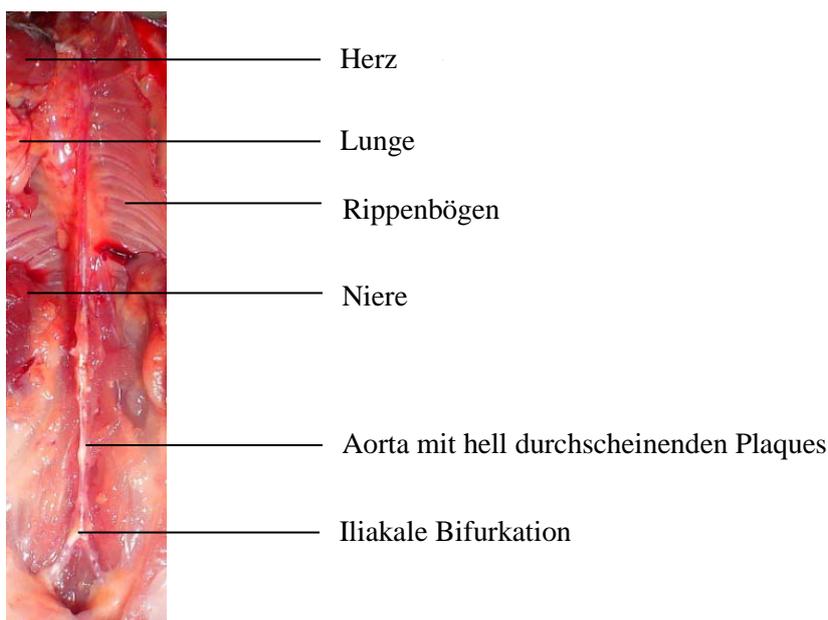
Die Analyse von Atherosklerose-relevanten Parametern bei apoE KO Mäusen erfolgte in Anlehnung an Teupser et al. (2003) und Mueller et al. (2008). Nach der Tötung der Tiere wurde das Blutkreislaufsystem mit 0,9% NaCl gespült. Dafür erfolgte eine Inzision der oberen Hohlvene mit anschließender Injektion der NaCl-Lösung über den linken Ventrikel. Das Herz wurde unter dem Stereomikroskop (Zeiss) frei präpariert und anschließend mit einem Schnitt zwischen Aortenwurzel und Brachiocephalarterie herausgetrennt. Die Herzen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C.

Zur Charakterisierung und Quantifizierung der atherosklerotischen Läsionen wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte (Jung, CM1800 Mikrotom, Leica) von der Aortenwurzel angefertigt. Hierfür wurden die Herzen transversal halbiert (Abb.7), die Herzspitze wurde verworfen. Der kraniale Teil des Herzens wurde in Einbettmedium (Jung, tissue freezing medium®, Leica) platziert und bei -20°C an einem Stempel angefroren. Die Platzierung des Herzens im Medium erfolgte so, dass von kaudal her mit der Abnahme der Schnitte begonnen werden konnte. Als Nullpunkt für die Quantifizierung wurde das erstmalige Erscheinen aller 3 Aortenklappen der Aortenwurzel definiert. Für jede Färbung wurden 4 aufeinander folgende Schnitte auf einen Objektträger gezogen, fixiert und anschließend gefärbt. Eine Übersicht über die Färbeprozedur ist in Tabelle 30 dargestellt und wird im Folgenden näher beschrieben. Die histomorphologische Charakterisierung und Auswertung der Schnitte erfolgte verblindet mittels computergestützter Videotechnik am Mikroskop (Zeiss-Axiolab Mikroskop; JVC TK 1070E Color Video Kamera; LuciaG software). Zur Auswertung wurden die Mittelwerte von je 4 Schnitten pro Färbung ermittelt.

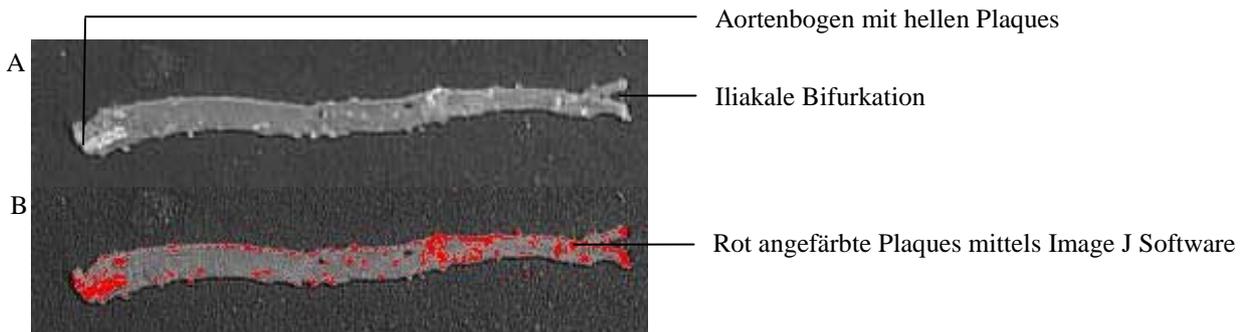
Um einen Überblick über die Plaqueverteilung im ganzen Gefäß zu erhalten, wurde bei einem Tier pro Gruppe die gesamte Aorta vom aufsteigenden Teil des Aortenbogens bis zur iliakalen Bifurkation freipräpariert (Abb. 8) und herausgetrennt. Die Gefäße wurden in 4%-igem Paraformaldehyd in PBS für 2 d bei 4°C fixiert. Anschließend wurden noch anhaftende Gewebereste unter dem Mikroskop entfernt, das Gefäß longitudinal geöffnet und auf einem Objektträger mit einem Deckgläschen fixiert. Die Gefäße wurden photographiert (Syngene Kamera) und anschließend mit Image J Software (Image Processing and Analysis in Java; <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>) analysiert (Abb. 9).



**Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Herzlängsschnittes mit Schnittebenen**



**Abbildung 8: Freigelegte Gesamtaorta mit Plaques einer apoE knockout-Maus**



**Abbildung 9: Longitunal geöffnete Aorta. [A] Originalaufnahme [B] Bearbeitung mit Image J Software. Für eine genauere Quantifizierung können die Plaques mittels *threshold*-Analyse besser sichtbar gemacht werden.**

### *Histologische Färbungen*

Alle Gefrierschnitte wurden luftgetrocknet, fixiert (10% Formol in Ethanol bzw. 10 % Formol in destilliertem Wasser (a.d.) für Ölrot-O), 3x in a.d. gespült und anschließend gefärbt.

Als Übersichtsfärbung wurde eine klassische *Hämalaun-Eosin-Färbung* durchgeführt. Hierbei wurden die Zellkerne mit saurem Hämalaun 15 min nach Harris angefärbt und zur anschließenden Differenzierung 15-20 min unter indirekt laufendem Leitungswasser gewaschen. Nach Spülen in a.d. erfolgte eine 5-minütige Plasmafärbung mit 0,1% Eosinlösung. Anschließend wurden die Schnitte in a.d. gespült, danach getrocknet und nach kurzem Tauchen des Objektträgers in Ethanol in Eukit/Kanadabalsam unter dem Abzug eingedeckt. Färbeergebnis: Kerne: blau, Zellplasma: hellrot

Für die Sichtbarmachung von neutralen Lipiden (Cholesterinester und Triglyceride) wurden die Schnitte mit *Ölrot-O* (Stammlösung: 0,5% in Isopropanol; Gebrauchslösung: 60%ig in a.d) für 15 min gefärbt. Nach 3-maligem Abspülen der Färbelösung in a.d. wurden die Schnitte noch 15 min in a.d. gewässert. Nach abschließendem Lufttrocknen wurden sie mit Gelatine eingedeckt. Färbeergebnis: Lipide: kräftig rot

Für eine charakteristische Färbung der Kollagenstrukturen wurde eine *Trichromfärbung nach Goldner* durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde 10 min mit Säurefuchsin-Ponceau gefärbt. Der Farbüberschuss wurde 2x in 1%iger Essigsäure abgespült. Als zweiter Farbstoff diente Phosphorwolframsäure-Orange G mit einer Inkubationszeit von 7 min. Auch hier wurde anschließend 2x in 1%iger Essigsäure gespült. Als dritte und letzte Komponente wurde Lichtgrün für 10-15 min aufgetragen. Abschließend erfolgte nochmals ein Spülen in 1%iger Essigsäure für 3 min. Nach Spülen in a.d. wurden die Schnitte luftgetrocknet und nach kurzem Tauchen in Ethanol und mit Eukit/Kanadabalsam unter dem Abzug eingedeckt. Färbeergebnis: Mineralisiertes Knochengewebe + Kollagen: leuchtend grün, verkalkte

*Knorpelmatrix: hellgrün, Osteoid: rot, Zellkerne: blauschwarz (kaum sichtbar), Zytoplasma: rötlich-braun, Erythrozyten: orange*

Um in den Plaques verkalkte Anteile nachweisen zu können, wurden die Schnitte einer *von-Kossa-Silberfärbung* unterzogen. Hierfür wurde in einem ersten Schritt 5%ige wässrige Silbernitrat-Lösung auftragen und 1 h im Dunkeln inkubiert. Nach 3-maligem Spülen in a.d. wurde das Silber mit NaCO<sub>3</sub>-Formaldehyd-Lösung (5g NaCO<sub>3</sub> in 25 ml Formaldehyd (37%) und 75 ml a.d.) 2 min reduziert. Nach 10 min Spülen in Leitungswasser wurde 5 min in 5%iger wässriger Natriumthiosulfat-Lösung fixiert. Nach einem letzten Waschschrift für 10 min in Leitungswasser und kurzem Tauchen in a.d. konnte mit Säurefuchsin-Ponceau (=Goldner 1) 3 min gegengefärbt werden. Abschließend wurden die Schnitte kurz in Ethanol getaucht und unter dem Abzug mit Eukit/Kanadabalsam eingedeckt. *Färbeergebnis: mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe: schwarz, Mineralisationsfronten: schwarz granuliert*

**Tabelle 30: Färbeübersicht der Aortenschnitte. Als Nullpunkt wurde das erstmalige Erscheinen aller 3 Aortenklappen definiert (in Anlehnung an Kuhlencordt et al. 2006).**

<b>Entfernung vom Nullpunkt [µm]</b>	<b>Färbung</b>	<b>Charakteristika</b>
0-40	Hämalaun-Eosin	Übersicht
90-120	Trichrom Goldner	Kollagen
170-200	von-Kossa-Silberfärbung	Verkalkung
530-560	Ölrot	neutrale Fette

### 2.6.2.9. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung in der Leberzytosolfraktion erfolgte als Doppelbestimmung nach *Bradford*. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA) verwendet. 50 µl Probe wurden dazu mit 200 µl *Bradford*-Reagenz (Brilliant Blue G in Phosphorsäure und Methanol, Sigma) versetzt und nach 10 minütiger Inkubation bei 590 nm am Plattenreader (Spectraflour Plus, Tecan, Österreich) gemessen.

### 2.6.2.10. Isolation mononukleärer Zellen

Für die Isolation wurden 3 ml Blut vorsichtig auf 3 ml raumtemperiertes Histopaque geschichtet und 30 min bei 400 x g und RT zentrifugiert. Von den 4 resultierenden Schichten (siehe Abb. 10) wurde zunächst die oberste Schicht aus Plasma vorsichtig abpipettiert und verworfen. Die opake Grenzschicht der mononukleären Zellen wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein 15 ml-Tube überführt. Nun wurden zum Waschen der Zellen

vorsichtig 10 ml PBS zugegeben und gemischt. Nach Abzentrifugieren der Zellen bei 250 x g für 10 min wurde das alte PBS abgenommen und verworfen. Anschließend wurde erneut 2-mal in 5 ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das verbliebene PBS abgezogen, das entstandene Zellpellet wurde in 250 ml TRIZOL gelöst und in ein Eppendorf-Tube überführt. Die Lagerung erfolgte bis zur RNA-Isolation bei -80°C.

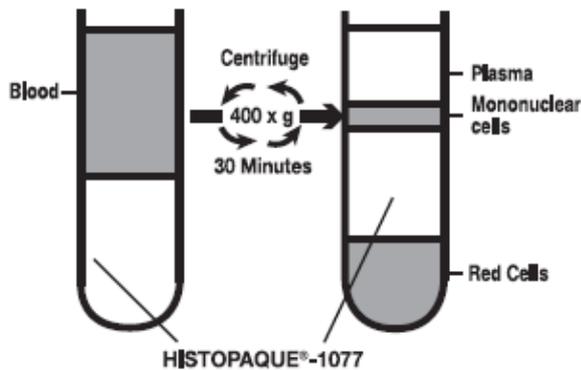


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Isolation von mononukleären Zellen vor und nach Zentrifugation mittels Histopaque-Reagenz (Sigma)

### 2.6.2.11. Genexpressionsanalyse

Für die Analyse der hepatischen relativen mRNA-Konzentration wurden ca. 30 mg Leber eingesetzt. Die gesamte RNA wurde mit 1 ml TRIZOL<sup>TM</sup>-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) RNA gemäß den Herstelleranweisungen isoliert. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte über 3 Minuten am Tissue-Lyser (Qiagen, Retsch, Deutschland) bei 15 Hz. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde das Homogenat 15 s kräftig geschüttelt. Nach 3 min Inkubation bei RT wurden die Proben 15 min bei 4°C und 13.000 U/min zentrifugiert. Der wässrige RNA-haltige Überstand wurde abgenommen und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach 10 min Inkubation bei RT erfolgte erneut ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 4°C und 13.000 U/min. Vom resultierenden Pellet wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen. In einem letzten Behandlungsschritt wurde die RNA mit 1 ml Ethanol (75% in Diethylpyrrocarbonat- (DEPC-, Sigma) Wasser gewaschen und anschließend ca. 10-15 min getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 50 µl DEPC-Wasser 10 min im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 60°C und 900 U/min gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Die RNA-Konzentration wurde in einer 1:100 Verdünnung in DEPC-Wasser bei 260 nm photometrisch bestimmt (Spektrophotometer Ultrospec 2000), der Reinheitsgrad wurde aus dem Quotienten der Extinktionen von 260 und 280 nm errechnet. Die Integrität der isolierten RNA wurde mit einer Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft. Hierfür wurden 0,36 g Agarose in 26,5 ml DEPC-Wasser und 3 ml Formaldehyd gelöst und auf über 65°C erhitzt. Nach

Abkühlen des Ansatzes wurden 50 µl Ethidiumbromid zur Visualisierung der RNA-Banden dazugegeben. Die Agaroselösung wurde gemischt und sofort in die Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden es ca. 30 min im 1x FA-Gel-Laufpuffer equilibriert. Abschließend wurden die Proben aufgetragen. Hierfür wurden 4 µl RNA, 6 µl DEPC-Wasser und 2 µl Ladepuffer vermischt, 3 min bei 65°C inkubiert, abgekühlt und schließlich auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der RNA erfolgte über ca. 45 min bei 80 V und wurde anschließend unter UV-Licht photographiert. Die Zusammensetzung der verschiedenen Reagenzien für die RNA-Gel-Elektrophorese ist in Tabelle 31 dargestellt.

**Tabelle 31: Reagenzien für RNA-Gelelektrophorese**

<b>Reagenz</b>	<b>Zusammensetzung</b>
10x FA-Gelpuffer	200 mM Mops, 50 mM Na-Acetat x 3 H <sub>2</sub> O, 10 mM EDTA, pH 7
1x FA-Gel - Laufpuffer	100 ml 10x FA Gelpuffer, 20 ml 37% Formaldehyd, 880 ml DEPC-Wasser
5x RNA Ladepuffer	20-30 mg Bromphenolblau, 80 µl 500 mM EDTA (pH 8.0), 720 µl 37% Formaldehyd, 2,0 ml Glycerol, 3,1 ml Formamid, 4,0 ml 10x FA-Gelpuffer
Gel (1,2%)	0,36 g Agarose, 3,0 ml 10x FA-Gelpuffer, 26,5 ml DEPC-Wasser

Für die cDNA-Synthese (Mastercycler Personal, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden 1,2 µg der isolierten RNA, oligo dT Primer (Operon Biotechnologies, Köln, Deutschland) und RevertAid M-MuL V reverse Transkriptase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) eingesetzt. Die Konzentration der mRNA relevanter Gene wurde per real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR; Rotorgene 2000 System; Corbett Research, Mortlake, Australien) bestimmt. Die real-time Detektion erfolgte mit SYBR® Green I (Sigma), 1,25 U Taq DNA Polymerase (Promega, Mannheim, Deutschland), 500 µM dNTPs und 26,7 pmol der spezifischen Primer (Operon Biotechnologies, Tabellen 33-35). Jeder PCR-Zyklus durchlief dabei folgende Schritte: Denaturierung für 20 s bei 95°C, Annealing der Primer für 30 s bei primerspezifischer Temperatur (58-65°C, siehe Tabellen 33-35) und Elongation bei 72°C für 55 s. Die Intensität des Fluoreszenzsignals wurde bei allen Proben nach jedem Elongationsschritt gemessen. Zur Berechnung der relativen mRNA-Konzentration wurden *threshold cycle* ( $C_t$ ) und Amplifikationseffizienz aus der Amplifikations-Kurve verwendet (RotorGene 4.6 - Software, Corbett Research). Anschließend wurde eine Schmelzkurve zur Identifikation der entstandenen Produkte erzeugt. Die Quantifizierung der spezifischen Gene erfolgte im Vergleich zu Haushalts-Gen  $\beta$ -Aktin.

Zur Überprüfung der PCR-Produkte auf Qualität und Größe wurde eine Agarose-Gel-Elektrophorese angeschlossen. Hierzu wurde ein 1,2%-iges Agarosegel hergestellt. 0,84 g Agarose wurden in 70 ml 0,5xTBE-Laufpuffer (siehe Tabelle 32) zum Kochen gebracht, nach Abkühlen auf 65°C wurden zur Visualisierung 25 µl Ethidiumbromid zugegeben. Nach gutem Durchmischen wurde das Gel in die Gelkammer gegossen. Nach 20 min Lufttrocknung erfolgte für 30 min eine Equilibrierung in 0,5xTBE-Laufpuffer. 10 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl 5xGelladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 30 - 40 min. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel unter UV-Licht analysiert.

**Tabelle 32: Reagenzien für DNA-Gelelektrophorese**

<b>Reagenz</b>	<b>Zusammensetzung</b>
5xTBE – Gelpuffer	54,0 g Tris Base, 2705 g Borsäure, 0,1 M EDTA; in 1 Liter Reinstwasser
0,5xTBE - Laufpuffer	100 ml 5xTBE-Gelpuffer, 900 ml Reinstwasser
6xDNA Gelladepuffer	2,5 µl Bromphenolblau (0,25%, w/v), 300 µl Glycerol (30%, v/v), 700 µl Reinstwasser
Gel (1,2 %)	0,84 g Agarose, 70 ml 0,5xTBE – Laufpuffer

**Tabelle 33: Primersequenzen für real time PCR in Lebern von Ratten**

Gen	Gen-Bank-Nr.	Primersequenzen	Annealing-temperatur (°C)	Cyclenzahl	Produktlänge (bp)
β-Aktin	NM 031144	for: 5' ATC GTG CGT GAC ATT AAA GAG AAG 3' rev: 5' GGA CAG TGA GGC CAG GAT AGA G 3'	60	18	429
SREBP 2	XM 216989	for: 5' ATC CGC CCA CAC TCA CGC TCC TC 3' rev: 5' GGC CGC ATC CCT CGC ACT G 3'	65	28	214
HMGR	NM 013134	for: 5' AAG GGG CGT GCA AAG ACA ATC 3' rev: 5' ATA CGG CAC GGA AAG AAC CAT AGT 3'	57	23	406
LDL-R	NM 175762	for: 5' AGA ACT GCG GGG CCG AAG ACA C 3' rev: 5' AAA CCG CTG GGA CAT AGG CAC TCA 3'	65	30	490
Cyp7A1	NM 012942	for: 5' CAA GAC GCA CCT CGC TAT CC 3' rev: 5' CCG GCA GGT CAT TCA GTT G 3'	60	25	206
SREBP 1c	XM 001075680	for: 5' GGA GCC ATG GAT TGC ACA TT 3' rev: 5' AGG AAG GCT TCC AGA GAG GA 3'	60	23	191
FSS	NM 017332	for: 5' AGG TGC TAG AGG CCC TGC TA 3' rev: 5' GTG CAC AGA CAC CTT CCC AT 3'	60	25	281
SCD1	NM 139192	for: 5' CCA GAG CGT ACC AGC TTT TC 3' rev: 5' TTA CCC ACT TCG CAA GCT CT 3'	60	25	195
FXR	NM 021745	for: 5' CAG CCA CAG ATC TCC TCC TC 3' rev: 5' TCT TTG TCA CAG GCA TCT CG 3'	60	25	160
BSEP	AF452071.1	for: 5' CCT CCC ACC CTT GAT CAC TA 3' rev: 5' CGC TCA TTA CAG AGG GAA GC 3'	60	30	227
LPL	BC081836.1	for: 5' TCC CAC CAC AAC GAA GTA CA 3' rev: 5' TCA GCC AGG GCA TTA TTT TC 3'	60	30	205
LXR	NM_031627.2	for: 5' TGA TGC TGA ATT TGC TCT GC 3' rev: 5' GGC TCA CCA GCT TCA TTA GC.3'	60	30	185

β-Aktin = beta Aktin, SREBP = Sterol Regulatory Element Binding Protein, HMGR = β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA-Reduktase, LDL-R = Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor; Cyp7A1 = Cholesterin-7-alpha-Hydroxylase 1, FSS = Fettsäuresynthase, SCD1 = Stearoyl-Coenzym-A-Desaturase 1, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, BSEP = Bile Salt Export Pump, LPL = Lipoproteinlipase, LXR = Leber-X-Rezeptor

**Tabelle 34: Primersequenzen für real time PCR in Lebern von apoE knockout-Mäusen**

Gen	Genbank Nr.		Primersequenz	Annealing- temperatur (°C)	Cyclen- zahl	Produkt- länge (bp)
β-Aktin	NM_007393.2	for	5`ACG GCC AGG TCA TCA CTA TTG 3`	66	28	87
		rev	5`CAC AGG ATT CCA TAC CCA AGA AG 3`			
SREBP 1c	NM_011480.2	for	5`GCA CCC TCT TGC TCT GTA GG 3`	65	30	312
		rev	5`ACC AAG CCA GCA AAT ACA CC 3`			
SCD1	NM_009127.3	for	5`AGG TGC CTC TTA GCC ACT GA 3`	60	20	280
		rev	5`CTG CTG AGG ATC CCC AAA TA 3`			
FSS	NM_007988.3	for	5`TGG GTT CTA GCC AGC AGA GT 3`	60	30	158
		rev	5`ACC ACC AGA GAC CGT TAT GC 3`			
LDL-R	NM_010700.2	for	5`CAG CTC TGT GTG AAC CTG GA 3`	60	30	271
		rev	5`TCA GGG CGC TGT AGA TCT TT 3`			
HL	NM_008280.2	for	5`GAC TGG ATC TCC CTG GCA TA 3`	60	35	131
		rev	5`AGG TGA ACT TTG CTC CGA GA 3`			
LPL	NM_008509.2	for	5`GGG CTC TGC CTG AGT TGT AG 3`	62	35	198
		rev	5`AGA AAT TTC GAA GGC CTG GT 3`			
ApoA5	NM_080434.3	for	5`CCT GCA GAT TGC TGC ATT TA 3`	60	25	239
		rev	5`GTT AAC CGG AGT GAC CCT CA 3`			
PPAR alpha	NM_011144.3	for	5`CGG GAA AGA CCA GCA ACA AC 3`	60	30	142
		rev	5`TGG CAG CAG TGG AAG AAT CG 3`			
ACO	NM_015729.2	for	5`CAG GAA GAG CAA GGA AGT GG 3`	60	30	189
		rev	5`CCT TTC TGG CTG ATC CCA TA 3`			
HMGS	NM_008256.3	for	5`CCT CTG TGA ATC CTG GGT GT 3`	60	25	141
		rev	5`CTG TGG GGA AAG ATC TGC AT 3`			

β-Aktin = beta Aktin, SREBP = Sterol Regulatoy Element Binding Protein, SCD1 = Stearoyl-Coenzym-A-Desaturase 1, FSS = Fettsäuresynthase, LDL-R = Low-Density-Lipoprotein- Rezeptor; HL = hepatische Lipase, LPL = Lipoproteinlipase, Apo A5 = Apolipoprotein A5, PPAR alpha = Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha , ACO = Acyl-CoA-Oxidase, HMGS = β-Hydroxy-β-Methylglutaryl-CoA-Synthase

**Tabelle 35: Primersequenzen für real time PCR in mononukleären Zellen von Probanden**

<b>Gen</b>	<b>Gen-Bank-Nr.</b>	<b>Primersequenz</b>	<b>Annealing-Temperatur (°C)</b>	<b>Cyclenzahl</b>	<b>Produktlänge (bp)</b>
β-Aktin	NM_001101.2	for: 5' GAG CGG GAA ATC GTG CGT GAC 3' rev: 5' GCC TAG AAG CAT TTG CGG TGG AC 3'	60	19	518
SREBP 2	NM_004599.2	for: 5' CGC CAC CTG CCC CTC TCC TTC C 3' rev: 5' TGC CCT GCC ACC TAT CCT CTC ACG 3'	65	28	390
LDL-R	NM_000527.2	for: 5' CCC CGC AGA TCA ACC CCC ACT C 3' rev: 5' AGA CCC CCA GGC AAA GGA AGA CGA 3'	60	30	369

β-Aktin = beta Aktin, SREBP = Sterol Regulatory Element Binding Protein, LDL-R = Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor

## **2.6.3. Analysen in Faeces, Urin und Chymus**

### **2.6.3.1. Stickstoffbestimmung in Faeces, Urin und Chymus**

Vor der Analytik wurden die Faeces- und Chymusproben gefriergetrocknet und gewogen. Die Faecesproben wurden zusätzlich in einer IKA-Universalmühle M20 (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) gemahlen. Für die Stickstoffbestimmung wurden dann entweder 200 mg der gemahlene Faecesprobe, die gesamte Chymusprobe oder aliquote Mengen an Urin mit Selen als Reaktionsbeschleuniger sowie 15 ml 96%-iger Schwefelsäure versetzt. Dieser Ansatz wurde 35 min bei 400°C in einem Aufschlussblock inkubiert. Nach 20-minütiger Abkühlung der Proben wurden diese in 40 ml Reinstwasser gelöst. Abschließend wurde im Kjeltex Analyzer (Foss, Rellingen, Deutschland) die enthaltene Menge an Stickstoff bestimmt. Die Bestimmung der Stickstoffkonzentration erfolgte im Chymus als Ein-, im Faeces als Zwei- und im Urin als Dreifachbestimmung. Die Stickstoffkonzentrationen wurden in Faeces und Chymus auf 1g Trockensubstanz, im Urin pro ml Flüssigkeitsvolumen bezogen.

### **2.6.3.2. Bestimmung der Triglyceridkonzentration im Faeces**

Die Extraktion der Lipide aus dem Faeces erfolgte nach Hara und Radin (1978). Hierfür wurden 500 mg gemahlene und gefriergetrocknete Faecesprobe mit 4 ml Hexan-Isopropanol (3:2, v/v) versetzt und über Nacht im Schüttelinkubator inkubiert. Nach kräftigem Durchmischen des Extraktes erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 2000 U/min. Aliquote des Überstandes wurden für die Bestimmung der Konzentration an Triglyceriden eingesetzt und analog den Beschreibungen unter 2.6.2.3. analysiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. *Untersuchung zur Verdaulichkeit von Lupinenprotein (Versuch 1)*

##### 3.1.1. Körpermassenentwicklung und Futteraufnahme

Zu Versuchsbeginn hatten die Tiere beider Gruppen im Mittel gleiche Anfangskörpermassen von  $238 \pm 18$  g. Weder durch die 4-tägige Fütterung während der Vorperiode, noch durch die anschließende 5-tägige Fütterung in den Stoffwechsellkäfigen (Hauptperiode) konnte durch Lupinenprotein eine veränderte Wachstumsentwicklung der Tiere gegenüber Casein festgestellt werden. Die Werte sind in Tabelle 36 dargestellt.

Die Lebermasse der Tiere war in der Gruppe, die über 9 Tage die Lupinenproteindiät erhielt, signifikant niedriger, als in der Kontrollgruppe Casein (-11%,  $P=0,005$ ). Auch die relative Lebermasse war bei den Tieren der Gruppe, die 20% Lupinenprotein in ihrer Diät erhielten, signifikant niedriger als bei den Tieren der Kontrollgruppe (-9%,  $P=0,003$ ).

**Tabelle 36: Leistungsparameter von Ratten, die über 9 Tage eine Diät mit entweder 20% Casein oder 20% Lupinenprotein erhielten.**

	Caseindiät	Lupinenproteindiät
KM Beginn Vorperiode [g]	$239 \pm 19$	$237 \pm 17$
KM Start Hauptperiode [g]	$246 \pm 16$	$244 \pm 17$
KM Ende Hauptperiode [g]	$272 \pm 13$	$266 \pm 14$
KMZ Vorperiode [g/d]	$1,84 \pm 1,14$	$1,91 \pm 0,58$
KMZ Hauptperiode [g/d]	$5,11 \pm 0,74$	$4,31 \pm 1,12$
Lebermasse absolut [g]	$12,5 \pm 0,7$	$11,1 \pm 0,8^*$
Lebermasse relativ [g/100g KM]	$4,59 \pm 0,23$	$4,16 \pm 0,19^*$

KM= Körpermasse, KMZ=Körpermassezunahme

Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt,  $n=7$

\* signifikant unterschiedlich von Tieren, die Casein erhielten ( $p<0.05$ ; Student's t-Test)

##### 3.1.2. Cholesterinkonzentrationen

Die Cholesterinkonzentration in Plasma und Leber der Tiere, welche über 9 Tage 20% Lupinenprotein in der Diät erhielten, war gegenüber den Tieren, die 20% Kontrollprotein erhielten, nicht verändert ( $P=0,265$  bzw.  $P=0,662$ , siehe Tabelle 37).

**Tabelle 37: Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Leber von Ratten, die über 9 Tage eine Diät mit entweder 20% Casein oder 20% Lupinenprotein erhielten.**

	Caseindiät	Lupinenproteindiät
Plasma [mmol/l]	$6,41 \pm 0,97$	$5,74 \pm 1,18$
Leber [ $\mu$ mol/g]	$95,4 \pm 10,3$	$98,5 \pm 15,0$

Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt,  $n=7$

### 3.1.3. Triglyceridkonzentrationen und Exkretionen

Um den Einfluss von Lupinenprotein auf die Triglyceride zu untersuchen, wurden deren Konzentrationen in Plasma, Leber und Faeces bestimmt; die Werte dazu sind in Tabelle 38 dargestellt. Die Triglyceridkonzentration im Plasma war durch Fütterung von Lupinenprotein um 18% niedriger im Vergleich zu Casein, dieser Effekt ist jedoch nicht statistisch signifikant ( $P=0,084$ ). In den Lebern zeigten sich durch die 9-tägige Fütterung der beiden Diäten keine signifikanten Unterschiede in den Triglyceridkonzentrationen. Ein signifikanter Effekt des Lupinenproteins auf die Triglyceridkonzentration im Faeces der Tiere konnte hingegen beobachtet werden. Hier war die Konzentrationen durch die Aufnahme von 20% Lupinenprotein um 32% höher als nach Aufnahme von Casein ( $P=0,001$ ), die Exkretion war um 34% ( $P=0,001$ ) höher.

**Tabelle 38: Triglyceridkonzentrationen in Plasma, Leber und Faeces sowie Triglyceridexkretion von Ratten, die über 9 Tage eine Diät mit entweder 20% Casein oder 20% Lupinenprotein erhielten.**

		Caseindiät	Lupinenproteindiät
TG-Konzentration	Plasma [mmol/l]	1,35 ± 0,22	1,11 ± 0,27
	Leber [µmol/g]	29,8 ± 6,0	34,6 ± 7,3
	Faeces [mg/g]	1,35 ± 0,18	1,78 ± 0,11*
TG-Exkretion	Faeces [mg/d]	1,94 ± 0,23	2,61 ± 0,21*

TG = Triglyceride

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=7

\* signifikant unterschiedlich von Tieren, die Casein erhielten ( $p<0.05$ ; Student's t-Test)

### 3.1.4. Stickstoffexkretion

Zur Beurteilung der Gesamtstickstoffexkretion der Tiere während der Fütterung der Diäten in den Stoffwechselläufigen wurde die Stickstoff-Konzentration in Urin, Faeces und Chymus bestimmt. Die Gesamturinmenge unterschied sich während der Versuchsphase zwischen den beiden Gruppen Casein und Lupinenprotein nicht (siehe Tabelle 39,  $P=0,747$ ). Ebenso unbeeinflusst war die im Urin enthaltene N-Konzentration ( $P=0,564$ ) sowie die tägliche Stickstoffausscheidung ( $P=0,144$ ). Ebenfalls keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigten sich in der Gesamtmenge an Faeces, gemessen jeweils als Feucht- und Trockenmasse. Die im Faeces enthaltene Konzentration an Stickstoff sowie die N-Exkretion unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den Tieren beider Gruppen. Die im Chymus bestimmte Konzentration an Stickstoff zeigte ebenso, wie die in Urin und Faeces, keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ( $P=0,720$ ). Demnach hat Lupinenprotein im Vergleich zum Kontrollprotein Casein keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtstickstoffexkretion von

Ratten, die über insgesamt 9 Tage die semisynthetische Diät mit 20% des Testproteins erhielten.

**Tabelle 39: Täglich ausgeschiedene Urin- und Faecesmenge, Stickstoffkonzentrationen und -exkretionen von Ratten, die über 9 Tage eine Diät mit entweder 20% Casein oder 20% Lupinenprotein erhielten.**

<b>Parameter</b>	<b>Caseindiät</b>	<b>Lupinenproteindiät</b>
<b><i>Urin</i></b>		
tägliche Ausscheidung [ml/d]	7,74 ± 3,85	8,47 ± 4,39
N-Konzentration [mg/ml]	18,4 ± 5,3	20,2 ± 5,7
N-Exkretion [mg/d]	126 ± 37	151 ± 22
<b><i>Faeces</i></b>		
tägliche Ausscheidung [g FM/d]	2,44 ± 0,27	2,51 ± 0,23
tägliche Ausscheidung [g TM/d]	1,42 ± 0,10	1,48 ± 0,06
N-Konzentration [mg/g TM]	20,9 ± 3,2	22,6 ± 2,2
N-Exkretion [mg/d]	29,6 ± 4,7	33,4 ± 3,4
<b><i>Chymus</i></b>		
Probenmenge [g TM]	0,11 ± 0,03	0,15 ± 0,05
N-Konzentration [mg/g TM]	28,1 ± 3,2	27,3 ± 4,7

FM = Feuchtmasse, TM = Trockenmasse, N = Stickstoff

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=7

### **3.2. Einfluss von nativem und erhitztem Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel in Abhängigkeit von der Diätzusammensetzung (Versuch 2)**

#### **3.2.1. Körpermassenentwicklung und Futteraufnahme**

Der Vergleich der Daten von Körpermasse und Körpermassenzunahme ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den 6 Gruppen (Tabelle 40). Allerdings wurde ein Effekt der Proteinart festgestellt. Die Ratten, die Casein mit der Diät erhielten, hatten am Versuchsende im Mittel leicht, aber signifikant niedrigere Körpermassen und niedrigere Körpermassenzunahmen als Ratten, die natives oder erhitztes Lupinenprotein erhielten ( $P=0,025$  bzw.  $P=0,013$ ). Die Art der Diät hatte keinen Effekt und es wurde keine Interaktion zwischen Proteinart und Diät festgestellt

Die Analyse der absoluten und relativen Lebermasse ergab signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Für beide Versuchsparameter wurde sowohl ein signifikanter Effekt der Proteinart als auch der Art der Diät festgestellt. Ratten, die Casein erhielten, hatten im Mittel höhere Lebermassen als Ratten, die natives oder erhitztes Lupinenprotein aufnahmen. Ratten, die fettreiche Diäten erhielten, hatten im Mittel niedrigere Lebermassen als Ratten, die kohlenhydratreiche Diäten aufnahmen. Das Erhitzen des Lupinenproteins hatte weder einen Einfluss auf die Körpermasse, noch auf die Lebermasse der Tiere.

#### **3.2.2. Glukosekonzentration**

Die Glukosekonzentrationen im Plasma waren mit mittleren  $8,92 \pm 1,36$  mmol/l ( $n=60$ ) in allen 6 Gruppen gleich. Es zeigten sich keine Effekte durch Proteinart oder Diät. Eine Interaktion beider Parameter wurde ebenfalls nicht gezeigt.

**Tabelle 40: Leistungsdaten von Ratten, welche über 13 Tage entweder eine kohlenhydratreiche oder eine fettreiche Diät mit entweder Casein, nativem oder erhitztem Lupinenprotein erhielten.**

	Kohlenhydratreiche Diät			Fettreiche Diät			P-Wert two-way ANOVA		
	Casein	Lupinenprotein nativ	Lupinenprotein erhitzt	Casein	Lupinenprotein nativ	Lupinenprotein erhitzt	Protein	Diät	Protein x Diät
Körpermasse Start [g]	204 ± 8	204 ± 10	203 ± 9	204 ± 8	204 ± 7	204 ± 8	1,000	0,958	0,997
Körpermasse Ende [g]	292 ± 7	297 ± 7	297 ± 7	293 ± 4	298 ± 9	299 ± 6	0,025	0,385	0,981
Körpermassezunahme [g/d]	6,34 ± 0,51	6,70 ± 0,34	6,74 ± 0,51	6,44 ± 0,51	6,81 ± 0,54	6,86 ± 0,30	0,013	0,346	0,997
Absolute Lebermasse [g]	16,4 ± 1,2 <sup>a</sup>	14,6 ± 0,8 <sup>bc</sup>	15,3 ± 1,2 <sup>b</sup>	15,2 ± 0,8 <sup>b</sup>	14,2 ± 1,2 <sup>c</sup>	14,8 ± 1,0 <sup>bc</sup>	≤0,001	0,007	0,469
Relative Lebermasse [g/100g KM]	5,63 ± 0,37 <sup>a</sup>	4,93 ± 0,20 <sup>b</sup>	5,15 ± 0,35 <sup>b</sup>	5,19 ± 0,26 <sup>b</sup>	4,76 ± 0,40 <sup>c</sup>	4,93 ± 0,30 <sup>bc</sup>	≤0,001	0,001	0,371

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=10

<sup>a,b,c</sup> Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0.05; Fisher`s Test)

### 3.2.3. Cholesterinkonzentration

Die Cholesterinkonzentrationen im Plasma der Tiere zeigten signifikante Unterschiede zwischen den 6 Gruppen. Es wurde ein signifikanter Effekt der Diät festgestellt. Ratten, die fettreiche Diät erhielten, hatten signifikant niedrigere Cholesterinkonzentrationen im Plasma, als die Tiere, die kohlenhydratreiche Diäten aufnahmen ( $P \leq 0,001$ , siehe Tabelle 41). Es konnte weder ein Effekt der Proteinart, noch eine Interaktion zwischen Proteinart und Diät festgestellt werden. Allerdings hatten Ratten, die natives Lupinenprotein aufnahmen, signifikant niedrigere Plasmacholesterinkonzentrationen (-35%) als Ratten, die Casein erhielten, wenn fettreiche Diät eingesetzt wurde. Tiere, die erhitztes Lupinenprotein aufnahmen, hatten Werte, die zwischen denen beider Gruppen lagen.

Bezüglich der Cholesterinkonzentrationen in den VLDL und LDL konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Die Art der Diät hatte einen signifikanten Einfluss auf die Cholesterinkonzentration. Ratten, die fettreiche Diät erhielten, hatten sowohl in den VLDL als auch in den LDL signifikant niedrigere Werte, als Ratten, die kohlenhydratreiche Diät aufnahmen ( $P \leq 0,001$  bzw.  $P = 0,002$ ). Die Proteinart zeigte keine signifikanten Effekte auf die Cholesterinkonzentrationen, eine Interaktion von Diät und Proteinart wurde ebenfalls nicht festgestellt.

Bei der Cholesterinkonzentration in den HDL wurde eine Interaktion von Proteinart und Diät festgestellt ( $P = 0,031$ ). Ratten, die fettreiche Diät erhielten, zeigten in den Gruppen, die natives oder erhitztes Lupinenprotein aufnahmen, signifikant niedrigere Konzentrationen, als Ratten, die Casein erhielten. Tiere, die kohlenhydratreiche Diät aufnahmen, zeigten zwischen den 3 Gruppen keine Unterschiede in den HDL-Cholesterinkonzentrationen. Des Weiteren wurde ein signifikanter Effekt der Diät gezeigt. Tiere, die fettreiche Diät aufnahmen, hatten höhere Werte, als Tiere, die kohlenhydratreiche Diät erhielten ( $P \leq 0,001$ ). Die Proteinart hatte ebenfalls einen signifikanten Einfluss. Ratten, die Lupinenproteine aufnahmen, hatten insgesamt niedrigere Cholesterinkonzentrationen in den HDL, als Tiere, die Casein erhielten ( $P = 0,004$ ).

Für die Cholesterinkonzentration in der Leber wurde ein signifikanter Effekt der Proteinart festgestellt. Es hatten sowohl Tiere, die natives Lupinenprotein erhielten, als auch Tiere, die erhitztes Lupinenprotein aufnahmen, geringere Werte, als die Tiere der Kontrollgruppe ( $P = 0,002$ ). Ein signifikanter Einfluss der Diät wurde ebenso wie eine Interaktion von Proteinart und Diät nicht gezeigt.

