

Aus der Medizinischen Klinik für Endokrinologie und
Stoffwechselmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Einfluss einer Proteinreichen versus
Ballaststoffreichen Ernährungsintervention auf die Prävention
des metabolischen Syndroms über den mTOR-Signalweg**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Friederike Müller

aus Freiburg im Breisgau

Datum der Promotion 21.06.2020

Vorwort

Die vorliegende Doktorarbeit entstand innerhalb der BMBF- geförderten Studie „PROFIMET – Protein, fibre, metabolic syndrome“, Principal investigator Prof. Dr. med. Martin O. Weickert, im Deutschen Institut für Ernährungsforschung – Potsdam Rehbrücke (DIfE) sowie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik für Endokrinologie und Stoffwechselmedizin unter Leitung von Prof. Dr. med. Andreas F.H. Pfeiffer.

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht und in dieser Arbeit zitiert unter:

Weickert MO, Roden M, Isken F, Hoffmann D, Nowotny P, Osterhoff M, Blaut M, Alpert C, Gögebakan O, Bumke-Vogt C, Mueller F, Machann J, Barber TM, Petzke KJ, Hierholzer J, Hornemann S, Kruse M, Illner AK, Kohl A, Loeffelholz CV, Arafat AM, Möhlig M, Pfeiffer AF (2011). Effects of supplemented isoenergetic diets differing in cereal fiber and protein content on insulin sensitivity in overweight humans. *Am J Clin Nutr*, Aug, pp. 459-71.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Zusammenfassung	7
2. Einleitung	9
2.1 Molekularer Pathomechanismus der Insulinresistenz	13
2.2 Der mTOR-Signalweg	13
2.2.1 Die p70S6 Kinase	16
2.2.2 AKT/ Proteinkinase B	17
2.2.3 Entstehung der Insulinresistenz im Kontext des mTOR-Signalwegs	17
2.2.4 Das human vacuolar protein sorting (hVps34) als Komponente des mTOR-Signalwegs	17
2.2.5 Der Einfluss von Sirtuin 1 auf die Insulinsensitivität	18
2.3 Einfluss der Ernährung auf die Insulinresistenz und den mTOR Signalweg	19
2.4 Auswirkung von Nahrungsinterventionen auf klinische und molekulare Parameter	21
2.5 Ziel der PROFIMET-Studie	22
3. Material und Methoden	24
3.1 Ethik	24
3.2 Rekrutierung der Probanden und die Studienkriterien	24
3.3 Ablauf der Studie	24
3.4 Nahrungsintervention	26
3.4.1 Ernährungsberatung der Probanden und die Ernährungsprotokolle.	29
3.5 Dropouts während der Intervention.....	30
3.6 Analysen	30
3.7 Einhaltung der Interventionsvorgaben	31
3.8 Messung der hepatischen und der Ganzkörper-Insulinsensitivität .	..31
3.9 Messung der Körperzusammensetzung	33
3.10 Gewinnung des Materials zur molekularen Analyse	34
3.10.1 Entnahme der Fettbiopsie	34
3.10.2 Verwendete Materialien und Spülsbstanzen	34
3.10.3 Entnahme der Muskelbiopsien	34
3.11 Aufarbeitung des Biopsiematerials35

3.11.1	Testversuch mit getrennter zytoplasmatischer- und nukleärer Fraktion	35
3.11.2	Testversuch mit Benutzung verschiedener Homogenisatoren.....	38
3.11.3	Proteinextraktion mit RIPA-Puffer.....	39
3.11.4	Testversuche mit den Muskelbiopsien.....	41
3.11.5	Proteinextraktion der Muskelbiopsate mittels Kugelmühle.....	41
3.12	Proteinkonzentrationsmessung.....	41
3.13	SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese).....	43
3.14	Immunoblot mittels Transferkammer.....	46
3.15	Detektion und densitometrische Quantifizierung	48
3.16	Statistische Auswertung.....	49
4.	Resultate.....	50
4.1	Einhaltung der Diäten und Akzeptanz.....	50
4.2	Biomarker und Körperzusammensetzung.....	50
4.3	Blutparameter, Blutdruck, Anthropometrie.....	50
4.4	Ergebnisse der Nahrungsintervention auf die Insulinsensitivität.....	52
4.5	Ergebnisse der Laboranalyse.....	53
4.5.1	Mammalian target of rapamycin (mTOR).....	55
4.5.2	p70S6 Kinase 1 (S6K1).....	56
4.5.3	Proteinkinase B / AKT.....	58
4.5.4	Phosphorylierte Form der Proteinkinase B / AKT.....	59
4.5.5	Human vacuolar protein sorting 34 (hVps34).....	60
4.5.6	Sirtuin 1 (SIRT1).....	61
5.	Diskussion.....	62
6.	Literaturverzeichnis.....	71
I	Verwendete Abkürzungen.....	5
II	Abbildungsverzeichnis	79
III	Eidesstattliche Erklärung.....	81
IV	Anteilerklärung Publikation.....	82
V	Lebenslauf.....	83
VI	Liste der Publikationen.....	85
VII	Danksagung	87

I Verwendete Abkürzungen

ADP	Air displacement Plethysmography
AKT	synonym PKB (siehe dort)
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-activated protein kinase
ATP	Adenosintriphosphat
APS	Ammonpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
BMI	Body-mass-index
BLS	Bundeslebensmittelschlüssel
CID	Clinical investigation day
Cu	Kupfer
DGE	Deutschen Gesellschaft für Ernährung
DOB	Delta over baseline
DTT	Dithiothreitol
EHC	euglycemic-hyperinsulinemic Clamp
EPIC-NL	European prospective investigation into cancer and nutrition
FKBP12	FK 506-binding-protein
FFQ	Food Frequency Questionnaires
FoxO1	Forkhead box protein O1
GAP	GTPase activating protein
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBD	Global Burden of disease Study
GβL	G-protein β-subunit-like –protein
HbA1c	Hämoglobin A1c
HDL	High density Lipoprotein
HEAT	Huntington, EF3, A subunit of PP2A, TOR 1
HOMA-IR	Homeostatic model assessment of Insulin resistance
HRP	Horse-Radish-Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
hVps 34	human vacuolar protein sorting 34
INF	Glukoseinfusionsrate
IGF	Insulin-like growth factor
IRS	Insulin receptor substrate
kDa	Kilo Dalton
LKB1	Liver Kinase B1
MRT	Magnetresonanztomographie
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NF ^κ B	nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
PAL	physical activity level
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1

PGC 1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
PI3	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP 2	Phosphatidylinositol-4,5-phosphat
PIP 3	Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat
PKB	Proteinkinase B/synonym AKT
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Ptp 1B	protein-tyrosine phosphatase 1B
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raptor	Regulatory Associated Protein of mTOR
REE	Ruhe-Nüchtern-Grundumsatz (Resting energy expenditure)
Rheb	Ras homolog enriched in brain
Rictor	Insulinrezeptorsubstrat
RIPA-	Radioimmunoprecipitation assay
S6K1	p70S6Kinase 1
SC	space correction factor
SCFA	kurzkettige fäkale Fettsäuren (short-chain fatty acids)
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standardfehler des arithmetrischen Mittels
Ser 312	Serin 312
SIR 2	Silent information regulator 2
SIRT 1	Sirtuin 1
TBST	Tris-bufferd saline with Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TSC 1/2	Tuberous sclerosis factor 1 und 2
UCP2	Mitochondrial uncoupling protein 2
WC	Waist circumference
WHO	World health organization
WHR	Waist to hip ratio

1. Abstract

Eine Proteinreiche Ernährung kann die alimentär bedingte Entstehung einer Insulinresistenz begünstigen und das Risiko einen Typ 2 Diabetes mellitus zu entwickeln erhöhen. Der Pathomechanismus wird kontrovers diskutiert.

Angesichts der z.T. widersprüchlichen Ergebnisse aus bisher veröffentlichten klinischen und experimentellen Studien entwickelten wir ein Studiendesign, in dem erstmalig ein direkter Vergleich zwischen einer Proteinreichen Ernährung und einer vermehrten Ballaststoffzufuhr stattfand.

In der PROFIMET-Studie führten wir an 84 übergewichtigen/ adipösen Probanden eine Ernährungsintervention in einem RCT-Ansatz durch, bei der über einen Zeitraum von insgesamt 4,5 Monaten die Effekte einer Proteinreichen versus Ballaststoffreichen Diät, verglichen mit einer moderat Ballaststoff/Proteinreichen Diät und einer Kontrollgruppe, untersucht wurden. Primärer Endpunkt der Studie war die Beeinflussung der Ganzkörperinsulinsensitivität, gemessen mit der Goldstandardmethode, dem euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamp (EHC). Sekundäre Endpunkte waren weitere Faktoren, die zu einer veränderten Insulinsensitivität beitragen können, wie Körperfettzusammensetzung, Leberfettgehalt, Hormone, Adipokine sowie inflammatorische und metabolische Marker.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Analyse der molekularen Veränderungen im mTOR Signalweg (mTOR, p70S6K1, AKT, IRS 1, hVps34) anhand von Fettgewebsbiopsien in Relation zur klinisch gemessenen Insulinsensitivität. Des Weiteren wurde die Veränderung des Sirtuin 1 anhand von Skelettmuskelbiopsien mittels Western Blot analysiert.

Die Hypothese lautete, dass eine isoenergetische Hochproteindiät über einen Zeitraum von 18 Wochen zu einer Verschlechterung der klinisch gemessenen Insulinsensitivität führt und dies auf molekularer Ebene mit einer erhöhten Proteinexpression des mTOR und seiner nachgeschalteten Faktoren, insbesondere der S6K1, korreliert. Des Weiteren erwarteten wir eine Verringerung des SIRT 1 in der Hochproteindiätgruppe, als Zeichen einer Insulinresistenzentwicklung, und einen Anstieg des SIRT 1 bei der Hochballaststoffgruppe im Sinne einer Verbesserung der Insulinsensitivität.

Ergebnis: Es zeigte sich eine signifikant gebesserte Insulinsensitivität in der Ballaststoffgruppe im Vergleich mit der Hochproteingruppe ($p=0,008$). Dies spiegelte sich auch auf molekularer Ebene wider. Hier zeigte sich eine signifikante Erhöhung der S6K1

in der Hochproteingruppe nach 6 Wochen Intervention im Vergleich zur Ballaststoffgruppe. Das SIRT 1 in den Muskelbiopsien war nach der ersten Interventionsphase in der Mix-Gruppe signifikant erhöht. Beide Ergebnisse waren jedoch nach einer 12-wöchigen ad libitum Phase nur noch moderat verändert.