**Tabelle 41: Cholesterinkonzentration von Ratten, welche über 13 Tage entweder eine kohlenhydratreiche oder eine fettreiche Diät mit entweder Casein, nativem oder erhitztem Lupinenprotein erhielten.**

	Kohlenhydratreiche Diät			Fettreiche Diät			P-Wert two-way ANOVA		
	Casein	Lupinenprotein nativ	Lupinenprotein erhitzt	Casein	Lupinenprotein nativ	Lupinenprotein erhitzt	Protein	Diät	Protein x Diät
Plasma [mmol/l]	12,3 ± 3,9 <sup>a</sup>	12,5 ± 3,6 <sup>a</sup>	13,4 ± 3,0 <sup>a</sup>	9,33 ± 3,43 <sup>b</sup>	6,09 ± 1,39 <sup>c</sup>	7,24 ± 0,99 <sup>bc</sup>	0,272	≤0,001	0,137
VLDL [mmol/l]	10,7 ± 3,2 <sup>a</sup>	10,5 ± 2,3 <sup>a</sup>	11,1 ± 2,2 <sup>a</sup>	6,34 ± 2,54 <sup>b</sup>	4,95 ± 1,63 <sup>b</sup>	5,42 ± 1,39 <sup>b</sup>	0,558	≤0,001	0,601
LDL [mmol/l]	2,77 ± 1,91 <sup>ab</sup>	3,19 ± 1,75 <sup>a</sup>	3,33 ± 1,24 <sup>a</sup>	2,52 ± 1,25 <sup>ab</sup>	1,60 ± 0,51 <sup>b</sup>	1,80 ± 0,62 <sup>b</sup>	0,829	0,002	0,210
HDL [mmol/l]	0,26 ± 0,08 <sup>b</sup>	0,23 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,25 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,46 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,06 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,07 <sup>b</sup>	0,004	≤0,001	0,031
Leber [μmol/g]	135 ± 27 <sup>a</sup>	107 ± 22 <sup>b</sup>	88,4 ± 25,1 <sup>b</sup>	128 ± 22 <sup>a</sup>	91,8 ± 35,3 <sup>b</sup>	117 ± 37 <sup>ab</sup>	0,002	0,781	0,057

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=10

<sup>a,b,c</sup> Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0.05; Fisher`s Test)

**Tabelle 42: Triglyceridkonzentration von Ratten, welche über 13 Tage entweder eine kohlenhydratreiche oder eine fettreiche Diät mit entweder Casein, nativem oder erhitztem Lupinenprotein erhielten.**

	Kohlenhydratreiche Diät			Fettreiche Diät			P-Wert two-way ANOVA		
	Casein	Lupinenprotein nativ	Lupinenprotein erhitzt	Casein	Lupinenprotein nativ	Lupinenprotein erhitzt	Protein	Diät	Protein x Diät
Plasma [mmol/l]	1,13 ± 0,28 <sup>ab</sup>	0,96 ± 0,38 <sup>b</sup>	1,01 ± 0,35 <sup>b</sup>	1,47 ± 0,60 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,22 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,34 <sup>b</sup>	0,002	0,843	0,049
VLDL † [mmol/l]	0,92 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,76 ± 0,33 <sup>ab</sup>	0,79 ± 0,31 <sup>ab</sup>	1,12 ± 0,46 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,20 <sup>b</sup>	0,63 ± 0,32 <sup>b</sup>	0,003	0,630	0,135
LDL [mmol/l]	0,15 ± 0,08	0,14 ± 0,09	0,14 ± 0,07	0,15 ± 0,07	0,07 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,076	0,051	0,272
HDL [mmol/l]	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,161	0,095	0,487
Leber [μmol/g]	53,5 ± 15,0 <sup>c</sup>	38,3 ± 4,7 <sup>d</sup>	50,3 ± 13,2 <sup>cd</sup>	89,5 ± 28,1 <sup>a</sup>	69,7 ± 12,0 <sup>b</sup>	78,1 ± 13,1 <sup>ab</sup>	0,004	≤0,001	0,720

† = errechneter Wert

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=10

<sup>a,b,c,d</sup> Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0.05; Fisher`s Test)

### 3.2.4. Triglyceridkonzentrationen

Zur weiteren Charakterisierung der Wirkung von Lupinenproteinen auf den Lipidstoffwechsel wurden neben den Cholesterin- auch die Triglyceridkonzentrationen der Tiere (siehe Tabelle 42) bestimmt. Für die Triglyceridkonzentrationen im Plasma konnte eine Interaktion von Proteinart und Diät festgestellt werden. Tiere, die fettreiche Diät aufnahmen, hatten in den Gruppen, die natives oder erhitztes Lupinenprotein erhielten, signifikant niedrigere Werte, als die Tiere, die Casein aufnahmen (-47% bzw. -46%,  $P=0,049$ ). Ratten, die kohlenhydratreiche Diät erhielten, zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen den 3 Gruppen. Da jedoch auch bei Aufnahme der kohlenhydratreichen Diät durch natives sowie erhitztes Lupinenprotein eine leichte Reduktion der Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle erzielt wurde (-15% bzw. -10%, n.s.), ergab sich für die Proteinart ein signifikanter Effekt auf die Triglyceridkonzentrationen im Plasma ( $P=0,002$ ). Für die Diät wurde kein Einfluss festgestellt.

In den VLDL zeigte sich ein ähnlicher Effekt, wie im Plasma. Die Tiere, die natives oder erhitztes Lupinenprotein in fettreicher Diät aufnahmen, hatten signifikant niedrigere Triglyceridkonzentrationen in den VLDL, als die Tiere, die Casein in der fettreichen Kost erhielten. Da auch bei den Tieren, die natives oder erhitztes Lupinenprotein in kohlenhydratreicher Diät aufnahmen, leichte Triglyceridsenkungen beobachtet wurden, ergab sich ein signifikanter Effekt der Proteinart. So hatten insgesamt die Tiere, die natives oder erhitztes Lupinenprotein aufnahmen, niedrigere Werte, als die Tiere, die Casein erhielten ( $P=0,003$ ). Ein Effekt der Diät wurde nicht festgestellt, ebenso wenig wie eine signifikante Interaktion von Protein und Diät.

Für die Triglyceridkonzentrationen in den LDL wurden keine Unterschiede zwischen den 6 Gruppen festgestellt. Dennoch konnte zum einen ein tendenzieller Effekt des Proteins gezeigt werden, denn Tiere, die natives oder erhitztes Lupinenprotein erhielten, hatten niedrigere Konzentrationen, als Tiere, die Casein erhielten ( $P=0,076$ ). Zum anderen wurde ebenso ein tendenzieller Effekt der Diät beobachtet. Tiere, die die fettreiche Diät aufnahmen, hatten insgesamt leicht niedrigere Werte, als die Tiere, die die kohlenhydratreiche Kost erhielten. Eine signifikante Interaktion beider Versuchsparameter wurde nicht gezeigt.

In den HDL war die Konzentration an Triglyceriden zwischen allen 6 Gruppen gleich. Es zeigten sich keine Effekte durch Proteinart oder Diät, eine Interaktion von Protein und Diät wurde auch hier nicht festgestellt.

Die Triglyceridkonzentrationen in der Leber waren signifikant unterschiedlich. Es zeigte sich zum einen ein Effekt der Proteinart. So hatten Ratten, die Lupinenproteine aufnahmen, niedrigere Werte, als Ratten, die Casein erhielten ( $P=0,004$ ). Zum anderen hatte die Diät einen Einfluss auf die Triglyceridkonzentrationen der Leber. Die Tiere, die fettreiche Diät erhielten, hatten höhere Konzentrationen, als Tiere, die kohlenhydratreiche Diät aufnahmen ( $P\leq 0,001$ ). Eine Interaktion von Protein und Diät wurde nicht gezeigt.

### **3.2.5. Enzymaktivitäten an FSS und G6PDH**

Die Aktivität der FSS war zwischen den 6 Gruppen unterschiedlich (siehe Tabelle 43). Es konnte ein signifikanter Effekt der Diät festgestellt werden. So hatten Ratten, die fettreiche Diät erhielten, niedrigere Werte, als Tiere, die kohlenhydratreiche Diät aufnahmen ( $P\leq 0,001$ ). Außerdem hatten Ratten, die kohlenhydratreiche Diät erhielten, in den Gruppen, die natives oder erhitztes Lupinenprotein erhielten, niedrigere Aktivitäten, als Tiere, die Casein aufnahmen (-34% bzw. -31%). Tiere, die fettreiche Diät erhielten, hatten in allen 3 Gruppen gleiche Aktivitäten. Eine Interaktion von Protein und Diät konnte jedoch nur als tendenziell bewertet werden ( $P=0,098$ ). Ein signifikanter Effekt der Proteinart wurde nicht gezeigt.

Auch die spezifische Enzymaktivität der G6PDH war zwischen den 6 Gruppen unterschiedlich. Die Tiere, die kohlenhydratreiche Diät erhielten, hatten in den Gruppen, die natives oder erhitztes Lupinenprotein erhielten, niedrigere Werte, als die Tiere, die Casein aufnahmen (-38% bzw. -32%). Tiere, die fettreiche Diät erhielten, hatten in allen 3 Gruppen gleiche Aktivitäten der G6PDH. Ratten, die kohlenhydratreiche Diät erhielten, hatten insgesamt höhere Werte, als Ratten, die fettreiche Diät aufnahmen. Demnach konnte sowohl für Proteinart und Diät ( $P=0,035$  bzw.  $P\leq 0,001$ ) als auch für die Interaktion beider Parameter eine Signifikanz angegeben werden ( $P=0,044$ ).

**Tabelle 43: Enzymaktivitäten [nmol/mg Protein] von Ratten, welche über 13 Tage entweder eine kohlenhydratreiche oder eine fettreiche Diät mit entweder Casein, nativem oder erhitztem Lupinenprotein erhielten.**

	Kohlenhydratreiche Diät			Fettreiche Diät			P-Wert two-way ANOVA		
	Casein	Lupinenprotein nativ	Lupinenprotein erhitzt	Casein	Lupinenprotein nativ	Lupinenprotein erhitzt	Protein	Diät	Protein x Diät
FSS	3,35 ± 1,10 <sup>a</sup>	2,20 ± 1,10 <sup>b</sup>	2,31 ± 0,95 <sup>b</sup>	0,63 ± 0,50 <sup>c</sup>	0,68 ± 0,67 <sup>c</sup>	0,61 ± 0,38 <sup>c</sup>	0,115	≤0,001	0,098
G6PDH	38,9 ± 17,4 <sup>a</sup>	24,2 ± 5,14 <sup>bc</sup>	26,3 ± 6,14 <sup>b</sup>	16,9 ± 5,14 <sup>c</sup>	16,5 ± 6,60 <sup>c</sup>	17,0 ± 8,79 <sup>c</sup>	0,035	≤0,001	0,044

FSS = Fettsäuresynthase, G6PDH = Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=10

<sup>a,b,c</sup> Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0.05; Fisher`s Test)

**Tabelle 44: Genexpressionsanalysen von Ratten, welche über 13 Tage entweder eine kohlenhydratreiche oder eine fettreiche Diät mit entweder Casein, nativem oder erhitztem Lupinenprotein erhielten.**

	Kohlenhydratreiche Diät			Fettreiche Diät			P-Wert two-way ANOVA		
	Casein	Lupinenprotein nativ	Lupinenprotein erhitzt	Casein	Lupinenprotein nativ	Lupinenprotein erhitzt	Protein	Diät	Protein x Diät
SREBP 1c	1,00 ± 0,31	1,17 ± 0,54	0,99 ± 0,66	1,00 ± 0,33	0,74 ± 0,29	0,88 ± 0,55	0,913	0,171	0,354
FSS	1,00 ± 0,57 <sup>a</sup>	0,46 ± 0,36 <sup>bc</sup>	0,55 ± 0,57 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,12 <sup>c</sup>	0,26 ± 0,15 <sup>bc</sup>	0,31 ± 0,18 <sup>bc</sup>	0,177	≤0,001	0,028
SCD1	1,00 ± 0,72 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,55 <sup>ab</sup>	0,53 ± 0,30 <sup>b</sup>	0,30 ± 0,16 <sup>b</sup>	0,33 ± 0,25 <sup>b</sup>	0,26 ± 0,10 <sup>b</sup>	0,153	≤0,001	0,285
LPL	1,00 ± 0,52	0,88 ± 0,35	0,76 ± 0,50	1,11 ± 0,72	0,59 ± 0,33	0,55 ± 0,23	0,031	0,318	0,408
SREBP 2	1,00 ± 0,49 <sup>b</sup>	1,71 ± 0,67 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,33 <sup>bc</sup>	0,66 ± 0,20 <sup>b</sup>	0,81 ± 0,24 <sup>ab</sup>	1,24 ± 0,76 <sup>ab</sup>	0,082	0,211	0,001
HMG-CoA-R	1,00 ± 0,40	1,35 ± 0,65	1,17 ± 0,82	0,83 ± 0,30	0,69 ± 0,35	0,91 ± 0,49	0,765	0,017	0,347
LDL-R	1,00 ± 0,47	1,16 ± 0,85	0,70 ± 0,29	0,77 ± 0,29	0,70 ± 0,18	0,73 ± 0,29	0,321	0,080	0,254
Cyp7A1	1,00 ± 0,92	0,59 ± 0,39	0,68 ± 0,54	0,56 ± 0,49	0,75 ± 0,64	1,11 ± 0,71	0,586	0,778	0,134
BSEP	1,00 ± 0,73	1,39 ± 1,26	1,05 ± 1,09	1,18 ± 1,10	0,49 ± 0,42	0,41 ± 0,49	0,470	0,074	0,182
FXR	1,00 ± 0,43	1,35 ± 0,94	1,00 ± 0,55	1,19 ± 0,55	0,97 ± 0,50	1,16 ± 0,50	0,913	0,946	0,294
LXR	1,00 ± 0,54	0,81 ± 0,54	0,69 ± 0,46	0,75 ± 0,19	0,58 ± 0,42	0,78 ± 0,53	0,497	0,309	0,460

SREBP = Sterol Regulatory Element Bindung Protein, HMGR =  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-CoA-Reduktase, LDL-R = Low-Density-Lipoprotein- Rezeptor; Cyp7A1 = Cholesterin-7-alpha-Hydroxylase 1, FSS = Fettsäuresynthase, SCD1 = Stearoyl-Coenzym-A-Desaturase 1, FXR = Farnesoid-X-Rezeptor, BSEP = Bile Salt Export Pump, LPL = Lipoproteinlipase, LXR = Leber-X-Rezeptor

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=10

Als Haushaltsgen diente beta-Aktin, Casein wurde 1 gesetzt.

<sup>a,b,c</sup> Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0.05; Fisher`s Test)

### 3.2.6. Genexpression

Zur Aufklärung möglicher Ursachen der gezeigten Effekte von Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel in Plasma und Leber wurden die relativen mRNA-Konzentrationen ausgewählter Gene in den Lebern der Tiere (n=60) bestimmt (Tabelle 44).

Die relative mRNA-Konzentration von SREBP 1c war in den 6 Gruppen ohne signifikante Unterschiede. Es wurde weder ein Effekt der Proteinart, noch der Diät festgestellt. Eine Interaktion beider Parameter wurde ebenfalls nicht beobachtet. Die relative mRNA-Konzentration des SREBP 1c-Zielgens FSS war in den 6 Gruppen unterschiedlich. Tiere, die kohlenhydratreiche Diät erhielten, hatten in den Gruppen, die natives oder erhitztes Lupinenprotein aufnahmen, niedrigere Werte, als Tiere, die Casein erhielten (-54% bzw. -45%). Ratten, die fettreiche Diät erhielten, hatten keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Gruppen. Demnach konnte eine Interaktion von Diät und Proteinart festgestellt werden ( $P=0,028$ ). Außerdem ergab sich ein signifikanter Effekt der Diät ( $P\leq 0,001$ ), denn Tiere, die fettreiche Diät aufnahmen, hatten insgesamt niedrigere mRNA-Konzentrationen der FSS, als Tiere, die kohlenhydratreiche Diät erhielten. Ein Einfluss der Proteinart allein wurde nicht festgestellt. Als ein weiteres SREBP 1c-Zielgen wurde die Expression von SCD1 bestimmt. Hier konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden, wie bei der FSS. Tiere, die kohlenhydratreiche Diät erhielten, hatten in den Gruppen, die natives bzw. erhitztes Lupinenprotein aufnahmen niedrigere Werte, als Tiere, die Casein erhielten (-22% (n.s.) bzw. -47%). Tiere, die fettreiche Diät aufnahmen, hatten zwischen den 3 Gruppen keine Unterschiede in den Konzentrationen. Eine signifikante Interaktion von Protein und Diät wurde dennoch nicht nachgewiesen. Die Diät per se hatte einen eindeutigen Effekt. Tiere, die fettreiche Diät erhielten, hatten signifikant geringere mRNA-Konzentrationen von SCD1, als Tiere, die kohlenhydratreiche Diät aufnahmen ( $P\leq 0,001$ ). Ein Effekt des Proteins wurde nicht gezeigt. Die relative mRNA-Konzentration der LPL war zwischen den 6 Gruppen ohne Unterschied. Dennoch konnte ein signifikanter Einfluss der Proteinart festgestellt werden, denn Tiere der Gruppen, die die Lupinenproteine erhielten, hatten geringere Werte, als die Tiere, die Casein aufnahmen ( $P=0,031$ ). Ein Effekt der Diätart sowie eine Interaktion der beiden Versuchsparameter wurde nicht gezeigt.

Ein weiterer bedeutender Transkriptionsfaktor im Lipidstoffwechsel ist SREBP 2, welches die Regulation des Cholesterinstoffwechsels entscheidend bestimmt. Auch hier wurden Unterschiede zwischen den 6 Gruppen festgestellt. Tiere, die kohlenhydratreiche Diät aufnahmen, hatten in der Gruppe, die natives Lupinenprotein aufnahm, höhere

Konzentrationen, als Tiere der Gruppe, die Casein erhielten (+71%). Die Werte der Tiere, die erhitztes Lupinenprotein aufnahmen, unterschieden sich nicht von denen der Caseingruppe. Ratten, die fettreiche Diät erhielten, hatten keine Unterschiede zwischen den 3 Gruppen. Demnach war eine signifikante Interaktion von Proteinart und Diät festzustellen ( $P=0,001$ ). Da auch durch Aufnahme von nativem Lupinenprotein in fettreicher Diät höhere, wenn auch nicht signifikante, Konzentrationen festgestellt wurden, als bei Casein in fettreicher Diät (+23%), konnte ein tendenzieller Effekt der Proteinart nachgewiesen werden ( $P=0,082$ ). Die Diät allein hatte keinen Einfluss auf die relative mRNA-Konzentration von SREBP 2. Zusätzlich zum Transkriptionsfaktor SREBP 2 wurde die relative mRNA-Konzentration 2 seiner Zielgene gemessen, zum einen die der HMG-CoA-Reduktase, zum anderen die des LDL-Rezeptors. Die Proteinart hatte keinen Einfluss auf die Höhe der mRNA-Konzentrationen beider Gene. Es zeigte sich lediglich ein Effekt der Diät für beide Gene, denn Tiere, die fettreiche Diät aufnahmen, hatten niedrigere Werte, als Tiere, die kohlenhydratreiche Diät erhielten. Für die HMG-CoA-Reduktase war dieser Effekt signifikant ( $P=0,017$ ), für den LDL-Rezeptor tendenziell ( $P=0,080$ ). Eine Interaktion von Proteinart und Diät wurde für beide Gene nicht nachgewiesen. Die relative mRNA-Konzentration von Cyp7A1 zeigte mit  $P=0,134$  eine mögliche Tendenz in der Interaktion von Proteinart und Diät. Tiere, die fettreiche Diät erhielten, hatten durch natives und erhitztes Lupinenprotein höhere Werte (+33% bzw. +98%), als Tiere, die Casein aufnahmen. Tiere, die die kohlenhydratreiche Kost erhielten, zeigten durch natives und erhitztes Lupinenprotein niedrigere Konzentrationen der Cyp7A1, als Casein (-41% bzw. -32%). Ein signifikanter Effekt der Proteinart sowie eine Interaktion der beiden Versuchsparameter wurde nicht gezeigt. Die relative mRNA-Konzentration der BSEP hatte keine signifikanten Unterschiede zwischen den 6 Gruppen. Dennoch konnte ein tendenzieller Effekt der Diät festgestellt werden ( $P=0,074$ ), denn Tiere, die fettreiche Diät erhielten, hatten im Mittel niedrigere Werte, als Tiere, die kohlenhydratreiche Diät aufnahmen. Ein Effekt der Proteinart wurde nicht festgestellt. Auch eine Interaktion wurde nicht gezeigt ( $P=0,182$ ). In den relativen mRNA-Konzentrationen von FXR und LXR ergaben sich zwischen den 6 Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Sowohl Proteinart als auch Diät zeigten keinen Effekt, eine Interaktion beider Versuchsparameter wurde ebenfalls nicht festgestellt.

### 3.3. Einfluss von Lupinenprotein auf die Atherogenese an apoE knockout-Mäusen (Versuch 3)

#### 3.3.1. Körpermassenentwicklung und Futteraufnahme

Die apoE knockout-Mäuse entwickelten sich bei gleichem Anfangsgewicht von  $24,0 \pm 1,5$  g während der 16-wöchigen Fütterung in allen 3 Gruppen gleichmäßig (Abb. 11). So zeigen die Tiere ein mittleres Endgewicht von  $31,2 \pm 2,1$  g in der Gruppe, die Casein,  $32,5 \pm 2,4$  g in der Gruppe, die Lupinenprotein und  $32,0 \pm 2,7$  g in der Gruppe, die Casein + Cystein mit der Diät erhielten ( $P=0,540$ ,  $n=10$ ). Die mittlere Körpermassezunahme von  $7,3 \pm 1,3$  g in der Kontrollgruppe,  $8,5 \pm 1,7$  g in der Lupinenproteingruppe und  $8,0 \pm 2,1$  g in der mit Cystein supplementierten Caseingruppe unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den Behandlungen ( $P=0,267$ ,  $n=10$ ). Die Tiere nahmen während der ad libitum Fütterung in allen 3 Gruppen durchschnittlich die gleiche Menge der angebotenen *Western diet* auf ( $2,94 \pm 0,35$  g,  $P=0,726$ ,  $n=30$ ). Die Lebermassen der Tiere zeigten in den 3 Gruppen keine Unterschiede ( $1,41 \pm 0,21$  g,  $P=0,166$ ,  $n=30$ ).

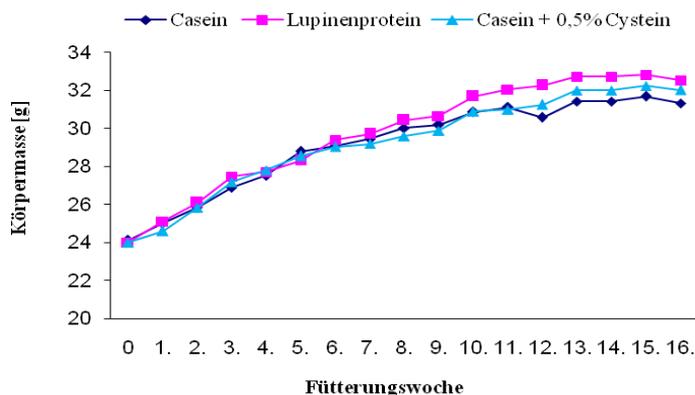
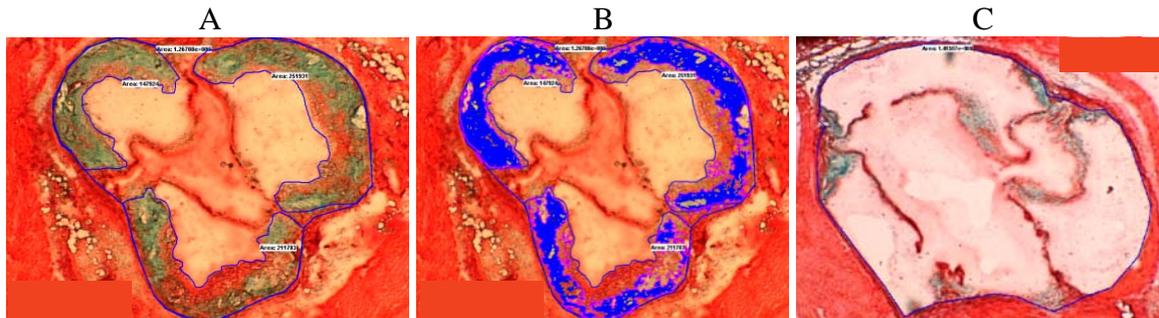


Abbildung 11: Körpermassenentwicklung von apoE knockout-Mäusen, welche über 16 Wochen eine *Western diet* mit entweder 10% Casein, 10% Lupinenprotein oder 9,5% Casein + 0,5% Cystein aufnahmen ( $n=10$ ).

#### 3.3.2. Histologische Quantifizierung der Atherosklerose

Zur Charakterisierung und Quantifizierung der Atheroskleroseentwicklung in den 3 Gruppen wurden 3 verschiedene Färbungen von Gefrierschnitten an der Aortenwurzel der apoE KO Mäuse ausgewertet. Die Anfärbung der Läsionen mittels Trichrom-Goldner Färbung (Abb. 12 A und B) konnte keine Unterschiede in der absoluten Größe der Plaueflächen (Tabelle 45 bzw. Abb. 13 [2]) aufzeigen. Auch die relative Größe der Plaques, bezogen auf die Gesamtquerschnittsfläche der Aorta zeigte keine Unterschiede zwischen den 3 Gruppen.

Ebenfalls ohne Unterschied war die absolute Fläche an Kollagen, sowie deren Anteil an der Plauefläche und der Gesamtaortenfläche im Querschnitt. Die sich als Differenz ergebende Fläche zwischen absoluter Plauefläche und absoluter Kollagenfläche wurde als fibromuskuläre Kappe definiert. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den 3 Gruppen. Da in allen 3 Gruppen insgesamt etwa 40% der Gesamtquerschnittsfläche der Aorta mit atherosklerotischen Plaques befallen war (Vergleich Abb. 12 A und C), wurde die Atherosklerose den Stadien der fortgeschrittenen Läsion (Typ V-VIII; nach Stary 2000) zugeordnet.



**Abbildung 12: Auswertung der histologischen Gefrierschnitte A: Originalaufnahme eines erkrankten Tieres mit Vermessung der Gesamtquerschnittsfläche der Aorta und der einzelnen Plaueflächen, B: Threshold-Maske zur Vermessung der Kollagenanteile in den Plaques C: Originalaufnahme eines nicht erkrankten Tieres ohne Plauebildung**

Die Auswertung der Kalkeinlagerungen in den Läsionen mittels von-Kossa-Silberfärbung ergab signifikant geringere Flächen an kalzifiziertem Gewebe nach der Aufnahme von Lupinenprotein oder Cysteinsupplement in der Caseindiät im Vergleich zu Casein ohne Supplementation, und zwar absolut als auch relativ in Bezug auf die Gesamtquerschnittsfläche der Aorta (relativ: -57% gegenüber Casein,  $P=0,019$ , siehe Abb.13 [3]).

Die Auswertung der Ölrot-O-Färbung ergab weder signifikante Unterschiede in der absolut eingelagerten Fettmenge, noch in der Lipidmenge pro Gesamtquerschnitt der Aorta (siehe Abb. 13 [4]). Hier ergab sich in der Caseingruppe ein Lipidanteil von 11,5% bezogen auf die Gesamtquerschnittsfläche der Aorta, 12,4% sowie 13,0% in den Gruppen, die Lupinenprotein bzw. Cystein-supplementierte Caseindiät erhielten.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass sich Größe und Ausmaß der atherosklerotischen Läsionen durch die Fütterung unterschiedlicher Diäten nicht unterschieden. Der Verkalkungsgrad der Läsionen als Maß eines sehr fortgeschrittenen Stadiums der Atherosklerose (nach Stary 2000) konnte hingegen sowohl durch Lupinenprotein als auch durch eine Zulage von Cystein zur Caseindiät signifikant reduziert werden.

**Tabelle 45: Histologische Auswertung von 10 µm dicken Gefrierschnitten der Aortenwurzel von apoE knockout-Mäusen nach Färbungen mittels Trichrom Goldner, von-Kossa-Silberfärbung und Ölrot-O.**

<b>Färbung</b>	<b>Fläche</b>	<b>Caseindiät</b>	<b>Lupinenprotein- diät</b>	<b>Caseindiät + 0,5% Cystein</b>
<b>Trichrom Goldner</b>	Aorta gesamt [ $\mu\text{m}^2 * 10^6$ ]	1,42 ± 0,38	1,51 ± 0,34	1,30 ± 0,32
	Plaque gesamt [ $\mu\text{m}^2 * 10^6$ ]	0,55 ± 0,18	0,61 ± 0,19	0,48 ± 0,13
	Plaque [% an Aortenquerschnitt]	39,3 ± 3,4	42,1 ± 8,9	39,5 ± 4,0
	Kollagen gesamt [ $\mu\text{m}^2 * 10^6$ ]	0,25 ± 0,10	0,23 ± 0,14	0,19 ± 0,06
	Kollagen [% an Aortenquerschnitt]	16,8 ± 4,2	15,8 ± 9,6	15,5 ± 5,6
	Kollagen [% an Plauefläche]	44,9 ± 11,7	38,5 ± 20,4	40,2 ± 13,1
	Kappe gesamt [ $\mu\text{m}^2 * 10^6$ ]	0,30 ± 0,13	0,37 ± 0,18	0,29 ± 0,11
	Kappe [% an Aortenquerschnitt]	20,9 ± 5,7	24,7 ± 10,9	22,2 ± 5,3
	Kappe [% an Plauefläche]	55,1 ± 11,7	61,5 ± 20,4	59,8 ± 13,1
<b>von-Kossa-Silberfärbung</b>	Aorta gesamt [ $\mu\text{m}^2 * 10^6$ ]	1,66 ± 0,23	1,57 ± 0,32	1,46 ± 0,32
	Verkalkung gesamt [ $\mu\text{m}^2 * 10^4$ ]	0,55 ± 0,25 <sup>a</sup>	0,24 ± 0,20 <sup>b</sup>	0,21 ± 0,15 <sup>b</sup>
	Verkalkung [% an Aortenquerschnitt]	0,35 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,13 <sup>b</sup>	0,15 ± 0,10 <sup>b</sup>
	Max. Länge der Kalkkristalle [ $\mu\text{m}$ ]	83,2 ± 30,4	82,5 ± 41,6	73,3 ± 24,9
	Max. Breite der Kalkkristalle [ $\mu\text{m}$ ]	14,7 ± 1,8	16,2 ± 5,8	12,7 ± 2,4
	Max. Fläche der Kalkkristalle [ $\mu\text{m}^2$ ]	1187 ± 375	1369 ± 584	1116 ± 268
<b>Ölrot-O</b>	Aorta gesamt [ $\mu\text{m}^2 * 10^6$ ]	1,23 ± 0,24	1,36 ± 0,35	1,46 ± 0,34
	Fett gesamt [ $\mu\text{m}^2 * 10^6$ ]	0,15 ± 0,10	0,19 ± 0,07	0,19 ± 0,08
	Fett [% an Aortenquerschnitt]	11,5 ± 5,3	12,4 ± 3,0	13,0 ± 4,6

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=10.

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedlichen Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0.05; Fisher`s Test)

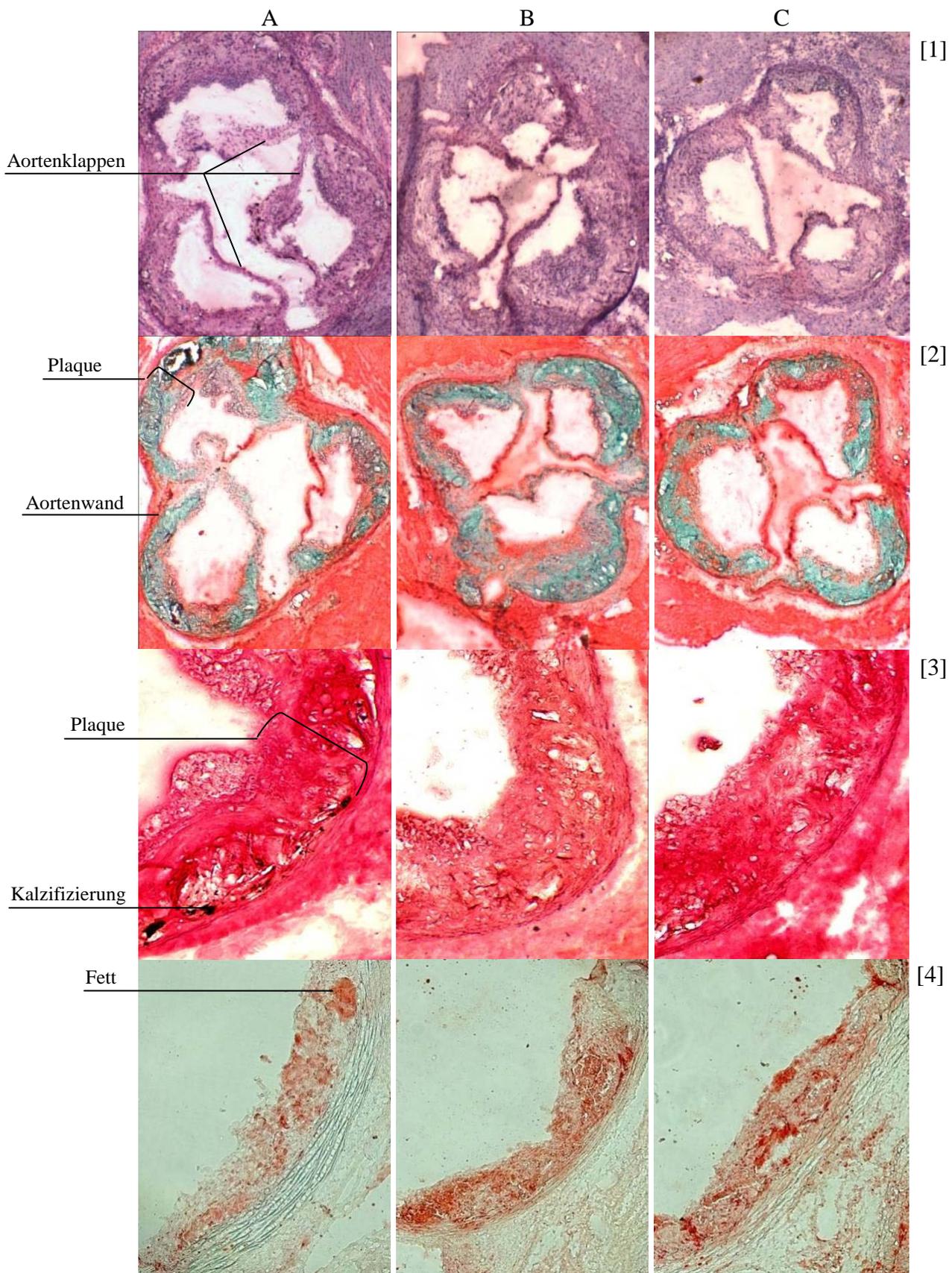


Abbildung 13: Färbungen von Gefrierschnitten (10 µm) der Aortenwurzel von apoE knockout-Mäusen, welche über 16 Wochen eine *Western diet* mit A: 10% Casein, B: 10% Lupinenprotein, C: 9,5% Casein + 0,5% Cystein erhielten. [1] Hämalaun-Eosin, Vergrößerung: 3x [2] Trichrom-Goldner, Vergrößerung: 3x [3] Von-Kossa-Silberfärbung, Vergrößerung: 10x [4] Ölrot-O, Vergrößerung: 10x.

### 3.3.3. Cholesterinkonzentrationen

Um zu untersuchen, ob die histologisch aufgezeigten Effekte durch Lupinenprotein und Cysteinsupplementation mit Veränderungen der Lipidkonzentrationen in Plasma oder Leber einhergehen, wurden zunächst die Cholesterinkonzentrationen untersucht.

Die Konzentration des Cholesterins zeigte im Plasma, in den VLDL und HDL keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (Tabelle 46). Mäuse, die Cystein-supplementierte Caseindiät erhielten, hatten signifikant geringere LDL-Cholesterinkonzentrationen als Mäuse, die Lupinenprotein mit der Diät aufnahmen (-28%,  $P=0,023$ ). Die Werte der Tiere, die die Caseindiät ohne Supplement aufnahmen, lagen dazwischen, waren jedoch 19% höher, als die der Tiere, die Cystein-supplementierte Diät erhielten. Die LDL-Cholesterinkonzentrationen von Mäusen, die Lupinenproteindiät erhielten, unterschieden sich nicht von denen, die Caseindiät ohne Supplement erhielten. Die LDL/HDL-Ratio unterschied sich nicht zwischen den 3 Gruppen. In der Leber konnten zwischen allen 3 Gruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Cholesterinkonzentrationen festgestellt werden ( $P=0,147$ ).

**Tabelle 46: Cholesterinkonzentrationen in Plasma, VLDL, HDL und LDL sowie in der Leber von apoE knockout-Mäusen, die über 16 Wochen eine Western diet mit entweder 10% Casein, 10% Lupinenprotein oder 9.5% Casein + 0,5% Cystein erhielten.**

	Caseindiät	Lupinenproteindiät	Caseindiät + 0,5% Cystein
Plasma [mmol/l]	25,9 ± 7,6	32,8 ± 8,9	24,0 ± 9,6
VLDL [mmol/l]	9,93 ± 3,13	15,5 ± 3,4	12,2 ± 3,5
LDL [mmol/l]	11,0 ± 2,2 <sup>ab</sup>	12,4 ± 0,9 <sup>a</sup>	8,90 ± 1,78 <sup>b</sup>
HDL [mmol/l]	7,53 ± 3,48	5,75 ± 0,58	4,80 ± 1,75
LDL/HDL	1,8 ± 1,0	2,2 ± 0,3	1,9 ± 0,3
Leber [µmol/g]	23,3 ± 8,6	29,9 ± 6,8	24,7 ± 7,3

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=10.

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedliche Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p<0.05$ ; Fisher's Test)

### 3.3.4. Triglyceridkonzentrationen

Neben den Cholesterinkonzentrationen wurden außerdem die Triglyceridkonzentrationen in Plasma, VLDL, LDL, HDL und Leber bestimmt. Da bei der Lipoproteinisolierung zunächst die Chylomikronen abgetrennt wurden, konnte die Triglyceridkonzentration in diesen als Differenz zwischen Plasma und der Summe aller anderen Lipoproteinfraktionen errechnet werden. Die Triglyceridkonzentration im Plasma war in der Gruppe, die Lupinenprotein in

der Diät erhielt, signifikant höher als in den beiden Gruppen, die Casein allein oder mit Cystein supplementiertes Casein aufnahmen ( $P=0,023$ ; Tabelle 47). Der höchste Anteil der Triglyceride der nicht genücherten Tiere war in den Chylomikronen. Die Konzentration der Triglyceride in den Chylomikronen war in der Gruppe, die Lupinenprotein erhielt, signifikant höher im Vergleich zu beiden anderen Gruppen ( $P=0,033$ ). In den VLDL war nur ein geringer Teil der Triglyceride. Die Tiere, die Casein erhielten, hatten signifikant niedrigere Konzentrationen als die Tiere der beiden anderen Gruppen ( $P=0,009$ ). Die Triglyceride in den LDL und HDL unterschieden sich nicht zwischen den 3 Gruppen. Die Konzentration der Triglyceride in der Leber war bei den Tieren, die Lupinenprotein aufnahmen, um 73% höher als bei den Tieren, die Casein erhielten. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ( $P=0,110$ ). Tiere, die mit Cystein supplementiertes Casein erhielten, hatten Triglyceridkonzentrationen, die zwischen denen der Casein- und Lupinenproteingruppen lagen.

**Tabelle 47: Triglyceridkonzentrationen in Plasma, VLDL, Chylomikronen, HDL und LDL sowie in der Leber von apoE knockout-Mäusen, die über 16 Wochen eine *Western diet* mit entweder 10% Casein, 10% Lupinenprotein oder 9.5% Casein + 0.5% Cystein erhielten.**

	Caseindiät	Lupinenproteindiät	Caseindiät + 0,5% Cystein
Plasma [mmol/l]	3,25 ± 1,77 <sup>b</sup>	4,91 ± 1,55 <sup>a</sup>	2,96 ± 1,43 <sup>b</sup>
Chylomikronen [mmol/l]	2,42 ± 1,37 <sup>b</sup>	4,00 ± 0,54 <sup>a</sup>	2,21 ± 0,97 <sup>b</sup>
Plasma ohne			
Chylomikronen [mmol/l]	0,83 ± 0,33	0,91 ± 0,15	0,75 ± 0,24
VLDL [mmol/l]	0,21 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,31 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,30 ± 0,03 <sup>a</sup>
LDL [mmol/l]	0,20 ± 0,07	0,26 ± 0,05	0,18 ± 0,05
HDL [mmol/l]	0,42 ± 0,23	0,34 ± 0,05	0,33 ± 0,10
Leber [µmol/g]	45,9 ± 29,5	79,3 ± 31,3	65,6 ± 37,8

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=10.

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedliche Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p<0,05$ ; Fisher's Test)

### 3.3.5. Konzentrationen an Cystein, Homocystein und Glutathion in Plasma und Leber

Um die Anreicherung der supplementierten Aminosäure Cystein sowie deren Stoffwechselmetabolite Homocystein und Glutathion in Plasma und Leber nachzuweisen, wurden deren Konzentrationen mittels HPLC bestimmt.

Der Zusatz von 0,5% Cystein in der Diät führte zu keiner Veränderung der Cysteinkonzentration im Plasma der Tiere. In der Leber bewirkte die Zulage von Cystein eine Steigerung der Cysteinkonzentration um 43% im Vergleich zur Caseingruppe. Tiere, die Lupinenprotein aufnahmen, hatten die gleiche Cysteinkonzentration in der Leber, wie die

Tiere, die Casein erhielten. Die Werte der Tiere, die Lupinenprotein erhielten, waren um 38% niedriger im Vergleich zur Caseingruppe mit Cysteinsupplement ( $P=0,004$ ). Die Homocysteinkonzentrationen in Plasma und Leber waren in allen 3 Gruppen gleich ( $P=0,515$  bzw.  $P=0,237$ ). Die Gesamtglutathionkonzentration im Plasma war bei den Tieren, die Lupinenprotein (-25%) oder Casein mit Cysteinsupplement (-37%) erhielten, signifikant niedriger, als bei den Tieren die Casein allein erhielten ( $P=0,003$ ). Die Glutathionkonzentration in der Leber unterschied sich nicht zwischen den 3 Gruppen ( $P=0,255$ ).

**Tabelle 48: Konzentration an Plasma- und Lebercystein, -homocystein und-glutathion von apoE knockout-Mäusen, welche über 16 Wochen eine *Western diet* mit 10% Casein, Lupinenprotein oder Casein + 0,5% Cystein erhielten.**

Plasma	Caseindiät	Lupinenproteindiät	Caseindiät + 0,5% Cystein
Cystein [ $\mu\text{mol/l}$ ]	125 $\pm$ 34	127 $\pm$ 31	115 $\pm$ 33
Homocystein [ $\mu\text{mol/l}$ ]	5,74 $\pm$ 1,96	5,18 $\pm$ 1,42	4,61 $\pm$ 2,84
Gesamtglutathion [ $\mu\text{mol/l}$ ]	28,9 $\pm$ 8,86 <sup>a</sup>	21,8 $\pm$ 3,80 <sup>b</sup>	18,4 $\pm$ 5,06 <sup>b</sup>
Leber			
Cystein [ $\mu\text{mol/g}$ ]	510 $\pm$ 120 <sup>b</sup>	530 $\pm$ 130 <sup>b</sup>	730 $\pm$ 190 <sup>a</sup>
Homocystein [ $\mu\text{mol/g}$ ]	65,0 $\pm$ 10,5	63,5 $\pm$ 13,2	71,1 $\pm$ 5,79
Gesamtglutathion [mmol/g]	9,68 $\pm$ 1,33	8,79 $\pm$ 1,39	8,83 $\pm$ 1,27

Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt, n = 10.

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedliche Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander ( $p < 0,05$ ; Fisher's Test)

### 3.3.6. Enzymaktivität der Glutathionreduktase

Da die Glutathionkonzentration in Plasma und Leber mit der angewandten Methodik nur als Gesamtglutathion bestimmt werden konnte, wurde zur weiteren Charakterisierung des Glutathionstoffwechsels die Glutathionperoxidase-Aktivität in Plasma und Leber bestimmt.

Die Aktivität des Enzyms zeigte jedoch zwischen den 3 Gruppen weder im Plasma, noch in der Leber signifikante Unterschiede (Tabelle 49).

**Tabelle 49: Glutathionperoxidaseaktivität in Plasma und Leber, von apoE knockout-Mäusen, die über 16 Wochen eine *Western diet* mit 10% Casein, 10% Lupinenprotein oder 9,5% Casein mit 0,5% Cystein gefüttert bekamen.**

	Caseindiät	Lupinenproteindiät	Caseindiät + 0,5% Cystein
Plasma GPO-aktiviät [U/ml]	1,39 $\pm$ 0,26	1,18 $\pm$ 0,19	1,40 $\pm$ 0,42
Leber GPO-aktivität [U/g Prot.]	1,17 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,24	1,21 $\pm$ 0,22

GPO = Glutathionperoxidase

Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt, n=10.

### 3.3.7. Genexpression

Um die Veränderungen der Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in den apoE knockout-Mäusen besser erklären zu können, wurden die relativen mRNA-Konzentrationen relevanter Gene in der Leber gemessen.

Die an der Regulation des Triglyceridkatabolismus beteiligten Gene wie PPARalpha, ACO und HMG-CoA-Synthase, ApoA5, hepatische Lipase und Lipoproteinlipase zeigten zwischen der Kontrollgruppe Casein und der Lupinenproteingruppe keine Unterschiede in relativen mRNA-Konzentration (Tabelle 50), ebenso wie die beteiligten Gene triglyceridanaboler Stoffwechselwege SREBP1c, FSS und SCD1. Die Gruppe, welche 0,5% Cystein supplementiert zur Caseindiät bekam, hatte niedrigere relative mRNA-Konzentrationen der FSS als die Caseingruppe (P=0,023). Die relative mRNA-Konzentration der LPL war bei den Tieren, die Cystein-supplementiertes Casein erhielten, doppelt so hoch, als bei den Tieren, die Casein allein aufnahmen (P=0,009). Die relative mRNA-Konzentration des LDL-Rezeptors unterschied sich nicht zwischen den 3 Gruppen.

**Tabelle 50: Relative mRNA-Konzentration in der Leber von apoE knockout-Mäusen, die über 16 Wochen eine Western diet mit 10% Casein, 10% Lupinenprotein oder 9,5% Casein mit 0,5% Cystein gefüttert bekamen.**

	Caseindiät	Lupinenproteindiät	Caseindiät + 0,5% Cystein
LDL-R	1,00 ± 0,47	1,01 ± 0,49	0,88 ± 0,51
SREBP 1c	1,00 ± 0,41	0,80 ± 0,57	0,61 ± 0,13
FSS	1,00 ± 0,34 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,60 <sup>a</sup>	0,44 ± 0,21 <sup>b</sup>
SCD1	1,00 ± 0,39	0,94 ± 0,41	0,99 ± 0,28
hepatische Lipase	1,00 ± 0,38	1,22 ± 0,36	0,87 ± 0,26
LPL	1,00 ± 0,49 <sup>b</sup>	1,06 ± 0,45 <sup>b</sup>	2,09 ± 1,19 <sup>a</sup>
Apo-A5	1,00 ± 0,40	1,32 ± 0,44	1,40 ± 0,40
PPAR alpha	1,00 ± 0,36	1,08 ± 0,37	0,99 ± 0,31
ACO	1,00 ± 0,36	0,89 ± 0,25	0,87 ± 0,29
HMG-CoA-S	1,00 ± 0,40	1,01 ± 0,34	1,07 ± 0,43

LDL-R = Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor, SREBP1c = Sterol Regulatory Element Binding Protein 1c, FSS = Fettsäuresynthase, SCD1 = Stearoyl-CoA-Desaturase 1, LPL = Lipoproteinlipase, Apo-A5 = Apolipoprotein A5, PPAR alpha = Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha, ACO = Acyl-CoA-Oxidase, HMG-CoA-S =  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-CoA-Synthase

Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt, n=10.

Als Haushaltsgen diente beta-Aktin, Casein wurde 1 gesetzt.

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedliche Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0.05; Fisher`s Test)

### 3.4. Einfluss von Lupinenprotein auf die Plasmalipide am Tiermodell Schwein (Versuch 4)

#### 3.4.1. Leistungsdaten

Die 33 Tiere zeigten im Verlauf der 3-wöchigen Studie eine altersgerechte Gewichtsentwicklung. Das mittlere Anfangsgewicht von 10,7 kg konnte nach 21 d ad libitum-Fütterung der 3 Diäten mit entweder 15% Casein, 15% Lupinenprotein der Sorte Boregine oder 15% Lupinenprotein der Sorte Vitabor auf durchschnittlich 19,8 kg Lebendmasse gesteigert werden. Das entspricht einer mittleren Lebendmassezunahme von 432 g/d. Zwischen allen 3 Behandlungsgruppen gab es im Hinblick auf die Gewichtsentwicklung keine signifikanten Unterschiede, die Werte sind in Tabelle 51 dargestellt. Die mittlere Futteraufnahme der Ferkel war in der Gruppe, die Lupinenprotein der Sorte Boregine erhielt, ca. 9% höher, als in den Gruppen, deren Diät Casein oder Lupinenprotein der Sorte Vitabor enthielt, statistisch konnte dies nicht gesichert werden. Im Hinblick auf den Futteraufwand benötigten die Tiere der Gruppe „Boregine“ ca. 9% mehr Futter für 1 kg Gewichtszunahme, als die Tiere der Gruppen „Casein“ bzw. „Vitabor“ (P=0,015).

**Tabelle 51: Leistungsdaten von männlichen Ferkeln, welche über 21 Tage eine ad libitum-Diät mit 15% Casein, 15% Lupinenprotein der Sorte Boregine oder 15% Lupinenprotein der Sorte Vitabor erhielten**

	Caseindiät	Lupinenproteindiät	
		Sorte Boregine	Sorte Vitabor
Lebendmasse Versuchsbeginn [kg]	10,9 ± 2,1	11,1 ± 2,1	10,0 ± 1,2
Lebendmasse Versuchsende [kg]	20,0 ± 3,0	20,2 ± 3,0	19,1 ± 2,5
Lebendmassezunahme [g/d]	432 ± 52	430 ± 69	434 ± 87
Futteraufnahme [g/Tag]	698 ± 78	760 ± 104	699 ± 93
Futteraufwand [g/g]	1,62 ± 0,08 <sup>b</sup>	1,77 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,63 ± 0,16 <sup>b</sup>

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=11.

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedliche Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0.05; Fisher`s Test)

#### 3.4.2. Glukosekonzentration

Die Konzentration der Plasmaglukose (siehe Tab. 52) der genücherten Tiere zeigte zu Beginn der Studie keine signifikanten Unterschiede zwischen den 3 Gruppen Casein, Lupinenprotein Sorte Boregine oder Lupinenprotein Sorte Vitabor. Nach der 3-wöchigen Fütterung der Diäten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Auch die Differenzen der Glukosekonzentration während der Intervention blieben zwischen den 3 Gruppen unverändert.

**Tabelle 52: Plasmaglukosekonzentration von männlichen Ferkeln, welche über 21 Tage eine ad libitum-Diät mit 15% Casein, 15% Lupinenprotein der Sorte Boregine oder 15% Lupinenprotein der Sorte Vitabor erhielten**

	Caseindiät	Lupinenproteindiät	
		Sorte Boregine	Sorte Vitabor
<b>Start</b>			
Glukose [mmol/l]	5,2 ± 1,2	6,0 ± 0,6	6,0 ± 1,6
<b>Ende</b>			
Glukose [mmol/l]	5,3 ± 1,2	6,2 ± 1,3	5,8 ± 1,0
<b>Änderung (Ende-Start)</b>			
Glukose [mmol/l]	0,09 ± 1,31	0,23 ± 1,33	-0,16 ± 1,77

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=11.

### 3.4.3. Cholesterinkonzentration

Um zu untersuchen, ob die Lupinenproteinisolate der beiden Sorten im Vergleich zu Casein unterschiedliche Wirkungen auf den Lipidstoffwechsel ausüben, wurden die Cholesterinkonzentrationen in Plasma, LDL und HDL vor und nach der 3-wöchigen Diätfütterung bestimmt.

Zu Beginn der Intervention war die Plasmacholesterinkonzentrationen in allen 3 Gruppen gleich (siehe Tabelle 53, P=0,976). Nach 3-wöchiger Fütterung der Diäten hatten die Tiere aller 3 Gruppen höhere Werte als zu Beginn der Intervention, aber weder im gesamten Plasma, noch in den LDL- oder HDL-Fractionen signifikant unterschiedlich zwischen den 3 Gruppen. Betrachtet man die Entwicklung der HDL-Cholesterinkonzentration während der Intervention, so konnte in allen 3 Gruppen eine Steigerung beobachtet werden. In der Kontrollgruppe war diese Steigerung signifikant höher (+74%), als in den beiden Gruppen, die Lupinenprotein der Sorte Boregine (+51%) oder Vitabor erhielten (+43%, P=0,023).

**Tabelle 53: Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Lipoproteinen von männlichen Ferkeln, welche über 21 Tage eine ad libitum-Diät mit 15% Casein, 15% Lupinenprotein der Sorte Boregine oder 15% Lupinenprotein der Sorte Vitabor erhielten**

	Caseindiät	Lupinenproteindiät	
		Sorte Boregine	Sorte Vitabor
<b>Start</b>			
Plasma [mmol/l]	2,35 ± 0,36	2,67 ± 0,35	2,63 ± 0,22
LDL [mmol/l]	1,11 ± 0,21	1,23 ± 0,21	1,31 ± 0,18
HDL [mmol/l]	0,94 ± 0,14	1,01 ± 0,15	1,04 ± 0,17
<b>Ende</b>			
Plasma [mmol/l]	2,87 ± 0,25	2,88 ± 0,34	2,91 ± 0,56
LDL [mmol/l]	1,24 ± 0,23	1,25 ± 0,15	1,37 ± 0,35
HDL [mmol/l]	1,63 ± 0,12	1,52 ± 0,23	1,49 ± 0,21
<b>Änderung (Ende-Start)</b>			
Plasma [mmol/l]	0,52 ± 0,41	0,21 ± 0,36	0,29 ± 0,57
LDL [mmol/l]	0,12 ± 0,18	0,02 ± 0,22	0,07 ± 0,28
HDL [mmol/l]	0,71 ± 0,22 <sup>a</sup>	0,50 ± 0,21 <sup>b</sup>	0,45 ± 0,13 <sup>b</sup>

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n = 11.

<sup>a,b</sup> Werte mit unterschiedliche Hochbuchstaben unterscheiden sich signifikant voneinander (p<0.05; Fisher`s Test)

#### 3.4.4. Triglyceridkonzentration

Zur weiteren Untersuchung der Wirkung von Lupinenprotein wurde neben der Cholesterinkonzentration auch die Konzentration der Triglyceride in Plasma und VLDL zu Beginn und am Ende der Studie bestimmt.

Die Konzentrationen der Triglyceride im Plasma sowie in den VLDL waren zu Beginn der Intervention zwischen den 3 Gruppen statistisch nicht unterschiedlich. Durch die 3-wöchige ad libitum-Fütterung der 3 Diäten wurden die Triglyceridkonzentrationen im Plasma kaum verändert, die Konzentrationen in den VLDL wurden in allen 3 Gruppen erhöht. Zwischen den 3 Gruppen waren sowohl im Plasma als auch in den VLDL keine Unterschiede.

**Tabelle 54: Triglyceridkonzentration in Plasma und Lipoproteinen von männlichen Ferkeln, welche über 21 Tage eine ad libitum-Diät mit entweder 15% Casein, 15% Lupinenprotein der Sorte Boregine oder 15% Lupinenprotein der Sorte Vitabor erhielten**

	Caseindiät	Lupinenproteindiät	
		Sorte Boregine	Sorte Vitabor
<b>Start</b>			
Plasma [mmol/l]	0,47 ± 0,14	0,39 ± 0,10	0,42 ± 0,08
VLDL [mmol/l]	0,25 ± 0,09	0,18 ± 0,07	0,21 ± 0,07
<b>Ende</b>			
Plasma [mmol/l]	0,39 ± 0,05	0,40 ± 0,12	0,41 ± 0,13
VLDL [mmol/l]	0,28 ± 0,04	0,30 ± 0,11	0,29 ± 0,12
<b>Änderung (Ende-Start)</b>			
Plasma [mmol/l]	-0,08 ± 0,15	0,01 ± 0,10	-0,02 ± 0,13
VLDL [mmol/l]	0,04 ± 0,10	0,10 ± 0,09	0,08 ± 0,13

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, n=11.

### 3.5. Einfluss von Lupinenprotein auf die Plasmalipide hypercholesterinämischer Probanden (Versuch 5)

#### 3.5.1. Probandenkollektiv

Von den 56 Probanden, welche sich zur Teilnahme an der Studie bereiterklärt hatten, schlossen 13 Probanden die Studie nicht ab: 10 Personen beendeten ohne nähere Angabe von Gründen (*Loss to follow up`s*), 2 Probanden konnten die Studienbedingungen nicht einhalten und eine Person musste wegen gastrointestinaler Probleme ausscheiden. Zusammengefasst ergaben sich 7 *Drop-out`s* in der Caseingruppe und 6 in der Lupinenproteingruppe, die Ausfallquote betrug daher 21,4% bzw. 25% pro Gruppe. Da 3 Probanden in der Auswertung nicht berücksichtigt werden konnten, ergaben sich letztendlich für die Kontrollgruppe 19 Probanden, bestehend aus 7 Männern und 12 Frauen, für die Behandlungsgruppe 21 Probanden aus 10 Männern und 11 Frauen.

Die Teilnehmer der Studie wurden als Probandenkollektiv zu Beginn der Interventionsphase nach Alter und Body-Mass-Index charakterisiert. Der Altersdurchschnitt lag im Mittel bei  $43,9 \pm 11,8$  Jahren, der BMI bei  $25,9 \pm 4,5$  kg/m<sup>2</sup>. Das Gewicht und damit auch der Body-Mass-Index der Studienteilnehmer wurde durch den 6-wöchigen Verzehr von 35 g Casein bzw. 35 g Lupinenprotein pro Tag nicht beeinflusst (Abb.14).

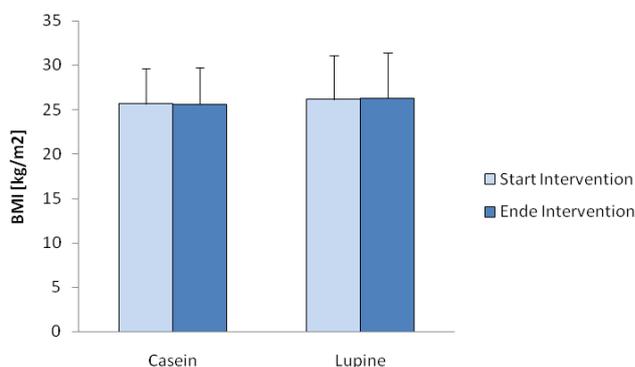


Abbildung 14: Body-Mass-Index von Probanden vor und nach Intervention mit Casein oder Lupinenprotein

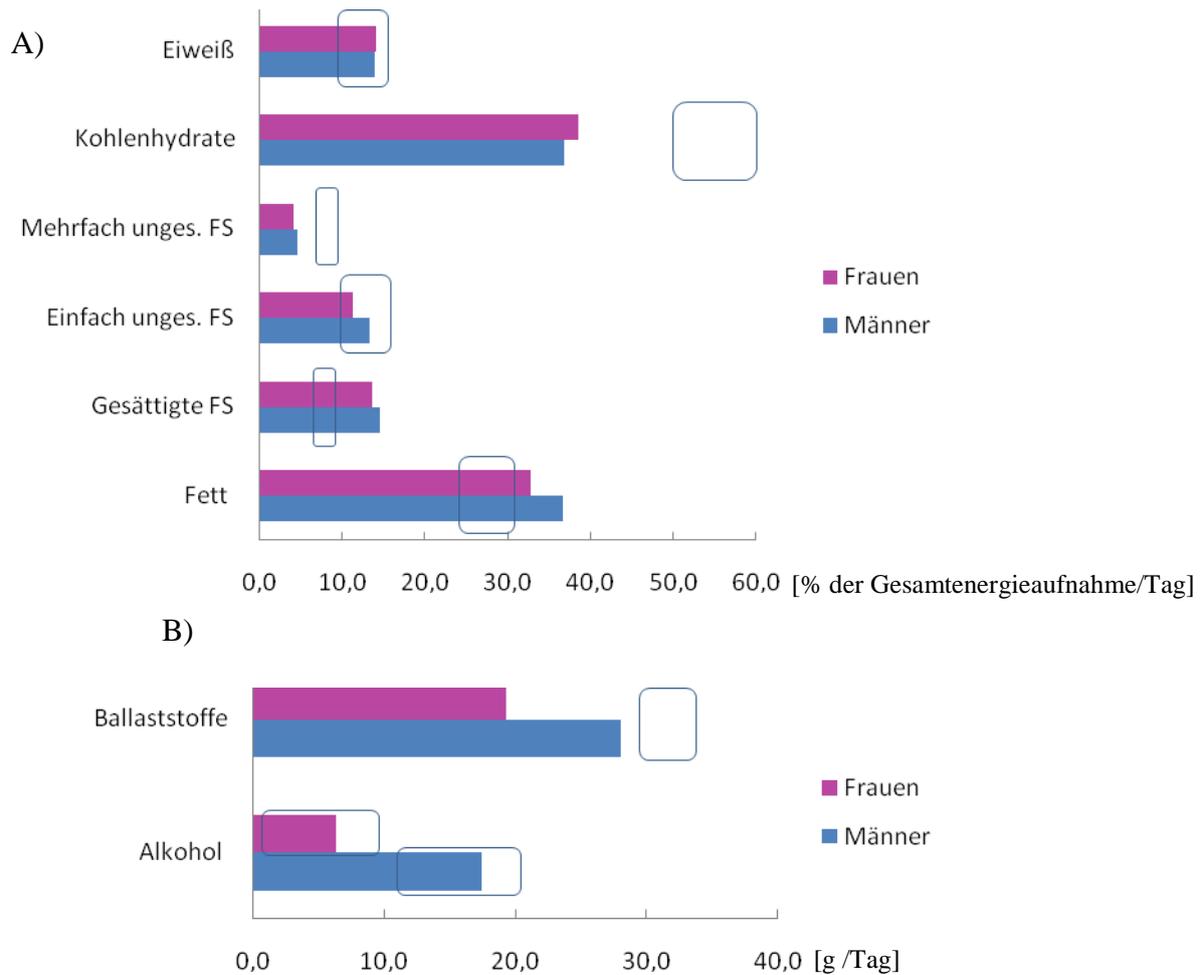
#### 3.5.2. Auswertung der Ernährungsprotokolle

Die während der 10-tägigen Run-In-Phase geführten 3-Tage-Ernährungsprotokolle wurden zum einen hinsichtlich der Gesamtenergieaufnahme, zum anderen hinsichtlich der Zusammensetzung der aufgenommenen Nahrung aus den jeweiligen

Hauptnährstoffkomponenten Eiweiß, Kohlenhydraten und Fett ausgewertet. Außerdem wurde die Aufnahme von gesättigten sowie ein- und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Alkohol und Ballaststoffen untersucht. Die Auswertung erfolgte nach Männern und Frauen getrennt.

Die Gesamtenergieaufnahme aller Probanden lag bei  $2544 \pm 1043$  kcal / Tag, aufgeschlüsselt nach dem Geschlecht bei  $3147 \pm 1124$  kcal bei den Männern sowie  $2092 \pm 713$  kcal bei den Frauen. Der Anteil der Nahrungskomponenten an der Gesamtenergieaufnahme pro Tag ist für Männer und Frauen in Abbildung 15 A dargestellt. Die Ergebnisse aus den Ernährungsprotokollen wurden mit den Allgemeinen Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE, Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 1. Auflage, 2001) verglichen. Die Referenzbereiche sind ebenfalls in Abb. 15 dargestellt.

Nach den Richtlinien der DGE nahmen die Probanden die empfohlene Menge an Eiweiß von 10-15% der Gesamtenergieaufnahme/d auf. Die Zusammensetzung des aufgenommenen Eiweißes aus tierischem und pflanzlichem Protein wurde bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Die Aufnahme an Kohlenhydraten lag bei den Probanden deutlich unter den Empfehlungen von 50-60% der Gesamtenergieaufnahme/d. Die Aufnahme an mehrfach ungesättigte Fettsäuren lag ebenfalls unterhalb der empfohlenen Menge von 7-10% der Gesamtenergieaufnahme/d. Die Aufnahme an einfach ungesättigten Fettsäuren lag im empfohlenen Bereich von 10-15% der Gesamtenergieaufnahme/d. Die Aufnahmen an gesättigten Fetten sowie die Fettaufnahme insgesamt lag bei Männern und Frauen über den üblichen Verzehrsempfehlungen von 8-10% für gesättigte Fette sowie 25-30% für die Gesamtfettaufnahme/d. Die Aufnahme an Ballaststoffen lag bei beiden Geschlechtern unter den Richtlinien von mindestens 30 g/Tag. Der Alkoholkonsum lag im Mittel nicht über den gesundheitlich bedenklichen Aufnahmemengen von 20 g/d bei Männern bzw. 10 g/d bei Frauen (Abb. 15 B).



**Abbildung 15: Auswertung der 3-Tage-Ernährungsprotokolle von Studienteilnehmern, welche während der Run-In-Phase an 3 aufeinanderfolgenden Tagen bei normalen Essgewohnheiten geführt wurden. A) Aufnahme der Hauptkomponenten, B) Ballaststoff- und Alkoholaufnahme. Die blau umrandeten Bereiche zeigen die optimale Aufnahmemenge der jeweiligen Komponente nach den Empfehlungen der DGE (Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr, 1, Auflage, 2001)**

### 3.5.3. Cholesterinkonzentration

Das Hauptaugenmerk dieser Studie lag in der Untersuchung der Cholesterinkonzentrationen im Blut und deren potentielle Beeinflussung durch Lupinenprotein. Dafür wurden die Konzentrationen an Cholesterin in den einzelnen Lipoproteinfraktionen VLDL, LDL und HDL sowie insgesamt im Plasma gemessen. Die Auswertung erfolgte zum einen für das Gesamtkollektiv, zum anderen wurde nach Männern und Frauen getrennt ausgewertet. Die Werte sind in Tabelle 55 dargestellt.

Innerhalb beider Versuchsgruppen konnte durch den 6-wöchigen Riegelverzehr die Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma im Vergleich zum Ausgangswert signifikant gesenkt werden. In der Kontrollgruppe, die 35 g/d Casein erhielt, erfolgte eine Reduktion der Konzentration um 8%, und in der Gruppe, die 35 g/d Lupinenprotein erhielt, um 9%.

Innerhalb der Caseingruppe ist dieser Effekt hauptsächlich auf eine Reduktion des HDL-Cholesterins zurückzuführen (-9%,  $P \leq 0,001$ ). Innerhalb der Lupinenproteingruppe ist die Gesamtcholesterinsenkung hingegen durch die signifikante Reduktion der LDL-Cholesterinkonzentration zu erklären (-9%  $P=0,008$ ). In der Caseingruppe war die Cholesterinkonzentration in den LDL nach der 6-wöchigen Intervention nicht verändert. Die Aufnahme von Casein bzw. Lupinenprotein über 6 Wochen zeigte keine Wirkung auf die Cholesterinkonzentration in den VLDL beider Gruppen. Innerhalb der Gruppe, die Lupinenprotein mit dem Riegel erhielt, wurde die LDL/HDL-Ratio über die Zeit von Studienbeginn zu Studienende reduziert. Innerhalb der Caseingruppe wurde ein Anstieg der LDL/HDL-Ratio beobachtet. Diese Änderungen unterschieden sich signifikant zwischen beiden Gruppen ( $P=0,043$ ).

Betrachtet man die Wirkung von Lupinenprotein im Vergleich zu Casein nur für Frauen, so konnten die Beobachtungen, die für das Gesamtkollektiv gemacht wurden, gleichermaßen gezeigt werden. Innerhalb beider Behandlungsgruppen wurde die Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma durch die 6-wöchige Intervention signifikant reduziert (Casein: -12%,  $P=0,005$ , Lupinenprotein: -10%,  $P=0,034$ ). Innerhalb der Gruppe, die täglich den Caseinriegel erhielt, war ebenfalls eine signifikante Reduktion des HDL-Cholesterins (-12%;  $P \leq 0,001$ ) zu verzeichnen. In der Gruppe, die Lupinenprotein im Riegel erhielt, wurde, wie für das Gesamtkollektiv beschrieben, eine signifikante Reduktion des LDL-Cholesterins (-8%;  $P=0,042$ ) beobachtet. Auch die Änderung der LDL/HDL-Ratio von Beginn zum Ende der Intervention war innerhalb der Lupinenproteingruppe signifikant unterschiedlich gegenüber der Änderung in der Caseingruppe ( $P=0,049$ ).

Betrachtet man die Wirkung des Lupinenproteins nur bei den Männern, so wurde die Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma ausschließlich innerhalb der Gruppe reduziert, welche 35 g/d Lupinenprotein über 6 Wochen verzehrte (-7%,  $P=0,046$ ). Für die Männer innerhalb der Caseingruppe wurde keine signifikante Veränderung der Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma (-2%,  $P=0,750$ ) durch die 6-wöchige Intervention festgestellt. Auch die Cholesterinkonzentrationen in den VLDL, LDL und HDL zeigten bei den Männern innerhalb der Caseingruppe keine signifikante Beeinflussung durch die Proteinaufnahme. Bei den Männern in der Lupinenproteingruppe konnte hingegen durch die 6-wöchige Intervention eine deutliche Abnahme der LDL-Cholesterinkonzentration im Vergleich zur Ausgangskonzentration beobachtet werden. Die Cholesterinkonzentrationen in den LDL war nach 6 Wochen Intervention mit Lupinenprotein signifikant niedriger, als die der Caseingruppe ( $P=0,030$ ). Die Änderung der VLDL-Cholesterinkonzentration von Anfang

zum Ende der Studie war bei den Männern in der Lupinengruppe im Vergleich zu den Männern der Caseingruppe signifikant höher ( $P=0,027$ ).

**Tabelle 55: Cholesterinkonzentrationen von Probanden, welche über 6 Wochen täglich 35 g Casein oder Lupinenprotein erhielten.**

	Caseingruppe			Lupinenproteingruppe		
	Start	Ende	$\Delta$	Start	Ende	$\Delta$
<b>Gesamt-</b>	-----[mmol/l]-----					
<b>kollektiv</b>						
Plasma	5,78 ± 0,82	5,32 ± 0,77*	-0,47	5,66 ± 0,64	5,17 ± 0,59*	-0,50
VLDL	0,44 ± 0,31	0,39 ± 0,27	-0,06	0,32 ± 0,22	0,37 ± 0,32	+0,05
LDL	3,65 ± 0,64	3,50 ± 0,73	-0,15	3,61 ± 0,65	3,30 ± 0,64*	-0,31
HDL	1,70 ± 0,38	1,54 ± 0,35*	-0,17	1,75 ± 0,48	1,67 ± 0,42	-0,08
LDL/HDL	2,29 ± 0,79	2,43 ± 0,83	+0,13	2,24 ± 0,74	2,13 ± 0,70	-0,11 <sup>†</sup>
<b>Männer</b>						
Plasma	5,83 ± 1,08	5,71 ± 0,61	-0,12	5,65 ± 0,52	5,24 ± 0,47*	-0,41
VLDL	0,62 ± 0,37	0,45 ± 0,25	-0,16	0,41 ± 0,25	0,54 ± 0,37	+0,13 <sup>†</sup>
LDL	3,89 ± 0,54	4,03 ± 0,59	+0,13	3,64 ± 0,54	3,33 ± 0,59 <sup>†</sup>	-0,31
HDL	1,41 ± 0,20	1,36 ± 0,21	-0,05	1,59 ± 0,38	1,52 ± 0,43	-0,07
LDL/HDL	2,84 ± 0,76	3,02 ± 0,65	+0,18	2,42 ± 0,71	2,37 ± 0,73	-0,06
<b>Frauen</b>						
Plasma	5,75 ± 0,68	5,08 ± 0,79*	-0,67	5,68 ± 0,80	5,10 ± 0,71*	-0,58
VLDL	0,34 ± 0,23	0,35 ± 0,29	+0,01	0,24 ± 0,15	0,20 ± 0,15	-0,04
LDL	3,50 ± 0,68	3,19 ± 0,64	-0,32	3,57 ± 0,77	3,27 ± 0,72*	-0,30
HDL	1,87 ± 0,37	1,64 ± 0,38*	-0,24	1,90 ± 0,54	1,82 ± 0,37	-0,08
LDL/HDL	1,97 ± 0,63	2,08 ± 0,74	+0,10	2,06 ± 0,79	1,89 ± 0,61	-0,17 <sup>†</sup>

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, Casein: n=19 Lupinenprotein: n=21

\* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen Start und Ende der Intervention innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe ( $p<0,05$ ; gepaarter t-Test)

† kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zu Casein ( $p<0,05$ ; Student`s t-Test)

### 3.5.4. Triglyceridkonzentrationen

Die Triglyceridkonzentration im Plasma innerhalb der Gruppe, die 35 g Lupinenprotein pro Tag konsumierte, wurde durch die 6-wöchige Intervention nicht verändert (siehe Tabelle 56). Innerhalb der Gruppe, welche 35 g Casein pro Tag erhielt, wurde die Konzentration der Triglyceride durch die 6-wöchige Riegelaufnahme signifikant um 20,8% im Vergleich zur Ausgangskonzentration vermindert ( $P=0,029$ ). Die Konzentrationen der Triglyceride nach 6 Wochen Intervention unterschieden sich jedoch nicht zwischen Caseingruppe und Lupinenproteingruppe ( $P=0,786$ ). Aufgetrennt nach Männern bzw. Frauen konnten für die Triglyceridkonzentration im Plasma keine statistisch signifikanten Unterschiede durch die 6-wöchige Aufnahme von 35 g Casein bzw. 35 g Lupinenprotein gezeigt werden.

Die Triglyceridkonzentration in den VLDL wurde weder im Gesamtkollektiv noch in den Teilkollektiven Männer und Frauen während der 6-wöchigen Intervention verändert.

**Tabelle 56: Triglyceridkonzentrationen in Plasma und VLDL von Probanden, welche über 6 Wochen täglich 35g Casein oder Lupinenprotein erhielten.**

	Caseingruppe			Lupinenproteingruppe		
	Start	Ende	$\Delta$	Start	Ende	$\Delta$
<b>Gesamt-kollektiv</b>	-----[mmol/l]-----					
Plasma	1,59 $\pm$ 1,00	1,26 $\pm$ 0,70*	-0,33	1,24 $\pm$ 0,53	1,32 $\pm$ 0,72	+0,08
VLDL	0,95 $\pm$ 0,72	0,88 $\pm$ 0,76	-0,07	0,72 $\pm$ 0,49	0,80 $\pm$ 0,63	+0,09
<b>Männer</b>						
Plasma	1,94 $\pm$ 1,25	1,42 $\pm$ 0,75	-0,52	1,41 $\pm$ 0,65	1,68 $\pm$ 0,86	+0,27
VLDL	1,32 $\pm$ 0,85	1,18 $\pm$ 0,95	-0,14	0,89 $\pm$ 0,57	1,13 $\pm$ 0,72	+0,23
<b>Frauen</b>						
Plasma	1,41 $\pm$ 0,85	1,18 $\pm$ 0,69	-0,23	1,08 $\pm$ 0,34	0,97 $\pm$ 0,31	-0,11
VLDL	0,74 $\pm$ 0,56	0,71 $\pm$ 0,59	-0,03	0,54 $\pm$ 0,32	0,48 $\pm$ 0,30	-0,06

Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt, Casein: n=19, Lupinenprotein: n=21

\* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen Start und Ende der Intervention innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe ( $p < 0,05$ ; gepaarter t-Test)

### 3.5.5. Konzentration an Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten im Plasma

Um zu untersuchen, ob die Aufnahme der Proteine zu Veränderungen spezifischer Aminosäuren führte, wurden deren Konzentrationen bzw. die von Aminosäurederivaten im Plasma der Probanden vor und nach Intervention bestimmt. Die Plasmakonzentration der Aminosäure Methionin wurde innerhalb der Gruppe, die über 6 Wochen den Lupinenproteinriegel verzehrte, signifikant gegenüber dem Ausgangswert vor Intervention vermindert (-7%,  $P=0,035$ , Tabelle 57). Die Methioninkonzentration im Plasma der Probanden, die Casein erhielten, wurde während der 6 Wochen nicht beeinflusst (+2%,  $P=0,574$ ). Auch die Änderung der Methioninkonzentration im Verlauf der Interventionsphase war signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen ( $P=0,046$ ). Betrachtet man die Methioninkonzentrationen getrennt für Männer und Frauen, so konnte der Effekt wie im Gesamtkollektiv zwar gleichermaßen beobachtet, statistisch jedoch nicht abgesichert werden. Die Konzentrationen an Cystein, Homocystein, Taurin und Glutathion wurden in beiden Versuchsgruppen durch den 6-wöchigen Riegelverzehr weder im Gesamtkollektiv, noch in den Teilkollektiven beeinflusst.

**Tabelle 57: Konzentration von spezifischen Aminosäuren und Aminosäure-Derivaten im Plasma von Probanden, welche über 6 Wochen täglich 35g Casein oder Lupinenprotein erhielten.**

	Caseingruppe			Lupinenproteingruppe		
	Start	Ende	Δ	Start	Ende	Δ
<b>Gesamt-kollektiv</b>	-----[μmol/l]-----					
Methionin	34,9 ± 5,1	35,5 ± 5,4	+0,55	35,6 ± 6,5	33,0 ± 5,3*	-2,64†
Cystein	186 ± 35	190 ± 42	+4,46	208 ± 61	210 ± 48	+2,02
Homocystein	12,8 ± 2,7	13,1 ± 3,0	+0,30	15,8 ± 5,6	15,0 ± 4,8	-0,83
Taurin	55,7 ± 12,6	49,7 ± 15,8	-5,95	58,3 ± 24,3	58,0 ± 14,3	-0,33
Glutathion	3,95 ± 1,34	4,47 ± 1,49	+0,52	4,18 ± 1,99	4,74 ± 1,39	+0,56
<b>Männer</b>						
Methionin	36,0 ± 6,7	36,4 ± 5,0	+0,45	38,2 ± 6,0	34,5 ± 5,9	-3,76
Cystein	215 ± 25	218 ± 34	+3,50	208 ± 49	215 ± 40	+7,05
Homocystein	14,5 ± 2,4	15,2 ± 1,9	+0,69	15,8 ± 3,6	15,3 ± 3,1	-0,47
Taurin	54,6 ± 12,1	51,0 ± 16,0	-3,59	52,5 ± 11,0	54,3 ± 12,7	+1,85
Glutathion	3,79 ± 1,15	5,07 ± 1,26	+1,27	3,92 ± 2,41	4,55 ± 1,68	+0,63
<b>Frauen</b>						
Methionin	34,2 ± 3,8	34,8 ± 5,8	+0,62	33,0 ± 6,2	31,5 ± 4,5	-1,53
Cystein	166 ± 25	171 ± 36	+5,14	209 ± 75	205 ± 57	-3,60
Homocystein	11,6 ± 2,3	11,7 ± 2,8	+0,03	15,7 ± 7,4	14,5 ± 6,3	-1,22
Taurin	56,5 ± 13,6	48,8 ± 16,4	-7,61	64,2 ± 32,4	61,7 ± 15,5	-2,50
Glutathion	4,07 ± 1,50	4,05 ± 1,56	-0,01	4,47 ± 1,48	4,95 ± 1,05	+0,48

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, Casein: n=19, Lupinenprotein: n=21  
 \* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen Start und Ende der Intervention innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe (p<0,05; gepaarter t-Test)

### 3.5.6. Blutglukosekonzentrationen

Die Glukosekonzentration im Plasma der Studienteilnehmer wurde in beiden Behandlungsgruppen durch die 6-wöchige Interventionsphase weder im Gesamtkollektiv, noch in den beiden Teilkollektiven Männer und Frauen signifikant beeinflusst.

**Tabelle 58: Glukose-Konzentration von Probanden, welche über 6 Wochen täglich 35g Casein oder Lupinenprotein erhielten. Die Daten sind zum einen von allen Probanden, zum anderen nach Männern und Frauen aufgeteilt, dargestellt.**

	Caseingruppe			Lupinenproteingruppe		
	Start	Ende	Δ	Start	Ende	Δ
<b>Gesamt-kollektiv</b>	-----[mmol/l]-----					
Glukose	4,90 ± 0,88	5,14 ± 0,78	+0,21	4,89 ± 0,92	5,10 ± 0,75	+0,21
<b>Männer</b>						
Glukose	5,34 ± 0,91	5,38 ± 0,87	+0,03	5,34 ± 0,66	5,19 ± 0,65	-0,16
<b>Frauen</b>						
Glukose	4,73 ± 0,82	5,03 ± 0,74	+0,30	4,43 ± 0,96	5,01 ± 0,86	+0,58

Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, Casein: n=19, Lupinenprotein: n=21

### 3.5.7. Genexpression

Um zu untersuchen, ob, ähnlich wie in den Tierstudien, auch am Menschen auf der Ebene der Genexpression Veränderungen durch Lupinenprotein erzielt wurden, wurden die relativen mRNA-Konzentrationen von LDL-Rezeptor und SREBP 2 in mononukleären Zellen bestimmt.

Hierbei konnte für das Gesamtkollektiv gezeigt werden, dass die relative mRNA-Konzentration des LDL-Rezeptors innerhalb beider Behandlungsgruppen durch den 6-wöchigen Riegelverzehr signifikant erhöht werden konnte (Casein: +67%, P=0,013; Lupinenprotein: +68%, P=0,005). Innerhalb der Lupinenproteingruppe konnte zusätzlich die relative mRNA-Konzentration des Transkriptionsfaktors SREBP 2 durch die Riegelaufnahme signifikant gesteigert werden (+32%, P=0,006).

Betrachtet man die Expressionen getrennt nach Geschlechtern, so ist bei den Männern innerhalb beider Behandlungsgruppen eine Steigerung der relativen mRNA-Konzentration des LDL-Rezeptors zu verzeichnen (Casein: P=0,040; Lupinenprotein: P=0,032). Die relative mRNA-Konzentration des SREBP 2 blieb innerhalb beider Gruppen unverändert.

Bei den Frauen konnte die relative mRNA-Konzentration des LDL-Rezeptors und des SREBP 2 nur innerhalb der Gruppe signifikant gesteigert werden, die Lupinenprotein konsumierte. Die Frauen der Caseingruppe zeigten keine statistisch absicherbare Veränderung in den relativen mRNA-Konzentrationen beider Gene.

**Tabelle 59: Relative mRNA-Konzentrationen von SREBP2 und LDL-Rezeptor in mononukleären Zellen von Probanden, welche über 6 Wochen täglich 35g Casein oder Lupinenprotein erhielten.**

	Caseingruppe			Lupinenproteingruppe		
	Start	Ende	Δ	Start	Ende	Δ
<b>Gesamtkollektiv</b>						
SREBP 2	1,00 ± 0,42	1,16 ± 0,34	+0,16	1,00 ± 0,28	1,32 ± 0,35*	+0,32
LDL-Rez.	1,00 ± 0,61	1,67 ± 0,55*	+0,67	1,00 ± 0,55	1,68 ± 0,77*	+0,68
<b>Männer</b>						
SREBP 2	1,00 ± 0,13	1,29 ± 0,23	+0,30	1,00 ± 0,27	1,36 ± 0,36	+0,37
LDL-Rez.	1,00 ± 0,41	1,94 ± 0,56*	+0,94	1,00 ± 0,43	1,54 ± 0,45*	+0,54
<b>Frauen</b>						
SREBP 2	1,00 ± 0,47	1,11 ± 0,38	+0,11	1,00 ± 0,30	1,27 ± 0,36*	+0,27
LDL-Rez.	1,00 ± 0,65	1,55 ± 0,56	+0,55	1,00 ± 0,42	2,12 ± 0,88*	+1,12

SREBP2 = Sterol Regulatory Element Binding Protein 2, LDL-Rez. = Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor  
Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt, Casein: n=19, Lupinenprotein: n=21

Als Haushaltsgen diente beta-Aktin, Casein wurde 1 gesetzt.

\* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen Start und Ende der Intervention innerhalb der jeweiligen Behandlungsgruppe (p<0,05; gepaarter t-Test)

## 4. Diskussion

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass Sojaprotein cholesterinsenkende Wirkung besitzt. Auch für Lupinenprotein, wie Sojaprotein ebenfalls aus der Pflanzenfamilie der Leguminosen, wurden bereits mehrfach hypolipämische Eigenschaften beschrieben. Um die Wirkung von Lupinenprotein auf die Lipidkonzentrationen weiter zu charakterisieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Studien an unterschiedlichen Tiermodellen sowie in einer Humanstudie durchgeführt. Es sollte dabei zum einen festgestellt werden, welche grundlegenden Mechanismen für die lipidsenkenden Eigenschaften des Proteins verantwortlich sind und welche Komponente des Proteins diese verursacht. Zum anderen sollten Einflussgrößen wie Verdaulichkeit und thermische Verarbeitung sowie die Zusammensetzung der Grunddiät untersucht werden, die die Wirksamkeit des Proteins beeinflussen können. Neben der Beeinflussung von Hyperlipidämien als Risikofaktor für Atherosklerose, sollte weiter untersucht werden, ob Lupinenprotein direkt die Atherogenese beeinflussen kann.