Schlussfolgerung: Eine supplementierte isoenergetisch geführte Ballaststoffreiche Ernährung führt nach einer Dauer von 6 Wochen zu einer Verbesserung der klinisch gemessenen Insulinsensitivität. Eine isoenergetische Hochproteindiät hingegen führt zu einer Insulinresistenz mit entsprechenden molekularen Veränderungen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen Ansätze einer möglichen präventiven Ernährungsform auf die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2, denen in weiteren Studien Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte.

Clinicaltrials.gov Identifier: NCT00579657

1.1. Abstract (english)

Protein-enriched diets can promote alimentary insulin resistance and increase the risk of developing type 2 diabetes mellitus. The pathomechanism is controversially discussed. In view of the partly contradictory results from published clinical and experimental studies, we developed a study design, which compares a protein-rich diet with increased dietary fibre intake.

In the PROFIMET-study we performed a dietary intervention (RCT) in 84 overweight/obese subjects over a period of 4.5 months to investigate the effects of a protein-enriched versus a fibre-enriched diet compared to a moderate fibre/protein-enriched diet versus control group. Primary endpoint of the study was whole-body insulin sensitivity as measured by the gold-standard method- euglycemic hyperinsulinemic clamp (EHC). Secondary endpoints were other known factors contributing to altered insulin sensitivity, such as body fat composition, liver fat content, hormones, adipokines, inflammatory and metabolic markers.

This thesis is focused on the analysis of molecular changes in mTOR-pathway (mTOR, p70S6K1, AKT, IRS 1, hVps34) using fat tissue biopsies in relation to clinically measured insulin sensitivity. The change of sirtuin 1 was analyzed in skeletal muscle biopsies by Western blot.

The hypothesis was that an isoenergetic high protein diet over a period of 18 weeks leads to a worsening of the clinically measured insulin sensitivity, correlating at the molecular

level with an increased protein expression of mTOR and its downstream factors, e.g. S6K1. Furthermore, we expected a reduction of SIRT 1 in the protein-enriched group as a sign of insulin resistance, and an increase of SIRT 1 in the fiber-enriched group.

Result: A significantly improved insulin sensitivity was observed in the dietary fiber group compared to the high protein group ($p=0.008$). This was also reflected at the molecular level. Here a significant increase of S6K1 in the high protein group was observed after 6 weeks of intervention compared to the dietary fiber group. SIRT 1 in muscle biopsies was significantly increased after the first intervention phase in the mix group. Both results were only moderately changed after a 12-week ad libitum phase.

Conclusion: A supplemented isoenergetically guided fiber-enriched diet leads to an improvement of the clinically measured insulin sensitivity after a period of 6 weeks. An isoenergetic protein-enriched diet leads to insulin resistance with corresponding molecular changes.

The results of this study could show approaches of a preventive nutrition to the development of diabetes mellitus type 2, to which attention should be paid in further studies.

Clinicaltrials.gov Identifier: NCT00579657

2. Einleitung

Die wachsende Prävalenz von Übergewicht und Adipositas ist weltweit ein rapide wachsendes Problem. Im Jahr 2015 waren laut der Global Burden of disease 2015 (GBD) Studiengruppe 107,7 Mio Kinder und 603,7 Mio Erwachsene übergewichtig. Damit hat sich die Prävalenz im untersuchten Zeitraum von 1980-2015 in über 70 Ländern verdoppelt (GBD 2015 obesity collaborators, 2017). In der Konsequenz sind nicht nur die individuellen gesundheitlichen Folgeerkrankungen wie beispielsweise kardiovaskuläre Morbidität, Diabetes mellitus Typ 2, Nierenerkrankungen, verschiedene Tumorerkrankungen und muskuloskelettale Folgeerscheinungen stark angestiegen. Auch die finanziellen Auswirkungen auf das Gesundheitssystem sind dramatisch. Simon et al stellten einen starken Anstieg der Kosten in allen Kategorien des Gesundheitssystems (ambulante Arztkonsultationen und Rezepte, stationäre Aufenthalte, psychosoziale Konsultationen) in Abhängigkeit vom Body-Mass-Index (BMI) fest. Die Depression als wesentliche Co-Morbidität bei übergewichtigen bzw. adipösen Patienten, insbesondere bei Frauen mittleren Alters, ist hierbei als unabhängiger

zusätzlicher Kostenfaktor von Bedeutung (Simon et al, 2011). Als Ursache der Adipositas wird ein Missverhältnis zwischen erhöhter Nahrungsaufnahme und gleichzeitig verminderter körperlicher Aktivität angenommen. Eine erhöhte Aufnahme von Nahrungsfetten, sowie hochkalorischer und energiedichter Nahrung, Umweltfaktoren (überwiegend sitzende berufliche Tätigkeiten, wenig sportliche Aktivität in der Freizeit u.ä.), soziale Faktoren (Urbanisierung, mangelnde soziale Kontakte, depressive Störungen), Erkrankungen und die Nebenwirkungen multipler Medikamenteneinnahme, neurobiologische, psychologische, biologische und polygenetische Faktoren verweben die Entstehung der Adipositas zu einem multifaktoriellen Kausalitätsgeflecht (GBD 2015 Obesity Collaborators, 2017). Nur in seltenen Fällen liegt eine eindeutige genetische Ursache beispielsweise in Form eines Prader-Willy-Syndroms zu Grunde. (Hinney et al, 1999; Montague et al, 1997; Krude et al, 1998)

Definition von Übergewicht und Adipositas nach WHO (WHO, 2000)

Kategorie nach WHO	BMI kg/m²	Risiko für Comorbidität
Untergewicht	≤ 18,5	Niedrig
Normalgewicht	18,5-24,9	durchschnittlich
Präadipositas	25,0-29,9	gering erhöht
Adipositas Grad 1	30,0-34,9	erhöht
Adipositas Grad 2	35,0-39,9	hoch
Adipositas Grad 3	≥ 40	sehr hoch

Tabelle 1 (eigene Darstellung)

Die Adipositas wird unterschieden in eine abdominale/viszerale (androide) und eine subkutane (gynoid) Körperfettverteilung. Das viszerale Fettgewebe wirkt als endokrines Organ und produziert freie Fettsäuren und inflammatorische Zytokine, welche die Entstehung einer Insulinresistenz begünstigen. Mittels des Taillenumfanges lässt sich das Risiko abschätzen, welches von dem abdominalen Fettgewebe ausgeht. Die Cut-off Werte liegen bei 86 cm für Männer und 78 cm für Frauen. Darüber liegende Werte zeigen eine vermehrte Assoziation zur Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus und einer Dyslipidämie. (Feng et al, 2012) Personen mit einem abdominalen Fettverteilungsmuster

haben also ein höheres Risiko für Folgeerkrankungen als Personen mit einem subkutanen Fettverteilungsmuster.

In der Dallas Heart Studie wurden verschiedene anthropometrische Messungen und deren Einfluss auf die Entstehung einer Atherosklerose getestet. Hier konnte eine unabhängige Assoziation zwischen der Waist-to-Hip ratio (WHR) und der Prävalenz einer koronarerteriellen Verkalkung gezeigt werden. (See et al, 2007). Der Cut-off Wert für die WHR lag hier bei 0,8 für die Frauen und 0,9 für die Männer. In dieser Studie zeigte sich die WHR dem BMI und dem Taillenumfang (Waist circumference, WC) als Risikomarker für kardiovaskuläre Erkrankungen überlegen (See et al, 2007). Andere epidemiologische Studien konnten hingegen keine verbesserten prädiktiven Aussagen über einzeln betrachtete oder kombinierte anthropometrische Maße wie BMI, Taillenumfang oder Taille-zu-Hüftumfang zum kardiovaskulären Risiko feststellen, wenn nicht weitere Faktoren vorlagen wie arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus Typ 2 oder erhöhte Cholesterinwerte (Emerging Risk Factors Collaboration, 2011).

Das bei übergewichtigen Personen häufig festgestellte Cluster von Symptomen wie zentrale Adipositas, Hypertriglyzeridämie, Dyslipoproteinämie in Form eines erniedrigten HDL-Cholesterinwertes sowie erhöhten LDL-Cholesterinwertes, arteriellem Hypertonus und erhöhten Nüchterglukosewerten bzw. einer gestörten Glukosetoleranz wird unter dem Begriff Metabolisches Syndrom zusammengefasst und stellt in dieser Koexistenz ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Insulinresistenz, kardiovaskulärer Erkrankungen und eines Typ 2 Diabetes mellitus dar. Das Metabolische Syndrom ist assoziiert mit einem 2-4fach erhöhten Anstieg kardiovaskulärer Morbidität und Schlaganfallrisiko (Levantesi et al, 2005).

Die Klassifizierung des früher als Syndrom X (Reaven, 2005) bezeichneten Krankheitsbildes sowie nunmehr die Kategorisierung als „Syndrom“ sind durchaus umstritten (Kahn et al, 2005) Die Definition des Metabolischen Syndroms ist von verschiedenen Organisationen nicht einheitlich gegeben (Kahn et al, 2005). Dadurch schwanken die Zahlen zur Prävalenz um bis zu 24% (Kahn et al, 2005). Auch ist umstritten, ob ein gemeinsamer Pathomechanismus der unterschiedlichen Faktoren zugrunde liegt und ob das Metabolische Syndrom im Vergleich mit anderen etablierten Risikoalgorithmen wie beispielsweise dem Framingham Risk score, PROCAM (Uthoff et al, 2010) oder ESC Euroscore System (Schunkert et al, 2008) eine ähnliche prädiktive Präzision für die Entstehung kardiovaskulärer Risiken aufweist (Moebus et al, 2007).

Beispiele für verschiedene Definitionen des Metabolischen Syndroms (Grundy et al, 2004; Balkau et al, 2002)

NCEP ATP III 2001	WHO
3 von 5 Kriterien müssen zutreffen	Diabetes, IFG, IGT oder Insulinresistenz (im Clamp gemessen)
Nüchterglukose ≥110 mg/dl (6,11mmol/l)	Plus mind. 2 folgende Kriterien:
Erhöhter Taillenumfang Frauen >88cm Männer > 102cm	Waist-to-hip-ratio Männer >0,90 Frauen >0,85
Hypertriglyzeridämie ≥ 150 mg/dl (1,7 mmol/l) Niedriges HDL Männer < 40 mg/dl (1,09 mmol/l) Frauen <50 mg/dl (1,29 mmol/l)	Hypertriglyzeridämie >1,7 mmol/l oder HDL-Cholesteroll Männer <0,9mmol/l Frauen <1,0 mmol/l
Arterieller Hypertonus ≥ 130/85 mmHg	Arterieller Hypertonus >140/90mmHg
	Mikroalbuminurie >20µg/min oder Albumin:Kreatinin ratio >30mg/g

Tabelle 2 (eigene Darstellung)

Die Prävalenz des Metabolischen Syndroms ist auch in einem hohen Maße abhängig vom Alter des Patientenkollektivs. In der NHANES-Studie stieg die Prävalenz von 7% bei den Teilnehmern zwischen 20-29 Jahren auf 44% bei den 60-69jährigen (Eckel et al, 2005; Cornier et al, 2008; Regitz-Zagrosek et al, 2006). Es zeigte sich hierbei ein deutlicher Unterschied zwischen der Altersabhängigen Prävalenz bei Frauen und bei Männern. In der NHANES-Kohorte 1988-1994 lag die Prävalenz bei Männern höher als bei Frauen (27,8% vs 23,9% n= 5575). Hingegen stieg in der NHANES-Kohorte von 1999-2002 die Prävalenz bei Frauen dramatisch an, während sie bei den Männern weitestgehend gleichblieb (30,3% vs 28,0%, n= 1514) (Cornier et al, 2008; Regitz-Zagrosek et al, 2006).