In früheren Studien wurde gezeigt, dass Lupinenprotein einen Einfluss auf die Glukosekonzentrationen ausüben kann (Magni et al. 2004, Viveros et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden in Untersuchungen an Ratten, Schweinen und Menschen jedoch keinerlei Veränderungen der Glukosekonzentrationen durch Lupinenprotein festgestellt. Daraufhin wurden im Rahmen dieser Arbeit keine weiterführenden Analysen zur Wirkung von Lupinenprotein auf den Glukosestoffwechsel durchgeführt.

### 4.1. Aspekte der Versuchsplanung

Um in wissenschaftlichen Studien aussagekräftige und qualitativ hochwertige Ergebnisse erzielen zu können, ist eine konzeptionierte Versuchsplanung entscheidende Grundlage. So war für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zum Beispiel zu klären, welche Spezies für die Untersuchung einer entsprechenden Fragestellung am besten geeignet ist. Außerdem musste die einzusetzende Menge von Protein und Fett in der Diät definiert werden, sowie die optimale Versuchsdauer.

Die Wahl des einzusetzenden Versuchstiermodells ergab sich in Abhängigkeit der zu untersuchenden Fragestellung. In den ersten beiden Versuchen dieser Arbeit sollten insbesondere Grundlagenanalysen zur Wirkung von Lupinenprotein durchgeführt werden. Dafür war das klassische Versuchstiermodell der Ratte gut geeignet. Die Tiere können

problemlos unter standardisierten Versuchsbedingungen gehalten und gefüttert werden. Durch die durchschnittliche Futterraufnahme der Tiere von etwa 15-20 g ist auch bei großen n-Zahlen eine überschaubare Futtermenge nötig. Die zu erzielenden Ergebnisse an diesem Modell lassen einen guten Schluss auf prinzipielle Regulationsmechanismen zu. Dennoch existieren gerade im Lipidstoffwechsel einige Unterschiede im Vergleich zum Menschen (Shrago et al. 1971, Swierczynski et al. 2000, Letexier et al. 2003, Mahley et al. 2006). Insbesondere die Verteilung des Cholesterins in den Lipoproteinen ist an diesem Modell für eine optimale Vergleichbarkeit mit dem Menschen limitierend. Aufgrund des fehlenden *cholesterol ester transfer proteins* (CETP) sind die HDL-Cholesterinkonzentrationen der Ratten ähnlich wie bei Mäusen und Hunden im Verhältnis zur Gesamtcholesterinkonzentration sehr hoch (Tsutsumi et al. 2001). Ein weiterer Unterschied besteht u.a. darin, dass Ratten keine Gallenblase besitzen. Die Abgabe der Gallenflüssigkeit kann daher nicht schubweise durch Kontraktion der Gallenblase erfolgen, sondern wird direkt von der Leber in den Zwölffingerdarm abgegeben (Kiris et al. 2006). Da die Gallenflüssigkeit einen entscheidenden Einfluss auf die Lipidverdauung hat, ergeben sich auch hier Ungenauigkeiten in der Übertragbarkeit auf den Menschen.

Ein Tiermodell, welches wesentlich besser mit dem Mensch vergleichbar ist, ist das Schwein. Neben hoher genetischer Ähnlichkeit hat das Schwein außerdem eine vergleichbare Körpermasse sowie ein ähnliches Verdauungs- und Herz-Kreislauf-System wie der Mensch. Die Verteilung des Cholesterins in den Lipoproteinen stimmt ebenfalls sehr gut mit dem des Menschen überein (Carey, 1997). Allerdings ist bei diesen Tieren zu beachten, dass bei einer täglichen Futterraufnahme von 500 – 1000 g die herzustellen Futtermenge wesentlich größer ist, als bei Ratten. Auch die Haltungsbedingungen, das allgemeine Handling sowie die Probennahmen sind wesentlich aufwendiger.

Für die Fragestellung der Wirksamkeit von Lupinenprotein auf die Atherogenese war ein Versuchstier zu verwenden, welches in einem überschaubaren zeitlichen Rahmen eine ausgeprägte Atherosklerose entwickelt. Da Wildtyp-Ratten und Wildtyp-Mäuse üblicherweise durch deren hohe HDL-Cholesterinkonzentrationen vor einer Atheroskleroseentwicklung gefeit sind, musste ein anderes Modell eingesetzt werden. Untersuchungen zur Atherosklerose werden meist an *Watanabe heritable hyperlipidemic* (WHHL) Kaninchen (Buja et al. 1990, Aliev et al. 1998, Marchesi et al. 2007) oder knockout-Mäusen (Teupser et al. 2003, Müller et al. 2008, Nagarajan et al. 2008) durchgeführt. Aufgrund der versuchstechnischen Vorteile eines Mausmodells gegenüber Kaninchen sowie dessen hohe Ähnlichkeit in

Krankheitsverlauf und –ausprägung zum Menschen (Zhang et al. 1992, Nakashima et al. 1994) wurden im Rahmen dieser Arbeit knockout-Mäuse eingesetzt.

Untersuchungen mit der größten Aussagekraft sind jedoch direkte Studien am Menschen. Insbesondere, wenn Substanzen, wie im vorliegenden Fall Lupinenprotein, für eine Verwendung in der menschlichen Ernährung diskutiert werden, sind umfassende Humanstudien unumgänglich. Die Analysen sind hier jedoch meist auf Blutproben beschränkt, denn die Gewinnung von Gewebeproben ist nur sehr selten und mit großem Aufwand möglich. Auch die Versuchsdurchführung ist aufgrund der Individualität der Probanden wesentlich aufwändiger, als an einem Tiermodell. Zusammenfassend sollten daher immer Vor- und Nachteile einer jeden Versuchsspezies mit der Relevanz der jeweiligen Forschungsfragestellung abgewogen werden.

Bei Untersuchungen zum Einfluss von Lupinenprotein auf den Lipidstoffwechsel ist neben dem Versuchsmodell hauptsächlich zu definieren, wie hoch der Anteil des Proteins an der gesamten Diät sein soll. Die verabreichte Proteinmenge sollte mindestens so groß sein, dass potenzielle Veränderungen der Lipidkonzentrationen statistisch absicherbar sind. Es kann jedoch auch nicht unbegrenzt viel Protein im Versuch eingesetzt werden, denn eine exzessive Zufuhr kann z.B. Allergien auslösen (Jäger et al. 2002). Am Tiermodell können zur Analyse grundlegender Mechanismen höhere Konzentrationen eingesetzt werden, als am Menschen. Außerdem kann in Tierversuchen, unter Beachtung der Zufuhr an essentiellen Aminosäuren, der gesamte Proteinbedarf durch das Testprotein gedeckt werden, während in Humanstudien die Menge an einsetzbarem Protein durch das übliche Ernährungsmuster limitiert ist. Bei einem durchschnittlichen Erwachsenen mit 70 kg Körpergewicht und einer empfohlenen täglichen Proteinaufnahme von 0,8 g / kg Körpergewicht ergibt sich eine empfohlene Gesamte Proteinaufnahme von 56 g / d. Eine tägliche Verzehrmenge des Lupinenproteins von mehr als 30-40 g ist bei normaler ausgewogener Mischkost ohne kalorisches Mehraufwand daher kaum möglich. Letztendlich muss eine realisierbare Menge definiert werden, ab der deutliche positive Effekte zu erzielen sind, ohne dass dabei unerwünschte Nebenwirkungen auftreten.

In diversen Humanstudien zu Sojaprotein variieren die verabreichte Proteinmengen von 25-50 g / d (Review nach Sirtori et al. 2007). Die Empfehlungen der *Health Claims* der *U.S. Food and Drug Administration* beschreiben für einen Verzehr von 25 g Sojaprotein eine gesundheitsfördernde Wirkung. Da mit Lupinenprotein bislang kaum Humanstudien durchgeführt wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine etwas höhere Menge von 35 g

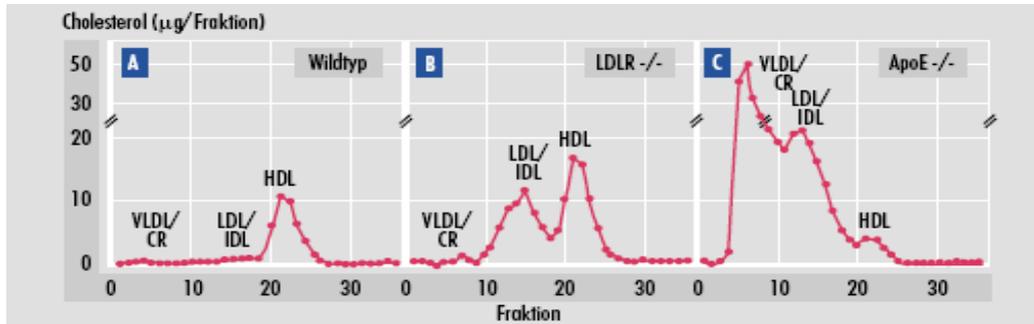
Lupinenprotein / d verabreicht, um einen möglichst deutlichen Effekt erzielen zu können. Dies entspricht bei einer mittleren täglichen Gesamtkalorienaufnahme von 2000 kcal etwa 140 kcal bzw. 7% der Gesamtkalorienaufnahme pro Tag.

Es existieren auch am Tier Studien, in denen mit 5% (Bettzieche et al. 2008 a, 2008 b) oder 10% Testprotein (Calagari et al. 2006, Rohn et al. 2006) deutliche Effekte auf die Lipidkonzentrationen beobachtet wurden. In Anlehnung an die Aufnahmemenge von Lupinenprotein in der Humanernährung (s.o.), wurde im Langzeitversuch an apoE knockout-Mäusen 10% Lupinenprotein eingesetzt. Zusätzlich wurde zum Decken des Bedarfs an essentiellen Aminosäuren 10% Eialbumin in der Diät zugesetzt. Zur Untersuchung grundlegender Wirkmechanismen von Proteinen auf die Lipidkonzentration werden im Allgemeinen höhere Konzentrationen verwendet. In vielen Tierstudien wurden zu diesem Zweck Proteinkonzentrationen von 18-20% in der Diät eingesetzt (Madani et al. 1998, Ascencio et al. 2004, Tovar et al. 2005, Brandsch et al. 2006, Pilvi et al. 2006, Spielmann et al. 2007, Shukla et al. 2007). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen an Ratten wurden ebenfalls 20% Lupinenprotein als alleinige Proteinquelle verfüttert. Im Versuch an Schweinen wurden in Anlehnung an Martins et al. (2004) mit 15% Lupinenprotein ähnliche Mengen eingesetzt. Limitierende Aminosäuren wurden jeweils zusätzlich supplementiert.

Neben dem Anteil des Proteins in der Diät können weitere Komponenten einen Einfluss auf die erzielbare Wirkung durch das Protein haben. So spielt das Diätfett eine entscheidende Rolle. In vielen Studien wurde gezeigt, dass die Wirkung von pflanzlichen Proteinen unter hyperlipämischen Bedingungen größer ist, als unter normolipämischen (Sirtori et al. 2007, Bettzieche et al. 2008 a). Besonders für die Untersuchung grundlegender Wirkmechanismen ist ein deutlicher hypolipämischer Effekt Voraussetzung. Daher sollten in den vorliegenden Versuchen an Ratten erhöhte Basalkonzentrationen an Cholesterin im Blut eingestellt werden. In einer Studie nach Mawatari et al. (2003) wurde an Ratten die Gabe von 0,5% Cholesterin oder/und 0,15% Choleat im Vergleich zu einer Basisdiät (keine Cholesterin- oder Choleatzulage) untersucht. Es zeigte sich, dass durch Cholesterinsupplementation allein keine Veränderung in der Gesamtcholesterin- sowie Gesamttriglyceridkonzentration im Vergleich zur Basisdiät zu beobachten war. Die Konzentration an LDL-Cholesterin war durch alleinige Cholesterinzulage im Vergleich zur Basisdiät erhöht, die Konzentration an Cholesterin in den HDL erniedrigt. Durch zusätzlich Gabe von Choleat zur cholesterinreichen Diät wurden Gesamt- und LDL-Cholesterin erhöht, HDL-Cholesterin und Gesamttriglyceridkonzentration im Vergleich zur Basisdiät erniedrigt. Außerdem konnte nur durch Cholesterin- und

Choleatzulage die in Ratten übliche Verteilung des Cholesterins in den Lipoproteinen, von überwiegend HDL-Cholesterin (ähnlich Abb. 16 A) zu überwiegend VLDL und LDL-Cholesterin, verschoben werden. Eine Lipoproteinverteilung mit hohen LDL-Cholesterinkonzentrationen ist typisch für den Menschen. Diverse Studien beschreiben zur Modifikation der Cholesterinverteilung in den Lipoproteinen eine Gabe von 1% Cholesterin und 0,5% Choleat (van Eck et al. 2004, Bettzieche et al. 2008 a, 2008 b). Daher wurden in den vorliegenden Versuchen an Ratten ebenfalls diese Konzentrationen eingesetzt.

Im Versuch an apoE knockout-Mäusen sollte durch die Diät eine Beschleunigung der Atheroskleroseentstehung erzielt werden. Die Tiere erhielten dafür eine klassische *Western diet* mit 21% Fett und 0,15% Cholesterin (Ueshima et al. 2005, Wang et al. 2006, Norata et al. 2007). Da das Cholesterinlipoproteinprofil in diesen Tieren durch das Fehlen des Gens für Apolipoprotein E im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen bereits stark verändert ist (siehe Abb. 16 A und C), wurde auf eine zusätzliche Gabe von Choleat verzichtet. Lichtman et al. (1999) und Teupser et al. (2003) zeigten, dass auch ohne Choleatzulage eine ausgeprägte Atherosklerose in knockout-Mäusen zu beobachten ist.



**Abbildung 16:** Verteilung des Cholesterins in den verschiedenen Lipoproteinen A) Wildtyp-Maus B) LDL-Rezeptor knockout-Maus C) apoE knockout-Maus (Braun JR et al. 1996)

Eine Spezies, die nicht durch Zulage von Cholesterin oder Gallensalzen an das Lipoproteinverteilungsmuster des Menschen angeglichen werden muss, ist das Schwein. An dieser Spezies fehlen jedoch umfassende Kenntnisse, ob die Wirkung von Lupinenprotein ebenfalls von den Basalkonzentrationen an Cholesterin und Triglyceriden abhängig ist. Daher sollte im Versuch an Schweinen eine normolipämische Diät getestet werden, eine Zulage an Cholesterin oder Gallensalzen bzw. eine erhöhte Fettzufuhr waren daher nicht notwendig.

Als Ergebnis der vorliegend durchgeführten Studien an Ratten, Mäusen und Schweinen und in Anlehnung an bereits durchgeführte Humanstudien mit Sojaprotein (Review nach Sirtori et

al. 2007), war am Menschen mit erhöhten Blutfetten der größtmögliche Effekt durch Lupinenprotein zu erwarten. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein hypercholesterinämisches Probandenkollektiv mit Cholesterinkonzentrationen zwischen 5,7 und 7,9 mmol/l für die Humanstudie rekrutiert.

Außer der Diätzusammensetzung war die Dauer der Versuche ein entscheidendes Kriterium in der Versuchsplanung. Je kürzer Versuche anberaumt werden können, umso geringer ist deren organisatorischer und materieller Aufwand. Jedoch können in Abhängigkeit von der Versuchsfragestellung verschieden lange Versuchszeiträume nötig sein, um Effekte des Lupinenproteins beobachten zu können. Im Versuch an Ratten, in dem die Verdaulichkeit des Lupinenproteins untersucht werden sollte, war eine kurze Versuchsdauer von 9 Tagen ausreichend. Aufgrund der beschriebenen Transitzeit im Magen-Darm-Trakt von Ratten von 20 h für Flüssigkeiten und 22 h für Festfutter (Engelhardt et al. 2005) war die Messung der N-Ausscheidung in Kot und Urin bereits nach wenigen Tagen möglich. Auch im zweiten Versuch an Ratten, in dem die Wirkung von 20% nativem oder erhitztem Lupinenprotein untersucht werden sollte, war eine Versuchsdauer von 13 Tagen ausreichend. Die Fütterungsperiode wurde in Anlehnung an frühere Studien der eigenen Arbeitsgruppe gewählt, wo mit 5% Protein nach 17 Tagen Fütterung deutliche Effekte auf die Lipidkonzentrationen erzielt wurden (Betzliche et al. 2008 a). Studien anderer Autoren zeigten mit 12-36% Lupinenprotein über einer Versuchsdauer von 10 Tagen Cholesterinsenkungen von 16-34% (Review nach Sirtori et al. 2009). Im vorliegenden Versuch am Schwein wurde mit 21 d etwas länger gefüttert. Auch hier wurde sich an früheren Studien an Schweinen orientiert, in denen mit 15% Lupinenprotein nach 2 Wochen Fütterungsperiode deutliche Reduktionen des LDL-Cholesterins beobachtet werden konnten (Martins et al. 2005). Da in jener Studie jedoch hypercholesterinämisch gefüttert wurde, waren die Effekte vermutlich deutlicher und eher zu beobachten, als unter Diät ohne Cholesterinzulage. Daher wurde im vorliegenden Versuch am Schwein mit Lupinenprotein in normolipämischer Diät über 3 Wochen gefüttert.

An apoE knockout-Mäusen war zur Untersuchung des Einflusses von Lupinenprotein auf die Atherosklerose eine deutlich längere Versuchsdauer nötig. Fortgeschrittene Läsionen der Atherosklerose sind trotz Fütterung einer *Western diet* erst nach einer Zeit von etwa 3-6 Monaten zu beobachten (Tangirala 1995, Wang et al. 2006). Im vorliegenden Versuch wurde die Diät mit Lupinenprotein über 4 Monate verabreicht. In diesem Zeitraum wurden in

früheren Studien am gleichen Maus-Modell deutliche Effekte auf die Atherosklerose beobachtet (Leppänen et al. 1997, Adams et al. 2002, 2004).

Um in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Humanstudie möglichst deutliche Effekte durch Lupinenprotein erzielen zu können, wurde über eine Studiendauer von 6 Wochen getestet. Es wird für Statine, ein Medikament, welches über Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zur Senkung des Plasmacholesterins führt, eine Einnahmedauer von etwa 6 Wochen bis zur Einstellung von Lipidsenkungen empfohlen (Laufs et al. 2004). Vergleichbare Studien mit Sojaprotein wurden in ähnlichen Zeiträumen durchgeführt (Teixeira et al. 2000, Hermansen et al. 2001, Lichtenstein et al. 2002, Puska et al. 2002, Steinberg et al. 2003, Blum et al. 2003). In einer Studie, in der der Einfluss von Sojaprotein auf die Cholesterinkonzentrationen untersucht wurde, wurde nach 6-wöchiger Intervention sogar ein wesentlich deutlicherer Effekt gezeigt, als nach 12 Wochen (Anderson et al. 2005).

#### **4.2. *Eigenschaften des Lupinenproteins***

Die Qualität eines Proteins bestimmt entscheidend Wachstum und Entwicklung eines Organismus. Im ersten Versuch im Rahmen dieser Arbeit sollte als Grundlage für die folgenden Studien untersucht werden, ob Lupinenprotein eine ähnliche Verdaulichkeit im Vergleich zu Casein hat. Eine unterschiedliche Verdaulichkeit könnte das Wachstum der Tiere und damit direkt den Energie- und Lipidstoffwechsel beeinflussen. Im vorliegenden Versuch wurde nach Aufnahme der Proteindiäten die KMZ als auch die N-Ausscheidung der Tiere über den Kot untersucht. Damit war eine Aussage zur scheinbaren Verdaulichkeit des Proteins möglich. Die N-Ausscheidung im Urin sollte gleichzeitig eine Aussage zur Biologischen Wertigkeit des Proteins liefern. Es existieren frühere Studien, in denen gezeigt wurde, dass Samenmehl von Lupinen eine schlechtere Verwertbarkeit besitzt, als z.B. Laktalbumin (Rubio et al. 1995). In gleicher Studie wurde für Lupinenmehl u.a. eine erhöhte Konzentrationen an Stickstoff im Urin gemessen sowie eine verminderte Wachstumsentwicklung der Tiere. Die eigenen Untersuchungen an der Ratte ergaben für Casein und Lupinenprotein bei gleicher N-Aufnahme ähnliche N-Konzentrationen in Chymus, Urin und Kot. Die KMZ der Tiere unterschied sich ebenfalls nicht nach 9-tägiger Fütterung. Demnach scheint sich sowohl die Verdaulichkeit als auch die Biologische Wertigkeit der beiden Proteine Casein und Lupinenprotein nicht zu unterscheiden. Studien an Ratten zeigten ebenfalls, dass Lupinenprotein einen adäquaten Nährwert aufweist, wie Casein und Laktalbumin (Caligari et al. 2006). Es ist bekannt, dass die im vorliegenden Versuch

ermittelte scheinbare Verdaulichkeit nur ein ungefähres Maß zur Beurteilung der Proteinqualität ist. Nicht berücksichtigt werden bei dieser Methode z.B. die N-Verluste durch bakteriell gebildete Proteine oder Verdauungssäfte. Da sich die beiden im Versuch verabreichten Diäten jedoch ausschließlich in der Proteinart unterschieden, ist die Aussage zur scheinbaren Verdaulichkeit in diesem Fall ein annähernd gutes Maß für die wirkliche Verdaulichkeit der Proteine.

Als weiteres entscheidendes Kriterium zur Beurteilung der Qualität eines Nahrungsproteins gilt, wie der Bedarf an essentiellen Aminosäuren gedeckt wird. Der Protein- und Aminosäuregehalt der Lupinen ähnelt sehr dem von Sojabohnen (Mellenthin et al. 1999, Bettzieche et al. 2008 a). Unterschiede betreffen jedoch z.B. die essentiellen Aminosäuren Lysin und Tryptophan sowie die schwefelhaltige essentielle Aminosäure Methionin und das semiessentielle Cystein. Diese kommen im Lupinenprotein in etwas geringerer Konzentration vor, als im Sojaprotein. Arginin kommt im Lupinenprotein zu höheren Anteilen vor, als in Sojaprotein (Duranti et al. 1979, Van Barneveld et al. 1999, Friedman et al. 2001, Mariotti et al. 2002). Im Vergleich zu Casein sind im Lupinenprotein die Konzentrationen an Arginin und Cystein höher und die an Methionin geringer. Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fütterungsversuchen wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Spezies und den Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren im Protein entsprechend mit essentiellen Aminosäuren supplementiert. Alle weiteren Aminosäuren wurden nicht ausgeglichen, da das Aminosäuremuster des jeweiligen Proteins so gut wie möglich erhalten bleiben sollte. Vor Versuchsbeginn wurden stets Analysen der Aminosäuregehalte im jeweils eingesetzten Protein durchgeführt. Für optimales Angleichen der essentiellen Aminosäuren war dies von großer Bedeutung, denn prinzipiell ist der Eiweißgehalt im Samenkorn der Lupine bzw. die Aminosäurezusammensetzung des Proteins stark abhängig von der Art, der Sorte, dem Standort und dem Erntejahr der Lupine. Selbst bei der gleichen Sorte kann der Gehalt in einem Anbaujahr standortbedingt um bis zu 8 Prozentpunkte schwanken (Gesellschaft zur Förderung der Lupine e.V. 2007). Die zuzusetzenden essentiellen Aminosäuren wurden individuell für die entsprechende Spezies gemäß den Empfehlungen des NRC, AIN oder der GfE errechnet. In den Versuchen an Ratten wurden Methionin bzw. Threonin, Valin und Lysin zugesetzt. In Versuchen mit Schweinen erfolgte die Supplementation mit Methionin, Threonin, Tryptophan und Lysin. Im Langzeitversuch an Mäusen wurde zum Decken des Bedarfs aller essentiellen Aminosäuren neben 10% Lupinenprotein 10% Eialbumin zugesetzt.

Neben Aminosäuren können verschiedene andere Pflanzeninhaltsstoffe an den Effekten der Proteine beteiligt sein. So existieren zahlreiche Studien, in denen die positiven Wirkungen von Sojaprotein durch deren Gehalt an Isoflavonen begründet wurden (Meta-Analyse nach Anderson et al. 1995, Kirk et al. 1998, Adams et al. 2002, Ma et al. 2005). Viele neuere Untersuchungen deuten jedoch darauf hin, dass die Wirkung vorrangig durch das Protein als solches hervorgerufen wurde, und nicht durch die Isoflavone (Anthony et al. 1997, Crouse et al. 1999, Lichtenstein et al. 2002, Shukla et al. 2007, Nagarian et al. 2007, Cho et al. 2008). Lupinenprotein ist im Vergleich zu Soja sehr arm an Isoflavonen. Die Konzentrationen liegen nach eigenen Untersuchungen unter der Nachweisgrenze von 2,22  $\mu\text{mol/kg}$  für Genistein, 1,18  $\mu\text{mol/kg}$  für Daidzein und 1,39  $\mu\text{mol/kg}$  für Genistin. Da für Lupinenprotein in früheren Studien positive Effekte auf Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen (Sirtori et al. 2004, Spielmann et al. 2007, Bettzieche et al. 2008 a, 2008 b), Blutdruck (Pilvi et al. 2006) und Atherosklerose (Marchesi et al. 2007) gezeigt wurden, wird angenommen, dass Peptide, oder einzelne Aminosäuren, die beim intestinalen Verdau freigesetzt werden, für die positiven Wirkungen des Proteins verantwortlich sein könnten (Sirtori et al. 2009). In Studien der eigenen Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass Totalproteinextrakt der Lupine weniger stark wirkt, als einzelne Teilfraktionen des Proteins (Bettzieche et al. 2008 b). Für Conglutin  $\gamma$ , ein Speicherpeptid des Lupinenproteins, wurden bereits direkt lipidsenkende Effekte beobachtet (Sirtori et al. 2004). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit zumeist eine Conglutin  $\gamma$ -reiche Teilfraktion des Lupinenproteins Sorte Boregine eingesetzt.

Schließlich können auch Inhaltsstoffe in Proteinen enthalten sein, die einen negativen Effekt haben. Proteine von Lupinen sind in ihrer ursprünglichen Form z.B. reich an bitteren Alkaloiden, insbesondere an Lupanin, Angustifolin und  $13\alpha$ -Hydroxylupanin. Da diese Verbindungen für den Organismus ungenießbar und in hohen Mengen sogar toxisch sind, wurden alkaloidarme Sorten gezüchtet (Duranti et al. 1997). Die heute verwendeten Sorten werden daher als Süßlupinen bezeichnet. Der Alkaloidgehalt des im Rahmen vorliegender Untersuchungen eingesetzten Proteins der *L. angustifolius* der Sorte Boregine betrug 0,016%. Dieser Wert liegt deutlich unter den Referenzwerten für einen Einsatz in Futtermitteln (max. 0,05%) sowie in der menschlichen Ernährung (max. 0,02%). Weitere antinutritive Inhaltsstoffe, wie Trypsininhibitoren, Saponine und Tannine sind im Lupinenprotein ebenfalls minimal (Van Barneveld et al. 1999) und beeinflussen daher die Verdaulichkeit und Wirksamkeit des Proteins nicht.

Neben antinutritiven Inhaltsstoffen kann auch die Verarbeitung des Proteins seine Qualität bzw. Wirksamkeit negativ beeinflussen. Lupinenprotein wird in Deutschland bereits vereinzelt in Lebensmitteln wie Pasta, Brot oder Tofu-Ersatz eingesetzt. Während der industriellen Herstellung von Produkten für die Humanernährung unterliegen die Proteine einer Vielzahl von thermischen Einflüssen (Sprühtrocknungen, Hitzeinaktivierung von mikrobiellen Keimen, Verarbeitung im Lebensmittel etc.). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob durch thermische Behandlungen die Wirksamkeit der Proteinisolate beeinflusst wird. Dafür wurde in einem Versuch an Ratten untersucht, ob sich natives und erhitztes Lupinenprotein in seiner Wirkung auf den Lipidstoffwechsel unterscheidet. Durch thermische Denaturierungsvorgänge kommt es zu Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur eines Proteins. Die Reihenfolge der Aminosäuren (Primärstruktur) ändert sich dabei nicht, da kovalente Bindungen nicht gespalten werden können. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das Protein 30 Minuten bei 85-95°C erhitzt und damit nahezu vollständig denaturiert. Insgesamt wurde festgestellt, dass sich die Lipidkonzentrationen der Tiere, die natives oder erhitztes Protein aufnahmen, in Plasma und Lipoproteinen meist nicht statistisch unterschieden. In der Leber waren die hypolipämischen Effekte durch natives Protein meist deutlicher. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das zusätzliche Erhitzen die bioaktiven Substanzen des Proteins und damit deren gesundheitsfördernde Wirkung nicht wesentlich verändert haben muss. Neben der thermischen Beeinflussung des Proteinisolates können auch hitzebedingte Veränderungen des Proteins im Lebensmittel erfolgen. Ob bei der Herstellung und Zubereitung von Produkten, die Lupinenproteine enthalten, auch Maillard-Reaktionen mit weiteren Lebensmittelinhaltsstoffen wie Kohlenhydraten stattfinden, wurde im vorliegenden Versuch nicht getestet. Frühere Studien zur Thermostabilität von Lupinenprotein während der Herstellung der Isolate (D'Agostina et al. 2006), zur Stabilität von Lupinengries in Spaghetti (Doxastakis et al. 2007) oder Lupinenmehl bzw. Proteinisolat in Gebäck (Bez et al. 2005) ergaben ähnlich marginale hitzebedingte Schäden wie in Kontrollen mit 100% Weizenmehl. Als Marker für Hitzeschäden wurde hier N-(2-furoyl-methyl)-L-Lysin (Furosin) gemessen, welches ein stabiles Derivat eines Amadori-Produktes aus der Reaktion reduzierender Zucker mit Lysin ist (Henle et al. 1995).

Trotz der potentiell gesundheitsfördernden Wirkungen, die Lupinenprotein im Organismus hervorrufen kann, darf auch deren allergenes Potential nicht unerwähnt bleiben. So können nach Verzehr von Lupinen-Produkten die klassischen Symptome einer Allergie wie Juckreiz,

gerötete Augen, Niesanfalle, anschwellende Schleimhäute oder Magen-Darm-Beschwerden auftreten. Bei hoch sensitiven Personen kann der Verzehr sogar bis zu Atemnot und anaphylaktischem Schock führen (Brennecke et al. 2007). Es gibt mehrere Sensibilisierungswege der Lupinenproteinallergie. Vereinzelt kommt es zu einer *de novo*-Entwicklung, in der Mehrzahl der Fälle jedoch zu einer Kreuzreaktivität mit einer bereits bestehenden Allergie gegen andere Vertreter der Leguminosen (Radcliffe et al. 2005), z.B. Erdnuss, Sojabohne, Linse, grüne Bohne oder Erbse. Die Kreuzreaktivität zu Erdnuss scheint dabei besonders häufig zu sein (68-88%, Moneret-Vautrin et al. 1999, Leduc et al. 2002). Die Ursache darin liegt in der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen Erdnussallergen Ara h 8 und Lupinenallergen PR-10. Außerdem ähneln eine Precursorform des Conglutin- aus dem Lupinenprotein dem Erdnussallergen Ara h 1. Zusätzlich besteht eine Sequenzähnlichkeit mit Bet v1, dem Hauptallergen der Birkenpollen (Guarneri et al. 2005).

Seit 2004 unterliegen europäische Lebensmittelproduzenten einer EU-Kennzeichnungspflicht für potentiell allergene Inhaltsstoffe (Gluten, Fisch, Krustentiere, Eier, Soja, Milch, Nüsse, Milchprodukte, Erdnüsse, Senf, Sellerie, Sesamsamen und Sulfite). 2006 wurde Lupine in den Anhang III A der Richtlinie 2000/13/EG aufgenommen. Jedoch ist diese noch nicht vollständig umgesetzt (Brennecke et al. 2007). Insgesamt ist die Lupinenproteinallergie in Deutschland bis dato selten, dennoch könnte bei vermehrtem Einsatz von Lupinenprotein auch die Anzahl der Allergiker steigen. Generell ist zu empfehlen, dass aufgrund der Schwere und der Häufigkeit der Kreuzreaktionen, Personen mit einer Allergie gegen Erdnuss Produkte mit Bestandteilen der Lupine meiden sollten.

### **4.3. Wirkungen des Lupinenproteins auf den Triglyceridstoffwechsel**

Neben erhohnten Konzentrationen an LDL-Cholesterin und verringerten Konzentrationen an HDL-Cholesterin (Grundy et al. 1998, Gotto et al. 1998) werden auch hohe Triglyceridkonzentrationen als unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose und Koronarer Herzkrankheit (KHK) angesehen (Jacobson et al. 2007). Aufgrund der hohen Prävalenz von Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems ist eine Beeinflussung der Plasmatriglyceride mit der Nahrung von enormer Bedeutung. Tierstudien der eigenen Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass durch Aufnahme pflanzlicher Proteine, wie Sojaprotein (Shukla et al. 2007) oder Lupinenprotein (Spielmann et al. 2007, Bettzieche et al. 2008 a), eine Senkung der Triglyceridkonzentrationen erzielt wurde. Im Rahmen dieser

Arbeit sollten weitere Erkenntnisse über die triglyceridsenkende Wirkung von Lupinenprotein gewonnen werden.

In zwei Versuchen an Ratten, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, sollten v.a. Hinweise auf die grundlegenden Mechanismen der triglyceridsenkenden Effekte durch Lupinenprotein gewonnen werden. Im ersten Versuch dazu konnte an Ratten die Triglyceridkonzentration im Plasma der Tiere durch Aufnahme von 20% Lupinenprotein in der Diät tendenziell um 18% reduziert werden. Die Konzentration an Triglyceriden im Faeces war dabei signifikant um 32% erhöht, ebenso wie die Exkretion der Triglyceride (+34%). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die geringere Plasmakonzentration durch Aufnahme von Lupinenprotein im Vergleich zu Casein über eine vermehrte Ausscheidung der Triglyceride mit dem Kot bedingt wurde. Vergleichbare Studien mit Sojaprotein zeigten ähnliche Ergebnisse. So konnte an Ratten eine Senkung der Plasmatriglyceride um 41% gezeigt werden, was unter anderem mit einer signifikant erhöhten Exkretion an freien Fettsäuren (+32%) begründet wurde (Fukui et al. 2004). Ähnliche Beobachtungen wurden an übergewichtigen Mäusen gemacht. Auch hier wurde durch Fütterung von  $\beta$ -Conglycinin, der Hauptproteinkomponente des Sojaproteins, die Reduktion der Plasmatriglyceride (-31%) u.a. mit einer vermehrten Ausscheidung von Triglyceriden mit dem Faeces begründet (+69%; Moriyama et al. 2003). Beide Arbeitsgruppen vermuten als Ursache für die vermehrte Ausscheidung eine Hemmung der Pankreaslipase durch Protein- oder Peptidkomponenten. Die damit verminderte Hydrolyse der Triglyceride beeinträchtigt deren Resorption. Außerdem wurde eine Bindung der freien Fettsäuren durch  $\beta$ -Conglycinin und somit deren erhöhte Ausscheidung diskutiert.

Im zweiten Versuch dieser Arbeit wurde ebenfalls an Ratten gezeigt, dass bei den Tieren, die fettreiche Diäten erhielten, die Triglyceridkonzentrationen im Plasma durch die Aufnahme von Lupinenprotein signifikant um fast 50% im Vergleich zu Casein gesenkt wurden. Die Reduktion im Plasma konnte auf eine Verminderung der Triglyceride in den VLDL, ebenfalls um fast 50%, zurückgeführt werden. Bei den Tieren, die die kohlenhydratreiche Diät erhielten, wurden die Konzentration in Plasma und VLDL durch Lupinenprotein leicht um etwa 10-15% vermindert. Daher ergab sich insgesamt ein signifikanter Effekt des Proteins. Die thermische Behandlung des Lupinenproteins hatte dabei keinen Einfluss auf die Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Lipoproteinen. In der Leber wurden die Triglyceride durch Aufnahme des nativen Lupinenproteins im Mittel um 24% reduziert, durch erhitztes Lupinenprotein wurde keine signifikante Veränderung zu Casein festgestellt.

Es wurde in Studien der eigenen Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass Lupinenprotein in der Leber die Expression von Genen des Triglyceridstoffwechsels wie SREBP 1c, FAS und SCD1 beeinflussen kann (Spielmann et al. 2007, Bettzieche et al. 2008 a) und somit Hinweise auf die Ursachen hypolipämischer Wirkungen liefert. Daher wurden auch im vorliegenden Versuch an Ratten die relativen mRNA-Konzentrationen von SREBP 1c, FAS und SCD1 bestimmt. SREBP 1c gehört wie SREBP 1a und SREBP 2 zur Familie der membranständigen Transkriptionsfaktoren *sterol regulatory element binding proteins* (SREBP). Diese sind Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper Proteine und regulieren bei Wirbeltieren direkt die Expression von mehr als 30 Genen des Lipidstoffwechsels (Brown & Goldstein, 1997, Horton et al. 1999, Edwards et al. 2000, Sakakura et al. 2001). SREBP 1c ist dabei bei der Regulation der Fettsäurebiosynthese, VLDL-Bildung und Glukoneogenese von herausragender Bedeutung. SREBP 2 hingegen steuert Gene der Cholesterinhomöostase. Gebildet werden alle SREBPs als Precursorform-Form, welche im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle lokalisiert ist (siehe auch Abb.17, Seite 103). Sind in einer Zelle genügend Aktivatoren der SREBPs, wie Fettsäuren, Sterole, Oxysterole oder Insulin vorhanden, kommt es zur Interaktion des *SREBP cleavage - activating protein* (SCAP) mit dem ebenfalls im ER lokalisierten Insulin-induzierten Gen (Insig). Insig bewirkt eine Rückhaltung des SCAP-SREBP-Komplexes im ER, die Ausreifung des nukleären (n)SREBPs unterbleibt (Brown & Goldstein, 1997). Sind hingegen nicht genügend Aktivatoren z.B. von SREBP 1c (z.B. Fettsäuren oder Insulin) vorhanden, kommt es nicht zur Interaktion des SCAP mit Insig. Die Insig vermittelte Retention des SCAP-SREBP-Komplexes unterbleibt, es kommt zu dessen Freisetzung aus dem ER mit anschließendem Transport zum Golgi Apparat. Hier wird durch 2 Proteasen S1 und S2 das SREBP zum nSREBP aktiviert und kann so im Zellkern an *sterol regulatory elements* der DNA binden und als Transkriptionsfaktor z.B. für die lipogenen Gene FAS oder SCD1 wirken. Dieser Mechanismus der *feedback* Regulation ist von enormer Bedeutung für die Lipidhomöostase im Organismus.

Es muss dabei erwähnt werden, dass die gemessene mRNA-Konzentration eines Gens nicht in jedem Fall die Menge des letztendlich synthetisierten Proteins angeben muss. Weitere Prozesse wie Phosphorylierung oder Ubiquitinierung können das Protein weiter modifizieren (Jump et al. 2005). Dennoch ist die Expressionsmessung ein sehr guter Hinweis darauf, wie die Synthese eines Proteins reguliert wird. Im Rahmen des vorliegenden Versuches wurden die Ergebnisse zudem mit Enzymaktivitätsmessungen weiter bestätigt.

Anhand von Genexpressionsanalysen sollte im aktuellen Versuch aufgedeckt werden, wo die Ursachen für die hypotriglyceridämischen Effekte durch Lupinenprotein liegen. Eine

Möglichkeit, über die die Triglyceridhomöostase beeinflusst werden kann, ist eine veränderte körpereigene *de novo*-Synthese von Fettsäuren in der Leber. Der Schlüsseltranskriptionsfaktor ist hierbei das SREBP 1c, welcher transkriptionell eine Reihe von lipogenen Enzymen reguliert (Magana et al. 1996, Ntambi et al. 1999, Stoeckman et al. 2002). Ein Zielgen des SREBP 1c ist dabei die Fettsäuresynthase, ein Multienzymkomplex, welcher als Schlüsselenzym die Synthese von Fettsäuren reguliert (Chirala et al. 2004). Die Expression der FSS war im vorliegenden Versuch an Ratten bei Aufnahme von Lupinenprotein in der kohlenhydratreichen Diät signifikant um etwa 50% niedriger. Zusätzlich zur geringeren mRNA-Konzentration war auch die Enzymaktivität der FSS in der Leber bei den Tieren, die Lupinenprotein mit der kohlenhydratreichen Kost erhielten, signifikant niedriger. Ebenfalls niedriger war die Enzymaktivität der G6PDH in der Leber durch Aufnahme von Lupinenprotein in der kohlenhydratreichen Diät im Vergleich zu Casein. Die G6PDH gehört wie die FSS zur Familie der lipogenen Enzyme und unterliegt der Regulation durch SREBP 1c bzw. Hormonen und Nahrungsbestandteilen (Kletzien et al. 1994). Ein Enzym, welches außerdem die Eigensynthese der Triglyceride steuert und ebenfalls über SREBP 1c reguliert wird, ist SCD1. Diese fügt, von der Carboxylgruppe aus gesehen, am Kohlenstoffatom 9 von Fettsäuren eine Doppelbindung ein (Flowers et al. 2008). Die Expression der SCD1 war bei Aufnahme von Lupinenprotein in der kohlenhydratreichen Diät ebenfalls niedriger, wenn auch nur bei erhitztem Lupinenprotein signifikant. Der Transkriptionsfaktor SREBP 1c als solcher blieb in seiner Expression unverändert. Die mRNA-Expression von SREBP 1c ist jedoch nicht ganz relevant, da bei SREBP 1c üblicherweise durch z.B. Ubiquitinierung oder Phosphorylierung Veränderungen der wirksamen Proteinmenge hervorrufen werden (Jump et al. 2005). In früheren Versuchen wurde ebenfalls gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor SREBP 1c weniger stark in seiner Expression vermindert wurde, als die beiden Zielgene FSS und SCD1 (Letexier et al. 2003). Zusammenfassend könnte die leicht geringere Plasma- und VLDL-Triglyceridkonzentration durch Aufnahme von Lupinenprotein in kohlenhydratreicher Diät auf eine geringere *de novo*-Fettsäuresynthese zurückzuführen sein, zumal auch die Triglyceridkonzentrationen in der Leber zumindest durch natives Lupinenprotein gesenkt wurden. Es existieren vergleichbare Studien mit Soja-Conglycinin, in denen ebenfalls eine verminderte Fettsäuresynthese als eine Ursache für verminderte Triglyceridkonzentrationen diskutiert wird (Moriyama et al. 2003). In jener Studie wurde durch Sojaprotein u.a. eine verminderte FSS-Aktivität im Vergleich zu Casein gemessen.