Als ein zentrales pathogenetisches Prinzip des Metabolischen Syndroms wird die Insulinresistenz gesehen, die per se einen eigenständigen Risikofaktor für das Entstehen einer koronaren Herzerkrankung darstellt (Pyörälä et al, 1998). Das Ausmaß der Insulinresistenz steigt hierbei in Abhängigkeit von dem steigenden Körpergewicht (Weyer et al, 2000).

Ein großer Vorteil des Konzepts „Metabolisches Syndrom“ gerade für die klinische Ernährungsberatung und Ernährungsinterventionsstudien liegt jedoch m.E. in der gut verständlichen gesundheitspädagogischen Darstellung für betroffene Personen. Zusammenhänge zwischen inadäquater Ernährung, fehlender körperlicher Aktivität, Übergewicht und möglichen Folgeerkrankungen und Risiken können anschaulich vermittelt werden und eigenverantwortliche Behandlungsoptionen aufgezeigt werden.

2.1 Molekularer Pathomechanismus der Insulinresistenz

Der Pathomechanismus der Insulinresistenz entsteht durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Kompartimente: Insulinresistenz im Fettgewebe (Hajer et al, 2008) und Sezernierung von inflammatorisch und prodiabetisch wirkenden Adipokinen (Möhlig, 2007), Insulinresistenzentwicklung im Muskel (Roden et al, 2004) und in der Leber und durch eine Dysfunktion der β -Zellen des Pankreas (Kahn et al, 2006).

Die folgende Arbeit fokussiert sich auf die molekulare Regulation des Insulinsignalwegs in Fettgewebe und Skelettmuskel im Rahmen einer humanen Ernährungsinterventionsstudie. Der hierfür relevante Aktivierungszyklus setzt sich aus den Faktoren Insulin, Insulinrezeptorsubstrat (IRS), Proteinkinase B/AKT, Tuberous sclerosis factor 1 und 2 (TSC 1 und 2), Ras homolog enriched in brain (Rheb), mTOR, p70S6Kinase 1 (S6K1), S6 Protein und human vacuolar protein sorting 34 (hVps34) zusammen, deren Aktivierungsprozesse im Folgenden dargestellt werden sollen.

2.2 Der mTOR-Signalweg

Mammalian target of rapamycin (mTOR) ist ein zentrales Protein in der Regulation des Insulinsignalwegs. Diese Serin/Threonin Kinase aus der Gruppe der Phosphatidylinositol Kinase related Kinasen (PIKK) nimmt eine Schlüsselrolle in zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Ribosombiogenese, Translation, Organisation von Zytoskelett und Nährstoffimport ein (Wullschleger, 2006; Hay et al, 2004). mTOR ist durch seine zentrale

Stellung in Zellregulationsprozessen und durch das Konfluieren mehrerer verschiedener Signalwege ein wichtiges Element in der Entstehung von Insulinresistenz, Diabetes und Tumorgenese. Entdeckt wurde mTOR bei der Erforschung des Immunsuppressors und Proliferationshemmers Rapamycin. Für die Wirkung des Rapamycins ist der intrazelluläre Kofaktor FKBP12 (FK 506-binding-protein) entscheidend. Dieser bildet einen Komplex mit Rapamycin und inhibiert dadurch mTOR (Wullschleger, 2006). Die Struktur des hochmolekularen Proteins mTOR besteht aus 2549 Aminosäuren und besitzt an ihrem N terminalen Ende 20 tandem HEAT Wiederholungen (Huntington, EF3, A subunit of PP2A, TOR 1), die zahlreiche hydrophobe und hydrophile Bindungsstellen haben und somit ein großes Interface für Protein-Protein-Interaktionen bieten. (Hay et al, 2004) An dem C terminalen Ende enthält mTOR eine Kinasedomäne, die Ähnlichkeiten mit einer katalytischen PI3Kinase-Struktur aufweist.

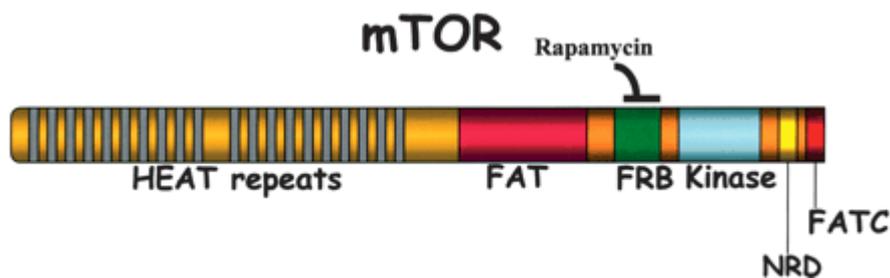


Abbildung 1 Struktur mTOR (Hay, 2004)

In biochemischen Studien zu mTOR konnten zwei Komplexe unterschieden werden, in denen diese Kinase vorliegt. mTORC1 ist Rapamycin-sensitiv durch die Komponente Regulatory Associated Protein of mTOR (Raptor), die mittels mehrerer Kontaktpunkte an mTOR bindet und unter einer Nährstoffdeprivation die mTOR Aktivität inhibiert. (Hay et al, 2004; Kim et al, 2003) Ein weiterer Interaktionspartner von mTOR ist die GβL (G-protein β-subunit-like-protein), welche die mTOR-Raptor Verbindung unter verschiedenen Ernährungsbedingungen stabilisiert (Hay et al, 2004; Kim et al, 2003). Der Rapamycin-insensitive Komplex mTORC2 mit der Komponente rapamycin-insensitive companion of mTOR (Rictor) reguliert dagegen den Zellaufbau durch Actinorganisation. Ein Knockdown von Rictor resultiert in einem Ausbleiben der Actinpolymerisation (Jacinto et al, 2004). Multiple Signalwege fließen über mTOR zusammen. Der LKB1/AMPK-Signalweg nimmt über eine Erhöhung der AMP/ATP-ratio den Energiestatus der Zellen wahr und reguliert mTOR. So inhibieren ein Glukosemangel und Energieverbrauchende Prozesse wie Bewegung und Stress die ATP-konsumierende Proteintranslation. Auch

das Antidiabetische Medikament Metformin wirkt über diesen Signalweg. (Tremblay et al, 2005) Mittels des PI3Kinase-Signalwegs wird mTOR durch Insulin und Wachstumsfaktoren reguliert. Durch die Bindung von Insulin oder Insulin-like growth factor (IGF) an den Membranrezeptor wird IRS zur Membran rekrutiert und phosphoryliert. In der Folge bindet die PI3Kinase an IRS und konvertiert Phosphatidylinositol-4,5-phosphat (PIP2) an der Zellmembran zu Phosphatidylinositol-3,4,5-phosphat (PIP3). Die Akkumulation von PIP3 an der Zellmembran kann antagonisiert werden durch die Lipidphosphatase PTEN (Phosphatase and tensin homolog). Im nächsten Schritt werden PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase 1) und die Proteinkinase B /AKT zur Membran rekrutiert, PDK1 wird phosphoryliert und aktiviert dadurch AKT. Aktiviertes AKT phosphoryliert wiederum den TSC2-Faktor und inaktiviert diesen Komplex dadurch. TSC 2 funktioniert als GAP (GTPase activating protein) für die kleine Protease Rheb. Durch die Bindung von TSC2 an Rheb wird dieses Enzym (GTPase) in den inaktiven GDP-gebundenen Status versetzt. GTP-gebundenes Rheb wird direkt an die Kinasedomäne von mTOR gebunden und induziert eine Konformationsänderung in mTORC1, die zu einer Aktivierung von mTOR und letztlich zu einer Phosphorylierung von downstream targets führt (Wullschleger, 2006; Um et al, 2006).

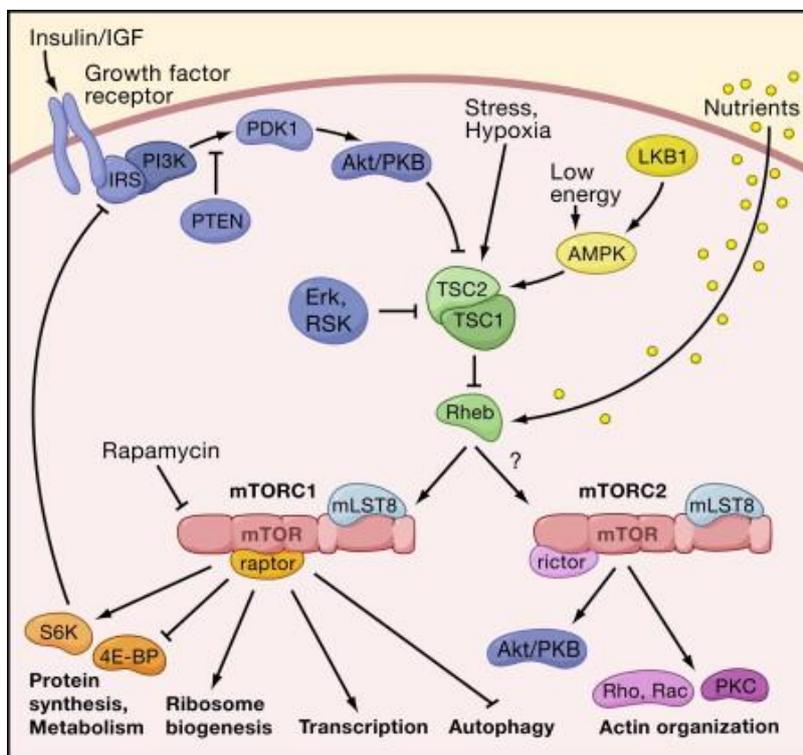


Abbildung 2 mTOR-Aktivierung (Wullschleger S, 2006)

2.2.1 Die p70S6 Kinase

Die S6K1 ist ein wichtiges downstream target von mTOR im Insulinsignalweg und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Insulinresistenz. S6K1 ist eine Serin/Threonin Proteinkinase, die bei Säugetieren in zwei Isoformen vorliegt (Um et al, 2006). Die größere S6K1L liegt im Nucleus vor und ist charakterisiert durch eine aminoterminal 23-Aminosäurenextension. Die kleinere Isoform S6K1S ist im Zytoplasma lokalisiert (Um et al, 2006). S6K1 wirkt indirekt auf die mRNA Translation über die Phosphorylierung von downstream Faktoren wie das S6 Ribosomale Protein. Die phosphorylierte Form des S6 Ribosomalen Proteins korreliert mit der Translation der mRNA. Der Grad der Phosphorylierung von S6 Ribosomalem Protein kann als Kennzeichen für die Aktivität der S6K1 betrachtet werden (Hay et al, 2004). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass ein negativer Feedback-Mechanismus von der Nährstoffsensitiven TSC-mTOR-S6K1 Kette zum Insulinsensitiven IRS-1 besteht (Krebs et al, 2007; Khamzina et al, 2005). In tierexperimentellen Studien konnte an Mäusen unter einer fettreichen Diät gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von S6 K1 (Thr 389) und IRS-1 (Ser 636/639) bei wild-typ Mäusen unter einer Fettreichen Diät ansteigt, verglichen mit der Kontrollgruppe, die ein normales standardisiertes Futter erhielt. Bei S6K1-Knockout Mäusen dagegen fehlt der Anstieg in der IRS-1 Phosphorylierung und somit das Korrelat zur Insulinresistenzentwicklung (Um et al, 2006). An ob/ob Mäusen konnte eine deutlich erhöhte S6K1 Aktivität gezeigt werden und eine gesteigerte Phosphorylierung von IRS-1 (Ser 636/639 und Ser 307) (Um et al, 2004).

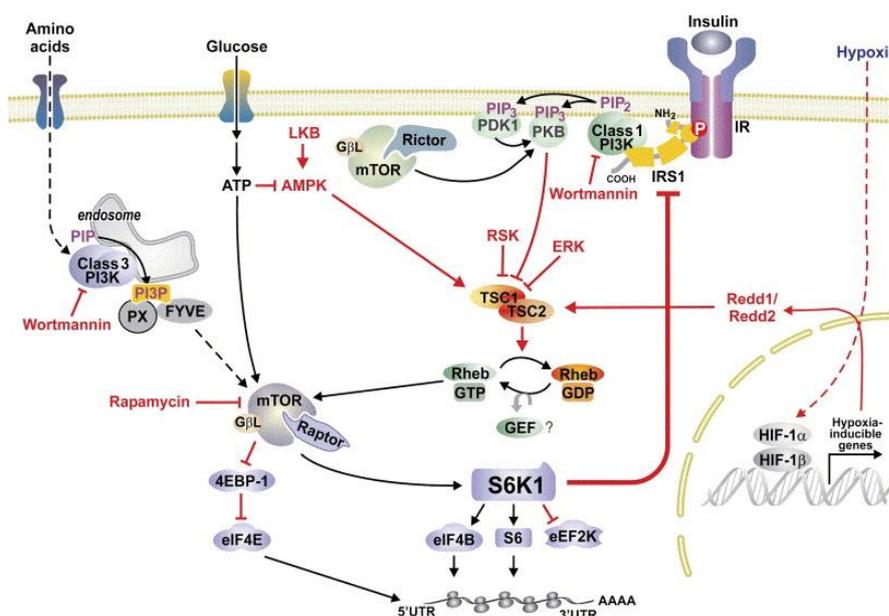


Abbildung 3 S6K1-Aktivierung (Um et al, 2006)

2.2.2 AKT/ Proteinkinase B

AKT oder auch Proteinkinase B genannt ist eine Serin/ Threonin Kinase und spielt eine zentrale Rolle in der Aktivierung von mTOR. AKT wird an der PH (Pleckstrin homology) Domäne an PIP 3 gebunden und dadurch an die Membran transloziert. Dort wird es durch die PDK phosphoryliert und aktiviert. Einige Studien zeigen, dass AKT über die Faktoren TSC2 und Rheb das mTOR positiv reguliert (Vander Haar et al, 2007).

2.2.3 Entstehung der Insulinresistenz im Kontext des mTOR-Signalwegs

Entscheidend für das Entstehen der Insulinresistenz ist die Phosphorylierung des IRS-1 am Ser (636/639) und Ser (307) durch die S6K1. Es konnte in in vitro Studien mit Zellkulturen unter Hyperglykämie auch gezeigt werden, dass mTOR im Komplex mit Raptor direkt das IRS-1 phosphoryliert (Ser 636/639) und damit das Insulinsignal am Insulinrezeptor blockiert (Tzatsos et al, 2006). Des Weiteren wird unter einer Langzeitaktivierung von mTOR durch Überexpression von Rheb das IRS-1 degradiert. Die Stimulation der IRS-1 (Ser 636/639) Phosphorylierung ist in einem hohen Maße abhängig von der Nährstoffumgebung. Glukose wirkt über eine Suppression der AMPK negativ auf mTOR (Tzatsos et al, 2006). Auch die Verfügbarkeit von Aminosäuren, insbesondere der essentiellen Aminosäuren Leucin und Arginin, wird für die mTOR Aktivierung benötigt (Cohen et al, 2009). So führt Leucin über einen weitgehend unbekanntem Mechanismus zu einer Raptorabhängigen mTOR-Aktivierung (Tzatsos et al, 2006).

2.2.4 Das human vacuolar protein sorting (hVps34) als Komponente des mTOR-Signalwegs

Jüngste Studien konnten eine weitere Komponente des mTOR-Signalwegs identifizieren, die eine substantielle Rolle bei der direkten Aktivierung von mTOR durch Aminosäuren spielt, unabhängig von dem TSC1/2 –Komplex (Um et al, 2006). Das hVps34 (Human vacuolar protein sorting) gehört zu der Familie der PI3Kinasen (phosphoinositid 3-Kinase) und wurde erstmals beschrieben im Zusammenhang mit Endozytose und vesikulärem Verkehr (Backer et al, 2008; Yan et al, 2007). Diese

Lipidkinase steuert zugleich auch die Fähigkeit der Zellen, auf nutritive Veränderungen zu reagieren, indem sie direkten Einfluss auf die Aktivierung von mTOR nimmt. So ist die hVps34 selbst direkt von Nährstoffen, insbesondere durch Aminosäuren, reguliert (Backer et al, 2008; Yan et al, 2007).

Eine weitere Funktion dieser Klasse 3PI3Kinase liegt in der Induzierung von intrazellulären Autophagieprozessen unter nutritiver Deprivation (Nobukini et al, 2007; Byfield et al, 2005). Die bisher vorliegenden Daten über hVps34 sind weitestgehend in Zellkulturversuchen und Experimenten mit *Caenorhabditis elegans* entstanden (Nobukini et al, 2007; Byfield et al, 2005; Backer et al, 2008; Yan et al, 2007). In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass Aminosäuren mTOR nicht über den AKT /PKB-Signalweg aktivieren. Unter einer Aminosäurestimulation steigen die Aktivität von hVps34 und die Menge von PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphat), dem Produkt der hVps34. Dies ist ein Effekt, der auch in TSC2^{-/-} Zellen erhalten bleibt. Somit verhält sich die hVps34 als nutritiver Sensor für die S6K1 (Nobukini et al, 2007; Byfield et al, 2005; Um et al, 2006). In Humanstudien, insbesondere in einer Ernährungsintervention wurde diese Lipidkinase bisher noch nicht untersucht.

2.2.5 Der Einfluss von Sirtuin 1 auf die Insulinsensitivität

Eine prominente Rolle in metabolischen Geweben (Leber, Skelettmuskulatur und Fettgewebe) spielt das Sirtuin 1 (SIRT 1). SIRT-1 ist das am meisten untersuchte Homolog von SIR 2 (Silent information regulator 2) - Proteinen, die in verschiedenen Modellorganismen einen Einfluss auf die Lebenszeitregulation zeigen konnten. SIRT 1 ist eine NAD-abhängige Histondeacetylase, die in metabolischen Geweben Transkriptionsfaktoren und Co-Faktoren der Zellregulation wie FoxO1 (Forkhead box protein O1), UCP2 (Mitochondrial uncoupling protein 2), NF^κB (nuclear factor '*kappa*-light-chain-enhancer' of activated *B*-cells) und PGC1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) deacetyliert und somit einen Effekt auf den Glukosestoffwechsel ausübt (Liang et al, 2009). SIRT 1 beeinflusst die Adaptation des Skelettmuskels auf Umweltveränderungen. So dient SIRT 1 z.B. als Sensor für den Redox- und Energiestatus der Muskelzelle. Es wird dabei moduliert über die Verfügbarkeit seines Co-Faktors NAD⁺ (Pardo et al, 2011). Durch die Deacetylierung von PGC1 α mediiert SIRT1 die mitochondriale Biogenese (Liang et al, 2009). SIRT 1 steigert außerdem die Adiponektin Expression und erhöht damit die Insulinsensitivität.

Eine wichtige Rolle spielt das SIRT1 innerhalb des Insulin-Signalwegs. So induziert in einer Studie an insulin-sensitiven Zellkulturen und Geweben eine Inhibition von SIRT 1 eine Insulinresistenz (Blander et al, 2004; Sun et al, 2006). Dies geschieht über eine Unterdrückung von Ptp 1B (protein-tyrosine phosphatase 1B), die eine Insulinsekretion bewirkt. SIRT 1 reguliert auch das IRS 1 (Insulin receptor substrate) und IRS 2 und die AKT- Aktivierung (synonym PKB alpha) und wirkt sich somit positiv auf die Insulinsensitivität aus (Liang et al, 2009). SIRT1 wurde in der vorliegenden Arbeit anhand von Muskelbiopsien der Probanden in der PROFIMET Studie analysiert.