Hingegen den Beobachtungen bei Aufnahme von Lupinenprotein in kohlenhydratreicher Diät zeigten die Tiere im vorliegenden Versuch, die Lupinenprotein in fettreicher Diät erhielten,

keine signifikanten Veränderungen in der Expression von FSS oder SCD1 sowie in der Aktivität der FSS und G6PDH im Vergleich zu Casein. Auch die Expression von SREBP 1c blieb ohne Beeinflussung. Da die Gene FSS und SCD1 durch die Aufnahme der 30%-igen Fettdiät jedoch bereits um etwa 70% in ihrer Expression reduziert waren (siehe nächste Seite), war eine Beeinflussung durch Lupinenprotein möglicherweise nicht mehr möglich. In einer früheren Studie der eigenen Arbeitsgruppe wurde an Ratten hingegen gezeigt, dass bei 10% Fettzulage in der Diät durch Lupinenprotein die relativen mRNA-Konzentrationen der FSS und SCD1 vermindert werden konnten (Bettzieche et al. 2008 a). Die körpereigene Lipogenese war hier vermutlich nicht so drastisch reduziert, sodass eine weitere Beeinflussung durch Lupinenprotein möglich war.

Da in der aktuell vorliegenden Studie die deutlich geringeren Plasma- und VLDL-Triglyceride durch Aufnahme von Lupinenprotein in fettreicher Diät nicht durch eine verminderte *de novo*-Synthese zu erklären waren, wurden andere Stoffwechselwege beeinflusst. In Studien der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass auch Abbauewege der Triglyceride via Hydrolyse durch Lupinenprotein beeinflusst werden (Bettzieche et al. 2008 a). Die Expression der LPL und HL wurden in jener Studie durch Lupinenprotein erhöht. Entgegen dieser Beobachtung wurde im vorliegenden Versuch an Ratten die hepatische Lipoproteinlipase durch Lupinenprotein in seiner Expression jedoch vermindert. Eine vermehrte Hydrolyse ist demnach auch nicht die Ursache der triglyceridsenkenden Wirkung bei Aufnahme von Lupinenprotein in fettreicher Diät. Eine weitere Möglichkeit zur Regulation der Triglyceridhomöostase ist deren Ausscheidung über den Kot. Die Triglyceridkonzentrationen im Faeces wurden in diesem Versuch jedoch nicht bestimmt. Allerdings konnte im ersten Versuch an Ratten, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, bereits eine höhere Triglyceridexkretion durch Lupinenprotein im Vergleich zu Casein gezeigt werden. Auch Studien mit Sojaprotein zeigten eine vermehrte Triglyceridausscheidung über den Darm als Ursache für triglyceridsenkende Effekte im Plasma (Fukui et al. 2004, Moriyama et al. 2004).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass gemäß den Beobachtungen an 2 durchgeführten Versuchen an Ratten Lupinenprotein in Abhängigkeit von den Diätkomponenten unterschiedliche Stoffwechselprozesse der Triglyceride beeinflussen kann, nämlich sowohl deren Synthese in der Leber über SREBP 1c-abhängige Genregulation, als auch deren Ausscheidung über den Darm. Weitere Studien könnten sich u.a. damit befassen, über welche grundlegenden Mechanismen die vermehrte Triglyceridexkretion durch Lupinenprotein erklärt werden kann.

Neben den Untersuchungen zu den grundlegenden Mechanismen der hypotriglyceridämischen Effekte des Testproteins sollten verschiedene Diätvarianten getestet werden, die die Wirkung von Lupinenprotein beeinflussen können. Unterschiedliche Diätkomponenten können selbst eine Wirkung auf die Lipidkonzentrationen erzielen und so die Wirksamkeit der Testproteine beeinflussen. Im vorliegenden Versuch wurde die Wirkung von Lupinenprotein in Kombination mit kohlenhydrat- oder fettreicher Diät untersucht.

Die dabei im Versuch eingesetzte kohlenhydratreiche Diät enthielt 20% Fruktose, 20% Glukose sowie 20% Stärke, die fettreiche Kost neben 30% Stärke hauptsächlich Fett (30%). Beide Diäten enthielten außerdem 1% Cholesterin und 0,5% Choleat, um die Cholesterinspiegel der Tiere zu erhöhen. Typischerweise steigert eine fruktosereiche Diät die Triglyceridkonzentrationen im Plasma (Huang et al. 2004, Lě et al. 2006). Man hätte demnach vermuten können, die Triglyceridkonzentrationen aller Tiere wären bei Aufnahme der kohlenhydratreichen Diät höher, als bei Aufnahme der fettreichen Diät. Potentielle hypotriglyceridämische Effekte durch Lupinenprotein hätten bei erhöhten Ausgangskonzentrationen möglicherweise deutlicher gezeigt werden können. Frühere Studien der eigenen Arbeitsgruppe zeigten bereits hypotriglyceridämischen Wirkungen durch Lupinenprotein (Spielmann et al. 2007, Bettzieche et al. 2008 a). Der Einfluss der Ausgangstriglyceridkonzentrationen wurde jedoch noch nicht getestet. Entgegen den Erwartungen waren die Plasmatriglyceridkonzentrationen nach Aufnahme der kohlenhydrat- oder fettreichen Diät im vorliegenden Versuch etwa in gleichen Größenordnungen. Für den Einsatz von Choleat wurde in der Literatur ein triglyceridsenkender Effekt beschrieben (Mawatari et al. 2003). Folglich könnte die triglyceridsteigernde Wirkung der eingesetzten Fruktose durch die triglyceridsenkende Wirkung des Choleats antagonisiert worden sein. Weiter ist zu bemerken, dass die in der Literatur beschriebenen triglyceridsteigernden Effekte durch eine *high fructose* Diät zumeist durch eine Zulage von 60% Fruktose erzielt wurden. In der im vorliegenden Versuch verabreichten Diät waren lediglich 20% Fruktose enthalten. Trotz annähernd gleich hoher Triglyceridspiegel in Plasma und Lipoproteinen durch Aufnahme der beiden Diätvarianten, waren die Triglyceridkonzentrationen in der Leber durch Aufnahme der fettreichen Diät insgesamt höher, als durch Aufnahme der kohlenhydratreichen Diät. Möglicherweise bewirkten die hohen hepatischen Lipidkonzentrationen über eine *feedback*-Regulation eine verminderte *de novo*-Synthese, denn die Expression von Enzymen der Fettsäuresynthese war durch Aufnahme der Diäten verändert. Die hepatische mRNA-Konzentration der FSS und SCD1 war bei allen Tieren, die fettreiche Diät aufnahmen, signifikant um etwa 70% niedriger, als bei Aufnahme der kohlenhydratreichen Diät. In

früheren Studien wurde ebenfalls durch Aufnahme einer *high fat* Diät eine Reduktion der FSS Expression beschrieben (Letexier et al. 2003). Im vorliegenden Versuch war auch die Enzymaktivität von FSS und G6PDH in der Leber durch die Aufnahme der Fettdiät im Vergleich zur kohlenhydratreichen Diät um etwa 60-80% niedriger. Lavau et al. (1979) beschrieben durch Aufnahme einer *high fat*-Diät gleichermaßen eine Reduktion von intrazellulären Enzymaktivitäten der Fettsäuresynthese in der Leber. Zusätzlich zur *down*-Regulation der Fettsäurebiosynthese bei Aufnahme einer *high fat*-Diät könnten auch durch die hohe Kohlenhydrataufnahme mit resultierenden erhöhten Insulinspiegeln lipogene Enzyme gesteigert worden sein (Kletzien et al. 1994). Stoeckman et al. (2002) beschrieben für die Aufnahme einer kohlenhydratreichen Kost eine Induzierung der SREBP 1c-Expression und damit ebenfalls die des Zielgens der Fettsäuresynthase.

Im Hinblick auf die Wirksamkeit von Lupinenprotein in Kombination mit den beiden Diätvarianten konnte gezeigt werden, dass die Triglyceridsenkungen durch Aufnahme des Proteins in der fettreichen Diät wesentlich deutlicher waren (Plasma: -50%, VLDL: -47%), als bei Aufnahme in der kohlenhydratreichen Diät (Plasma: -13%, VLDL: -16%). Demnach kann zusammenfassend festgestellt werden, dass am Versuchstier Ratte ein hypotriglyceridämischer Effekt wesentlich stärker gezeigt werden kann, wenn eine fettreiche Diät gefüttert wird.

Hingegen den Ergebnissen an Ratten konnten im Langzeitversuch an apoE knockout-Mäusen durch Lupinenprotein keinerlei triglyceridsenkende Effekte beobachtet werden. Die Triglyceridkonzentrationen in Plasma und VLDL waren durch Aufnahme des Lupinenproteins sogar signifikant höher als nach Caseinaufnahme. Die mRNA-Konzentrationen von triglyceridanabolen Genen SREBP 1c, FSS und SCD1 sowie von triglyceridkatabolen Genen HL, LPL, PPAR $\alpha$ , ACO und HMG-CoA-Synthase wurden ebenfalls nicht durch Lupinenprotein beeinflusst.

Die verabreichte Proteinkonzentration von 10% und die Versuchsdauer von 16 Wochen konnten nicht die verantwortlichen Faktoren für das Ausbleiben der Effekte an apoE knockout-Mäusen sein. In einer früheren Studie der eigenen Arbeitsgruppe an Ratten wurden bereits mit 5% Lupinenprotein über eine Versuchsdauer von 17 Tagen deutliche Effekte auf den Lipidstoffwechsel gezeigt. Daher war womöglich das Versuchstiermodell nicht geeignet. In einer früheren Studie fremder Arbeitsgruppen wurde gezeigt, dass diverse Parameter des Lipidstoffwechsels durch den knockout von apoE drastisch verändert sind. So ist die Konzentration von Triglyceriden doppelt so hoch und die Konzentration von Cholesterin 4mal so hoch wie in Tieren von Wildtyp-Stämmen (Moghadasian et al. 2001). Aufgrund

dessen sind möglicherweise physiologische Regulationsmechanismen, in die Lupinenprotein eingreifen würde, im Organismus nicht möglich. In einer vergleichbaren Studie, in der apoE knockout-Mäuse Sojaprotein aufnahmen, konnte ebenfalls keine Senkung der Triglyceridkonzentrationen erzielt werden (Nagarian et al. 2007). An zwei Maus-Stämmen ohne apoE knockout (ICR-Mäuse bzw. KK-A<sup>y</sup>-Mäuse) zeigte sich hingegen, dass durch Sojaprotein die Triglyceridkonzentrationen signifikant im Vergleich zu Casein gesenkt werden konnten (Moriyama et al. 2004).

Eine Hypothese für das Ausbleiben der triglyceridsenkenden Effekte an apoE knockout-Tieren könnte darin liegen, dass an diesem Modelltier wegen dem fehlenden apoE durch Lupinenprotein keine Steigerung des LPL-assoziierten VLDL-Abbaus möglich war. ApoE ist notwendig für den Abbau von VLDL (Mahley et al. 1988). In einer Studie nach Medh et al. (2000) wurde gezeigt, dass sich apoE, LPL sowie die HL in ihrer Wirkung beeinflussen. Der Abbau normaler (apoE-haltiger) VLDL konnte in jener Studie durch unterschiedliche Konzentrationen an LPL bzw. HL dosisabhängig um 4-8-fach gesteigert werden, der Abbau apoE-freier VLDL (z.B. aus apoE knockout-Mäusen) wurde auch bei hohen Konzentrationen der LPL (1 µg/ml) und HL (10 µg/ml) nicht signifikant verändert. In Studien der eigenen Arbeitsgruppe wurde an Ratten bereits gezeigt, dass die LPL sowie die HL in der Leber durch Lupinenprotein in ihrer Expression erhöht werden konnten (Bettzieche et al. 2008 a). Wenn man davon ausgeht, dass LPL und HL auch in ihrer endothelialen Form durch Lupinenprotein so beeinflusst werden, wie in der Leber, so müsste durch eine Steigerung der Synthese dieser Enzyme ein beschleunigter Abbau der VLDL die Folge sein. Im o.g. Versuch nach Bettzieche et al. (2008 a) konnte durch Lupinenprotein eine Reduktion der Triglyceridkonzentration in den VLDL um über 50% beobachtet werden.

Neben Lupinenprotein führte auch die Aufnahme von Caseindiät mit Cysteinsupplement zu keinen triglyceridsenkenden Effekten. Entgegen dieser Beobachtung wurde in früheren Studien beschrieben, dass durch Cystein oder cysteinhaltige Substanzen triglyceridsenkende Wirkungen gezeigt wurden (Lin et al. 2004, Lin and Yin 2008). Allerdings wurden auch hier keine apoE knockout-Tiere verwendet. Die Mehrzahl der gemessenen Gene wurde durch die Cysteinsupplementation nicht in ihrer Expression beeinflusst. Lediglich die Expression der Fettsäuresynthese wurde durch die Supplementation von Cystein im Vergleich zu Casein um über 50% vermindert, die der Lipoproteinlipase um über 100% vermehrt. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Beobachtungen der eigenen Arbeitsgruppe, in denen Cystein ebenfalls triglyceridanabole Gene wie SREBP1c, FSS und SCD1 in ihrer Expression vermindern konnte (Bettzieche et al. 2008 c). In Studien an Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) wurde durch

Cysteingabe mit dem Trinkwasser ebenfalls eine verminderte Aktivität der FSS beobachtet (Lin et al. 2004). Dass im vorliegenden Fall neben der FSS-Abnahme außerdem das triglyceridkatabole Enzym Lipoproteinlipase in seiner Expression verstärkt wurde, deutet darauf hin, dass durch Cystein potentiell auch ein vermehrter Abbau der Triglyceride erreicht werden kann. Da im aktuellen Versuch durch Cystein jedoch keine verminderten Triglyceridkonzentrationen in Plasma oder Leber festgestellt wurden, wurde das synthetisierte Protein möglicherweise auf posttranskriptionalem Wege durch z.B. Phosphorylierung oder Ubiquitinierung weiter modifiziert. Wie bereits beschrieben, könnte auch das verwendete Versuchsmodell die Ursache für fehlende Effekte in Plasma und Leber durch Cysteinsupplementation sein.

Daher sollte aus der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie an apoE knockout-Mäusen keine qualitative Aussage zur Wirkung von Lupinenprotein und Cystein auf den Lipidstoffwechsel getroffen werden. Dieser Versuch sollte sich primär damit befassen, wie Lupinenprotein die Atherosklerose beeinflussen kann und dafür sind apoE knockout-Mäuse ein sehr gut geeignetes Versuchsmodell.

Um die Effekte von Lupinenprotein, an einem Modell zu untersuchen, dessen Lipidstoffwechsel dem des Menschen besser entspricht, wurde ein Versuch mit Schweinen durchgeführt. Vor allem das Lipoproteinprofil dieser Tiere ähnelt sehr dem des Menschen. Bei beiden Spezies befindet sich ein großer Anteil des Cholesterins in den LDL. Um unter diesen physiologischen Bedingungen die Wirkung der 2 Lupinenproteinsorten Boregine und Vitabor auf die Lipide zu untersuchen, wurde das Protein jeweils in eine übliche Standarddiät für Schweine integriert. Die 3-wöchige Fütterung von Lupinenprotein ergab keine Veränderung der Triglyceridkonzentrationen in Plasma und VLDL im Vergleich zu Casein. Die beiden eingesetzten Sorten zeigten dabei keine Unterschiede in der Wirkung. Die fehlende Wirkung des Lupinenproteins auf die Plasmalipide ließ vermuten, dass ohne bestehende Hyperlipidämie keine Effekte durch Lupinenprotein zu erzielen sind. Einige wenige Studien am Schwein zeigten, dass Lupinenprotein bei Fütterung mit cholesterinangereicherter Diät zu einer Senkung der Plasmalipide führen konnte (Martins et al. 2005).

Anhand der Ergebnisse aus den Tierstudien wurden in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Humanstudie deshalb Probanden rekrutiert, die moderat erhöhte Cholesterinkonzentration im Plasma hatten. Es sollte so eine möglichst große Wirkung von Lupinenprotein auf die Plasmalipide erreicht werden.

Im Gegensatz zu den tierexperimentellen Studien an Ratten konnte bei den Probanden durch die 6-wöchige Aufnahme von Lupinenprotein keine Senkung der Triglyceride in Plasma und VLDL beobachtet werden. Die Reduktion der Plasmatriglyceride nach 6-wöchiger Aufnahme von Casein ist auf die zufällig erhöhten Ausgangskonzentrationen in der Kontrollgruppe zurückzuführen (1,59 vs. 1,24 mmol/l in der Lupinenproteingruppe). Die Werte nach 6-wöchigem Riegelverzehr der beiden Gruppen unterschieden sich nicht, ebenso wie die Änderungen in beiden Gruppen über die Zeit. Da die Probanden in der vorliegenden Studie nach ihren Screening-Cholesterinkonzentrationen randomisiert auf die Versuchsgruppen aufgeteilt wurden, sind die voneinander abweichenden Ausgangskonzentrationen der Triglyceride nicht vorhersehbar und auch nicht zu beeinflussen gewesen. In vergleichbaren Studien mit Sojaprotein waren die zufälligen *baseline* Triglyceridkonzentrationen von Kontrolle (1,57 mmol/l) und Behandlung (1,28 mmol/l) ebenfalls in den Größenordnungen verschieden (Tonstad et al. 2002), wie im vorliegenden Fall.

Dass die Wirkung pflanzlicher Proteine auf die Triglyceride nicht immer einheitlich ist, zeigte sich ebenfalls in Studien mit Sojaprotein. Auch hier wurden sowohl verminderte (Anderson et al. 2005), als auch unveränderte Triglyceridkonzentration durch die Aufnahme von Sojaprotein beschrieben (Høie et al. 2004). Die Ursachen für diese inhomogenen Beobachtungen könnten darin liegen, dass Triglyceride im Allgemeinen dem Einfluss verschiedener Ernährungsfaktoren (z.B. Alkohol, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, raffinierte Kohlenhydrate; Yuan et al. 2007) und damit relativ starken Schwankungen unterliegen. Eine statistische Absicherung potentieller Effekte ist durch eine große Streuung der Daten meist schwierig. Auch in der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie ergaben sich für die Triglyceridkonzentrationen relativ große Standardabweichungen. Daher sollte insbesondere für Analysen der Triglyceridkonzentrationen ein möglichst großes Probandenkollektiv gewählt werden, um potentielle Effekte auch statistisch absichern zu können. Auch das Verabreichen von definierter Kost während Studien zum Triglyceridstoffwechsel wäre besonders bei kleinem Probandenkollektiv empfehlenswert. Zudem könnte die Aufnahme an Alkohol während der Studienteilnahme kontrolliert werden, um die Schwankungen der Triglyceridkonzentrationen zu minimieren. Außerdem könnten Studien an einem hypertriglyceridämischen Probandenkollektiv vermutlich deutlichere, und damit einfacher statistisch abzusichernde Effekte liefern. Zu beachten ist jedoch, dass unter allzu strengem Studiendesign die Compliance der Probanden möglicherweise gering ist. Selbst in der vorliegenden Humanstudie, in der keine strikten Veränderungen der Ernährungsgewohnheiten verlangt wurden, war die *drop-out* Rate mit insgesamt etwa 23% relativ hoch. Dies war u.a.

bedingt durch die Darreichung des Proteins in Form eines Proteinriegels. Für weitere Studien sollte das Protein in ein Lebensmittel eingebracht werden, welches eine bessere Akzeptanz bei den Probanden erfährt.

#### **4.4. Wirkungen des Lupinenproteins auf den Cholesterinstoffwechsel**

Neben hohen Triglyceridkonzentrationen sind hohe Konzentrationen an LDL-Cholesterin und niedrige Konzentrationen an HDL-Cholesterin beim Menschen als unabhängige Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose und KHK bekannt (Grundy et al. 1998, Gotto et al. 1998). Auch das Verhältnis von LDL- zu HDL-Cholesterin (LDL/HDL-Ratio) wird als bekannter Risikofaktor angesehen. Hohe Ratios gehen meist einher mit einem erhöhten Krankheitsrisiko (Greene et al. 2005). In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Proteinextrakte der Lupine Cholesterinkonzentrationen bzw. LDL/HDL-Ratios in hypercholesterinämischen Ratten (Sirtori et al. 2004, Bettzieche et al. 2008 b), Kaninchen (Marchesi et al. 2008) und Schweinen (Martins et al. 2005) signifikant gesenkt haben. In der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte von Lupinenprotein auf die Cholesterinkonzentrationen weiter charakterisiert werden, mögliche Ursachen der hypolipämischen Wirkungen aufgedeckt bzw. Diätkomponenten untersucht werden, die die Wirkung des Proteins beeinflussen können.

In den ersten beiden Versuchen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden an Ratten die Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Leber bzw. in den Lipoproteinen bestimmt. Im ersten Versuch konnte durch Lupinenprotein kein cholesterinsenkender Effekt in Plasma und Leber der Ratten beobachtet werden. Möglicherweise war die Versuchsdauer von 9 Tagen für einen Effekt auf die Cholesterinkonzentrationen zu kurz. Für die primäre Fragestellung jenes Versuches nach der Verdaulichkeit von Lupinenprotein war die Zeitspanne jedoch ausreichend.

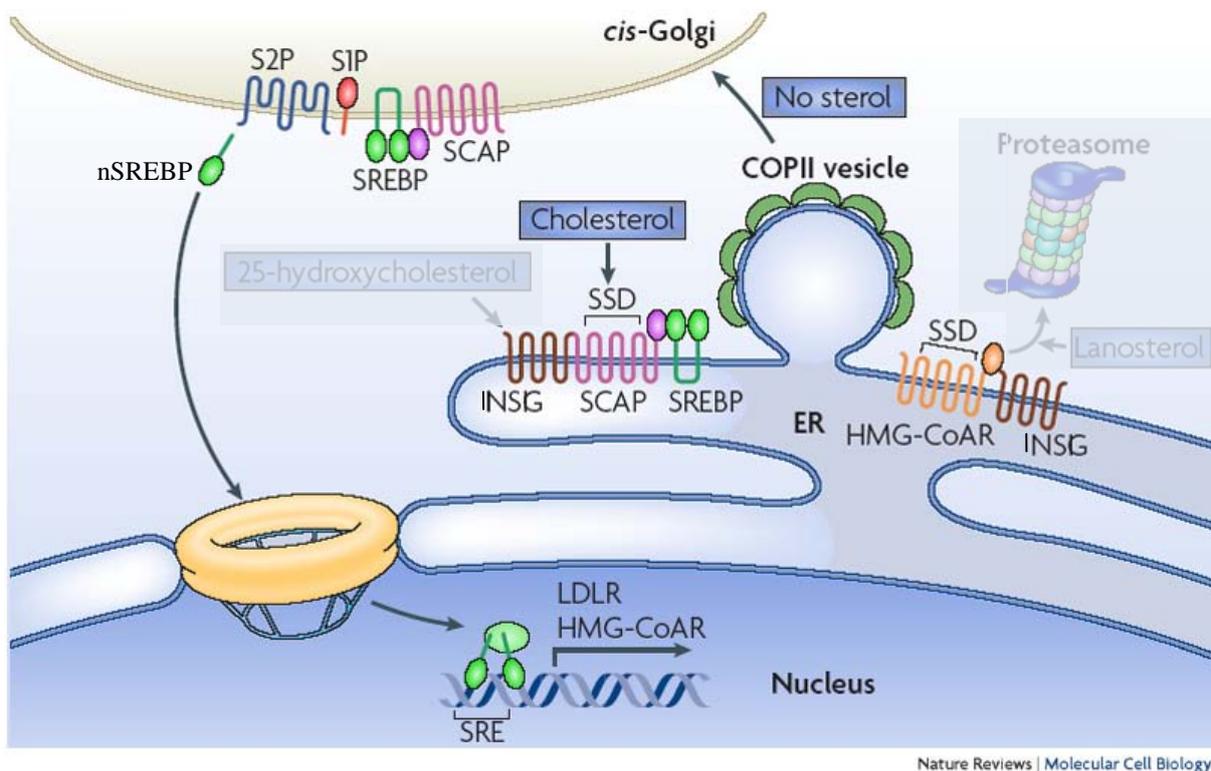
Im zweiten vorliegenden Versuch an Ratten wurde nach 13-tägiger Fütterung ein Effekt durch Lupinenprotein erzielt. So war bei den Tieren, die die kohlenhydratreiche Diät erhielten, in der Leber eine cholesterinsenkende Wirkung durch Lupinenprotein zu beobachten. Bei den Tieren, die fettreiche Diät aufnahmen, wurde in Plasma und Leber eine Cholesterinsenkung durch Lupinenprotein erzielt. Die beiden Proteinvarianten „Nativ“ bzw. „Erhitzt“ bewirkten in kohlenhydratreicher Diät ähnliche Effekte im Vergleich zu Casein, in fettreicher Diät hatte

das native Protein deutlicher Wirkungen, als das Erhitze. Die möglichen Ursachen der hypocholesterinämischen Wirkungen durch Lupinenprotein werden im späteren Verlauf dieses Kapitels an Hand von Genexpressionsmessungen diskutiert.

Neben den positiv zu bewertenden Cholesterinsenkungen in Plasma und Leber war auch die Cholesterinkonzentration in den HDL durch Aufnahme von nativem und erhitztem Lupinenprotein in der Fettdiät im Vergleich zu Casein vermindert. Diese Beobachtung ist jedoch ungünstig, denn hohe HDL-Cholesterinkonzentrationen schützen vor Atherosklerose und KHK (Sirtori et al. 2006). Auch in vergleichbaren Studien mit Sojaprotein, in denen Kaninchen 16% Protein in einer hyperlipämischen Diät erhielten, wurden HDL-Cholesterinsenkungen beobachtet (-41%, Castiglioni et al. 2003). In früheren Studien fremder Arbeitsgruppen wurde eine hohe Arginin/Lysin Ratio als Ursache für hypolipämische Wirkungen durch Sojaprotein diskutiert (Kritchevsky et al. 1982). Hohe Arginin/Lysin Ratios sind für Proteine von Leguminosen typisch. In Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe wurde in diesem Zusammenhang an Ratten untersucht, wie sich verschieden hohe Arginin bzw. Lysin-Supplementationen auf die Lipidkonzentrationen auswirken (Spielmann et al. 2008). In jener Studie wurde gezeigt, dass HDL-Cholesterinkonzentrationen bei Aufnahme von supplementiertem Arginin mit der Diät gesenkt wurden. Als Ursache wurde u.a. eine erhöhte Expression von SR-B1 beschrieben, und damit eine vermehrte Aufnahme von HDL-Partikeln in die Leber. Da in jenem Versuch steigende Konzentrationen an Arginin und Lysin supplementiert wurden, wurde durch die parallel dazu abnehmenden HDL-Cholesterinkonzentrationen geschlussfolgert, dass eine erhöhte Arginin:Lysin Ratio mit vermindertem HDL-Cholesterin einhergehen kann. Die Cholesterinkonzentration in LDL und VLDL wurde durch die verschiedenen Arginin/Lysin Ratios nicht beeinflusst. Für die eingesetzte Caseindiät im vorliegenden Versuch an Ratten betrug die Arginin:Lysin Ratio etwa 0,4, die der Lupinendiät etwa 2,2. Es konnte im Rahmen dieses Versuches demnach ebenfalls gezeigt werden, dass hohe Arginin-Lysin-Ratios des Proteins mit verringerten HDL-Cholesterinkonzentrationen einhergehen können. Für die Klärung dieses Zusammenhanges bedarf es weiterer Untersuchungen.

Bereits frühere Untersuchungen ließen erkennen, dass Veränderungen der Plasmacholesterinspiegel gleichzeitig mit veränderten mRNA-Expressionen von Genen der Cholesterinhomöostase verbunden sind (Sirtori et al. 2004, Bettzieche et al. 2008 b). Damit konnten Erkenntnisse über die Ursachen der lipidsenkenden Effekte gewonnen werden. Um die grundlegenden Mechanismen der hypocholesterinämischen Effekte durch Lupinenprotein im vorliegenden Versuch erklären zu können, wurden die Expressionen von SREBP 2, LDL-

Rezeptor und HMG-CoA-Reduktase sowie Cyp7A1, BSEP, LXR und FXR in der Leber gemessen. SREBP 2 ist wie SREBP 1c (siehe Kapitel 4.3.) ein entscheidender Transkriptionsfaktor für die Lipidhomöostase im Organismus (Brown & Goldstein, 1997, Horton et al. 1999, Edwards et al. 2000, Sakakura et al. 2001). Während SREBP 1c hauptsächlich die Fettsäurebiosynthese reguliert, ist SREBP 2 bedeutender Transkriptionsfaktor für den Cholesterinstoffwechsel. Ist in einer Zelle genügend Cholesterin vorhanden, kommt es durch Bindung des Sterols an der *sterol sensing domain* des SCAP zu dessen Konformationsänderung. Die dadurch mögliche Interaktion mit Insig verhindert die die Ausreifung des SREBPs zum nSREBP (Abb.17). In cholesterindefizienten Zellen unterbleibt die Insig-vermittelte Retention des SCAP-SREBP-Komplexes im ER. Es erfolgt der Transport zum Golgi-Apparat mit anschließender Ausreifung des nSREBPs durch die Proteasen S1 und S2. Das reife SREBP kann nun im Zellkern an *sterol response elements* von z.B. LDL-Rezeptor oder HMG-CoA-Reduktase binden und so den zellulären Cholesteringehalt beeinflussen.



**Abbildung 17:** Regulation der Cholesterinhomöostase durch SREBP. Bindet Cholesterin an der sterol sensing domain (SSD) des SREBP cleavage activating protein (SCAP) im Endoplasmatischen Retikulum (ER), so kann INSIG den SCAP-SREBP-Komplex im ER zurückhalten, der Transport des Komplexes über COPII-Vesikel zum Golgi-Apparat unterbleibt. Dieser Transport ist notwendig für die proteolytische Reifung des Transkriptionsfaktors SREBP mittels S1 und S2-Proteasen. Das reife, nukleäre (n)SREBP wandert dann in den Zellkern und kann an sterol response elements (SRE) von Genen wie LDL-Rezeptor oder HMG-CoA-Reduktase binden. (modifiziert nach Ikonen, 2008).

In dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuch an Ratten wurde die relative mRNA-Konzentration von LDL-Rezeptor, welcher cholesterinreiche Lipoproteine aus dem Blut in die Leber aufnimmt (Jeon et al. 2005) und HMG-CoA-Reduktase als Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese (Hampton et al. 1996) durch Lupinenprotein im Vergleich zu Casein nicht verändert. In einer früheren Studie wurde durch Lupinenprotein der Sorte Boregine ebenfalls keine veränderte Expression des LDL-Rezeptors sowie der HMG-CoA-Reduktase im Vergleich zu Casein gezeigt (Bettzieche et al. 2008 b). Der übergeordnete Transkriptionsfaktor der beiden Gene, SREBP 2, wurde im vorliegenden Versuch durch Aufnahme von nativem Lupinenprotein in kohlenhydratreicher Diät in seiner Expression erhöht. Da sowohl die *down stream* Gene des SREBP 2 als auch die Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Lipoproteinen keine Veränderungen durch Aufnahme von Lupinenprotein in kohlenhydratreicher Diät zeigten, erfolgten vermutlich posttranslationale Modifikationen, die die Menge an gebildetem Protein SREBP 2 weiter regulierten. Alle weiteren Versuchsgruppen unterschieden sich nicht in der Expression des SREBP 2. Zusammenfassend konnten die verminderten Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Leber durch die Aufnahme von Lupinenprotein nicht durch SREBP 2-assoziierte veränderte Cholesterinaufnahme in die Leberzellen via LDL-Rezeptor bzw. eine veränderte Eigensynthese über die HMG-CoA-Reduktase erklärt werden.

Eine weitere mögliche Ursache für die im vorliegenden Versuch gezeigten hypocholesterinämischen Effekte durch Lupinenprotein könnte eine vermehrte Ausscheidung des Sterols mit der Gallenflüssigkeit sein. Frühere Studien mit Hydrolysaten von Sojaprotein zeigten im Vergleich zu Caseinhydrolysaten bei Ratten eine vermehrte Sterolausscheidung über den Kot (Nagaoka et al. 1997). In späteren Studien jener Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass durch Sojaproteinhydrolysat die *micellar cholesterol solubility* im Jejunum vermindert wurde (Nagaoka et al. 1999). Außerdem wurde nachgewiesen, dass neben der verminderten jejunalen Aufnahme auch die ileale Reabsorption der Gallensalze vermindert wurde. Die Peptide des Sojaproteins hatten dabei eine höher Bindungsaffinität zu den Gallensalzen, als Casein und reduzierten so deren Wiederaufnahme via enterohepatischen Kreislauf (Nagaoka et al. 1999, Higaki et al. 2006). Die Mengen an Gallensalzen, die über den enterohepatischen Kreislauf zur Leber zurück kehren, regulieren die Synthese des Schlüsselenzyms der Gallensalzbildung, der Cholesterin-7-alpha-Hydroxylase (Cyp7A1, Chen et al. 2001). Die relative mRNA-Konzentration der Cyp7A1 wurde im Rahmen der vorliegenden Studie ebenfalls untersucht. Es wurde bei den Tieren, die die fettreiche Diät erhielten, durch Lupinenprotein eine Steigerung der Expression der Cyp7A1 gezeigt, bei den Tieren, die die

kohlenhydratreiche Diät aufnahmen, hingegen eine Abnahme. Es ergab sich jedoch nur eine mögliche Tendenz in der Interaktion zwischen Protein und Diät ( $P=0,134$ ). Ob daher die Aufnahme von Lupinenprotein in fettreicher Diät durch eine verminderte Reabsorption von Gallensalzen aus dem Darm eine Steigerung der Gallensalzsynthese in der Leber verursacht hat, kann nur vermutet werden. Die relativen mRNA-Konzentrationen des FXR, welcher die Cyp7A1-Transkription hemmt bzw. die des LXR, welcher die Cyp7A1-Transkription stimuliert (Chiang et al. 2001), blieben im vorliegenden Versuch ebenfalls ohne signifikante Unterschiede zwischen den 6 Gruppen. Neben dem Schlüsselenzym der Gallensalzsynthese wurde außerdem die Expression der *bile salt export pump* (BSEP) gemessen, welche die konjugierten Gallensalze ATP-abhängig aus der Leber in die Gallenkanälchen exportiert (Alrefai et al. 2007). Hierbei zeigte sich jedoch durch Lupinenprotein kein Einfluss im Vergleich zu Casein. In früheren Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass die Ausscheidung des Cholesterins mittels Gallensäuren durch Lupinenprotein beeinflusst werden kann (Bettzieche et al. 2008 b). Dass eine verminderte Reabsorption des Cholesterins in Form von Gallensalzen die Ursache für verminderte Blutcholesterinkonzentrationen sein kann, wurde ebenfalls bereits beschrieben (Iwami et al. 1986, Nagaoka et al. 1999). Dennoch können anhand der gewonnenen Daten der vorliegenden Studie keine eindeutigen Aussagen für eine vermehrte Ausscheidung des Cholesterins mittels Gallensäuren getroffen werden. Die grundlegenden Mechanismen der hypocholesterinämischen Wirkung von Lupinenprotein konnte im Rahmen dieser Studie demnach nicht einheitlich aufgeklärt werden. Es bedarf weiterer Untersuchungen, die sich u.a. mit der Wirkung von Proteinkomponenten auf die Sterolexkretion in Form von Gallensalzen befassen könnten. Möglicherweise sollte für die Analysen von grundlegenden Mechanismen auch eine etwas längere Versuchsdauer in Betracht gezogen werden.

Neben der Untersuchung der grundlegenden Mechanismen der hypocholesterinämischen Wirkung von Lupinenprotein sollte untersucht werden, ob sich die Wirkung des Proteins in Abhängigkeit von Diätkomponenten unterscheidet. Frühere Studien der eigenen Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass unterschiedliche Wirkungen von Lupinenprotein unter normo- oder hypercholesterinämischer Diät zu beobachten sind (Bettzieche et al. 2008 b). Im vorliegenden Versuch zeigte sich ebenfalls, dass Lupinenprotein in Abhängigkeit von Diätkomponenten unterschiedlich wirkt. So wurden bei Aufnahme des Proteins in fettreicher Diät signifikante Senkungen der Cholesterinkonzentrationen in Plasma und Leber gezeigt, bei Aufnahme in der kohlenhydratreichen Diät hingegen nur in der Leber. Insgesamt scheint die Aufnahme einer kohlenhydratreichen Diät die Wirkung von Lupinenprotein im Blut nicht zu

begünstigen. Möglicherweise liegt in der oben beschriebenen Hypothese zur Beeinflussung des Gallensalzmetabolismus die Ursache, warum Lupinenprotein besser unter fettreicher Diät (mit 30% SFA) wirkt, als unter kohlenhydratreicher (mit 8% SFA). Je mehr Fett mit der Nahrung aufgenommen wird, umso mehr wird die Gallensalzproduktion und -sezernierung angeregt (Friedman et al. 1980). Umso mehr Gallensalze in den Darm sezerniert werden, umso mehr könnten durch Peptide des Lupinenproteins in ihrer Reabsorption gehemmt werden und so hypolipämische Effekte bedingen. Möglicherweise könnte über diesen Regulationsweg der Gallensalzabsorptionshemmung auch ein Zusammenhang bestehen in der in früheren Versuchen beschriebenen erhöhten LDL-Rezeptor Expression durch Lupinenprotein (Sirtori et al. 2004, Bettzieche et al. 2008 b). Für eine Malabsorption von Gallensalzen wurde eine Aktivierung des LDL-Rezeptors beschrieben (Färkkilä et al. 1990). Die veränderte Expression des LDL-Rezeptors durch Lupinenprotein könnte somit nur ein sekundärer Effekt sein. Zukünftige Studien sollten sich damit befassen, wie die Reabsorption der Gallensalze aus dem Darm durch Lupinenprotein beeinflusst wird und ob dies mit einer veränderten Ausscheidung des Cholesterins mit dem Kot einhergeht.

Es wurde außerdem in der vorliegenden Studie an Ratten gezeigt, dass die beiden Diätvarianten als solche einen Einfluss auf die Lipidkonzentrationen in Plasma, Lipoproteinen und Leber haben. Bemerkenswert war u.a., dass die Cholesterinkonzentrationen bei allen Tieren, die die fettreiche Diät erhielten, in Plasma, VLDL und LDL signifikant niedriger waren, als bei den Tieren, die die kohlenhydratreiche Kost aufnahmen. Die Konzentrationen in Plasma, VLDL und LDL der Tiere, die Casein in fettreicher Diät erhielten, entsprachen dabei denen früherer Studien mit Casein und ähnlicher hyperlipämischer Fütterung (Spady et al. 1992, Bettzieche et al. 2008 b). Die Konzentrationen bei den Tieren, die Casein in kohlenhydratreicher Diät (20% Fruktose, 20% Glukose, 20% Stärke) aufnahmen, waren höher. Bisherige Studien zeigen, dass eine *high fructose* Diät zu erhöhten Cholesterinkonzentrationen im Vergleich zu Standarddiät führen kann (Huang et al. 2004, Abdullah et al. 2009). Auch der Cholesteringehalt in den VLDL war bei Aufnahme der kohlenhydratreichen Diät höher (im Mittel etwa 85%), als bei Aufnahme der Fettdiät (etwa 75%). Eine mögliche Ursache hierfür könnte in der Wirkung der eingesetzten Fruktose liegen. Es ist bekannt, dass eine *high fructose* Diät zu erhöhten Insulinspiegeln im Blut führen kann (Huang et al. 2004, Stanhope et al. 2008). Hohe Insulinspiegel bedingen in der Leber sowohl eine vermehrte Bildung von Triglyceriden, als auch eine vermehrte Sekretion triglyceridreicher VLDL (Zavaroni et al. 1982, Silbernagel et al. 1998). Da jedoch auch ein gewisser Anteil an Cholesterin in den VLDL enthalten ist, könnte sich über eine insgesamt

gesteigerte Menge an sezernierten VLDL-Partikeln auch eine erhöhte Menge an Cholesterin in dieser Fraktion ergeben. Allerdings basieren Untersuchungen mit einer *high fructose* Diät zumeist auf 60% Fruktosegehalt als alleinige Kohlenhydratquelle in der Diät (Huang et al. 2004, Kelley et al. 2003). Ob auch im vorliegenden Fall durch die 13-tägige Aufnahme der 20%-igen fruktosehaltigen Diät eine veränderte Insulinsekretion erzielt wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Dass bei allen Tieren der Anteil an Cholesterin in den VLDL mit 75% bzw. 85% überhaupt so hoch war, lag an der Zulage an Cholesterin und Choleat in der verabreichten Diät. Frühere Studien an Ratten zeigten deutlich, dass durch Gabe von Cholesterin und Choleat mit der Diät eine Änderung der Cholesterinverteilung in den Lipoproteinen erzielt wird. Nach Aufnahme einer Kontrolldiät waren bei Ratten 5% des Gesamtcholesterins in den VLDL, 16% in den LDL und 79% in den HDL (Spady et al. 1992). Nach Zulage von 2% Cholesterin und 0,5% Choleat zur Kontrolldiät war die Verteilung hingegen zu 75% in den VLDL, 14% in den LDL und 11% in den HDL verschoben.

Auch die Höhe der Expression von Genen des Cholesterinstoffwechsels unterschied sich im vorliegenden Versuch zwischen den beiden Diätvarianten. So war die Expression von LDL-Rezeptor und HMG-CoA-Reduktase durch Aufnahme der fettreichen Diät bei allen Tieren geringer, als durch Aufnahme der kohlenhydratreichen Diät. Es ist in früheren Studien bereits gezeigt worden, dass durch die vermehrte Aufnahme von gesättigtem Fett (Nicolosi et al. 1997) und Cholesterin (Goldstein et al. 2006) über negative Rückkopplung die körpereigene Cholesterinsynthese vermindert wird. In einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe (Bettzieche et al. 2008 b) wurde durch eine hyperlipämische Diät im Vergleich zu normolipämischer Kost die Expression der Gene LDL-Rezeptor und HMG-CoA-Reduktase ebenfalls vermindert.