2.3 Einfluss der Ernährung auf die Insulinresistenz und den mTOR Signalweg

Zur Auswirkung von Ernährungsfaktoren auf die Entstehung von Insulinresistenz liegen zahlreiche vorwiegend klinische Studien vor. Allerdings wurden bisher fast ausschließlich Effekte von Nahrungsfetten untersucht, sowie Effekte auf den sogenannten glykämischen Index. Der Glykämische Index ist ein System zur Klassifizierung von Nahrungsmitteln, die Kohlenhydrate enthalten. Er ist definiert als die Zunahme der area under the curve einer Glukoseantwortkurve nach einer standardisierten Menge von Kohlenhydraten in Form einer Testmahlzeit relativ zu der Glukoseantwort nach Einnahme einer Kontrollmahlzeit (Weißbrot oder Glukose) (Ludwig et al, 2002). Der Glykämische index ist in der Lage unabhängig von Veränderungen des Körpergewichts das Risiko für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes zu beeinflussen. Diäten mit einem hohen Glykämischen Index zeigten in verschiedenen Studien eine Hyperinsulinämie aufgrund einer postprandialen Hyperglykämie, eine gegenregulierende Hormonantwort und einen Anstieg der freien Fettsäuren (Ludwig et al, 2002). Der glykämische Index ist auch relevant für die Ballaststoffe. Ballaststoffe können differenziert werden in lösliche und unlösliche Fasern. Die wasserlöslichen Ballaststoffe sind komplexe Substanzen, die bei ihrer Lösung visköse und/oder Gelförmige Eigenschaften haben, Sie verlangsamen die Magenentleerung und werden im Kolon fermentiert. Die Absorption von Makronährstoffen wird inhibiert und die postprandiale Glukoseantwort wird reduziert (Weickert et al, 2008). Lösliche Fasern, die v.a. in Früchten und Gemüse vorkommen, zeigen außerdem einen positiven Einfluss auf Blutlipide im Sinne einer Erniedrigung des Gesamt- und LDL-Cholesterins (Weickert et al, 2008). In Bezug auf das Diabetesrisiko sind die unlöslichen Ballaststoffe jedoch relevanter. Die Zufuhr von unlöslichen

Ballaststoffen ist assoziiert mit einer 20-30%igen Reduktion des Diabetesrisikos (de Munter et al, 2007; Schulze et al, 2007). Unlösliche Ballaststoffe kommen v.a. in Form von Getreidefasern vor. Studien konnten metabolische Veränderungen unabhängig von Körpergewichtsveränderungen zeigen wie z.B. eine Verbesserung der Insulinsensitivität oder eine Modulation der Sekretion von bestimmten Darmhormonen. Diäten mit einem hohen Anteil an unlöslichen Fasern konnten in Studien eine Reduktion inflammatorischer Marker aufzeigen, die mit dem Metabolischen Syndrom assoziiert sind (Weickert et al, 2008). Die Einnahme einer gesteigerten Menge von cerealen Fasern führt bereits nach einer kurzen Periode von 3 Tagen zu einer signifikant verbesserten Insulinsensitivität (Weickert et al, 2006). Für unlösliche Getreide-Ballaststoffe konnte gezeigt werden, dass sie bei einer erhöhten Zufuhr über bisher nicht geklärte Mechanismen die Insulinsensitivität und die akute Insulinantwort gemessen im intravenösen Glukosetoleranztest verbessern (Liese et al, 2005). Der Mechanismus hierfür ist noch völlig unklar. Auch die Frage nach der Nachhaltigkeit und den Langzeiteffekten ist nach wie vor ungeklärt.

Die PROFIMET-Studie hat es sich daher zum Ziel gemacht, die längerfristige vermehrte Ingestion von Ballaststoffen in einem isokalorisch geführten Design, welches den Bias einer Gewichtsabnahme-induzierten Verbesserung der Insulinsensitivität herausnehmen sollte, zu analysieren. Hierzu wurden auf klinischer Ebene Goldstandardmethoden verwendet, in Kombination mit molekularbiologischen Analysen.

Schätzungen der Insulinsensitivität sind in den meisten Studien nur Annäherungen, da auf Grund geringerer Komplexität in fast allen Studien nicht der Goldstandard, der euglykämisch-hyperinsulinämische Clamp (DeFronzo, 1979), sondern Surrogatmarker wie z.B. HOMA-IR (Homeostatic model assessment of Insulin resistance), Nüchtern glukose, HbA1c-Wert oder die Insulinkonzentration (Jenkins et al, 2008; Sacks et al, 2009; Gannon et al, 2003) gemessen wurden. Diese Parameter sind einfach und kostengünstig, bilden aber die Insulinresistenz nur inkomplett ab (Sacks et al, 2009; Lau et al, 2005). In den wenigen Clamp-Studien wurden in den verschiedenen Ernährungsgruppen (High fiber vs Kontrollgruppe) stark unterschiedliche Fettanteile verwendet. Dies stellt einen möglichen Bias dar (Anderson et al, 1991; Fukagawa et al, 1990).

2.4 Auswirkung von Nahrungsinterventionen auf klinische und molekulare Parameter

Einige Studien konnten zeigen, dass unter einer reduzierten Kalorienzufuhr ein vergleichbarer Gewichtsverlust stattfindet, unabhängig davon, welche Makronährstoffzusammensetzung zugrunde liegt (Sacks et al, 2009; Dansinger et al, 2005; Ballesteros-Pomar et al, 2010; Brinkworth et al, 2004). Andere Studien konnten hingegen eine höhere Gewichtsreduktion unter einer Hochproteindiät zeigen (Samaha et al, 2003; Clifton et al, 2008; Clifton et al, 2009; McAuley et al, 2005), sowie eine Verbesserung des kardiovaskulären Risikoprofils (Brinkworth et al, 2004) in Form einer verbesserten Insulinsensitivität (Samaha et al, 2003) und reduzierter Triglyzeridlevels (Samaha et al, 2003; Layman et al, 2003; Clifton et al, 2009; McAuley et al, 2005). Es werden außerdem ein früheres und stärkeres Sättigungsgefühl (Layman et al, 2003) und ein Anstieg des Ruhegrundumsatzes unter einer Proteinbetonten Diät beschrieben (Tremblay et al, 2005).

Diese Studien zeigen eine durch Gewichtsabnahme induzierte Verbesserung kardiovaskulärer Marker durch eine erhöhte Proteinzufuhr. Diese Marker sind jedoch nur Surrogatparameter und analysieren nicht mittels Goldstandardmethoden. In einer großen epidemiologischen Studie zeigte sich in einem 10 Jahres follow-up mit 38.094 Teilnehmern aus dem EPIC-NL-Kollektiv (European prospective investigation into cancer and nutrition) ein gesteigertes Risiko für einen Diabetes mellitus Typ 2 bei erhöhter Ingestion von Proteinen (Sluijs et al, 2010). Hier waren v.a. die tierischen Proteine wie Milchprodukte und Fleisch relevant. Der Konsum von 5% Energieaufnahme in Form von Protein anstelle von 5% Kohlenhydraten oder Fetten steigerten das Diabetes Risiko um ca. 30% (Sluijs et al, 2010).

Weitere Studien hatten das Ziel, den Mechanismus der Proteininduzierten Veränderungen durch die Kombination klinischer Parameter, z.T. mit Goldstandardmethoden wie dem Clamp gemessen, mit molekularen Faktoren zu analysieren. In humanen Aminosäureinfusionsstudien, in denen u.a. auch Clamps durchgeführt wurden, resultierte unter einer Hyperaminoacidämie kombiniert mit einer Hyperinsulinämie eine Überaktivierung der S6Kinase1, die dann die inhibitorische IRS-1 Phosphorylierung am Ser 312 und Ser 363 vorantreibt. Dies resultierte in einer aminosäureinduzierten Insulinresistenz (Krebs et al, 2007; Tremblay et al, 2005). Somit könnten Aminosäuren die Insulinmedierte Suppression der Glukoseproduktion

verschlechtern und zugleich könnten sie sich negativ auf die Insulinstimulierte Verteilung der Glukose in den Skelettmuskel auswirken (Tremblay et al, 2005). Diese Effekte sind jedoch nur für einen kurzen Zeitraum von wenigen Stunden gezeigt worden, in denen die Bedingungen artifiziell geschaffen sind. Studien, die eine Langzeitdiät mit einem hohen Prozentsatz von Protein, mittels klinischem Nachweis einer veränderten Insulinsensitivität (Clamp) kombiniert mit molekularen Faktoren verglichen fehlen bis dato.

Daher wurden in der PROFIMET-Studie erstmalig Effekte einer isoenergetischen Hochproteindiät über einen Zeitraum von 6 Wochen mit klinischen Goldstandardmethoden und Aufklärung molekularer Mechanismen dargestellt. Die molekularen Analysen stützten sich hierbei auf den mTOR-Signalweg als wichtigsten Knotenpunkt Insulinabhängiger und –unabhängiger aminosäureninduzierter Entstehung einer Insulinresistenz.

2.5 Ziel der PROFIMET-Studie

Die molekularen Grundlagen zu Kausalität und Verständnis der Mechanismen hinter der Entstehung einer Insulinresistenz durch Veränderungen in der Ernährung sind noch weitgehend ungeklärt, bedürfen jedoch dringend genauerer Erforschung, um die Prävention und Therapie der Adipositas und der Insulinresistenz als Vorstufe zum Typ 2 Diabetes mellitus vorantreiben zu können, z.B. durch Entwicklung hochwertiger und gesundheitsförderlicher Nahrungsmittel.

Die zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnisse aus bisher durchgeführten Studien wurden in der PROFIMET-Studie (Protein, fibre, metabolic syndrome) erstmalig im direkten Vergleich zwischen einer Proteinreichen Ernährung und einer Ernährung mit höherer Ballaststoffzufuhr in Form unlöslicher Getreidefasern parallel über einen Zeitraum von 4.5 Monaten untersucht. Hierfür wurde eine randomisierte kontrollierte Studie geschaffen, die Effekte isoenergetischer Diäten, variierend im Protein- und unlöslichen Ballaststoffgehalt, auf die Ganzkörper- und die hepatische Insulinsensitivität, gemessen mit Goldstandardmethoden, als primären Endpunkt vergleichen sollte. Weitere Faktoren, die zu einer veränderten Insulinsensitivität beitragen könnten, wurden als sekundäre Endpunkte analysiert, wie die Körperfettzusammensetzung (MRT und Air displacement plethysmography), Leberfettgehalt (H1-Spektroskopie), Hormone, Adipokine, inflammatorische und metabolische Marker und molekulare Faktoren des

Insulinsignalwegs in Fettgewebe- und Muskelbiopsaten (Genexpression und Proteinebene), ebenso wurden aus Stuhlproben Veränderungen der Darmmikroflora analysiert. Als Marker für die Adhärenz wurden die Nitrogen/Kreatinin ratio aus Urinproben, sowie die fäkalen verzweigt-kettigen Aminosäuren für die Proteingruppe bestimmt. Für die Adhärenz in der Ballaststoffgruppe wurden die fäkalen kurzkettigen Fettsäuren, sowie die Atemhydrogenspiegel als Marker für den Fermentationsprozess gemessen. Außerdem wurden als Marker für die Kohlenhydrateinnahme die HDL Cholesterolevels bestimmt.

Ziel der folgenden Arbeit ist es, die Auswirkungen von Veränderungen der Makronährstoffkomposition auf molekularer Ebene zu erforschen. Eine zentrale Rolle spielt hierbei der mTOR- Signalweg, mit seinen insulinabhängigen Komponenten S6K1, AKT und mTOR und auch der insulinunabhängigen Regulierung von mTOR durch die Lipidkinase hVps34. Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die Intervention für die Hochproteindiät Gruppe und die Analyse der Insulinsignalkaskade, insbesondere den mTOR pathway, auf Proteinebene mittels Western Blot. Es wurden hierfür Fettgewebsbiopsien und für das SIRT1 Skelettmuskelbiopsien der Probanden aus den verschiedenen Interventionsgruppen analysiert.