Obwohl Lupinenprotein im Rattenmodell eine deutliche cholesterinsenkende Wirkung hatte, zeigte sich in apoE knockout-Mäusen keine Veränderungen der Cholesterinkonzentrationen durch Lupinenprotein oder Casein mit Cysteinsupplement im Vergleich zu Casein ohne Supplement. Auch der LDL-Rezeptor unterschied sich nicht in seiner Expression zwischen den 3 Gruppen. Da im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (Sirtori et al. 2004) weder die Cholesterinkonzentration noch die LDL-Rezeptor-Expression durch Lupinenprotein verändert war, wurde auf die Expressionsanalyse weiterer Gene des Cholesterinstoffwechsels verzichtet. Es wurde außerdem bereits unter 4.3. beschrieben, dass die Untersuchung des Lipidstoffwechsels an apoE knockout-Tieren möglicherweise keine eindeutigen Ergebnisse liefern kann. Auch Sojaproteine zeigen in apoE knockout-Mäusen keine cholesterinsenkende Wirkungen (Adams et al. 2002, Nagarian et al. 2008), in klassischen Labortieren hingegen schon (Review nach Sirtori et al. 2008). Auch durch Lupinenprotein (Sirtori et al. 2004,

Martins et al. 2005, Viveros et al. 2007, Bettzieche et al. 2008 b, Marchesi et al. 2008) oder Cystein bzw. cysteinhaltigen Substanzen (Lin et al. 2004, Lin and Yin 2008) konnten in klassischen Tiermodellen ohne Gen-knockout hypocholesterinämische Wirkungen gezeigt werden. An apoE knockout-Mäusen fehlen bislang vergleichbare Studien mit Lupinenprotein oder Cystein. Durch das Ausschalten von apoE sind einige Parameter des Cholesterinstoffwechsels unphysiologisch verändert (Plasmacholesterin +400%, HDL-Cholesterin -80%, hepatische HMG-CoA-Reduktase-Aktivität -50%, hepatische Cholesterinkonzentration +30%; Moghadasian et al. 2001). In Versuchen an Ratten wurde gezeigt, dass unterschiedliche Cholesterinspiegel im Blut einen entscheidenden Einfluss auf die Wirksamkeit von Lupinenprotein haben (Bettzieche et al. 2008 a). Durch die exzessiv veränderten Ausgangskonzentrationen an Cholesterin in apoE knockout-Mäusen konnte das Protein möglicherweise nicht in die Mechanismen eingreifen, an denen unter physiologischen Bedingungen eine Interaktion möglich gewesen wäre.

Im Versuch an Schweinen, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, sollte untersucht werden, ob die hypocholesterinämischen Effekte durch Lupinenprotein aus Rattenversuchen auch an einer Spezies zu beobachten sind, die mit dem Mensch noch besser vergleichbar sind, als Nager. Da es an Schweinen bislang kaum Untersuchungen mit Lupinenprotein gibt, in denen wirkungsfördernde Diätbestandteile definiert wurden, wurde im vorliegenden Versuch bewusst eine übliche normolipämische Standarddiät gefüttert. Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen ist daher als sehr hoch einzuschätzen. Nach der 21-tägigen Fütterung der beiden Lupinenproteinsorten Boregine und Vitabor konnten keine signifikanten Unterschiede der Cholesterinkonzentrationen in Plasma, VLDL, LDL und HDL festgestellt werden. Die gemessenen Plasmacholesterinkonzentrationen entsprachen dabei denen aus anderen Studien unter normolipämischer Diät ( $2,64 \pm 0,08$  mmol/l; Martins et al. 2004). Lediglich die Änderung des HDL-Cholesterins über die Zeit war im vorliegenden Versuch zwischen den 3 Gruppen verschieden. So wurde das HDL-Cholesterin um etwa 50% durch Fütterung beider Lupinenproteinsorten angehoben, in der Caseingruppe jedoch ebenfalls um etwa 70%. Die beiden eingesetzten Sorten Boregine und Vitabor, die in einem früheren Versuch der eigenen Arbeitsgruppe die stärkste lipidsenkende Wirkung hatten (Bettzieche et al. 2008 b), unterschieden sich nicht in ihrer Wirksamkeit. Einige wenige Studien mit Lupinenprotein an Schweinen zeigten bei hyperlipämischer Fütterung cholesterinsenkende Effekte in Plasma und LDL (Martins et al. 2005). Jedoch wurden hier Lupinensamen eingesetzt, die im Gegensatz zu Proteinisolaten u.a. auch Ballaststoffe

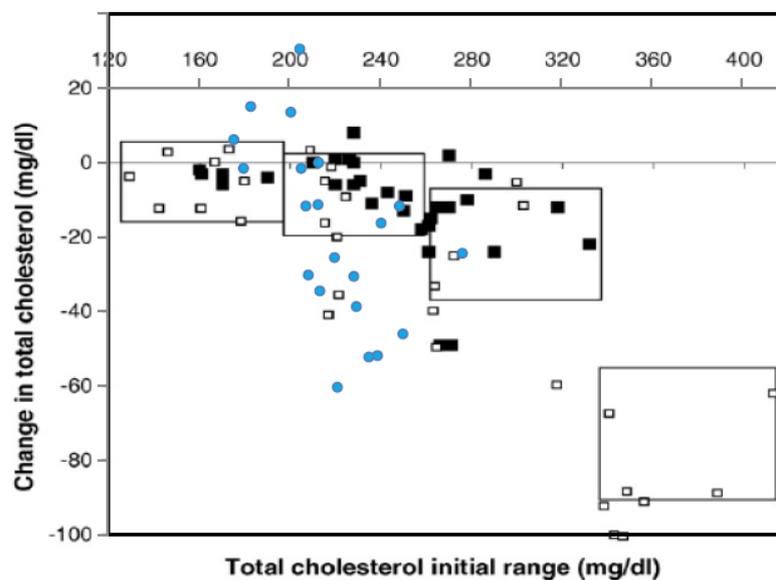
enthalten. Für Ballaststoffe selbst wurden bereits cholesterinsenkende Eigenschaften beschrieben (Salas-Salvadó et al. 2006). In zukünftigen Versuchen am Schwein könnte untersucht werden, ob auch ballaststofffreies Lupinenproteinisolat unter hyperlipämischer Diät eine cholesterinsenkende Wirkung erzielen kann.

Nach umfassenden Vorstudien am Tier sollte erstmals getestet werden, ob die beobachteten hypocholesterinämischen Effekte auch in einer Humanstudie zu beobachten sind. Aufgrund der Ergebnisse aus den bereits beschriebenen Versuchen an Ratten und Schweinen wurden für die Studie Probanden gewählt, die moderat erhöhte Cholesterinkonzentrationen von 5,7 – 7,9 mmol/l im Plasma hatten. Probanden mit exzessiv erhöhten Werten wurden, mit Empfehlung zur medikamentösen Einstellung ihrer Cholesterinkonzentrationen durch den Hausarzt, nicht in die Studie aufgenommen.

Durch die 6-wöchige Intervention wurde durch Lupinenprotein die Gesamtcholesterinkonzentration im Plasma der Probanden um 9% gesenkt. Dies wurde bedingt durch eine Reduktion des „ungünstigen“ LDL-Cholesterins um ebenfalls 9%. Probanden, die 6 Wochen Casein aufnahmen, hatten ebenfalls verminderte Gesamtcholesterinkonzentrationen (-8%), jedoch hier durch die Reduktion des „günstigen“ HDL (-9%). Die LDL/HDL-Ratio als Risikofaktor für KHK konnte durch Lupinenprotein während der 6-wöchigen Intervention gesenkt werden, durch Caseinaufnahme wurde sie hingegen erhöht. Wenn man das Gesamtkollektiv nach Männern und Frauen aufteilte, waren die Effekte von Lupinenprotein bei den Frauen ähnlich, wie im Gesamtkollektiv. Bei den Männern wurde nur durch Lupinenprotein die Gesamtcholesterinkonzentration gesenkt, durch Casein zeigte sich keine Beeinflussung.

Da es am Menschen bis dato keine vergleichbaren Studien mit Lupinenprotein gibt, konnte sich nur an Daten orientiert werden, die in Humanstudien mit Sojaprotein gezeigt wurden. In einer Meta-Analyse aus 31 Studien (Anderson et al. 1995) wurde für den Konsum von im Mittel 47 g Sojaprotein / d beschrieben, dass die Gesamtcholesterinkonzentration durchschnittlich um 9,3% gesenkt werden konnte, die LDL-Cholesterinkonzentration im Mittel um 12,9%. In einer neueren Meta-Analyse nach Sirtori et al. (2007) wurden alle Publikationen erfasst, die nach 1995 zur Wirkung von Sojaprotein auf die Cholesterinkonzentrationen durchgeführt wurden. Hier ergab sich im Gesamtcholesterin eine Senkung um 4%, im LDL-Cholesterin um 4,5%. Allerdings wurden in jener Studie von Sirtori Probanden mit exzessiv hohen Ausgangskonzentrationen an Gesamtcholesterin nicht in der Auswertung berücksichtigt. Die im Rahmen der vorliegenden Humanstudie beschriebenen Senkungen der Cholesterinkonzentrationen durch die Aufnahme von 35 g Lupinenprotein / d

(siehe Abb.18, blaue Kreise) lagen demnach in ähnlichen Größenordnungen wie die, die für die Aufnahme von Sojaprotein beschrieben wurden (schwarze und weiße Kästchen, Meta-Analysen nach Anderson et al. 1995 und Sirtori et al. 2007; aus Sirtori et al. 2009). Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass jeder Meta-Analyse etwa 30 Einzelstudien zugrunde liegen. Deren Auswertung hat daher eine wesentlich höhere Aussagekraft. In beiden Meta-Analysen wurde außerdem gezeigt, dass die Ausgangskonzentration der Probanden einen entscheidenden Einfluss auf die Höhe der lipidsenkenden Wirkung durch Sojaprotein hatte. So wurden bei Probanden mit baseline Gesamtcholesterinkonzentrationen von 3,31-6,59 mmol/l LDL-Cholesterinsenkungen von 7% im Vergleich zu tierischem Protein erreicht, 10% Senkung des LDL-Cholesterins bei baseline Gesamtcholesterinkonzentrationen von 6,70-8,61 mmol/l und 24% Senkung des LDL-Cholesterins bei über 8,61 mmol/l Basalgesamtcholesterin. Diese Abhängigkeit konnte in der vorliegenden Studie mit Lupinenprotein ebenfalls bestätigt werden (Abb.18). Die Senkung der Cholesterinkonzentration durch Lupinenprotein war bei den Probanden signifikant größer, die höhere Ausgangskonzentrationen hatten ( $P=0,006$ ).



**Abbildung 18:** Ausgangskonzentrationen und Nettoänderungen von Cholesterinkonzentrationen nach Konsum von Sojadiäten (Studien anderer Autoren; weiße und schwarze Kästchen) oder Lupinenproteindiät (im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Humanstudie; blaue Kreise). Die weißen Kästchen entsprechen den Auswertungen der Meta-Analyse nach Anderson et al. (1995), die schwarzen Kästchen den Auswertungen einer Meta-Analyse nach Sirtori et al. (2007). Die Rechtecke symbolisieren das „Anderson-Normogramm“ (Anderson et al. 1995), in denen jeweils Ausgangscholesterinkonzentrationen und das 95% Konfidenzintervall der Nettoänderung des jeweiligen Quartils dargestellt sind (Sirtori et al. 2009).

Als Ursache der lipidsenkenden Eigenschaften von Soja- oder Lupinenprotein werden am Tiermodell Veränderungen am LDL-Rezeptor beschrieben (Soja: Shukla et al. 2007, Cho et al. 2008; Lupine: Sirtori et al. 2004, Martins et al. 2005). Um zu untersuchen, ob Lupinenprotein auch am Menschen diese Mechanismen regulieren kann, wurde die relative mRNA-Konzentration von LDL-Rezeptor und dem übergeordneten Transkriptionsfaktor SREBP 2 in den mononukleären Blutzellen der Probanden gemessen. Es zeigte sich in der vorliegenden Studie für das Gesamtkollektiv, dass durch 6-wöchige Aufnahme von 35 g Lupinenprotein die Expression beider Gene signifikant gesteigert wurde. In Studien wurde sowohl am Tier als auch am Menschen bereits gezeigt, dass Gene des Cholesterinstoffwechsels in mononukleären Zellen gleichermaßen reguliert werden, wie in der Leber (Powel et al. 1994, Aggarwal et al. 2006, Mutungi et al. 2007). Man konnte demnach davon ausgehen, dass in der vorliegenden Studie auch die Expression von LDL-Rezeptor und SREBP 2 in der Leber durch Lupinenprotein beeinflusst wurde und somit möglicherweise zu einer vermehrten Aufnahme der LDL-Partikel aus dem Plasma in die Leber führte. Warum auch durch die Aufnahme von Casein die LDL-Rezeptor Expression erhöht wurde, konnte nicht abschließend geklärt werden. Die SREBP 2 Expression als auch die LDL-Cholesterinkonzentrationen wurden durch die Aufnahme von Casein nicht verändert.

Neben veränderten Genexpressionen als Ursache der hypocholesterinämischen Wirkungen durch Lupinenprotein gibt es weitere Größen, die Einfluss auf die Cholesterinkonzentrationen haben können. So wird u.a. Homocystein als Einfluss- und Risikofaktor für Dyslipidämien und KHK diskutiert (Welch et al. 1998). Homocystein entsteht bei der Verstoffwechslung der Aminosäure Methionin. Für Methionin wurden nach 6-wöchiger Aufnahme des Lupinenproteins, welches im Vergleich zu Casein sehr geringe Methioninkonzentrationen aufweist, signifikant niedrigere Plasmakonzentrationen festgestellt. In der Caseingruppe waren sie unverändert. Man hätte schlussfolgern können, dass die verminderten Methioninkonzentrationen durch die Aufnahme von Lupinenprotein auch zu einer verminderten Synthese des hypercholesterinämisch wirkenden Homocystein führen. In den Konzentrationen an Homocystein zeigten sich jedoch in der vorliegenden Studie keine Unterschiede durch die Aufnahme der beiden Proteine.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Untersuchungen durch Lupinenprotein erstmals auch am Menschen die hypolipämische Wirkung auf Gesamtcholesterin und LDL-Cholesterin beschrieben werden. Das Ausmaß der Effekte entsprach dabei etwa denen, die bereits in umfassenden Studien mit Sojaprotein gezeigt wurden. Die zugrundeliegenden Mechanismen für die cholesterinsenkenden Effekte könnten möglicherweise in einer vermehrten Aufnahme

über den LDL-Rezeptor liegen. Dennoch bedarf es dazu noch weitreichender zukünftiger Untersuchungen. Da die Aufnahme von 35 g Lupinenprotein / d relativ unrealistisch für die alltägliche Ernährung ist, sollte zukünftig weiter untersucht werden, ab welcher minimal aufzunehmenden Proteinmenge eine hypolipämische Wirkungen zu erwarten ist. Auch sollten die potentiell aktiven Peptide oder Aminosäuren des Proteins gesucht werden. Denn je gezielter bestimmte Komponenten definiert werden können, umso effektiver könnten diese in der humanen Ernährung eingesetzt werden. Trotz der positiven Effekte auf die Cholesterinkonzentrationen, die durch Lupinenprotein für das Gesamtkollektiv im Rahmen dieser Studie gezeigt wurden, sind auch einige kritische Aspekte des Versuchsablaufes zu diskutieren. Die Compliance der Studie war zum Beispiel mit etwa 77% relativ gering. Dadurch ergaben sich v.a. für die Teilkollektive Männer und Frauen in den jeweiligen Gruppen sehr kleine n-Zahlen. Es sollte daher unbedingt an einem größeren Probandenkollektiv untersucht werden, ob Lupinenprotein bei Männern und Frauen unterschiedlich wirkt. Auch sollte betrachtet werden, dass in die vorliegende Studie Frauen im Alter von 21-70 aufgenommen wurden. Die individuell gebildete Menge an Sexualhormonen der Frauen war daher möglicherweise sehr unterschiedlich. Dass Östrogene und Gestagene einen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel haben, wurde bereits gezeigt (Schwandt et al. 2006). Um einen hormonellen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel möglichst auszuschließen, wurden in vergleichbaren Untersuchungen mit Sojaprotein nur postmenopausale Frauen rekrutiert (Lichtenstein et al. 2002). Um den im Rahmen dieser Studie gezeigten geschlechterspezifischen Effekt von Lupinenprotein weiter zu untersuchen, könnten zukünftige Studien ebenfalls mit postmenopausalen Frauen durchgeführt werden. Hauptkriterium muss jedoch auch bei einem definierteren Probandenkollektiv ein großer Probenumfang sein. Nur so können Effekte trotz möglicher *drop outs* statistisch nachgewiesen werden.

Grund für die hohe *drop out* Rate im vorliegenden Versuch war die teilweise schlechte Akzeptanz des Proteinriegels. Insbesondere die Konsistenz des Riegels wurde von den Teilnehmern beanstandet und als hauptsächlicher Grund für einen Studienabbruch angegeben. Außerdem wurden Unverträglichkeiten als Grund für das Ausscheiden aus der Studie angeführt. Eine allergische Reaktion auf Lupinenprotein wurde als Nebenwirkung zwar nicht beschrieben, dennoch musste eine Probandin aufgrund gastrointestinaler Probleme die Studie abbrechen. Möglicherweise wurde die Empfehlung nicht befolgt, den Riegel mit ausreichend Flüssigkeit zu konsumieren. Für weitere Studien sollte das Protein in ein Lebensmittel eingebracht werden, welches eine bessere Akzeptanz bei den Probanden erfährt. In Studien

mit Sojaprotein wurden u.a. Verabreichungsformen in Joghurt oder Milch gewählt (Mensink et al. 2002, Gardner et al. 2007). Zu beachten ist hierbei jedoch, dass aufgrund der begrenzten Haltbarkeit solcher Produkte der Studienaufwand für Probanden und Studienpersonal möglicherweise höher ist.

#### **4.5. Einfluss des Lupinenproteins auf die Atherogenese**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Lupinenprotein neben der Beeinflussung atherogener Risikofaktoren auch eine direkte Wirkung auf den Krankheitsverlauf der Atherosklerose ausüben kann. Atherosklerose ist eine chronisch progrediente Veränderung der Arterienwand, die von der Gefäßintima ausgeht. Durch fibröse Einlagerungen in der Intima kommt es zur Plaquebildung und damit zur Einengung des Gefäßlumens. Stenosen, Thrombusbildungen oder Blutungen können lebensbedrohliche Folgen sein. Die auslösenden Mechanismen der Plaquebildung sind bislang noch nicht endgültig aufgeklärt. Bekannt ist jedoch, dass die endotheliale Dysfunktion eine entscheidende Rolle in der Krankheitsentstehung spielt. Endotheliale Dysfunktion bedingt an Gefäßwänden u.a. eine erhöhte Permeabilität der Endothelzellen, z.B. für LDL-Partikel aus dem Lumen. In die Intima eingewanderte LDL fördern die Bildung von endothelialen Adhäsionsmolekülen und Chemokinen. Durch diese Substanzen werden Leukozyten und Monozyten aus dem Blut angelockt, wandern in den subendothelialen Raum der Gefäßwand ein und differenzieren zu Makrophagen. Diese Makrophagen setzen nun u.a. zelltoxische reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei. Die durch den Einfluss von ROS entstehenden oxidierten LDL können nicht mehr apoB100-abhängig via LDL-Rezeptor in Zellen aufgenommen werden, sondern binden nun vornehmlich über Scavenger-Rezeptoren von Makrophagen. Durch Aufnahme der oxidierten LDL durch die Makrophagen differenzieren diese zu Schaumzellen. Werden diese Schaumzellen nekrotisch, lagern sich die gespeicherten Lipide extrazellulär als charakteristischer Lipidkern in der Intima ab. Wachstumsfaktoren, die beim Zerfall der Schaumzellen freigesetzt werden, stimulieren eine Entzündungsreaktion und die Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Gefäßmedia. Die Gefäßmuskelzellen ändern ihre Funktion und beginnen zu proliferieren. Dabei bilden sie eine kollagenreiche Bindegewebmatrix mit Elastin sowie Proteoglykanen und sezernieren Zytokine und Chemokine, die zu einem weiteren Fortschreiten der Läsionsbildung führen. Die zunehmende Anhäufung von Lipiden und Kollagen im subendothelialen Raum führt zu einer immer größer werdenden Lumeneinengung des Gefäßes (Silbernagel et al. 1998, Kreuzer et al. 2003). Ob

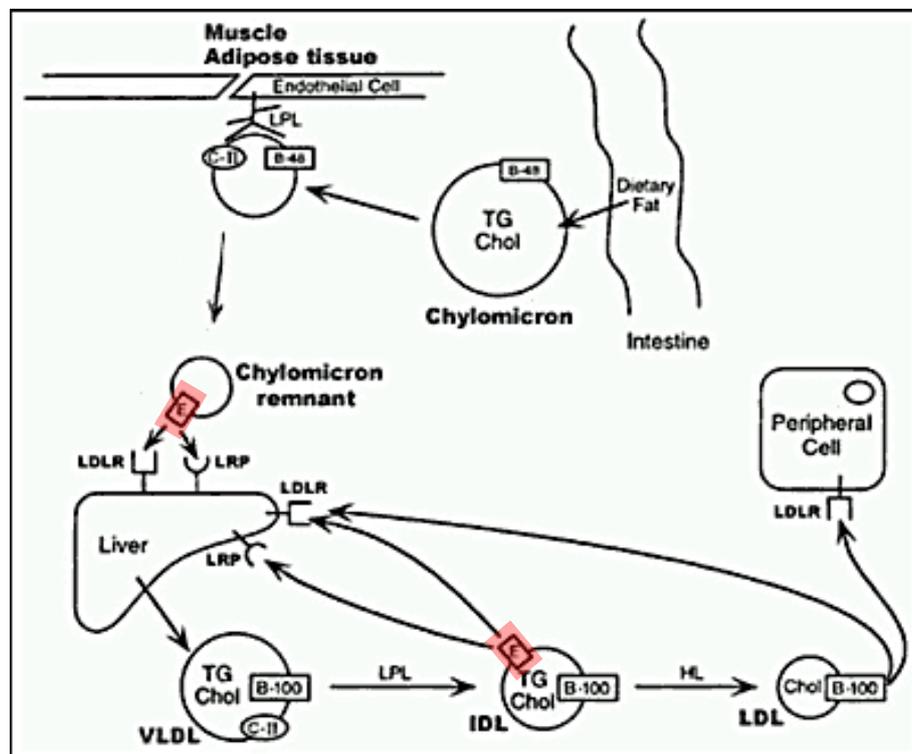
ein Plaque während seiner Entwicklung stabil bleibt oder ob er ruptiert, hängt von seiner Zusammensetzung ab. Die von den Gefäßmuskelzellen gebildete fibröse Kappe kann sich unter dem Einfluss von Makrophagen, die Matrixmetalloproteinasen und proteolytische Enzyme bilden, verdünnen. Stabile Plaques haben eine dicke Kappe und einen kleinen Lipidkern, vulnerable Läsionen hingegen eine dünne Kappe mit einem großen Lipidkern. Ein ruptierter Plaque kann zur Thrombusbildung und damit zur Einengung des Restlumens des Gefäßes führen, was z.B. wiederum in einem Herzinfarkt oder Hirnschlag resultieren könnte.

Es existieren beim Menschen genetische Dispositionen, die die Entstehung der Atherosklerose fördern. So führen bei familiärer Hypercholesterinämie (FH, auch Hyperlipoproteinämie Typ II) Mutationen im Gen des LDL-Rezeptors zu einer reduzierten, vornehmlich hepatischen Aufnahme von apoB100 und/oder apoE enthaltenden cholesterinreichen Lipoproteinen aus dem Plasma. Die betroffenen Lipoproteine akkumulieren im Blut und fördern schließlich die Entstehung von Atherosklerose und Koronarer Herzkrankheit. Mit einer Häufigkeit von etwa 1:500 (Heterozygote) zählt die FH zu den häufigsten angeborenen Stoffwechselerkrankungen des Menschen. Bei der Remnant-Hyperlipidämie (Hyperlipoproteinämie Typ III), ebenfalls eine genetisch bedingte Stoffwechselerkrankung, führt abnormes apoE zu unvollständigem Abbau der Chylomikronenremnants und der IDL, sodass deren Plasmakonzentrationen ansteigen. Folgen sind ein massiv erhöhtes Atheroskleroserisiko. Außerdem sind verschiedene, sog. sekundäre Dyslipoproteinämien bekannt, die ebenfalls ein deutlich verändertes Lipidprofil im Blut aufweisen.

Aufgrund der großen Häufigkeit dieser genetischen Dispositionen ist es von hoher Relevanz, die Atherosklerose unter genau diesen Bedingungen zu untersuchen. Mit Hilfe von speziellen knockout-Modellen lassen sich die Krankheitsbilder in genetisch definierten Kleintiermodellen nachahmen und auf Regulationsmechanismen zur Verbesserung der Symptome untersuchen. So können z.B. die Gene des LDL-Rezeptors (LDL-R<sup>-/-</sup>) oder des apoE (apoE<sup>-/-</sup>) „ausgeschaltet“ werden, um z.B. Typ II bzw. Typ III Hyperlipoproteinämien zu imitieren. In beiden Modellen entwickelt sich eine fortgeschrittene Atherosklerose.

Da bereits gezeigt wurde, dass Lupinenprotein einen Einfluss auf den LDL-Rezeptor ausüben kann (Sirtori et al. 2004), wurde für die Analysen zur Atherosklerose im Rahmen dieser Arbeit das apoE knockout-Modell gewählt. Vergleichende Studien mit beiden knockout-Modellen ergaben außerdem, dass durch Sojaprotein in apoE<sup>-/-</sup> Mäusen z.B. die Cholesterylester stärker gesenkt werden konnten, als in LDL-R<sup>-/-</sup> Mäusen (Adams et al. 2003).

ApoE ist eines der zehn Plasmalipoproteine, die ein Teil der hydrophilen Hüllschicht von Lipoproteinkomplexen sind. ApoE bindet wie apoB100 u.a. am LDL-Rezeptor und ist entscheidend an der Aufnahme von Chylomikronenremnants und VLDL-Remnants (IDL) aus dem Blut beteiligt (Abb. 19). Beim Fehlen des Gens für apoE und damit des kodierten Proteins, können o.g. Lipoproteine nicht mehr absorbiert werden und akkumulieren in den Gefäßen. ApoE-defiziente Mäuse entwickeln daher bereits unter normolipämischer Kost fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen, die histologisch denen im Menschen gleichen (Zhang et al. 1992, Nakashima et al. 1994). Das Modell ist daher sehr gut geeignet, um Untersuchungen zur Atherosklerose durchzuführen und eine hohe Übertragbarkeit auf den Menschen zu gewährleisten.



**Abbildung 19: Metabolismus von postprandialen TRLs (Triglycerid-reiche-Lipoproteine). ApoE ist dabei bedeutend für die TRLs Clearance. TG = Triglyceride; Chol = Cholesterin; B-48, B-100, C-II und E = spezifische Apolipoproteine; LPL = Lipoproteinlipase; HL = hepatische Lipase; LDLR = LDL Rezeptor; LRP = LDLR-related Protein (modifiziert nach Ruotolo, 2003)**

Dass durch Protein der blauen Lupine die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen, welche als Risikofaktor für eine Atheroskleroseentstehung gelten, gesenkt werden können, wurde im Rahmen dieser Arbeit in den Versuchen an Ratten bereits gezeigt. Um zu untersuchen, ob Lupinenprotein auch per se auf die Atherogenese einen Einfluss hat, wurde diese Studie an apoE knockout-Mäusen durchgeführt. Lupinenprotein und andere

hypolipämisch wirkende Proteine sind reich an Cystein. Da für diese Aminosäure ebenfalls lipidsenkende Wirkungen nachgewiesen wurden (Lin et al. 2004, Lin et al. 2008), sollte auch der Einfluss einer erhöhten Cysteingabe auf die Atherogenese untersucht werden. Hierbei wurde die Ausbildung atherosklerotischer Läsionen an der Aortenwurzel sowie exemplarisch in der Gesamtaorta untersucht. Dabei wurden sowohl die Größe der Plaques, als auch deren Zusammensetzung aus Kollagen, Fett und Kalk analysiert.

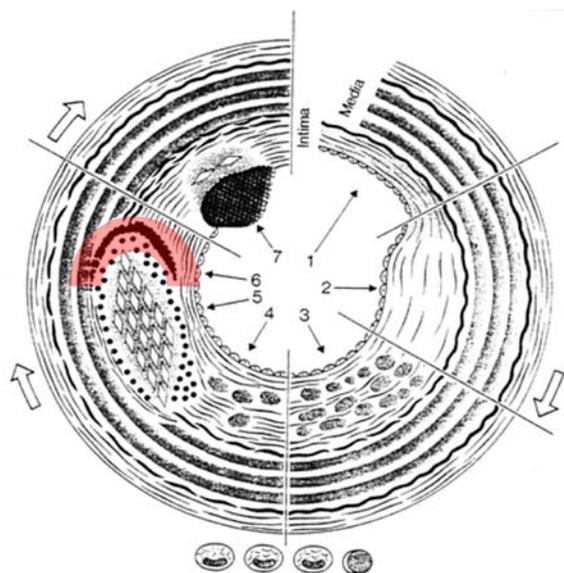
Aufgrund des knockouts des Genes für apoE und der 16-wöchigen Fütterung der *Western diet* entwickelten die Tiere eine ausgeprägte Atherosklerose. Bei allen Tieren zeigte sich eine Reduktion des Aortenlumens um etwa 40% durch den Befall mit Plaque. Ähnliche Studien zeigten nach 11-wöchiger Fütterung etwa 30% Plaquebefall (Villeneuve et al. 2003). Aufgrund der Zusammensetzung der Läsionen aus einer fibromuskulären Kappe, dominierenden Kollagenstrukturen, Lipideinlagerungen sowie Kalzifizierungen wurde die Atherosklerose im vorliegenden Versuch bei allen Tieren in das Stadium der Fortgeschrittenen Läsion (nach Müller et al. 2007) eingeordnet, was etwa einer Einteilung in die Stadien V –VIII nach Sary (2000) entspricht.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals an apoE knockout-Mäusen gezeigt werden, dass Protein der *L. angustifolius* sowie Caseindiät mit Cysteinsupplementierung die Kalzifizierung von atherosklerotischen Läsionen im Vergleich zu Casein um 57% reduzieren konnten. Die Größe der Plaquefläche sowie der Gehalt an Kollagen und Lipiden blieben dabei unverändert. Der Verkalkungsprozess ist in der atherosklerotischen Plaqueentwicklung ein sehr fortgeschrittenes Stadium (dominant in Stadium VII, nach Sary, 2000, siehe auch Abb. 20). Hierbei differenzieren u.a. glatte Muskelzellen und Myofibroblasten, die aus der Media in die Intima eingewandert sind, zu Osterblasten-ähnlichen Zellen (Abedin et al. 2004). Die Zellen verlieren dabei charakteristische Marker von glatten Muskelzellen wie SM22 und SM-aktin zugunsten spezifischer Knochen-Proteine wie Matrix Gla Protein (MGP), BMP-2, Osteocalcin, Osteoprotegerin oder Osteopontin (OPN). Auch Cbfa1, ein Transkriptionsfaktor der Knochenmorphogenese wird im Laufe eines Kalzifizierungsprozesses von glatten Muskelzellen vermehrt gebildet (Steitz et al. 2001, Abedin et al. 2004). Der eigentliche Mechanismus der Kalzifizierung ist noch nicht einheitlich aufgeklärt. So wurde als eine Ursache der Kalkeinlagerung eine veränderte zelluläre Membranpermeabilität mit resultierendem erhöhtem Calcium-Influx beschrieben (Giachelli et al. 1999). Das eingewanderte Calcium kann dann mit hohen Konzentrationen an Phosphationen zu Calciumphosphatkristallen, bestehend aus Hydroxylapatit, Calciumoxalat oder Octacalciumphosphat, ausfallen (Giachelli et al. 1999). Außerdem wurde beschrieben, dass

von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) calciumhaltige Vesikel freigesetzt werden, die ebenfalls zur Kalkeinlagerung im Gewebe beitragen. So werden zum einen sogenannte Matrix-Vesikel von lebenden VSCM freigesetzt, zum anderen sezernieren auch apoptotische VSMC calciumhaltige *apoptotic bodies* (Reynolds et al. 2004).

Anhand des beobachteten verminderten Kalkanteils im Plaque im vorliegenden Versuch und der insgesamt späten Ausbildung der Kalkkristalle im Krankheitsverlauf der Atherosklerose kann vermutet werden, dass Lupinenprotein sowie Casein mit Cysteinsupplement die Progression der Erkrankung verzögern können. Kalkablagerungen führen zu einer Versteifung der Gefäße, vermindern damit die Elastizität der Gefäßwände und bedingen dadurch einen Blutdruckanstieg. Zudem geht eine vermehrte Kalzifizierung einher mit einer vermehrt auftretenden Koronarstenose (Abedin et al. 2004). Eine Reduktion der Kalkeinlagerung wirkt sich demnach positiv auf das Gefäßsystem sowie auf dessen Blutdruckregulation aus. In früheren Studien konnten ebenfalls positive Wirkungen des Lupinenprotein auf die Blutdruckregulation nachgewiesen werden (Pilvi et al. 2006). Hier wurde an hypertonen diabetischen Goto-Kakizaki- (GK) Ratten die Aufnahme von Diäten mit 20% Lupinenprotein über 2 Wochen getestet. Das Lupinenprotein konnte dabei die Blutdruckwerte der GK-Ratten wieder auf das Niveau von normotonischen Kontrollratten senken. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Lupinenprotein die erhöhte Vasokonstriktion sowie die verminderte Relaxationsfähigkeit der Gefäße wieder normalisieren konnte. Diese blutdrucksenkenden Effekte wurden im gleichen Versuch auch für Sojaprotein gezeigt, jedoch nicht so deutlich wie für Lupinenprotein. Als Ursache dieser Wirkung wurden Angiotensin-Converting-Enzym (ACE)-hemmende Peptide diskutiert, die bereits in einigen Studien mit Sojaprotein als hypotonisch wirksam beschrieben wurden. Diese Peptide können beim intestinalen Verdau aus dem totalen Protein freigesetzt werden. Ob diese ACE-hemmenden Peptide auch im Lupinenprotein enthalten sind und möglicherweise synergistisch mit einer verminderten Kalzifizierung positiv auf das Gefäßsystem wirken können, bedarf weiterer Untersuchungen. Es wird weiter angenommen, dass Verkalkungen im Gefäß zu gesteigertem mechanischen Stress führen und die Gefahr einer Plaqueruptur erhöhen, insbesondere bei basalwärts gerichteter „spot-artiger“ Verteilung der Kalkkristalle (sog Mikrokalzifizierungen). Im Gegensatz dazu wird beschrieben, dass eine flächenhafte Verkalkung im Bereich der Kappe im Sinne einer Barrierebildung eher zur Stabilisierung der Plaques beiträgt (Doherty et al. 1994, Virmani et al. 2003, Ehara et al. 2004, Vengenyuk et al. 2006). Dabei wurde beobachtet, dass kleinere Kristalle von 1-2 µm Durchmesser vermehrt zur Ausschüttung proinflammatorische Zytokine führen und damit die Überlebensfähigkeit der Zellen

verschlechtern, als größere Kristalle. Kristalle mit einem Durchmesser größer 40 µm sollen die Zellviabilität nicht beeinflussen (Ewence et al. 2008). Bei den apoE knockout-Tieren im vorliegenden Versuch waren die Kalkkristalle im Bereich der großflächigen Kollagenstrukturen an der Basis der Plaques lokalisiert. Die Verkalkungen waren hier vereinzelt, „spot-artig“, eingestreut und deuten daher auf einen relativ instabilen Plaque. Die Plaques enthielten außerdem keine stabilisierende Kappe aus Kalkstrukturen. Daher könnte die Reduktion der Kalkkristalle von Tieren, die Lupinenprotein oder Caseindiät mit Cysteinsupplement erhielten, eine günstige, den Plaque möglicherweise stabilisierende Wirkung besitzen. Eine Aussage zur Produktion proinflammatorischer Zytokine der Kristalle konnte im vorliegenden Versuch nicht getroffen werden. Eine elektronenmikroskopische Auswertung sollte für eine genauere Aussage über die Morphologie der Kristalle für weiterführende Versuche in Betracht gezogen werden.



**1:** normale Arterienwand; **2:** initiale, subintimale Akkumulation von Lipiden, Proteoglykanen und Kollagenfasern; **3:** intimale Lipidherde, erste Schaumzellen; **4:** fortschreitende Schaumzellenansammlung, proliferierende Myofibroblasten; **5:** Atherom mit zentraler, Cholesterinkristalle enthaltender Nekrose, umsäumt von Schaumzellen und einzelnen T-Lymphozyten und perifokaler Sklerose; **6:** spangenförmige Atheromverkalkung (rot); **7:** atheromatöses Geschwür mit parietalem Abscheidungsthrombus

**Abbildung 20: Pathogenese der Atherosklerose (modifiziert nach Riede et al. 1994)**

Da im aktuellen Versuch die Beeinflussung der Atherosklerose mit verminderten Kalzifizierungen sowohl in der Gruppe auftrat, die Lupinenproteindiät erhielt, als auch in der, die Cystein-supplementierte Caseindiät aufnahm, lag die Vermutung nahe, dass die Aminosäure Cystein selbst einen entscheidenden Einfluss auf die Kalzifizierung des atherosklerotischen Plaques ausüben kann. In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass cysteinhaltige Verbindungen in den Stoffwechsel von osteoiden Zellen eingreifen können. In Studien an *dental pulp stromal cells* wurde beschrieben, dass N-acetyl-Cystein die Zellviabilität und den antioxidativen Status von toxisch belasteten Zellen verbessern konnte

und dabei u.a. die Osteopontinbildung induziert. Die antioxidativ wirkenden Vitamine E und C konnten diese Effekte hingegen nicht erzielen (Paranjpe et al. 2007). Osteopontin ist im Kalzifizierungsprozess der Atherosklerose ein charakteristisches Mineralisationsmodulierendes Matrix-Protein, welches u.a. von glatten Muskelzellen (Steitz et al. 2001, Abedin et al. 2004) und Makrophagen während fortschreitendem Krankheitsverlauf in steigender Konzentration gebildet wird (Hirota et al. 1994). In einer aktuellen Studie wurde für OPN gezeigt, dass es zum einen positiver Regulator von atherosklerotischen und inflammatorischen Prozessen ist, andererseits aber auch als Inhibitor von Kalzifizierung bzw. als ein Induktor von Dekalzifizierungen agieren kann (Cho et al. 2009). Es könnte demnach möglich sein, dass auch im vorliegenden Versuch durch supplementiertes Cystein bzw. die hohe Cysteinkonzentration im Lupinenprotein über eine Steigerung von OPN ein hemmender Einfluss auf den Kalzifizierungsprozess ausgeübt werden konnte. Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, könnten zukünftig Untersuchungen mit Lupinenprotein und Cystein an speziellen Versuchsmodellen für Kalzifizierungsprozesse durchgeführt werden, z.B. an MPG knockout-Mäusen, welche durch fehlendes MPG schon nach wenigen Tagen spontane Kalzifizierungen entwickeln, oder an Zellkulturstudien mit BASMV oder VSMC, bei denen z.B. durch Zugabe von  $\beta$ -Glycerophosphat leicht eine Verkalkung induziert werden kann.

Es existieren für die Entstehung von Atherosklerose diverse Risikofaktoren. So sind hohe Plasmakonzentrationen an Cholesterin und Triglyceriden entscheidende Parameter, die die Plaqueentwicklung negativ beeinflussenden können. Die üblicherweise beschriebene hypocholesterinämische Wirkung von Lupinenprotein (Sirtori et al. 2004, Bettzieche et al. 2008) bzw. Cystein (Lin et al. 2004, Lin et al. 2008) konnte im vorliegenden Versuch an apoE knockout-Mäusen nicht festgestellt werden. Auch die beschriebene hypotriglyceridämische Wirkung (Spielmann et al. 2007, Bettzieche et al. 2008 a) blieb aus. Veränderte Lipidkonzentrationen als mögliche Ursache für die beeinflusste Atheroskleroseentwicklung durch Lupinenprotein und Cystein können daher ausgeschlossen werden. Diese Beobachtungen bestätigen Studien mit Sojaprotein an apoE knockout-Mäusen, in denen eine Beeinflussung atherosklerotischer Läsionen ebenfalls nicht mit veränderten Lipidkonzentrationen einherging (Nagarajan et al. 2008).

Es ist außerdem bekannt, dass oxidativer Stress die Atherosklerose bzw. die Kalzifizierung induzieren kann (Byon et al. 2008). Da Cystein ein Baustein des antioxidativ wirksamen Glutathions ist (Mosharov et al. 2000), könnte durch die höhere Cysteinzufuhr eine Verbesserung des antioxidativen Status erzielt worden sein. Frühere Studien zeigten, dass cysteinhaltige Verbindungen die Glutathionperoxidaseaktivität und den antioxidativen Status

von Mäusen verbessern konnten (Lin et al. 2004, 2008). Auch wurde die Glutathionkonzentration in der Leber durch die cysteinhaltigen Verbindungen gesteigert (Lin et al. 2008). Im vorliegenden Versuch war die Glutathionkonzentration in der Leber, dem Ort seiner Hauptsynthese, jedoch in allen 3 Diätgruppen gleich. Im Plasma waren die Konzentrationen an Glutathion in der Gruppe, die Lupinenprotein, sowie in der Gruppe, die Cystein-supplementierte Caseindiät erhielt, sogar niedriger als in der Kontrollgruppe. Zudem ergab die Analyse der Glutathionperoxidaseaktivität in Plasma und Leber, als Marker für die Synthese von oxidiertem Glutathion, auch keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Demnach ist die unterschiedliche Kalzifizierung in den 3 Gruppen nicht auf unterschiedliche GSH-Konzentration zurückzuführen.

Eine weitere Aminosäure, die in Lupinenprotein in deutlich unterschiedlicher Konzentration im Vergleich zu Casein enthalten ist, ist Methionin. Methionin ist Ausgangsprodukt für die Synthese von Homocystein. Dieses wird ebenfalls als deutlicher Risikofaktor für die Entstehung von Atherosklerose definiert (Nehler et al. 1997). Da Methionin in Lupinenprotein in deutlich geringerer Konzentration vorkommt als in Casein (-38%), war auch eine verminderte Synthese an atherogenem Homocystein zu vermuten. Die Analysen in Plasma und Leber ergaben jedoch keine Unterschiede zwischen den 3 Gruppen. Demnach konnten die reduzierten Kalzifizierungen nicht mit einer verminderten Homocysteinkonzentration erklärt werden.

Es existieren weiterhin Studien, die die Wirkung von Arginin auf die Atherogenese untersuchen. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Zufuhr an Arginin die Atherosklerose in LDL-R knockout-Mäusen (Aji et al. 1997) und Kaninchen (Böger et al. 1995), z.B. über eine Syntheseregulation des vasodilatatorisch wirkenden Stickstoffmonoxid (NO) vermindern konnte. Da die Konzentration an Arginin im Lupinenprotein etwa doppelt so hoch ist wie in Casein, kann vermutet werden, dass auch die hohen Argininkonzentrationen einen positiven Einfluss auf die Kalzifizierung haben können. Studien dazu fehlen jedoch bislang.

Zusammenfassend bleibt die Beobachtung, dass Lupinenprotein und Casein mit Cysteinsupplement die Zusammensetzung atherosklerotischer Plaques beeinflussen können. Es kann aufgrund der verminderten Kalzifizierungen der Plaques durch die Aufnahme von Lupinenprotein und Cystein vermutet werden, dass die Progression der Erkrankung vermindert werden konnte. Auch könnte die Reduktion der Verkalkungen einen positiven Einfluss auf die Plaquestabilität sowie auf das Gefäßsystem und die Blutdruckregulation haben.

## 5. Zusammenfassung

Dyslipidämien mit den Folgen Atherosklerose und Koronarer Herzkrankheit stellen ein massives gesundheitliches Problem dar. Daher ist es von großer Relevanz, über medikamentöse Behandlung und entsprechende Ernährung erhöhte Blutfettkonzentrationen zu senken. Nachweislich kann die Aufnahme von bestimmten pflanzlichen Proteinen einen positiven Effekt auf Dyslipidämien und Atherosklerose ausüben. So existieren z.B. für Sojaprotein zahlreiche Untersuchungen, in denen lipidsenkende und atheroprotektive Wirkungen beschrieben wurden. Auch für Protein aus Lupinen, die wie die Sojabohnen zur Familie der Leguminosen gehören, gibt es Hinweise für blutfettsenkende Eigenschaften. Für eine allgemeine Verzehrempfehlung von Lupinenprotein sind die bisher existierenden Studien jedoch noch nicht umfassend genug. Um die Wirkungen von Lupinenprotein auf die Blutfettwerte weiter zu charakterisieren, wurden in dieser Arbeit verschiedene Versuche am Tiermodell Ratte durchgeführt, sowie ein Versuch an Schweinen. Außerdem wurde die direkte Wirkung von Lupinenprotein auf die Atherogenese untersucht, wobei hierfür apoE knockout-Mäuse als Modelltiere genutzt wurden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zudem erste Erkenntnisse darüber gewonnen, ob Lupinenprotein auch am Menschen eine blutfettsenkende Wirkung ausübt. In allen Versuchen wurde dafür Proteinisolat der blauen Lupine (*L. angustifolius*) der Sorte Boregine eingesetzt.

Zunächst wurde als Grundlage für die folgenden Untersuchungen die scheinbare Verdaulichkeit von Lupinenprotein im Vergleich zu Casein an Ratten bestimmt. Die Studie ergab, dass sich die N-Ausscheidung der Tiere über Faeces und Urin durch Aufnahme des Lupinenproteins im Vergleich zu Casein nicht unterschied. Da auch die Körpermassezunahme der Tiere nach Aufnahme der beiden Proteindiäten keine Unterschiede zeigte, wurde auf eine ähnliche Verdaulichkeit von Lupinenprotein und Casein geschlossen. Die Triglyceridkonzentration im Plasma der Tiere war in diesem Versuch nach Aufnahme von Lupinenprotein im Vergleich zu Casein tendenziell niedriger, die Triglyceridexkretion über den Faeces war hingegen signifikant höher. Es wurde daher vermutet, dass eine gesteigerte Ausscheidung von Triglyceriden mit dem Kot zu den triglyceridsenkenden Effekten des Lupinenproteins im Plasma beiträgt.

In einem zweiten Versuch wurde an Ratten untersucht, ob eine thermische Behandlung des Lupinenproteins, wie sie u.a. bei der Proteinaufbereitung zur Hitzeinaktivierung mikrobieller Keime angewandt wird, seine Wirksamkeit beeinflusst. Außerdem wurde die Wirksamkeit

von Lupinenprotein in Kombination mit einer kohlenhydratreichen Kost und einer fettreichen Kost untersucht, da eine hohe Aufnahme an Kohlenhydraten und Fett in den westlichen Industrienationen weit verbreitet ist. Es wurde in dieser Studie gezeigt, dass die hypolipämische Wirkung von nativem und erhitztem Lupinenprotein in Plasma und Lipoproteinen ähnlich war, die Konzentration der Leberlipide wurde durch das native Lupinenprotein jedoch deutlicher gesenkt. Die cholesterin- und triglyceridsenkenden Effekte in Plasma, Lipoproteinen und Leber waren bei Aufnahme von Lupinenprotein in einer fettreichen Diät stärker, als bei Aufnahme in einer kohlenhydratreichen Diät. Die Analyse der Genexpression in der Leber ergab, dass Lupinenprotein triglyceridanabole Gene der *de novo* Fettsäuresynthese vermindert. Zudem gab es Hinweise darauf, dass auch Gene der Cholesterinhomöostase durch Lupinenprotein beeinflusst werden. Insgesamt wurde in diesem Versuch festgestellt, dass die Wirksamkeit von Lupinenprotein durch die Konzentrationen der Diätbestandteile Kohlenhydrate und Fett wesentlich stärker beeinflusst wird, als durch eine thermische Behandlung.

Neben den nachgewiesenen positiven Effekten auf Dyslipidämien als atherogenem Risikofaktor sollte in dieser Arbeit auch der direkte Einfluss von Lupinenprotein auf die Atherogenese untersucht werden. Als Modelltier wurden apoE knockout-Mäusen eingesetzt, da diese Tiere aufgrund des Fehlens von Apolipoprotein E eine fortgeschrittene Atherosklerose entwickeln und somit für Untersuchungen zur Atherogenese ein geeignetes Versuchsmodell darstellen. Im Langzeitversuch erhielten die Mäuse über 16 Wochen eine semisynthetische „*Western diet*“, die entweder 10% Casein, 10% Lupinenprotein oder 9,5% Casein mit 0,5% Cystein enthielt. Cystein kommt im Lupinenprotein in relativ hoher Konzentration vor und könnte für dessen Wirkungen mit verantwortlich sein. Zur Quantifizierung der Atherosklerose wurden Gefrierschnitte von der Aortenwurzel der Tiere angefertigt und relevante morphologische Strukturen angefärbt. Es wurde gezeigt, dass die Größe der atherosklerotischen Plaques sowie deren Zusammensetzung aus Kollagen und Fett durch Lupinenprotein und Cystein nicht beeinflusst wurden. Allerdings wurden die Kalkeinlagerungen in den Plaques durch Lupinenprotein und durch Cysteinsupplementierung um über 50% im Vergleich zu Casein ohne Cystein vermindert. Die Kalkkristalle waren an der Basis der atherosklerotischen Plaques lokalisiert und dort spotartig eingestreut. Diese Morphologie wird im Zusammenhang mit einer destabilisierenden Wirkung auf den Plaque beschrieben. Daher könnten Lupinenprotein und Cystein durch eine Reduktion der spotartigen Kalzifizierungen zu einer erhöhten Stabilität des Plaques beigetragen haben. Da der

Verkalkungsprozess in der Atheroskleroseentstehung relativ spät eintritt, wird außerdem vermutet, dass Lupinenprotein und Cystein die Progression der Erkrankung hemmen. Zudem sind verkalkte Gefäße weniger elastisch und führen eher zu Bluthochdruck, so dass sich eine Reduktion der Kalkeinlagerung durch Lupinenprotein und Cystein auch positiv auf das Gefäßsystem und die Blutdruckregulation auswirken könnte. Da die verminderte Kalzifizierung sowohl durch Lupinenprotein als auch durch Cystein gleichermaßen beobachtet wurde, könnte Cystein eine entscheidende Wirkkomponente des Lupinenproteins sein.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die Wirkung von Lupinenprotein an Schweinen getestet, da diese Tiere in der Regulation des Lipidstoffwechsels dem Menschen ähnlicher sind als Nager. Das Protein wurde in diesem Versuch bewusst in einer normolipämischen Kost verabreicht, um das physiologische, dem Menschen sehr ähnliche, Lipoproteinprofil der Tiere zu erhalten. Die gemessenen Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Lipoproteinen zeigten jedoch unter diesen Bedingungen keinerlei Beeinflussung durch Lupinenprotein im Vergleich zu Casein. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen an Ratten, dass Lupinenprotein eine deutlichere hypolipämische Wirkung entfaltet, wenn es in Kombination mit einer fettreichen Diät aufgenommen wird.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte erstmals getestet werden, wie Lupinenprotein am Menschen wirkt. In Anbetracht der Ergebnisse der zuvor beschriebenen Tierstudien wurde ein hypercholesterinämisches Probandenkollektiv rekrutiert. 56 Männer und Frauen erhielten über 6 Wochen in einer doppelt verblindeten, randomisierten Interventionsstudie 35 g Lupinenprotein oder Casein pro Tag in einem Snackriegel. Es wurden die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Lipoproteinen sowie die Expression von Genen der Cholesterinhomöostase in den mononukleären Zellen des Blutes vor und nach Intervention gemessen. Es konnten nach 6-wöchiger Intervention durch beide Proteine verminderte Gesamtcholesterinkonzentrationen festgestellt werden. Bei den Probanden, die Lupinenprotein aufnahmen, beruhte diese verminderte Konzentration auf einer signifikanten Abnahme der LDL-Cholesterinkonzentrationen, bei den Probanden, die Casein erhielten, hingegen auf einer Reduktion des HDL-Cholesterins. Die LDL/HDL-Ratio als Risikofaktor für Atherosklerose und Koronare Herzkrankheit konnte durch die 6-wöchige Aufnahme von Lupinenprotein gesenkt werden, während sie durch die Aufnahme von Casein erhöht wurde. Durch die Messung der Genexpression in den mononukleären Zellen konnte keine eindeutige

Erklärung für die verschiedenen Wirkungen von Casein und Lupinenprotein gefunden werden. Interessanterweise war die Wirkung der beiden Proteine bei Männern und Frauen sowohl bezüglich der Blutlipide als auch der Genexpression unterschiedlich. Diese Beobachtung sollte zukünftig in einem größeren Probandenkollektiv weiter untersucht werden. Die triglyceridsenkenden Effekte von Lupinenprotein, die in diversen Tierstudien festgestellt wurden, konnten unter den gewählten Versuchsbedingungen am Menschen nicht gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass Lupinenprotein die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in Plasma, Lipoproteinen und Leber in Abhängigkeit von Tiermodell und Versuchsdesign senken kann. Dabei kommen eine verminderte *de novo* Synthese der Fettsäuren sowie eine vermehrte Lipidausscheidung als mögliche Ursachen der hypolipämischen Wirkungen des Lupinenproteins in Frage. Es wurde außerdem gezeigt, dass eine positive Beeinflussung der Atheroskleroseentwicklung durch Lupinenprotein möglich ist. Zudem konnte erstmals gezeigt werden, dass auch beim Menschen durch Lupinenprotein eine Senkung der Blutfettkonzentrationen zu erreichen ist. Durch die Senkung der Lipidkonzentrationen kann vermutlich auch das Erkrankungsrisiko für Atherosklerose und Koronarer Herzkrankheit vermindert werden. Es wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit auch gezeigt, dass die Nährstoffzusammensetzung der aufgenommenen Nahrung die Wirkung des Proteins entscheidend mitbestimmt. Bevor der Einsatz von Lupinenprotein als gesundheitsförderndes Lebensmittel empfohlen werden kann, sollten weitere Studien durchgeführt werden. Diese könnten z. B. weitere wirksame Komponenten des Proteins wie Peptide oder Aminosäuren aufdecken oder aber auch Informationen über die zu empfehlende Verzehrsmenge liefern.

## Summary

Dyslipidemia and its implication for atherosclerosis and coronary heart disease is a major problem in human health. Therefore, therapeutic and dietary approaches for treatment and prevention of elevated blood lipids are highly relevant. It's a matter of common knowledge that the intake of different plant proteins have positive effects on dyslipidemia and atherosclerosis. In various studies it was shown that soy protein can induce hypolipemic and antiatherosclerotic effects. Another protein-rich legume beside soy is lupin. Soy and lupin belong to the same plant family and are characterized by a similar protein content and composition. Recent investigations have shown that protein extracts from lupin are also capable of lowering blood lipids. However, to recommend lupin protein for use in human nutrition the existing studies are not yet widespread enough. To examine further the effects of lupin protein on blood lipid concentrations, different experiments using rats as animal model and one study using pigs were performed. Moreover, the effect of lupin protein on atherogenesis was investigated using apoE deficient mice. Finally, the present work should give first insides if lupin protein can change plasma lipids in humans, too. In all experiments protein isolate of blue lupin (*L. angustifolius*) from Boregine cultivar was used.

As a basis for following investigations the apparent digestibility of lupin protein and casein was determined in rats. The nitrogen excretion *via* feces and urine was the same for both proteins. Since body mass development of the animals fed the two proteins was also the same, it was concluded that lupin protein has a similar digestibility as casein. The plasma triglyceride concentration tended to be lower after consuming lupin protein compared to casein, whereas the triglyceride excretion *via* the feces was significantly increased by lupin protein. Therefore, the increased elimination of triglycerides was assumed to participate in the plasma triglyceride lowering effect of lupin protein.

In a second experiment with rats it was investigated if thermal processing, which is used during protein isolation to inactivate microbial germs, change the effectiveness of lupin protein. Furthermore, the effectiveness of lupin protein was tested in combination with a diet rich in carbohydrates and a diet rich in fat, because high intake of carbohydrates and fat is very common in western industrial nations and there of relevance. The hypolipemic effect of native and heated lupin protein was similar in plasma and lipoproteins, the effect in the liver, however, was more pronounced in rats fed the native lupin protein. The cholesterol and triglyceride lowering effect in plasma, lipoproteins and liver was stronger when lupin protein

was consumed in a high fat diet than in a diet high in carbohydrates. The analysis of gene expression showed, that lupin protein could decrease mRNA concentration of genes of the *de novo* fatty acid synthesis. In addition, lupin protein affected the expression of genes involved in the cholesterol homeostasis. In conclusion, the concentration of the components fat and carbohydrates in the diet had a stronger influence on lupin protein effectiveness than thermal processing of the protein.

After showing the effects of lupin protein on dyslipidemia as an atherogenic risk factor, in the second part it should be examined, if lupin protein has a direct effect on atherosclerosis. ApoE knockout mice were used as animal model since the absence of the apolipoprotein E leads to severe hypercholesterolemia and atherosclerosis and therefore, these animals are one of the most appropriate model for human atherosclerosis. In a long- term study the mice were fed a semi-synthetic *Western diet* with either 10% lupin protein, 10% casein or 9,5% casein supplemented with 0.5% cysteine over 16 weeks. Cysteine could be responsible for the hypolipemic effects of lupin protein because lupin protein is high in this amino acid. For quantification of atherosclerosis frozen sections were taken from the aortic root of the animals. The sections were stained for different morphologic structures. The size of the atherosclerotic plaques as well as the plaque content in collagen and fat was not affected by lupin protein or cysteine compared to casein alone. However, over 50% less calcified areas were observed in mice fed lupin protein or casein supplemented with cysteine compared to mice fed casein without cysteine. The calcified crystals were localized at the base of the atherosclerotic plaques and had a spot-like distribution. Since this morphology is characterized by instability of the plaque, lupin protein and cysteine may have a positive effect on plaque stability. In the development of atherosclerosis the calcification process is a relative final stage. Therefore, it can be assumed further, that lupin protein and cysteine inhibit the progression of atherosclerosis. In addition, calcified vessels are less flexible and lead rather to hypertension, so the reduction of vascular calcification seems to have positive effects on the vascular system and the blood pressure regulation as well. Because less calcification was accomplished with lupin protein and cysteine, as well, cysteine could be one of the active components of lupin protein.

In the next part of this work lupin protein was tested on pigs, a species which has a higher similarity to humans than rodents, especially in the regulation of lipid homeostasis. In this study lupin protein was integrated in a normolipemic standard diet to remain the physiological

lipoprotein profile of pigs, which is very similar to that of humans. However, the measured cholesterol and triglyceride concentrations in plasma and lipoproteins showed no influence of lupin protein compared to casein. These results confirm the observations made in the experiments with rats that lupin protein shows stronger hypolipemic effects under high fat diet conditions.

In the last part of this work it should be tested for the first time how effective lupin protein is in humans. In consideration of the results gained with rats and pigs hypercholesterolemic subjects were recruited for the investigation. 56 men and women received over 6 weeks in a double blind, randomized intervention study 35 g lupin protein or casein per day in a snack bar. The cholesterol and triglyceride concentrations in plasma and lipoproteins, as well as the expression of genes related to cholesterol homeostasis in mononuclear blood cells were determined before and after intervention. As a result, decreased total cholesterol concentrations were measured after 6-week intervention by both proteins. In subjects who consumed lupin protein the effect was caused by a significant decrease in LDL cholesterol concentration, while in subjects who consumed casein, the effect was caused by a reduction of the HDL cholesterol concentration. The LDL/HDL ratio as a risk factor of atherosclerosis and coronary heart disease was decreased by 6 week intervention with lupin protein, by casein intervention, in contrast, it was increased. The measurement of the mRNA concentrations showed no clear explanation for the different effects of lupin protein and casein. Interestingly, effects in blood lipids and gene expression were different in men and women. Further studies in a larger collective should investigate this observation in detail. The triglyceride lowering effect of lupin protein observed in some animal models, however, could not be shown in humans under the selected conditions.

In conclusion this study demonstrated that lupin protein influences the cholesterol and triglyceride concentrations in plasma, lipoproteins and liver in dependence on the species and the experimental design. A decreased *de novo* synthesis of fatty acids, as well as an increased lipid excretion seems to be causes for the lipid lowering effects of lupin protein. In addition it was shown that lupin protein directly affects atherosclerosis. Furthermore, first indications for a hypolipemic effect of lupin protein in humans could be provided. By lowering blood lipid concentrations lupin protein could also limit the risk of atherosclerosis and coronary heart disease. Finally, it was also shown, that the composition of the diet has an essential influence on the effectiveness of lupin protein. Before advertising lupin protein as a health-promoting

food for the human nutrition, further investigations are needed. Among others, the identification of further active components of lupin protein, such as peptides or amino acids remains, as well as the definition of the recommended amount of lupin protein to be consumed.

## 6. Literaturverzeichnis

Abdullah MM, Riediger NN, Chen Q, Zhao Z, Azordegan N, Xu Z, Fischer G, Othman RA, Pierce GN, Tappia PS, Zou J, Moghadasian MH (2009) Effects of long-term consumption of a high-fructose diet on conventional cardiovascular risk factors in Sprague-Dawley rats. *Mol Cell Biochem.* [Epub ahead of print]

Abedin M, Tintut Y, Demer LL (2004) Vascular calcification: mechanisms and clinical ramifications. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24, 1161-70. Review.

AbuMweis SS, Jones PJ (2008) Cholesterol-lowering effect of plant sterols. *Curr Atheroscler Rep.* 10, 467-72. Review.

Adams MR, Golden DL, Franke AA, Potter SM, Smith HS, Anthony MS (2004) Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *J Nutr.* 134, 511-6.

Adams MR, Golden DL, Register TC, Anthony MS, Hodgin JB, Maeda N, Williams JK (2002) The atheroprotective effect of dietary soy isoflavones in apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice requires the presence of estrogen receptor- $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22, 1859-64.

Aggarwal D, Freake HC, Soliman GA, Dutta A, Fernandez ML (2006) Validation of using gene expression in mononuclear cells as a marker for hepatic cholesterol metabolism. *Lipids Health Dis.* 15, 22.

Agheli N, Kabir M, Berni-Canani S, Petitjean E, Boussairi A, Luo A, Bornet F, Slama G, Rikzalla S (1998) Plasma lipids and fatty acid synthase activity are regulated by short-chain fructo-oligosaccharides in sucrose-fed insulin-resistant rats. *J. Nutr.* 128, 1283-1288.

Aji W, Ravalli S, Szabolcs M, Jiang XC, Sciacca RR, Michler RE, Cannon PJ (1997) L-arginine prevents xanthoma development and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *Circulation* 95, 311-2.

Alexandre A, Miguel M. (2008) Dietary fiber in the prevention and treatment of metabolic syndrome: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 48, 905-12. Review.

Aliev G, Burnstock G (1998) Watanabe rabbits with heritable hypercholesterolaemia: a model of atherosclerosis. *Histol Histopathol.* 13, 797-817.

Allgemeinen Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (2001) *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr*, 1. Auflage.

Alrefai WA, Gill RK (2007) Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications. *Pharm Res.* 24, 1803-23. Review.

Álvarez-Álvarez J, Guillamón E, Crespo JF, Cuadrado C, Burbano C, Rodríguez J, Fernández C, Muzquiz M (2005) Effects of Extrusion, Boiling, Autoclaving, and Microwave Heating on Lupine Allergenicity. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1294-1298.

Anderson JW, Hoie LH (2005) Weight loss and lipid changes with low-energy diets: comparator study of milk-based versus soy-based liquid meal replacement interventions. *J Am Coll Nutr* 24, 210-6.

- Anderson JW, Johnstone BM & Cook-Newell ME (1995) Meta-analysis of the effects of soybean protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* 333, 276-282.
- Angela K. Stoeckman and Howard C. Towle (2002) The Role of SREBP-1c in Nutritional Regulation of Lipogenic Enzyme Gene Expression\*. *JBC* 277, 27029–27035, 2002.
- Anthony MS, Clarkson TB, Bullock BC, Wagner JD (1997) Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17, 2524-31.
- Arnoldi A, Resta D, Brambilla F, Boschini G, D'Agostina A, Sirtori E, O'Kane F (2007) Parameters for the evaluation of the thermal damage and nutraceutical potential of lupin-based ingredients and food products. *Mol Nutr Food Res.* 51, 431-6. Review.
- Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gómez-Pérez FJ, Hernández-Pando R & Tovar AR (2004) Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J Nutr* 134, 522-529.
- Bassler R, Buchholz H. (1993) Methodenbuch Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Darmstadt, VDLUFA-Verlag.
- Besnard P, Landrier JF, Grober J, Niot I (2004) [Is the ileal bile acid-binding protein (I-BABP) gene involved in cholesterol homeostasis?] *Med Sci (Paris)* 20, 73-7.
- Bettzieche A, Brandsch C, Hirche F, Eder K, Stangl GI. (2008 c) L-cysteine down-regulates SREBP-1c-regulated lipogenic enzymes expression via glutathione in HepG2 cells. *Ann Nutr Metab.* 52, 196-203.
- Bettzieche A, Brandsch C, Schmidt M, Weisse K, Eder K, Stangl GI. (2008 b) Differing effect of protein isolates from different cultivars of blue lupin on plasma lipoproteins of hypercholesterolemic rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 72, 3114-21.
- Bettzieche A, Brandsch C, Weisse K, Hirche F, Eder K, Stangl GI. (2008 a) Lupin protein influences the expression of hepatic genes involved in fatty acid synthesis and triacylglycerol hydrolysis of adult rats. *Br J Nutr* 99, 952-62.
- Bez J, Schott M, Seger A (2005) Application of lupin protein ingredients in muffins, biscuits and extruded snack. In: *Final Conference of Healthy-Profood*, 51-66.
- Blum A, Lang N, Vigder F, Israeli P, Gumanovsky M, Lupovitz S, Elgazi A, Peleg A, Ben-Ami M (2003) Effects of soy protein on endothelium-dependent vasodilatation and lipid profile in postmenopausal women with mild hypercholesterolemia. *Clin Invest Med.* 26, 20-6.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Frölich JC (1996) The L-arginine-nitric oxide pathway: role in atherosclerosis and therapeutic implications. *Atherosclerosis.* 127, 1-11.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* Bd. 72, 248-254.
- Brandsch C, Shukla A, Hirche F, Stangl GI, Eder K (2006) Effect of proteins from beef, pork, and turkey meat on plasma and liver lipids of rats compared with casein and soy protein. *Nutrition* 22, 1162-70.

- Braun JR, Willnow TE (1996) Die „Knockout“-Maus als Krankheitsmodell – Prinzipien und klinische Relevanz. *Deutsches Ärzteblatt* 93, Heft 26, A-1765-1769.
- Brennecke S, Becker WM, Lepp U, Jappe U (2007) Anaphylaktische Reaktion auf Lupinenmehl. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* Volume 5 Issue 9, 2013.
- Brown MS & Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89, 331-340.
- Buja LM, Clubb FJ Jr, Bilheimer DW, Willerson JT (1990) Pathobiology of human familial hypercholesterolaemia and a related animal model, the Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbit. *Eur Heart J.* 11, E, 41-52.
- Byon CH, Javed A, Dai Q, Kappes JC, Clemens TL, Darley-Usmar VM, McDonald JM, Chen Y (2008) Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem.* 283, 15319-27.
- Caligari S, Chiesa G, Johnson SK, Camisassi D, Gilio D, Marchesi M, Parolini C, Rubio LA, Sirtori CR (2006) Lupin (*Lupinus albus*) protein isolate (L-ISO) has adequate nutritional value and reduces large intestinal weight in rats after restricted and ad libitum feeding. *Ann Nutr Metab.* 50, 528-37.
- Carey GB (1997) The swine as a model for studying exercise-induced changes in lipid metabolism. *Med Sci Sports Exerc.* 29, 1437-43. Review.
- Castiglioni S, Manzoni C, D'Uva A, Spiezie R, Monteggia E, Chiesa G, Sirtori CR, Lovati MR (2003) Soy proteins reduce progression of a focal lesion and lipoprotein oxidizability in rabbits fed a cholesterol-rich diet. *Atherosclerosis* 171, 163-70.
- Chen W, Owsley E, Yang Y, Stroup D, Chiang JY (2001) Nuclear receptor-mediated repression of human cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene transcription by bile acids. *J Lipid Res.* 42, 1402-12.
- Chiang JY, Kimmel R, Stroup D (2001) Regulation of cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR $\alpha$ ). *Gene.* 262, 257-65.
- Chirala SS, Wakil SJ (2004) Structure and function of animal fatty acid synthase. *Lipids.* 39, 1045-53. Review.
- Cho HJ, Cho HJ, Kim HS (2009) Osteopontin: a multifunctional protein at the crossroads of inflammation, atherosclerosis, and vascular calcification. *Curr Atheroscler Rep* 11, 206-13.
- Cho SJ, Juillerat MA, Lee CH (2008) Identification of LDL-receptor transcription stimulating peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. *J Agric Food Chem.* 56, 4372-6.
- Crouse JR 3rd, Morgan T, Terry JG, Ellis J, Vitolins M, Burke GL (1999) A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med.* 159, 2070-6.

- D'Agostina A, Antonioni C, Resta D, Arnoldi A, Bez J, Knauf U, Wäsche A (2006) Optimization of a pilot-scale process for producing lupin protein isolates with valuable technological properties and minimum thermal damage. *Journal of agricultural and food chemistry* 54, 92-8.
- De Hoff JL, Davidson JH & Kritchevsky D (1978) An enzymatic assay for determining free and total cholesterol in tissues. *Clin Chem* 24, 433-435.
- Deutsch J (1983) Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Methods of Enzymatic Analysis* 190-197, Verlag Chemie, Weinheim, Germany.
- Doherty M (1994) Calcium pyrophosphate in joint disease. *Hosp Pract (Off Ed)*. 29, 93-6, 99-100, 103-4 passim. Review.
- Doxastakis G, Papageorgiou M, Mandalou D, Irakli M, Papalamprou E, D'Agostina A, Resta D, Boschin G, Arnoldi A (2007) Technological properties and non-enzymatic browning of white lupin protein enriched spaghetti *Food Chemistry* 101, 57-64.
- Duranti M, Cerletti P (1979) Amino acid composition of seed proteins of *Lupinus albus*. *J Agric Food Chem*. 27, 977-8.
- Duranti M, Gius C (1997) Legume seeds: protein content and nutritional value. *Improvement of Grain Legumes* 53, 31-45.
- During A, Combe N, Mazette S, Entressangles B (2000) Effects on cholesterol balance and LDL cholesterol in the rat of a soft-ripened cheese containing vegetable oils. *J Am Coll Nutr* 19, 458-66.
- Eder K, Peganova S, Kluge H (2001) Studies on the tryptophan requirement of piglets. *Arch Tierernahr*. 55, 281-97.
- Edwards PA, Tabor D, Kast HR & Venkateswaran A (2000) Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim Biophys Acta* 1529, 103-113.
- Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, Shimada K, Shimada Y, Fukuda D, Nakamura Y, Yamashita H, Yamagishi H, Takeuchi K, Naruko T, Haze K, Becker AE, Yoshikawa J, Ueda M (2004) Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. *Circulation*. 110, 3424-9.
- Elina Ikonen (2008) Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9, 125-138.
- Engelhardt W, Breves G, Ahrens F (2005) *Physiologie der Haustiere*, Edition 2, Georg Thieme Verlag, Seite 355.
- Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, Neumann M, Shanahan CM, Proudfoot D (2008) Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res*. 103, e28-34.
- Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP, 2001) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285, 2486-97.

- F Ledl, E Schleicher (1990) New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie International Edition* 29, 565-706.
- Färkkilä M, Miettinen TA (1990) Lipid metabolism in bile acid malabsorption. *Ann Med.* 22, 5-13.
- Flowers MT, Ntambi JM (2008) Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 19, 248-56. Review.
- Fontaine J, Bech-Andersen S, Bütikofer U, Froidmont-Görtz I (1998) Determination of tryptophan in feed by HPLC - Development of an optimal hydrolysis and extraction procedure by the EU Commission DG XII in three international collaborative studies. *Agribiological Research* 51, 97-108.
- Food and Drug Administration (1999). Food labeling, health claims, soy protein, and coronary heart disease. *Fed Reg* 57, 699-733.
- Friedman HI, Nylund B (1980) Intestinal fat digestion, absorption, and transport. *Am J Clin Nutr.* 33, 1108-39. Review.
- Friedman M, Brandon DL (2001) Nutritional and health benefits of soy proteins. *J Agric Food Chem.* 49, 1069-86. Review.
- Fukui K, Kojima M, Tachibana N, Kohno M, Takamatsu K, Hirotsuka M, Kito M (2004) Effects of soybean beta-conglycinin on hepatic lipid metabolism and fecal lipid excretion in normal adult rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68, 1153-5.
- Gardner CD, Messina M, Kiazand A, Morris JL, Franke AA (2007) Effect of two types of soy milk and dairy milk on plasma lipids in hypercholesterolemic adults: a randomized trial. *J Am Coll Nutr.* 26, 669-77.
- Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (2006) *Empfehlungen zur Energie- und Nährstoffversorgung von Schweinen*, DLG-Verlag, Frankfurt/Main, Germany.
- Gesellschaft zur Förderung der Lupine e.V. (2007) *Lupinen - Verwertung und Anbau*, 5. Auflage.
- Giachelli CM (1999) Ectopic Calcification - Gathering Hard Facts about Soft Tissue Mineralization. *American Journal of Pathology* 154, 671-675.
- Gladstones JS, Atkins CA, Hamblin J (1998) Distribution, origin, taxonomy, history and importance. Lupins as crop plants: biology, production and utilization. *CAB International*, Wallingford, UK. 1-39.
- Goldscheider S, www.biothemen.de 2002-2009.
- Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS (2006) Protein sensors for membrane sterols. *Cell.* 124, 35-46. Review.
- Gotto AM Jr (1998) Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 82, 22Q-25Q. Review.

- Gouni I, Oka K, Etienne J, Chan L (1993) Endotoxin-induced hypertriglyceridemia is mediated by suppression of lipoprotein lipase at a post-transcriptional level. *J Lipid Res.* 34, 139-46.
- Greene CM, Zern TL, Wood RJ, Shrestha S, Aggarwal D, Sharman MJ, Jeff S, Volek JS, Fernandez ML (2005) Maintenance of the LDL Cholesterol:HDL Cholesterol Ratio in an Elderly Population Given a Dietary Cholesterol Challenge. *J. Nutr.* 135, 2793-2798.
- Grundey SM (1998) Hypertriglyceridemia, atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol.* 81, 18B-25B. Review.
- Guarneri F, Guarneri C, Benvenega S (2005) Identification of potentially cross-reactive peanut-lupine proteins by computer-assisted search for amino acid sequence homology. *Int Arch Allergy Immunol.* 138, 273-7.
- Hampton R, Dimster-Denk D, Rine J.(1996) The biology of HMG-CoA reductase: the pros of contra-regulation. *Trends Biochem Sci.* 21, 140-5. Review.
- Hara A & Radin NS (1978) Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. *Anal Biochem* 90, 420-426.
- Hartmann R, Meisel H (2007) Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Curr Opin Biotechnol.* 18, 163-9. Review.
- Hartmuth-Hoene (1988) Einfluss der Keimung auf die Proteinqualität von Weizen und Mungobohnen – Stickstoffbilanzversuche an wachsenden Ratten. *Z. Ernährungswiss.* 27, 40-47.
- Henle T, Zehetner G, Klostermeyer H (1995) Fast and sensitive determination of furosine. *Z Lebensm Unters Forsch.* 200, 235-7.
- Hermansen K, Søndergaard M, Høie L, Carstensen M, Brock B (2001) Beneficial effects of a soy-based dietary supplement on lipid levels and cardiovascular risk markers in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care.* 24, 228-33.
- Higaki N, Sato K, Suda H, Suzuka T, Komori T, Saeki T, Nakamura Y, Ohtsuki K, Iwami K, Kanamoto R (2006) Evidence for the existence of a soybean resistant protein that captures bile acid and stimulates its fecal excretion. *Biosci Biotechnol Biochem.* 70, 2844-52.
- Høie LH, Morgenstern EC, Gruenwald J, Graubaum HJ, Busch R, Lüder W, Zunft HJ (2005) A double-blind placebo-controlled clinical trial compares the cholesterol-lowering effects of two different soy protein preparations in hypercholesterolemic subjects. *Eur J Nutr.* 44, 65-71.
- Horton JD & Shimomura I (1999) Sterol regulatory element-binding proteins: activators of cholesterol and fatty acid biosynthesis. *Curr Opin Lipidol* 10, 143-150.
- Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W (2004) The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab.* 6, 120-6.

- Hudgins LC, Hellerstein MK, Seidman C, Neese R, Diakun J, Hirsh J (1996) Human fatty synthesis is stimulated by a eucaloric low fat high carbohydrate diet. *J. Clin. Invest.* 98, 2081–2091.
- Iritani N, Hosomi H, Fukuda H, Tada K & Ikeda H (1996) Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in Wistar fatty rats. *J Nutr* 126, 380-388.
- Jacobson TA, Miller M, Schaefer EJ (2007) Hypertriglyceridemia and cardiovascular risk reduction. *Clin Ther.* 29, 763-77. Review.
- Jäger L., Wüthrich B. (2002) *Nahrungsmittelallergien und –intoleranzen*, Urban und Fischer, 2.Auflage, Kap. 3.2.3., S. 12.
- Jeon H, Blacklow SC(2005) Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem.* 74, 535-62. Review.
- Jump DB, Botolin D, Wang Y, Xu J, Christian B, Demeure O (2005) Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *J Nutr.* 135, 2503-6.
- Katagiri Y, Ibrahim RK, Tahara S (2000) HPLC analysis of white lupin isoflavonoids. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 1118-25.
- Kelley GL, Allan G, Azhar S (2003) High Dietary Fructose Induces a Hepatic Stress Response Resulting in Cholesterol and Lipid Dysregulation. *Endocrinology* 145, 548–555.
- Kersten S (2001) Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep.* 21, 282–286.
- Kim H, Takahashi M, Ezaki O (1999) Fish oil feeding decreases mature SREBP-1c by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mRNAs. *J. Biol. Chem.* 274, 25892–25898.
- Kiris S (2006) *Die tiermedizinische Fachangestellte*. Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co.
- Kirk EA, Sutherland P, Wang SA, Chait A, LeBoeuf RC (1998) Dietary isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr.* 128, 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 (2003) Effect of phytate in soy protein on the serum and liver cholesterol levels and fatty acid profile in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 15-22.
- Kreuzer J, Tiefenbacher C (2003) *Atherosklerose, Taschenatlas spezial*. Thieme Verlag.
- Kritchevsky D, Tepper SA, Czarnecki SK, Klurfeld DM (1982) Atherogenicity of animal and vegetable protein. Influence of the lysine to arginine ratio. *Atherosclerosis.* 41, 429-31.

- Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL (2006) Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 113, 3099-104.
- Laufs U, Donner-Banzhoff N, Popert U (2004) Lipidsenkung mit Statinen: Titration oder feste Dosis. *Dtsch Arztebl* 101(23).
- Lavau M, Fried SK, Susini C, Freychet P (1979) Mechanism of insulin resistance in adipocytes of rats fed a high-fat diet. *J Lipid Res.* 20, 8-16.
- Lê KA, Faeh D, Stettler R, Ith M, Kreis R, Vermathen P, Boesch C, Ravussin E, Tappy L (2006) A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. *Am J Clin Nutr* 84, 1374-9.
- Lê KA, Tappy L. (2006) Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 9, 469-75. Review.
- Leduc V, Moneret-Vautrin DA, Guérin L (2002) Allergenicity of lupin flour. *Allerg Immunol* 34, 213-7.
- Lengauer E. <http://www.landwirtschaftundleben.at/downloads/lehrbrief3.3.8.pdf>
- Leppänen P, Luoma JS, Hofker MH, Havekes LM, Ylä-Herttuala S (1998) Characterization of atherosclerotic lesions in apo E3-leiden transgenic mice. *Atherosclerosis* 136, 147-52.
- Letexier D, Pinteur C, Large V, Fréring V, Beylot M (2003) Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *J Lipid Res.* 44, 2127-34.
- Levander O.A, Deloach D.P., Morris V.C. Moser A.B (1983) Platelet Glutathione Peroxidase Activity As an Index of Selenium Status in Rats. *J. Nutr.* 113, 55-63.
- Lichtenstein AH, Jalbert SM, Adlercreutz H, Goldin BR, Rasmussen H, Schaefer EJ, Ausman LM (2002) Lipoprotein response to diets high in soy or animal protein with and without isoflavones in moderately hypercholesterolemic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22, 1852-8.
- Lichtman AH, Clinton SK, Iiyama K, Connelly PW, Libby P, Cybulsky MI (1999) Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19, 1938-44.
- Lin CC, Yin MC (2008) Effects of cysteine-containing compounds on biosynthesis of triacylglycerol and cholesterol and anti-oxidative protection in liver from mice consuming a high-fat diet. *Br J Nutr.* 99, 37-43.
- Lin CC, Yin MC, Hsu CC, Lin MP (2004) Effect of five cysteine-containing compounds on three lipogenic enzymes in Balb/cA mice consuming a high saturated fat diet. *Lipids.* 39, 843-8.
- Ma Y, Chiriboga D, Olendzki BC, Nicolosi R, Merriam PA, Ockene IS (2005) Effect of soy protein containing isoflavones on blood lipids in moderately hypercholesterolemic adults: a randomized controlled trial. *J Am Coll Nutr.* 24, 275-85.

- Madani S, Lopez S, Blond JP, Prost J, Belleville J (1998) Highly purified soybean protein is not hypocholesterolemic in rats but stimulates cholesterol synthesis and excretion and reduces polyunsaturated fatty acid biosynthesis. *J Nutr.* 128, 1084-91.
- Magaña MM, Osborne TF (1996) Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J Biol Chem.* 271, 32689-94.
- Magni C, Sessa F, Accardo E, Vanoni M, Morazzoni P, Scarafoni A, Duranti M (2004) Conglutin gamma, a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. *J Nutr Biochem.* 15, 646-50. Review.
- Mahley RW (1988) Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 240, 622-30. Review.
- Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH (2006) Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *J Clin Invest.* 116, 1226-9.
- Marchesi M, Parolini C, Diani E, Rigamonti E, Cornelli L, Arnoldi A, Sirtori CR, Chiesa G. (2008) Hypolipidaemic and anti-atherosclerotic effects of lupin proteins in a rabbit model. *Br J Nutr.* 4, 1-4.
- Mariotti F, Pueyo ME, Tomé D, Mahé S (2002) 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 <sup>15</sup>N-labelled proteins. *Br J Nutr.* 87, 315-23.
- Martins JM, Riotta M, de Abreu MC, Viegas-Crespo AM, Lança MJ, Almeida JA, Freire JB, Bento OP (2005) Cholesterol-lowering effects of dietary blue lupin (*Lupinus angustifolius*) in intact and ileorectal anastomosed pigs. *L. Lipid Re.* 46, 1539-1547.
- Martins JM, Riottot M, de Abreu MC, Lança MJ, Viegas-Crespo AM, Almeida JA, Freire JB, Bento OP (2004) Dietary raw peas (*Pisum sativum* L.) reduce plasma total and LDL cholesterol and hepatic esterified cholesterol in intact and ileorectal anastomosed pigs fed cholesterol-rich diets. *J Nutr.* 134, 3305-12.
- Mawatari S, Ohnishi Y, Kaji Y, Maruyama T, Murakami K, Tsutsui K, Fujino T (2003) 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.* 67, 1457-64.
- Medh JD, Fry GL, Bowen SL, Ruben S, Wong H, Chappell DA (2000) Lipoprotein lipase- and hepatic triglyceride lipase- promoted very low density lipoprotein degradation proceeds via an apolipoprotein E-dependent mechanism. *J Lipid Res.* 41, 1858-71.
- Mellenthin O, Galensa R (1999) Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products. *J Agric Food Chem.* 47, 594-602.
- Mittendorfer B, Sidossis L (2001) Mechanism for the increase in plasma triacylglycerol concentrations after consumption of short-term high-carbohydrate diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 892-899.