Ziel ist es Langzeitwirkungen auf molekulare Schlüsselfaktoren, die durch eine hohe enterale Proteinzufuhr reguliert werden, zu untersuchen und mit den klinischen Ergebnissen der Studie, insbesondere Veränderungen der Insulinsensitivität, gemessen mittels euglykämischen-hyperinsulinämischen Clamp und stabilen- Isotopen -Techniken zu korrelieren. Da viele Folgeerkrankungen des Metabolischen Syndroms schwierig und kostenintensiv zu behandeln sind und im Hinblick auf die Tatsache, dass diese Erkrankungen z.T. irreversibel sind, ist es besonders wichtig, den Fokus auf die Prävention zu legen. Hierbei spielt eine geeignete Ernährungsform die entscheidende Rolle.

Die PROFIMET-Studie ist von besonderer Bedeutung für die Entwicklung von Ernährungskonzepten, insbesondere für Patienten, die bereits eine Insulinresistenz entwickelt haben, oder die gefährdet sind für Erkrankungen wie das Metabolische Syndrom und Diabetes mellitus Typ 2, und für die optimale Komposition von präventiv wirksamen Nahrungsmitteln.

3. Material und Methoden

3.1 Ethik

Die Studie wurde in Ablauf und Zielsetzung von der unabhängigen Ethikkommission der Universität Potsdam geprüft und befürwortet. Die Teilnehmer wurden intensiv über Inhalte und Ziele des Projektes aufgeklärt und gaben vor der Durchführung der Studie ihr schriftliches Einverständnis.

3.2 Rekrutierung der Probanden und die Studienkriterien

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte ab August 2007 durch Öffentlichkeitsarbeit der Arbeitsgruppe Klinische Ernährung des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (DIfE). Alle 111 Teilnehmer unterzogen sich vorab einem Stoffwechselscreening (OGTT, Routinelabor, Anthropometrie), einer körperlichen Untersuchung, sowie einer ausführlichen Anamnese (Familien- und Krankheitsanamnese). Diese Untersuchungen wurden in der Stoffwechselambulanz von den Mitarbeiter*innen der Abteilung Klinische Ernährung am Deutschen Institut für Ernährungsforschung durchgeführt. Nach den Einschlusskriterien wurden Frauen und Männer im Alter von 24-70 Jahren mit einem Body mass Index (BMI) von mindestens 25 und maximal 44 und zusätzlich einem Taillenumfang größer als 94cm für Männer und größer als 80cm für Frauen eingeschlossen. Nach den Ausschlusskriterien wurden Teilnehmer mit chronischen Darmerkrankungen, einem Diabetes mellitus Typ 1 und 2, sowie antidiabetischer Therapie, Glukokortikoideinnahme, Einnahme von Acetylsalicylsäurepräparaten oder unter einer anderen blutverdünnenden Therapie stehend und Teilnehmer mit Leberfunktionsstörungen, Nierenfunktionsstörungen und kardiovaskulären Erkrankungen ausgeschlossen. Unter Beachtung dieser Kriterien konnten insgesamt 115 Individuen eingeschlossen werden. Vier der Probanden erschienen nicht zum ersten Untersuchungstag und wurden somit ausgeschlossen.

3.3 Ablauf der Studie

Zu Beginn der Studie, nach 6 Wochen isokalorischer Diät und nach 12 Wochen der ad libitum Phase erfolgten die Untersuchungstermine (Clinical investigation day, CID). Es

wurden anthropometrische Messungen gemacht und zur Untersuchung des Leberfettgehaltes wurden H1-Spektroskopie-Untersuchungen durchgeführt, ebenso Magnetresonanztomographien zur Messung von Veränderungen des Abdominal- und des subkutanen Fettes. Zur Messung der Insulinsensitivität wurden euglykämisch-hyperinsulinämische Clamps durchgeführt. In einer Subgruppe wurden mittels stabiler Isotopentechnik die hepatische Insulinempfindlichkeit und ihre Veränderungen im Verlauf der Intervention ermittelt. Änderungen der Darmmikroflora wurden aus Stuhlproben ermittelt. Es wurden Blutproben genommen, auch zur Untersuchung von verschiedenen Biomarkern und zur Kontrolle der Einhaltung der jeweiligen Diäten. Die Einhaltung der Diät in der Hochproteingruppe wurde mittels Nitrogen/Kreatinin ratio (Simmons et al, 1972) Bestimmung im Urin mittels Isotop-ratio Massenspektrometrie und durch die Analyse der Konzentration der verzweigtkettigen Aminosäure Isovaleriansäure in den Stuhlproben (Geypens et al, 1997) gemessen. In der Ballaststoffgruppe wurde mittels Hydrogen-Atem-Tests (Weickert et al, 2006) und durch die Messung der kurzkettigen fäkalen Fettsäuren (short-chain fatty acids, SCFA) die Compliance ermittelt. Vor Beginn der Untersuchungen wurde eine Urinprobe genommen. Um die nährstoffinduzierten molekularen Mechanismen zu ergründen, wurden den Probanden Fettbiopsien entnommen. Diese wurden zum einen für Genexpressionsanalysen genutzt. Zur Entschlüsselung der Parameter der Insulin-Signalkaskade auf Proteinebene wurden Western Blots durchgeführt. Des Weiteren wurden einer Subgruppe von Probanden Skelettmuskelbiopsien entnommen. Diese Probanden waren angehalten, ihre entsprechende Kost nach Abschluss des CID 3 noch einen Tag bis maximal eine Woche weiter einzuhalten. In dieser Zeit wurde eine Muskelbiopsie an der Wade entnommen. Eine zweite Muskelbiopsie wurde nach einer Auswaschphase von weiteren 18 Wochen entnommen, in der die Probanden sich ohne Supplemente und ohne Ernährungsberatung ernährten. Diese diente als Kontrolle. Die Muskelbiopsien dienten zur molekularen Analyse des Insulinsignalwegs zum einen auf Proteinebene mittels Western Blot.

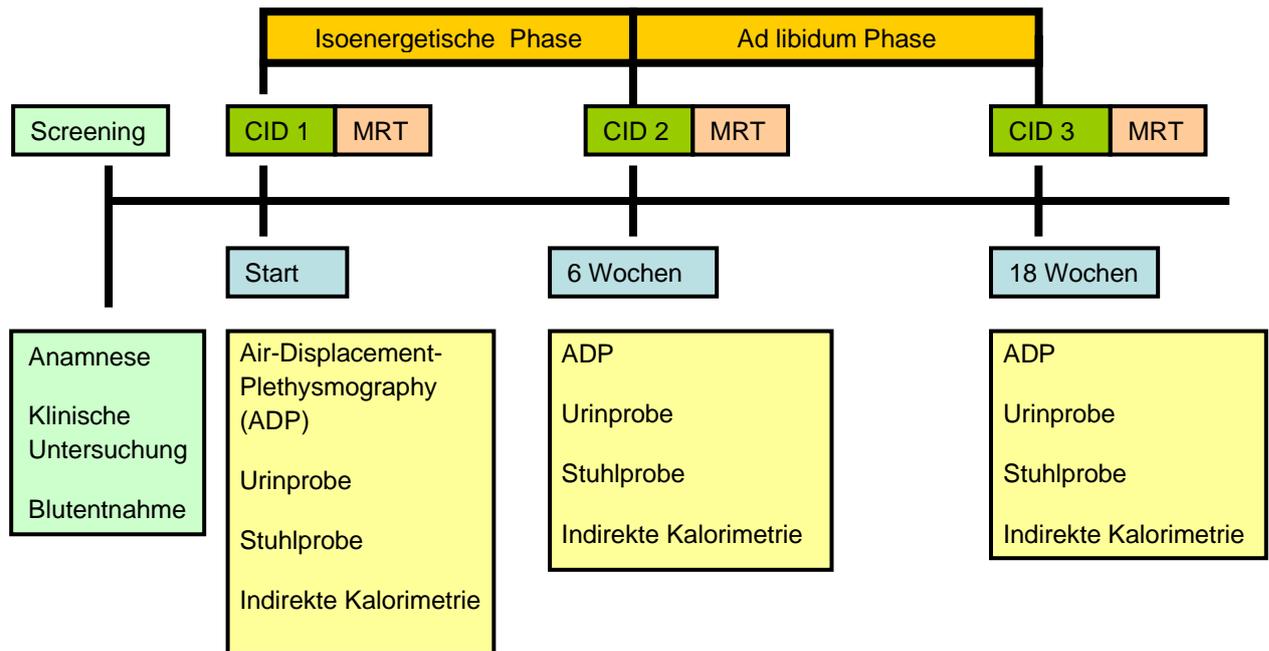


Abbildung 4 Darstellung des Interventionsablaufes (eigene Darstellung)

3.4 Nahrungsintervention

Die Randomisierung der Probanden erfolgte in drei Interventionsgruppen und eine Kontrollgruppe. Die Interventionsgruppen variierten im Kohlenhydrat-, Ballaststoff- und Proteingehalt je nach Art der Intervention.

Um eine reliable Homogenität in der Verteilung auf die unterschiedlichen Interventionsgruppen zu erreichen wurde ein Matching-Algorithmus durchgeführt. Dieser beruhte auf der Euklidischen Distanz Methode.

Die Matching Variablen wurden ihrer Wichtigkeit entsprechend geordnet in folgender Weise:

- Hüftumfang (25%),
- Geschlecht (25%),
- Alter (25%),
- Medikamentöse Therapie z.B. antihypertensive Medikation oder Statine (15%)
- BMI (10%)

Die maximale Fallzahl pro Gruppe lag bei $n=30$. Nachdem die ersten 4 Probanden nach dem Zufallsprinzip den Gruppen zugeteilt wurden, wurde jeder neue Fall entsprechend der kleinsten Abweichung der Euklidischen Distanz zwischen den Gruppen gematcht.

Der Algorithmus stellte sich in zwei Schritten dar:

- i) Die Abweichung von der Homogenität einer Gruppe sollte durch den neuen zu matchenden Fall möglichst gering sein, diente aber zur Wiederherstellung einer gestörten Homogenität in einer Gruppe wenn dies nötig war.
- ii) Die Möglichkeit einen neuen Fall einer Gruppe zuzuteilen, die bisher eine niedrige Fallzahl hatte war höher als für eine Gruppe mit hoher Fallzahl.