- Moghadasian MH, McManus BM, Nguyen LB, Shefer S, Nadji M, Godin DV, Green TJ, Hill J, Yang Y, Scudamore CH, Frohlich JJ (2001) Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans. *FASEB J.* 15, 2623-30.
- Moghadasian MH, Nguyen LB, Shefer S, Salen G, Batta AK, Frohlich JJ (2001) Hepatic cholesterol and bile acid synthesis, low-density lipoprotein receptor function, and plasma and fecal sterol levels in mice: effects of apolipoprotein E deficiency and probucol or phytosterol treatment. *Metabolism.* 50, 708-14.
- Moneret-Vautrin DA, Guérin L, Kanny G, Flabbee J, Frémont S, Morisset M (1999) Cross-allergenicity of peanut and lupine: the risk of lupine allergy in patients allergic to peanuts. *J Allergy Clin Immunol.* 104, 883-8.
- Moriyama T, Kishimoto K, Nagai K, Urade R, Ogawa T, Utsumi S, Maruyama N, Maebuchi M (2004) Soybean beta-conglycinin diet suppresses serum triglyceride levels in normal and genetically obese mice by induction of beta-oxidation, downregulation of fatty acid synthase, and inhibition of triglyceride absorption. *Biosci Biotechnol Biochem.* 68, 352-9.
- Mosharov E, Cranford MR, Banerjee R (2000) The quantitatively important relationship between homocysteine metabolism and glutathione synthesis by the transsulfuration pathway and its regulation by redox changes. *Biochemistry* 39, 13005-11.
- Mueller MA, Beutner F, Teupser D, Ceglarek U, Thiery J (2008) Prevention of atherosclerosis by the mTOR inhibitor everolimus in LDLR(-/-) mice despite severe hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 198, 39-48.
- Mutungi G, Torres-Gonzalez M, McGrane MM, Volek JS, Fernandez ML (2007) Carbohydrate restriction and dietary cholesterol modulate the expression of HMG-CoA reductase and the LDL receptor in mononuclear cells from adult men. *Lipids Health Dis.* 28, 34.
- Muzquiz M, Pedrosa MM, Cuadrado C, Ayet G, Burbano C, Brenes A (1998) Variation of alkaloids, alkaloids esters, phytic acid and phytase activity in germinated seed of *Lupinus albus* and *L. luteus*. Recent Advances of Research in antinutritional Factors in Legumes Seeds and Rape Seeds. *EAAP Publication* 93, 387-390.
- Nagaoka S, Awano T, Nagata N, Masaoka M, Hori G, Hashimoto K (1997) Serum cholesterol reduction and cholesterol absorption inhibition in CaCo-2 cells by a soyprotein peptic hydrolyzate. *Biosci Biotechnol Biochem.* 61, 354-6.
- Nagaoka S, Miwa K, Eto M, Kuzuya Y, Hori G, Yamamoto K (1999) Soy protein peptic hydrolysate with bound phospholipids decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2 cells. *J Nutr.* 129, 1725-30.
- Nagarajan S, Burris RL, Stewart BW, Wilkerson JE, Badger TM (2008) Dietary soy protein isolate ameliorates atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice potentially by inhibiting monocyte chemoattractant protein-1 expression. *J Nutr.* 138, 332-7.
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* 14, 133-40.

- National Research Council (1995) Science and the Endangered Species Act. Washington, DC, *National Academy Press* 202 p.
- Naumann C & Basler R (1993) Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. *Methodenbuch Band III*. Darmstadt, VDLUFA-Verlag.
- Nehler MR, Taylor LM Jr, Porter JM (1997) Homocysteinemia as a risk factor for atherosclerosis: A Review. *Cardiovasc Surg.* 5, 559-67.
- Nepokroeff CM, Lakshmanan MR, Porter JW (1975) *Methods Enzymol.* 35, 37-44.
- Nicolosi RJ (1997) Dietary fat saturation effects on low-density-lipoprotein concentrations and metabolism in various animal models *Am J Clin Nutr.* 65(5 Suppl), 1617S-1627S.
- Norata GD, Marchesi P, Passamonti S, Pirillo A, Violi F, Catapano AL (2007) Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of catechin, caffeic acid and trans-resveratrol in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* 191, 265-71.
- Ntambi JM (1999) Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J Lipid Res.* 40, 1549-58.
- Ostlund RE Jr (2007) Phytosterols, cholesterol absorption and healthy diets. *Lipids* 42, 41-5. Review.
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70, 158-69.
- Palanisamy N, Viswanathan P, Anuradha CV (2008) Effect of genistein, a soy isoflavone, on whole body insulin sensitivity and renal damage induced by a high-fructose diet. *Ren Fail.* 30, 645-54.
- Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A (2007) N-acetylcysteine protects dental pulp stromal cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells. *Free Radic Biol Med.* 43, 1394-408.
- Petterson DS, Gladstones JS, Atkins CA, Hamblin J (1998) Composition and food uses of lupins. *Lupins as Crop Plants: Biology, Production, and Utilization*, CAB International, Wallingford, UK. 353-384.
- Pilvi TK, Jauhiainen T, Cheng ZJ, Mervaala EM, Vapaatalo H, Korpela R. (2006) Lupin protein attenuates the development of hypertension and normalises the vascular function of NaCl-loaded Goto-Kakizaki rats. *J Physiol Pharmacol.* 57, 167-76.
- Plat J, Mensink RP (2002) Effects of plant stanol esters on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells of healthy men and women. *FASEB J.* 16, 258-60.
- Potter SM. (1995) Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr.* 125, 606S-11S.

- Powell EE, Kroon PA (1994) Low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in human mononuclear leukocytes is regulated coordinately and parallels gene expression in human liver. *J Clin Invest.* 93, 2168-74.
- Puska P, Korpelainen V, Høie LH, Skovlund E, Lahti T, Smerud KT (2002) Soy in hypercholesterolaemia: a double-blind, placebo-controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 56, 352-7.
- Radcliffe M, Scadding G, Brown HM (2005) Lupin flour anaphylaxis. *Lancet.* 365, 1360.
- Rahma EH, Narasinga Rao MS (1984) Effect of debittering treatment on the composition and protein components of lupine seed (*Lupinus termis*) flour. *J. Agric. Food Chem.* 32, 1026–1030.
- Reeves PG, Nielsen FH & Fahey GC Jr (1993) AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr* 123, 1939-1951.
- Reynolds JL, Johannides AJ, Skepper JN, Mcnair R, Schurgers LJ, Proudfoot D, Jahnchen-Dechent W, Weissberg PL, Shanahan CM (2004) Human Vascular Smooth Muscle Cells Undergo Vesicle-Mediated Calcification in Response to Changes in Extracellular Calcium and Phosphate Concentrations: A Potential Mechanism for Accelerated Vascular Calcification in ESRD. *J Am Soc Nephrol* 15, 2857–2867.
- Riede UN, Schäfer HE (1994) *Allgemeine und spezielle Pathologie.* Thieme Verlag, Stuttgart. S. 438.
- Rohn S, Petzke KJ, Rawel HM, Kroll J (2006) Reactions of chlorogenic acid and quercetin with a soy protein isolate--influence on the in vivo food protein quality in rats. *Mol Nutr Food Res.* 50, 696-704.
- Rubio LA, Grant G, Scislawski PWO, Brown D, Bardocz S, Pusztai A. (1995) The Utilization of Lupin (*Lupinus angustifolius*) and Faba Bean Globulins by Rats Is Poorer than of Soybean Globulins or Lactalbumin but the Nutritional Value of Lupin Seed Meal Is lower only than That of Lactalbumin. *Am J Nutr* 2145 - 2155.
- Ruotolo G, Howard BV, Robbins DC (2003) *Dyslipidemia of Obesity*, Chapter 10 Endotext.com – Your Endocrine Source
- Sakakura Y, Shimano H, Sone H, Takahashi A, Inoue N, Toyoshima H, Suzuki S & Yamada N (2001) Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Comm* 286, 176-183.
- Salas-Salvadó J, Bulló M, Pérez-Heras A, Ros E (2006) Dietary fibre, nuts and cardiovascular diseases. *Br J Nutr.* 96 Suppl 2:S46-51. Erratum in: *Br J Nutr.* 2008 99, 447-8. Review.
- Sanchez A, Hubbard RW (1991) Plasma amino acids and the insulin/glucagon ratio as an explanation for the dietary protein modulation of atherosclerosis. *Med Hypotheses.* 36, 27-32.
- Schuster D, Modi MW, Lalka D, Gengo FM (1988) Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay to quantitate diastereomeric derivatives of metoprolol enantiomers in plasma. *J Chromatogr* 433, 318-25.

- Schwandt P, Parhofer K (2006) *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen: Dyslipoproteinämien und Atherosklerose: Diagnostik, Therapie und Prävention*. Edition 3, Kapitel 5.2., Schattauer Verlag.
- Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hastry AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S & Yamada N (1999) Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem* 274, 35832-35839.
- Shrago E, Glennon J, Gordon E (1971) Comparative aspects of lipogenesis in mammalian tissues. *Metabolism*. 20, 54-62.
- Shukla A, Bettzieche A, Hirche F, Brandsch C, Stangl GI, Eder K (2006) Dietary fish protein alters blood lipid concentrations and hepatic genes involved in cholesterol homeostasis in the rat model. *Br J Nutr*. 96, 674-82.
- Shukla A, Brandsch C, Bettzieche A, Hirche F, Stangl GI & Eder K (2007) Isoflavone-poor soy protein alters the lipid metabolism of rats by SREBP-mediated down-regulation of hepatic genes. *J Nutr Biochem* 18, 313-321.
- Silbernagel S, Lang F (1998) *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Thieme Verlag.
- 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, 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, Moranti S, D'Agostina A & Arnoldi A (2004) Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. *J Nutr* 134, 18-23.
- Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Gianazza E, Bondioli A, Staels B & Auwerx J (1998) Reduction of serum cholesterol by soybean proteins: clinical experience and potential molecular mechanisms. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 8, 334-340.
- Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Monetti M, Pazzucconi F & Gatti E (1995) Soy and cholesterol reduction: clinical experience. *J Nutr* 125, 598S-605S.
- Spady DK, Cuthbert JA (1992) Regulation of hepatic sterol metabolism in the rat. Parallel regulation of activity and mRNA for 7 alpha-hydroxylase but not 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase or low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem*. 267, 5584-91.

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.

Stanhope KL, Havel PJ (2008) Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* 19, 16-24.

Stary HC (2000) Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20, 1177-8. Review.

Statistisches Bundesamt Deutschland (2008) 2007: Krankheiten des Herz/Kreislaufsystems weiterhin häufigste Todesursache, *Pressemitteilung* Nr.303.

Steinberg FM, Guthrie NL, Villablanca AC, Kumar K, Murray MJ (2003) Soy protein with isoflavones has favorable effects on endothelial function that are independent of lipid and antioxidant effects in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 78, 123-30.

Stoeckman AK, Towle HC (2002) The role of SREBP-1c in nutritional regulation of lipogenic enzyme gene expression. *J Biol Chem.* 277,27029-35.

Sung JH, Choi SJ, Lee SW, Park KH, Moon TW (2004) Isoflavones found in Korean soybean paste as 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase inhibitors. *Biosci Biotechnol Biochem* 68, 1051-8.

Susie A. Steitz, Mei Y. Speer, Gabrielle Curinga, Hsueh-Ying Yang, Paul Haynes, Ruedi Aebersold, Thorsten Schinke, Gerard Karsenty, Cecilia M. Giachelli (2001) Smooth Muscle Cell Phenotypic Transition Associated With Calcification - Upregulation of Cbfa1 and Downregulation of Smooth Muscle Lineage Markers. *Circ Res.* 89, 1147-1154.

Swierczynski J, Goyke E, Wach L, Pankiewicz A, Kochan Z, Adamonis W, Sledzinski Z, Aleksandrowicz Z (2000) Comparative study of the lipogenic potential of human and rat adipose tissue. *Metabolism.* 49, 594-599.

Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W (1995) Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res.* 36, 2320-8.

Teixeira SR, Potter SM, Weigel R, Hannum S, Erdman JW Jr, Hasler CM (2000) Effects of feeding 4 levels of soy protein for 3 and 6 wk on blood lipids and apolipoproteins in moderately hypercholesterolemic men. *Am J Clin Nutr.* 71, 1077-84.

Terrlink T, van Leeuwen PA, Houdijk A (1994) Plasma amino acids determined by liquid chromatography within 17 minutes. *Clinical Chemistry* 40, 245-249.

- Teupser D, Persky AD, Breslow JL (2003) Induction of atherosclerosis by low-fat, semisynthetic diets in LDL receptor-deficient C57BL/6J and FVB/NJ mice: comparison of lesions of the aortic root, brachiocephalic artery, and whole aorta (en face measurement). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23, 1907-13.
- Tonstad S, Smerud K, Høie L (2002) A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr.* 76, 78-84.
- Tovar AR, Murguía F, Cruz C, Hernández-Pando R, Aguilar-Salinas CA, Pedraza-Chaverri J, Correa-Rotter R & Torres N (2002) A soy protein diet alters hepatic lipid metabolism gene expression and reduces serum lipids and renal fibrogenic cytokines in rats with chronic nephritic syndrome. *J Nutr* 132, 2562-2569.
- Tsutsumi K, Hagi A, Inoue Y (2001) The relationship between plasma high density lipoprotein cholesterol levels and cholesteryl ester transfer protein activity in six species of healthy experimental animals. *Biol Pharm Bull.* 24, 579-81.
- Ueshima K, Akihisa-Umeno H, Nagayoshi A, Takakura S, Matsuo M, Mutoh S (2005) Implitapide, 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.* 28, 247-52.
- Uyeda, K, Yamashita H, Kawaguchi T (2002) Carbohydrate responsive element-binding protein (ChREBP): a key regulator of glucose metabolism and fat storage. *Biochem. Pharm.* 63, 2075–2080.
- Vallett SM, Sanchez HB, Rosenfeld JM, Osborne TF (1996) A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J Biol Chem.* 271, 12247-53.
- van Barneveld RJ (1999) Understanding the nutritional chemistry of lupin ( *Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. *Nutr Res Rev.* 12, 203-30.
- van der Poel, A.F.B., Huisman, J. & Saini, H. S. (ed.) (1993) *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*. Wageningen, Netherlands.
- Van Eck M, Bos IS, Hildebrand RB, Van Rij BT, Van Berkel TJ (2004) Dual role for scavenger receptor class B, type I on bone marrow-derived cells in atherosclerotic lesion development. *Am J Pathol.* 165, 785-94.
- Velasquez MT, Bhathena SJ (2007) Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci.* 4, 72-82. Review.
- Vengrenyuk Y, Carlier S, Xanthos S, Cardoso L, Ganatos P, Virmani R, Einav S, Gilchrist L, Weinbaum S (2006) A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 14678-83.
- Vester B, Rasmussen K. (1991) High performance liquid chromatography method for rapid and accurate determination of homocysteine in plasma and serum. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 29, 549-54.

- Vidon C, Boucher P, Cachefo A, Peroni O, Diraison F, Beylot M (2001) Effects of isoenergetic high-carbohydrate compared with high-fat diets on human cholesterol synthesis and expression of key genes of cholesterol metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 73, 878–884.
- Villeneuve N, Fortuno A, Sauvage M, Fournier N, Breugnot C, Jacquemin C, Petit C, Gosgnach W, Carpentier N, Vanhoutte P, Vilaine JP (2003) Persistence of the nitric oxide pathway in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein-E-deficient mice. *J Vasc Res.* 40, 87-96.
- Virmani R, Burke AP, Kolodgie FD, Farb A (2003) Pathology of the thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque. *J Interv Cardiol.* 16, 267-72.
- Viveros A, Centeno C, Arija I, Brenes A (2007) Cholesterol-lowering effects of dietary lupin (*Lupinus albus* var *multolupa*) in chicken diets. *Poult Sci.* 86, 2631-8.
- Wait R, Gianazza E, Brambilla D, Eberini I, Morandi S, Arnoldi A & Sirtori CR (2005) Analysis of *Lupinus albus* storage proteins by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 53, 4599-4606.
- Wang WJ, Baez JM, Maurer R, Dansky HM, Cohen DE (2006) Homozygous disruption of *Pctp* modulates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res.* 47, 2400-7.
- Wäsche A, Müller K, Knauf U (2001) New processing of lupin protein isolates and functional properties. *Nahrung* 45, 393-395.
- Welch AA, Bingham SA, Ive J, Friesen MD, Wareham NJ, Riboli E, Khaw KT (2006) Dietary fish intake and plasma phospholipid n-3 polyunsaturated fatty acid concentrations in men and women in the European Prospective Investigation into Cancer-Norfolk United Kingdom cohort. *Am J Clin Nutr.* 84, 1330-9.
- Welch GN, Loscalzo J (1998) Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 338, 1042-50. Review.
- Wiseman J, Cole D.J.A (1988) European legumes in diets for non-ruminants. *Recent-Adv-Anim-Nutr.* 13-37.
- Yamada M, Kojima N, Att W, Hori N, Suzuki T, Ogawa T (2009) N-Acetyl cysteine restores viability and function of rat odontoblast-like cells impaired by polymethylmethacrylate dental resin extract. *Redox Rep.* 14, 13-22.
- Yuan G, Al-Shali KZ, Hegele RA (2007) Hypertriglyceridemia: its etiology, effects and treatment. *CMAJ.* 176, 1113-20. Review.
- Zavaroni I, Chen YD, Reaven GM (1982) Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism.* 31, 1077-83.
- Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992) Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 258, 468-71.

*Anhang 1: Probandeninformationsblatt***MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT  
HALLE-WITTENBERG**

Naturwissenschaftliche Fakultät III  
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
Professur für Humanernährung

**Probandeninformation für die Teilnehmer der Studie:****„Einfluss von Lupinenprotein auf die Konzentration von Lipiden im Plasma  
beim Menschen“**

Im Rahmen dieser Studie soll die Wirkung von verzehrtem Lupineneiweiß (Protein) auf die Blutfettwerte beim Menschen untersucht werden. Von besonderem Interesse sind die Konzentrationen von Cholesterin und Triglyceriden im Plasma. Lupineneiweiß aus Samen der nahezu bitterstofffreien Süßlupine ist unbedenklich und wird bereits seit vielen Jahren in der menschlichen Ernährung eingesetzt. Es gibt erste wissenschaftliche Hinweise, wonach sich Lupineneiweiß als Bestandteil funktioneller Lebensmittel zur Senkung des Cholesterinspiegels hervorragend eignen würde.

Das zu testende Eiweiß wird als Bestandteil eines Riegels aufgenommen werden. Untersuchungen des Blutes während und nach der Aufnahme des Lupineneiweißes sollen Aufschluss über mögliche Blutfett-senkende Effekte aufzeigen. Das Forschungsvorhaben wird vom Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit gefördert. Die Ethikkommission hat diesem Forschungsvorhaben zugestimmt.

**Studienablauf**

Vor der Studie wurden bereits allgemeine Daten über Ihren Gesundheitsstatus, Ihre Ernährungsgewohnheiten und Ihren Lebensstil erfasst („Screeningfragebogen“). Die eigentliche Studie wird insgesamt ca. 8 Wochen dauern. Während der 10-tägigen Eingewöhnungsphase werden Sie gebeten, 2-mal täglich einen noch eiweißfreien Riegel („Leer-Riegel“) zu verzehren, sowie 3 Tage lang ein **Ernährungsprotokoll** zu erstellen, damit wir Ihre tägliche Nährstoffzufuhr abschätzen können. In der sich anschließenden 6-wöchigen Testphase werden Sie gebeten, **2 mal täglich einen Testriegel mit Eiweiß** (insgesamt 35 g) zu verzehren. Optimal wäre es, wenn Sie die Riegel jeweils vormittags und nachmittags anstelle einer kleinen Zwischenmahlzeit verzehren. (Ein Riegel hat etwa die Kalorien einer Banane). Die gewohnte Ernährung sollte ansonsten beibehalten werden. Auch eine Änderung der Lebensgewohnheiten ist nicht erforderlich. Während dieser Testphase sind 4 Blutentnahmen in 14-tägigem Abstand vorgesehen (jeweils 2 x 9 ml). Eine fünfte Blutabnahme (ebenfalls 2 x 9 ml) soll etwa 4-5 Wochen nach Abschluss der Testphase erfolgen. Die genauen Termine entnehmen Sie bitte dem **Terminplan**.

### **Blutabnahmen und Messparameter**

Die Blutabnahmen erfolgen am Universitätsklinikum Kröllwitz in Halle/Saale (Blutspendedienst). Sie werden gebeten, zu den Blutabnahmen nüchtern (**12 Stunden vor Blutabnahme kein Nahrungsmittelverzehr und keine gesüßten Getränke; Wasser darf aufgenommen werden**) zu erscheinen.

Im Blut sollen folgende klinisch-chemischen Parameter untersucht werden:

- Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen in Plasma und Lipoproteinfraktionen
- Konzentration von Apolipoproteinen (Apo A1, Apo AIV, Apo AV, Apo E, Apo B100) und Lp(a)
- Konzentration von Homocystein, asymmetrischem Dimethylarginin (ADMA), Folsäure, Aminosäuren
- Konzentration von Cholesterinester-Transferprotein, Adiponektin, Resistin, TNFalpha, Endothelin
- Nüchternglucose, basale Insulinkonzentration, C-reaktives Protein, Fibrinogen, IgE
- LDL-Rezeptordichte der Monozyten
- mRNA-Konzentrationen des LDL-Rezeptors und der HMG-CoA-Reduktase in den Monozyten

Nach abgeschlossener Analyse der oben genannten Blutparameter werden die restlichen Blutproben sachgerecht entsorgt. Eine kommerzielle Nutzung der Blutproben wird ausgeschlossen.

### **Risiken bei der Blutentnahme**

Eine absolute Risikofreiheit kann kein Arzt für seine Maßnahmen garantieren. Wird nach dem Entfernen der Nadel die Einstichstelle nicht ausreichend fest oder lange genug komprimiert (gedrückt), so kann es zu einer leichten Nachblutung und einem Bluterguss kommen. Im Bereich der Einstichstelle und/oder deren Umgebung kann es zu lokalen Infektionen kommen, welche sich im ungünstigsten Fall ausbreiten können. Missempfindungen im Bereich der Einstichstelle durch ungewollte Verletzung von Hautnerven sind in sehr seltenen Fällen möglich.

### **Mögliche Nebenwirkungen und Komplikationen**

Eiweiße aus der Süßlupine sind ungiftig (ähnliche Zusammensetzung wie Erbseneiweiß). Für Lupineneiweiß sind allerdings Kreuzallergien mit Erdnüssen und Sojaprotein bekannt. Bei einer bekannten Allergie oder dem begründeten Verdacht auf eine Allergie gegen Erdnuss oder Soja ist eine Teilnahme an unserer Studie nicht möglich. Wir möchten Sie außerdem bitten, während der Testphase Angaben über ihr allgemeines Wohlbefinden zu machen.

### **Auswertung der Daten**

Die im Rahmen der Studie gewonnenen Daten werden anonymisiert. Die Ergebnisse werden für Dritte unzugänglich aufbewahrt. Im Fall einer Publikation der Studienergebnisse kommen lediglich anonymisierte Daten (ohne Nennung des Namens und der Adresse) in Form von Mittelwerten zur Veröffentlichung (keine Einzeldaten).

### **Information über die Studienergebnisse**

Am Ende der Studie haben Sie die Gelegenheit, die Studienergebnisse einzusehen. Wir werden hierzu eine Informationsveranstaltung organisieren. Die Teilnahme ist selbstverständlich freiwillig. Sie haben außerdem die Möglichkeit, Ihre individuellen Daten im persönlichen Gespräch zu erfahren. Sollte es gewünscht sein, wird das Team der Arbeitsgruppe „Humanernährung“ auch kostenlos persönliche Ernährungstipps geben.

### **Aufwandsentschädigung**

Am Ende der Studie wird nach Teilnahme an allen Untersuchungen eine Aufwandsentschädigung von 100,- € gezahlt. Die Riegel mit dem zu testenden Eiweiß bekommen sie von uns. Während der Teilnahme an der Studie sind sie über eine Probandenversicherung und eine Wegeunfallversicherung abgesichert.

**Widerruf des Einverständnisses**

Der Widerruf des Einverständnisses zur Teilnahme an dieser Studie ist jederzeit möglich, ohne dass dadurch Nachteile für die Probanden entstehen.

**Verantwortlicher Leiter**

Frau Prof. Dr. Gabriele Stangl  
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
06108 Halle/Saale, Emil-Abderhalden-Straße 26  
Tel.-Nr.: (0345) 55 22 707

**Kontaktperson**

Frau Dr. Corinna Brandsch  
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
06108 Halle/Saale, Emil-Abderhalden-Straße 26  
Tel.-Nr.: (0345) 55 22 723

*Anhang2: Einverständniserklärung***MARTIN-LUTHER-UNIVERSITÄT  
HALLE-WITTENBERG**

Naturwissenschaftliche Fakultät III  
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
Professur für Humanernährung



## Einverständniserklärung

Hiermit erkläre ich \_\_\_\_\_ (Name) mich einverstanden, an einer klinischen Studie mit dem Titel „Einfluss von Lupinenprotein auf die Konzentration von Lipiden im Plasma beim Menschen“ teilzunehmen. Mir ist bekannt, dass die Teilnahme an dieser Studie freiwillig ist.

Ich wurde über Ziel und Ablauf der Studie mündlich und schriftlich informiert. Mir wurde erklärt, dass ich dazu 42 Tage lang täglich 35 g einer Eiweißprobe in 2 Gaben zu mir nehmen muss. Ich erkläre mich bereit, 5 Blutabnahmen durchführen zu lassen und hierzu jeweils nüchtern zu erscheinen: Zu Beginn der Studie am Tag 0, am Tag 14, am Tag 28, nach der letzten Proteineinnahme am Tag 42 sowie nach einer 4-wöchigen Run-out-Phase. Ich bin mit den venösen Blutabnahmen zu je 2 x 9 ml einverstanden. Über die bei der Blutabnahme bestehenden, nach der allgemeinen Erfahrung sehr seltenen Risiken, wurde ich aufgeklärt.

Ich bin mit der Bestimmung von klinisch-chemischen Parametern in meinem Blut und der Erfassung bzw. der anonymisierten Auswertung meiner Daten einverstanden.

Ich erkläre mich bereit, Fragebögen über Ernährungsgewohnheiten, Lebensstil und Gesundheitszustand auszufüllen sowie über 3 Tage ein Ernährungsprotokoll zu führen.

Mir ist bekannt, dass ich ohne Angaben von Gründen mein Einverständnis zur Teilnahme an dieser Studie widerrufen kann, ohne dass dadurch Nachteile für mich entstehen.

Datum: \_\_\_\_\_

Unterschrift: \_\_\_\_\_

## Anhang 3: Screeningfragebogen

# Screeningfragebogen

<p>1, <b>Name:</b>..... <b>Vorname:</b>.....</p> <p><b>Vorläufige Probandennummer:</b> □□□</p>
<p>2, <b>Geburtsdatum:</b> □□ □□ 19□□</p> <p><b>Geschlecht:</b> männlich <input type="checkbox"/> weiblich <input type="checkbox"/></p>
<p>3, <b>Sind Sie bereit, an unserer Studie teilzunehmen (5-malige Blutabnahme (nüchtern!), täglicher Verzehr des Proteins über 6 Wochen)?</b></p> <p>ja,.....<input type="checkbox"/>      nein,.....<input type="checkbox"/></p>
<p>4, <b>Gibt es einen Zeitraum, in dem bei Ihnen die Blutabnahmen nicht möglich sein werden (z.B. Urlaub)?</b></p> <p>ja,.....<input type="checkbox"/>      und zwar vom.....bis.....</p> <p>nein,.....<input type="checkbox"/></p>
<p>5, <b>Falls Sie während der 6-wöchigen Studie verreisen, wären Sie bereit, das von uns bereitgestellte Protein auch im Urlaub zweimal täglich zu verzehren?</b></p> <p>ja,.....<input type="checkbox"/>      nein,.....<input type="checkbox"/></p>
<p>6, <b>Wären Sie bereit, während der 6-wöchigen Studie auf Blutfett-senkende Nahrungsergänzungsmittel wie Becel pro-aktiv Produkte, Sojaprodukte oder Fischölkapseln zu verzichten? (Verzicht ist gewünscht)</b></p> <p>ja,.....<input type="checkbox"/>      nein,.....<input type="checkbox"/></p>
<p>7, <b>Spenden Sie regelmäßig Blut?</b></p> <p>ja,.....<input type="checkbox"/>      nein,.....<input type="checkbox"/></p> <p>Wenn ja, wann haben Sie das letzte Mal Blut gespendet? .....</p>



13, **Ernähren Sie sich streng vegetarisch (kein Fleisch, kein Fisch)?**



- nein (nie).....
- nein, aber ich esse selten Fleisch.....
- nein, aber ich esse nur Fisch und kein Fleisch.....
- ja (ich esse weder Fleisch noch Fisch).....

14, **Wie häufig nehmen Sie Sojaprodukte zu sich?**

z.B.: Sojabohnen/-sprossen, Sojamehl/-flocken, Sojaeiweiß, Sojamilch/ -joghurt/ -desserts, Sojasoße, Sojaöl, Fleischersatz auf Sojabasis, Brotaufstriche auf Sojabasis, Tofu, ...

Produkt / Menge

- Sehr selten .....
- Etwa 3x im Monat.....
- Etwa 1x pro Woche.....
- Mehrmals pro Woche.....
- Täglich.....

15, **Nehmen Sie Becel pro-activ Produkte (z.B. Becel pro-activ Margarine/ Joghurtdrink) zu sich?**

ja.....      nein.....

Wenn ja, welches Produkt in welchen Mengen?.....

16, **Wie häufig nehmen Sie folgende Nahrungsergänzungsmittel oder Vitamin- und Mineralstoffsupplemente zu sich?**

	regelmäßig	gelegentlich	nie
Vitamin- und Mineralstoffpräparate	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pflanzliche Wirkstoffe	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ballaststoffpräparate	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Knoblauchkapseln	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fischölkapseln	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Andere, und zwar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

.....  
 Ich nehme keinerlei Supplemente.....

17, **Wie oft trinken Sie folgende alkoholische Getränke?**



	Bier	Wein, Sekt	Spirituosen
Sehr selten	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Etwa 3x im Monat	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Etwa 1x pro Woche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mehrmals pro Woche	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Täglich	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Mehrmals täglich	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

In welchen Mengen werden die Getränke verzehrt? .....

.....



## Anhang 4: Ernährungsprotokoll

Name: .....

Tag: .....

## 3-Tage-Ernährungsprotokol

Geführt vom:.....bis zum:..... 2007

Mahlzeit	Lebensmittel/Zutaten	Verzehrtc Menge	Bemerkungen
<b>Frühstück</b> 	Speisen:  Getränke:		
<b>Zwischenmahlzeit</b> 	Speisen:  Getränke:		
<b>Mittagessen</b> 	Speisen:  Getränke:		
<b>Nachmittagsimbiss</b> 	Speisen:  Getränke:		
<b>Abendessen</b> 	Speisen:  Getränke:		
<b>Spätimbiss</b> 	Speisen  Getränke		
<b>Nahrungsergänzungsmittel</b> 	Name, Hersteller	Einnahmehäufigkeit	Menge / Dosierung

<sup>s</sup>Abkürzungen: TL: Teelöffel; EL: Esslöffel; St: Stück; Sch: Scheibe

*Anhang 5: Anleitung zum Ernährungsprotokoll***Anleitung zum Ernährungsprotokoll**

**Liebe Studienteilnehmerin, lieber Studienteilnehmer,**

mit dem Ernährungsprotokoll möchten wir Ihre übliche Nährstoffzufuhr abschätzen. Hierfür bitten wir Sie, sämtliche Speisen und Getränke, die Sie an **3 aufeinander folgenden Tagen** aufnehmen zu erfassen. Bitte **ändern** Sie während dieser 3 Tage **nicht** Ihre **Ernährungsgewohnheiten** und schreiben Sie **vollständig und ehrlich alles** auf, was Sie verzehrt haben. Essen Sie die gewohnten Lebensmittel und die gewohnten Mengen.

**Bitte beachten Sie die folgenden Regeln:**

Schauen Sie sich zunächst das Musterprotokoll und dann das für Sie vorgesehene Ernährungsprotokoll in aller Ruhe an. Tragen Sie Ihren Verzehr vom 1. bis 3. Tag in die entsprechenden Spalten ein. Notieren Sie ebenfalls das Datum und den jeweiligen Wochentag. Damit Sie die verzehrten Lebensmittel nicht abwägen müssen, notieren Sie bitte die üblichen Portionsgrößen bzw. Haushaltsmaße (Scheibe, Esslöffel, Glas, g, ml, ...) gegebenenfalls mit Beschreibung (groß, klein ...). Hierfür können Sie die folgenden **Abkürzungen** verwenden:

- TL = Teelöffel, EL = Esslöffel, geh = gehäuft
- Sch = Scheibe, St = Stück (jeweils dick oder dünn, groß oder klein angeben)
- Port = Portion, Tab = Tablette
- steht bei EL bzw. TL nicht ausdrücklich "gehäuft", so ist ein gestrichener Löffel gemeint
- Gläser: klein = ca. 150 ml, mittel = ca. 200 ml, groß = ca. 250 ml
- Tassen: klein, groß

Unter Bemerkungen können Sie gegebenenfalls den **Zustand** des verzehrten Lebensmittels näher beschreiben:

frisch/roh	gegart
tiefgefroren	gebacken/gebraten (Ofen)
getrocknet	gegrillt/getoastet
eingeweckt	frittiert
konserviert	gebraten (Pfanne)
gedünstet	gekocht/gedämpft

Bei **selbst zubereiteten Speisen** tragen Sie alle **Zutaten einzeln** ein. Kochen Sie für mehrere Personen, teilen Sie die Zutatenmenge und schreiben die **Ihnen zukommende Menge** auf.

In **Kantinen, Restaurants** u. ä. schätzen Sie so gut wie möglich die Speisenzusammensetzung ab. Fragen Sie evt. den Koch oder die Bedienung. Achten Sie auch auf Saucen, Aufstrich, Panade u.a.

**Es ist wichtig alle Lebensmittel möglichst genau zu bezeichnen!**

**Getränke:**

Fruchtgetränke werden nach Saft, Nektar und Saftgetränke unterschieden.

*Bsp.:* Apfelsaftschorle = 50% Mineralwasser + 50% Apfelsaft

**Alkohol:**

Rotwein (z.B. trocken), Cocktail, Longdrink (Name), Pflaumenschnaps 40% Alk., Branntweine

*Bsp.:* Campari - Orange = die entsprechenden Mengen Likör und Fruchtsaft notieren

Radler = die entsprechenden Mengen Limonade und Bier notieren

**Getreideprodukte:**

*Bsp.:* Nudeln (gekocht), Vollkornnudeln, Reis (gedünstet), Fertigmüsli, Frischkornmüsli mit frisch geschrotetem Getreide...

**Brot und Backwaren:**

*Bsp.:* Vollkornbrot, Mehrkornbrot, Schrotbrot, Mischbrot, Weißbrot, Vollkornbrötchen, Schrotbrötchen...

Kuchen (Rührkuchen, Hefestreuselkuchen mit Obst...), Torte (Buttercremetorte, Erdbeertorte...)

**Fisch, Fischerzeugnisse, Meeresfrüchte:**

*Bsp.:* Meereswasserfisch, Süßwasserfisch (mager, mittelfett oder fett, gebraten, paniert), Fischkonserven

**Fleisch, Fleischerzeugnisse, Wurstwaren:**

*Bsp.:* Rindfleisch (mager, geschmort), Schweinschnitzel (halbfett, paniert, gebraten), Schinken (gekocht oder geräuchert)

*Bsp.:* Hackfleisch: einzutragen als Schweinefleisch (fett) oder Rindfleisch (fett) oder Schweine- und Rindfleisch zu gleichen Teilen, wenn es sich um gemischtes Hackfleisch handelt

**Käse:**

Man unterscheidet folgende Käse-Gruppen: Hartkäse, Schnittkäse, Weichkäse, Frischkäse, Sauermilchkäse. Schauen Sie auf der Käseverpackung bzw. an der Käsetheke nach, welchen Fettgehalt Ihr Käse hat oder fragen Sie den/die Verkäufer/in danach.

**Milch und Milcherzeugnisse:**

Vollmilch mit natürlichem Fettgehalt (mindestens 3,5 %) oder mit eingestelltem Fettgehalt (3,5 %), Teilentrahmte (fettarme) Milch, Entrahmte Milch, Buttermilch, Fettarmer Joghurt, Trinkmilch (Fettgehalt?). Achten sie beim Joghurt auf Fettgehalt (%) und Menge (125 g, 150 g, 175 g, 200 g, 250 g).

**Milch im Kaffee:**

Geben Sie Art (Kondensmilch...), Fettgehalt (z.B. 4,0%) und Menge (TL) der verwendeten Milch an

**Fett und Öle:**

Geben Sie bitte Art (z.B. Olivenöl, Margarine (halbfett), Butter) und Menge (TL, EL) des verwendeten Fettes/Öls an

**Soßen und Suppen:**

*Bsp.:* Bratensoßen gebunden, Holländische Soße, Essig-Öl-Salatsoße, Joghurtdressing, Klare Suppe, Eintopf, Cremesuppe

**Gemüse und Obst:**

*Bsp.:* Bananen, Möhre (roh, groß, mittel oder klein), Erbsen (Feinfrost, gedünstet...)

**Sind Sie unsicher, so schauen Sie sich die Deklarationen auf den Verpackungen an oder fragen Sie Ihren Verkäufer. Falls beim Ausfüllen des Protokolls Fragen oder Unsicherheiten auftreten, stehen wir Ihnen gerne zur Verfügung. Rufen Sie uns an: Tel.: 0345 /55 22 729.**

## Anhang 6: Einzelmesswerte

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 Naturwissenschaftliche Fakultät III  
 Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften  
 Lehrstuhl für Humanernährung  
 Emil-Abderhalden-Str, 26  
 D-06108 Halle/Saale

## Ergebnisse der Humanstudie „Lupinenprotein“ – Einzelmesswerte

Name:.....

Probandennummer:.....

Parameter	1.Blutabnahme	4.Blutabnahme	5.Blutabnahme	Referenzbereich
<b>BMI</b> [kg/m <sup>2</sup> ]			-	s. Tabelle unten
<b>Gesamt-cholesterin</b> [mmol/l] [mg/dl]				< 5,2 < 200
<b>LDL-Cholesterin</b> [mmol/l] [mg/dl]				< 3,9 < 150
<b>HDL-Cholesterin</b> [mmol/l] [mg/dl]				>1,55 >60
<b>Gesamt-triglyceride</b> [mmol/l] [mg/dl]				< 1,7 <150
<b>Glukose</b> [mmol/l] [mg/dl]				< 6,1 <110
<b>Homocystein</b> [μmol/l]			-	< 15,0

- alle Blutabnahmen erfolgten nüchtern
- 1.Blutabnahme: Start der Interventionsphase
- 4.Blutabnahme: nach 6-wöchiger Interventionsphase
- 5.Blutabnahme: nach 4-wöchiger Wash-Out-Phase
- BMI = Body-Mass-Index: BMI =  $\frac{\text{Körpergewicht [kg]}}{(\text{Körpergröße [m]} \times \text{Körpergröße [m]})}$

BMI	
18 - 24,9	normalgewichtig
25 - 29,9	übergewichtig
ab 30	stark übergewichtig

**Lebenslauf**

---

Name: Weiße  
Vorname: Kristin Marion  
Geburtsdatum: 13.08.1982  
Geburtsort: in Leipzig

---

Schulausbildung: 1989/1992 87. Polytechnische Oberschule, Leipzig  
1992/1993 86. Grundschule, Leipzig  
1993/2001 Georg-Christoph-Lichtenberg-  
Schule/Gymnasium, Leipzig  
(mathematisch/naturwissenschaftliches Profil)  
Abitur 2001

---

Akademische Ausbildung: 2001/2006 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,  
Studium der Ernährungswissenschaften  
  
Diplomarbeit November 2005 - Juli 2006  
*„Experimentelle Studien zur Wirkung von exogen  
zugeführtem Homocystein auf den hepatischen  
Lipidstoffwechsel am Modelltier Ratte“*  
Diplom 2006  
  
2006/2008 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Promotionsstudium am Lehrstuhl für  
Humanernährung

---

**Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation „Experimentelle Studien zur Wirkung von Lupinenprotein (*L. angustifolius*) auf den Lipidstoffwechsel und die Atherogenese“ 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.

Halle/Saale, 05.05.2009

-----  
Kristin Weiße

### ***Danksagung***

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Klaus Eder danke ich für die sehr guten experimentellen Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Ernährungswissenschaften.

Frau Prof. Dr. Gabriele Stangl gilt mein aufrichtiger Dank für die Vergabe des interessanten Themas, die sehr gute Betreuung während meiner gesamten Doktorandenzeit, die anregenden Konsultationen, die angenehme Zusammenarbeit beim Schreiben der Veröffentlichungen, die konstruktiven Anregungen zur Dissertationsschrift sowie das stets offene Ohr bei Fragen und Problemen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Corinna Brandsch für die stets hilfsbereite, kompetente und herzliche Betreuung während meiner Doktorandentätigkeit. Ihre fachlichen Hilfestellungen bei den Experimenten, ihr kritisches Lesen sämtlicher Daten und Manuskripte sowie ihre aufmunternden Worte haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Die Übernahme von wochenendlichen Fütterungen der Mäuse sowie die hilfreiche Organisation und Beteiligung an den „Probenahmen“ sollen nicht unerwähnt bleiben. Vielen lieben Dank.

Herrn Dr. Frank Hirche danke ich sehr für die fachlichen Anleitungen sowie die geduldigen und konstruktiven Hilfestellungen an der HPLC.

Herrn Dr. Holger Kluge gilt der Dank für die angenehme und hilfsbereite Betreuung bei der Durchführung des Schweine-Versuches.

Des Weiteren danke ich Frau Ingeburg Kaiser und Frau Almute Schibelius-Assmann für Tipps und Tricks zum praktischen Laboralltag und der stets helfenden Hand bei den Analysen. Frau Ingeborg Günther danke ich für die Messungen der Aminosäurekonzentrationen in Proteinen und Diäten.

Herrn Dr. Rene Schmidt und Frau Elke Gebauer vom Institut für Tierzucht der Martin-Luther-Universität gilt mein herzlicher Dank für die überaus engagierten Hilfen beim Anfertigen und

## Danksagung

---

Färben der histologischen Schnitte sowie der einen oder anderen Aufmunterung an schlechten Histo-Tagen.

Außerdem danke ich Frau Doris Ludwig und Herrn Dr. Frank Beutner vom Institut für Klinische Chemie in Leipzig für die Hilfen zur Methodik der Probennahmen und den mikroskopischen Präparationen im knockout-Versuch.

Frau Dr. Petra Pavel und Frau Karin Richter vom Blutspendedienst des Universitätsklinikums der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg gilt der Dank für die Bereitstellung der Räumlichkeiten sowie der Hilfe bei den Blutabnahmen während der Humanstudie.

Anja Bettzieche, Maren Fischer und Anke Gutgesell danke ich für die schöne, erfahrungsreiche, gemeinsame Doktorandenzeit mit vielen kleinen und großen Motivationsschüben, ohne die so manche Analyse nicht möglich gewesen wäre.

Den Diplomandinnen Kathleen Hofmann, Germaine Nkengfack, Bianca Zernsdorf, Diana Kappis und Sandra Struzyna danke ich für die motivierte Beteiligung bei der Durchführung und Bearbeitung der Versuche.

Dem Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik in Freising danke ich für die Isolation und Aufbereitung aller Proteinisolate sowie für die Herstellung der Riegel der Humanstudie.

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

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Freund bedanken, die mir während der gesamten Zeit stets unterstützend, motivierend und aufmunternd zur Seite gestanden haben. Jetzt ist es geschafft!