Die Studie wurde teilweise verblindet, indem den TeilnehmerInnen nicht mitgeteilt wurde, welcher Gruppe sie angehörten. Die Supplemente wurden entsprechend verpackt und unterschieden sich möglichst wenig in Geschmack, Konsistenz und Aussehen. Insbesondere die Kontroll-, Mix und Ballaststoffreichen Supplemente waren in dieser Hinsicht sehr ähnlich. Zur Verbesserung der Diskriminierung zwischen den Diäten wurden den Supplementen die der jeweiligen Interventionsgruppe entsprechenden Nahrungsbestandteile (Proteine/unlösliche Getreidefasern/ eine Kombination aus moderatem Protein- und unlöslichem Getreidefasergehalt) beigefügt. Die Supplemente wurden unterstützend gegeben, um die Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich Ballaststoff und Proteinaufnahme weiter zu erhöhen.

Für jede Gruppe wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Getreideverarbeitung in Potsdam Bergholz-Rehbrücke eigens Nahrungsmittel in Form von Drinks verschiedener Geschmacksrichtungen und als Backmischung für die Zubereitung eines entsprechenden Crêpes als Mahlzeitenkomponente entwickelt, welche je nach Gruppe angereichert wurde mit genau definierten Mengen von unlöslichen Ballaststoffen und/oder Proteinen. Das für die Kontrollgruppe vorbereitete Supplement basierte auf einer Getreidemixtur, die auch als Träger für die Protein- und/oder Ballaststoff-Extrakte diente. Alle vier Diäten basierten auf pflanzlicher Basis. In der Hochproteingruppe wurden Molkeproteine und proteinreiche Gemüse bevorzugt, tierische Proteine wurden vermieden. Die Supplemente wurden genutzt, um die Ernährung der Probanden so hoch wie möglich mit Ballaststoffen und /oder „gesunden“ Proteinen anzureichern.

Die Interventionsarme bestanden aus einer

- Proteinreichen Diät (mindestens 25-30% Protein oder mehr),
- einer Kombination aus einer moderat Ballaststoff- und Proteinreichen Diät (20-25% Protein, 15-20g/1000kcal Ballaststoffe)
- und einer Ballaststoffreichen Diät (mindestens >20g unlösliche Ballaststoffe/1000kcal).
- Als Kontrolle diente eine Diät, die den Vorschriften der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) folgte (55% Kohlenhydrate, 15% Protein, 30% Fett). Der Fettgehalt war in allen Gruppen vergleichbar bei 30%.

Kontrolldiät	55% Kohlenhydrate, 30% Fett, 15% Protein, <15g /1000kcal Ballaststoffe (DGE-Richtlinie)
Hoch-Ballaststoffdiät (HF)	55% Kohlenhydrate, 30% Fett, 15% Protein, >20g /1000kcal Ballaststoffe
Hoch-Proteindiät (HP)	40-45% Kohlenhydrate, 30% Fett, >25-30% Protein, <15g/1000kcal Ballaststoffe
Intermediärdiät (MIX)	45-50% Kohlenhydrate, 30% Fett, 20-25% Protein, 15-20g/1000kcal Ballaststoffe

Tabelle 3 Interventionsgruppen und ihre Zusammensetzung (eigene Darstellung)

Die Teilnehmer verzehrten diese speziellen maßgeschneiderten Nahrungssupplemente zur besseren Erreichung der vorgeschriebenen Ernährungsziele, aufgeteilt in zwei Portionen täglich. Die Ernährungsziele sollten durch Gruppenentsprechende Makronährstoff-kompositionen in der Ernährung der Probanden erreicht werden, deren Einhaltung die Ernährungsberatung unterstützen sollte.

Die Intervention teilte sich auf in zwei Phasen: In der ersten Phase erfolgte zusätzlich zu den Nahrungssupplementen eine intensive Ernährungsberatung, die eine korrekte Zusammensetzung der vorgeschriebenen Anteile an Makronährstoffen sicherstellen und dafür sorgen sollte, dass die Gesamtenergiezufuhr in allen Gruppen vergleichbar isoenergetisch war. Hierzu unterstützend dienten telefonische Recalls bei den Probanden, Einzel-Ernährungsberatungssitzungen und so genannte Food Frequency

Questionnaires (FFQ), die die Probanden aller 4 Gruppen täglich über einen Zeitraum von 6 Wochen ausfüllten. Diese FFQ boten den Probanden eine Auswahl an 84 gewöhnlich konsumierten Nahrungsmitteln an, die geeignet waren, die Ernährungsziele der jeweiligen Gruppe zu erreichen. Die Auswertung der n=3738 FFQ für die Dauer der ersten 6wöchigen Interventionsphase erfolgte durch eine erfahrene Ernährungswissenschaftlerin des DIfE. In der zweiten, Phase wurden die Probanden angehalten/ermuntert ihre jeweiligen Diäten beizubehalten und nahmen weiterhin ihre zwei täglichen Supplemente zu sich, es erfolgte jedoch keine weitere Ernährungsberatung. Das Essverhalten wurde lediglich beobachtet und ausgewertet.

3.4.1 Ernährungsberatung der Probanden und die Ernährungsprotokolle

Vor Beginn der Studie erfolgte eine ausführliche Ernährungsanamnese mittels standardisiertem Fragebogen, um die Ernährungsgewohnheiten der Probanden abzuschätzen. Ziel war es die Ernährungsempfehlungen für die Intervention individuell auf den jeweiligen Probanden abzustimmen. Dazu diente auch die vor Beginn der Intervention durchgeführte indirekte Kalorimetrie, die den Ruhe-Nüchtern-Grundumsatz (Resting energy expenditure, REE) des jeweiligen Probanden ermittelte. Dieser Wert wurde mit einem für jeden Probanden individualisiertem Aktivitätsfaktor multipliziert, um die individuelle Energieaufnahme an das Aktivitätslevel des Probanden (physical activity level, PAL) anzupassen. Eine betreuende intensive Ernährungsberatung aller Probanden während der Studie, auch durch telefonische Anrufe (recalls) in der ersten und dritten Woche erhöhte die Wahrscheinlichkeit, dass die dem Interventionsarm entsprechende Makronährstoffkomposition eingenommen wurde und dass die Energieaufnahme in allen Gruppen vergleichbar war. Die entsprechenden, für diese Studie maßgeschneiderten Ernährungssupplemente in Form von Trockenpulver, welches mit 1.5%iger Milch in Form eines Shakes bzw. Crêpes eingenommen wurde, erhöhten die Wahrscheinlichkeit, dass die Vorgaben der Intervention eingehalten wurden.

Während der ersten 6 Wochen der Studie, in der isoenergetischen Phase, notierten die Probanden täglich die eingenommenen Nahrungsmittel in einem ausführlichen Ernährungs-Erhebungsfragebogen (FFQ). Des Weiteren wurden vor Beginn der Studie, nach 6 Wochen, nach 12 Wochen und nach 18 Wochen vier 3-Tages-Ernährungsprotokolle erfasst und ausgewertet. Von diesen drei Tagen musste ein Tag ein Wochenendtag sein. Die Ernährungsgewohnheiten wurden mittels

Bundeslebensmittelschlüssel (BLS, II.3.1, BfEL, Karlsruhe, Deutschland) und der Ernährungssoftware Prodi® (Nutri-Science, Hausach, Deutschland) ausgewertet.

3.5 Dropouts während der Intervention

Entsprechend der definierten Kriterien wurden Probanden ausgeschlossen, die eine Gewichtsveränderung von $>\pm 3$ kg zeigten (n=3, Kontrolle/HF/HP/MIX, 1/1/0/1) oder die signifikant die diätetischen Ziele während der 6-wöchigen isokalorischen Interventionsphase nicht erfüllten (n=6; Kontrolle/HF/HP/MIX; 0/2/2/2), ebenso Probanden, die während der Studie Medikamente einnahmen, die einen bekannten oder vermeintlichen Einfluss auf die Insulinsensitivität haben (z.B. Kortison, Acetylsalicylsäure, Antibiotika) (n=5; 1/2/2/0). Sieben Teilnehmer erschienen nicht zum zweiten klinischen Untersuchungstag (2/3/1/1) und ein Proband füllte die Ernährungsprotokolle und die FFQ nicht aus (0/1/0/0). Somit blieben n=89 Teilnehmer für die Analyse an CID2 übrig. In der zweiten Phase schieden fünf Probanden aus (drei Probanden nahmen an dem dritten Untersuchungstag nicht teil (1/1/1/0), ein Proband betrieb exzessive sportliche Betätigung vor dem Untersuchungstag (1/0/0/0) und ein Teilnehmer begann während der Studie eine Metformintherapie angeleitet durch den Hausarzt, ein Diabetes lag nicht vor (0/0/0/1). Den CID3 komplettierten n=84 Probanden erfolgreich.

3.6 Analysen

Die Untersuchungen wurden zum Zeitpunkt 0,6,18 Wochen bzw. nach Abschluss der 18 Wochen und nach insgesamt 36 Wochen bei Entnahme einer Muskelbiopsie durchgeführt. Zusätzliche Kontrolltermine, an denen ein oraler Glukosetoleranztest (oGTT), Biomarker und anthropometrische Daten erhoben wurden, fanden in den Wochen 3 und 12 statt. Die hepatische Insulinsensitivität wurde in einer Subgruppe von n= 12-14 Teilnehmer/Gruppe und CID Probanden untersucht. Die Entnahme von subkutanen Fettgewebsbiopsien wurde bei einer Subgruppe von n=28 Probanden durchgeführt. Die Subgruppe, der eine Muskelbiopsie entnommen wurde, bestand aus n=32 Probanden.

3.7 Einhaltung der Interventionsvorgaben

Die Einhaltung der Interventionsvorgaben konnte gemessen werden durch die Analyse von Urin-, Stuhl- und Blutproben. Die Compliance bei der Ballaststoffreichen Diät wurde überprüft mittels Hydrogen-Atem-Tests (Weickert et al, 2006) und durch die Messung der kurzkettigen fäkalen Fettsäuren (short-chain fatty acids, SCFA). Die Stuhlproben wurden weiterhin untersucht auf Darm-Mikrobiotika, die Einfluss nehmen auf die Butyratproduktion, Saccharolyse und Kohlenhydratverarbeitung mittels Durchflussszytometrie (Mueller et al, 2006). Die Einhaltung der Vorgaben für die Hochprotein-Diät Intervention wurde überprüft mittels Nitrogen/Kreatinin ratio (Simmons et al, 1972) Bestimmung im Urin mittels Isotop-ratio Massenspektrometrie und durch die Analyse der Konzentration der verzweigtkettigen Aminosäure Isovaleriansäure in den Stuhlproben (Geypens et al, 1997).

3.4 Messung der hepatischen und der Ganzkörper-Insulinsensitivität

Die Messung der Ganzkörper-Insulinsensitivität wurde mit dem Goldstandard, dem euglykämischen hyperinsulinämischen Clamp (EHC) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden dargestellt als M-Wert ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). Die hepatische Insulinsensitivität wurde mit der Infusion von $[6,6\text{-H}^2\text{H}_2]$ Glukose im Clamp ermittelt und konnte dargestellt werden als endogene Glukoseproduktion (EGP, $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) der Leber und der Suppression während der Clamps (Weickert et al, 2007). Zur Durchführung des euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamps erschienen die Probanden morgens zwischen 07:15 und 08:00 Uhr nach einer Nahrungskarenz von 10 Stunden über Nacht in der metabolischen Ambulanz des DIfE. Zu Beginn des Clamps wurden an beiden Armen zwei intravenöse Katheter gelegt. Der Arm, an dem die Blutentnahme erfolgte, wurde für die Dauer des EHC in eine Wärmebox (65°C) gelegt, um das venöse Blut zu arterialisieren. Nach intravenöser Gabe eines Insulinbolus zum Zeitpunkt -10 min (individuell adjustiert entsprechend der Körperoberfläche des Probanden), wurde eine kontinuierliche Insulininfusionsrate von $40 \text{ mU kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ eingestellt. Blutentnahmen zur Glukosebestimmung sowie zur Analyse metabolischer Marker wurden zu definierten Zeitpunkten (Siehe Abbildung 5) entnommen. Ebenso wurden in einer Subgruppe Blutentnahmen zur Analyse der stabilen Isotopen entnommen. Der EHC wurde über einen Zeitraum von 2 Stunden durchgeführt, solange bis stabile Bedingungen erreicht

wurden. Diese waren definiert als eine stabile Glukoseinfusionsrate über einen Zeitraum von 30min und eine stabile Plasmaglukosekonzentration von 4,4 +/- 0,4 mmol/L. Die Blutentnahmen in diesem sogenannten steady state dienten zur Analyse des M-Wertes und somit zur Bestimmung der Ganzkörperinsulinsensitivität. Die Blutproben wurden nach Entnahme sofort gekühlt, zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand wurde gelagert bei - 80°C bis zur Analyse.

Der M-Wert berechnet sich aus der Glukoseinfusionsrate (INF), einem Korrekturfaktor für den Verlust von Glukose über den Urin (UC), der im Mittel 0,2 mg/(kg·min) beträgt, und einem Korrekturfaktor, der die Glukosewerte adjustiert für die Glukose, die den Glukoseraum verlässt oder hinzugefügt wird.

Dieser sogenannte „space correction factor“ (SC) berechnet sich folgendermaßen:

$$SC = \frac{(G_2 - G_1) \times 10 \times (0,19 \times \text{Körpergewicht (kg)})}{20 \times \text{Körpergewicht (kg)}}$$

$$20 \times \text{Körpergewicht (kg)}$$

G_2 und G_1 sind hierbei die Glukosekonzentrationen in mg/dl am Ende und am Anfang der Zeitperiode, 2) $10 \times (0,19 \times \text{body wt}) (\text{kg}) \times (G_2 - G_1)$ berechnet die Glukose (mg) die den Glukoseraum in der 20 minütigen steady state Zeitdauer verlässt oder hinzugefügt wird. Die Formel kann reduziert werden auf

$$SC = (G_2 - G_1) \times 0,095$$

Der M-Wert kann dann mittels folgender Formel errechnet werden:

$$M = INF - UC - SC$$

Der M-Wert hat die Einheit mg (Glukose) $\text{min}^{-1} \text{kg Körpergewicht}^{-1}$. Die Methode wurde 1979 von de Fronzo standardisiert und ist geeignet, Veränderungen der peripheren Insulinsensitivität zu messen (DeFronzo, 1979). Ein gestiegener M-Wert weist auf eine höhere Insulinsensitivität hin, während ein fallender M-Wert eine vermehrte Insulinresistenz anzeigt.

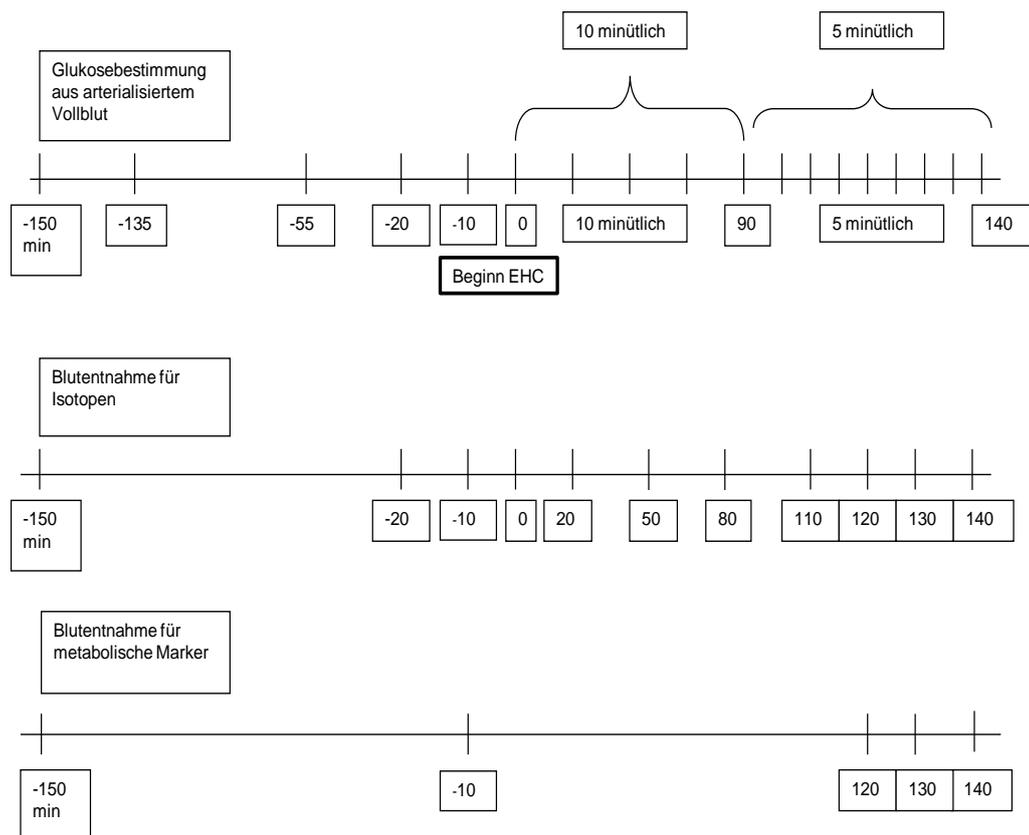


Abbildung 5 Zeitliches Ablaufschema der Blutentnahmen (eigene Darstellung)

3.9 Messung der Körperzusammensetzung

Die Verteilung des subkutanen und viszeralen Fettgewebes wurde mittels Magnetresonanztomographie gemessen (Machann J, 2006). Hierzu wurde ein 1.5Tesla whole body imager verwendet (Magnetom-Avanto, Siemens Healthcare, Deutschland). Der Fettgehalt in der Leber (berechnet in % (Fett/Wasser)) wurde mit der Proton magnetic-resonance-spectroscopy (^1H -MRS) bestimmt (Machann et al, 2006). Die Gesamt-Körperfettmasse und die Fettfreie Körpermasse wurden gemessen mittels der standardisierten und validierten Air-Displacement-Plethysmographie (Ginde et al, 2005)

3.10 Gewinnung des Materials zur molekularen Analyse

3.10.1 Entnahme der Fettbiopsie

Vor Beginn des euglykämisch-hyperinsulinämischen-Clamps wurde von erfahrenen Studienärzten des DIfE eine subkutane abdominelle Fettbiopsie durchgeführt. Die Biopsie wurde unter Lokalanästhesie mit 1% Lidocain lateral des Umbilicus durchgeführt und erfolgte bei allen drei CIDs eines Probanden auf derselben Seite des Bauches. Zum besseren Einführen der Biopsienadel wurde nach der Lokalanästhesie zunächst mit einem Skalpell eine kleine (ca. 3mm) Stichinzision gesetzt. Anschließend wurde mittels Vakuum-Biopsienadel unter leichter Bewegung eine Probe des subkutanen Fettgewebes gewonnen. Diese wurde zügig mit physiologischer Kochsalzlösung von Blutresten frei gespült und in zwei Aliquots à ca. 1g in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -80°C gelagert.

3.10.2 Verwendete Materialien und Spülsbstanzen

Die Biopsie wurde durchgeführt mit einem Hepafix®-Luer Lock Besteck für Leberbiopsie nach Menghini 15GI x1,8mm (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland. Verbrauchsmaterialien waren sterile Tücher, sterile Handschuhe, Kanülen (26Gx1 sowie 20Gx 1^{1/2}), Einmal-Injektionskanülen (B. Braun Sterican®, 14Gx3 1/8), Hautdesinfektionsmittel und Steristrips. Pro Biopsie wurden 2ml Lidocain 1%ig eingesetzt. Die Biopsien wurden mit einer Waage (OHAUS Adventurer Pro® Type AV 4102CM) abgewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren bis zur Lagerung bei -80°.

3.10.3 Entnahme der Muskelbiopsien

Die Probanden wurden angehalten ihre Supplemente einen Tag bis maximal eine Woche nach Abschluss des CID 3 noch weiter zu nehmen bis zur Entnahme der Muskelbiopsie. Die Probanden kamen morgens nüchtern und mit einem aktuellen Laborstatus, in dem Gerinnungswerte und ein Blutbild enthalten waren, in die Stoffwechselambulanz des DIfE. Die Probanden waren über die Risiken der Biopsie intensiv aufgeklärt worden (v.a. Blutung und Thrombosegefahr, Muskelkaterähnliche Schmerzen für ein paar Tage). Die

Biopsie wurde durchgeführt von erfahrenen Studienärzten der Abteilung Klinische Ernährung des DIfE.

Die Probanden wurden hierfür zunächst in die seitliche Lage, ggf. auch in die Bauchlage gebracht (linke Seitenlage bei Biopsie am rechten Bein). Das entsprechende Bein wurde, wenn nötig rasiert und gründlich desinfiziert. Anschließend erfolgte die lokale sub- bzw. intrakutane Anästhesie mit 1% Lidocain, welches ausschließlich benutzt wurde, da es die Analysen der Proben nicht störte. Die Wade wurde dann steril abgedeckt mit einem Lochtuch und die Haut wurde mit einem sterilen Skalpell inzidiert. Es wurde eine Biopsienadel (Biopsie Handy, Somatex, Größe 14 G/2,10mm) eingeführt und in der Regel wurden zwei Biopsate genommen. Die Proben wurden von nicht gewünschtem Material getrennt, in das Reaktionsgefäß gegeben, gewogen und sofort in flüssigen Stickstoff verbracht. Sie wurden bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

Die Wundränder wurden mittels Steri-Strip adaptiert und mit einem Pflaster versiegelt. Nach Abschluss der Biopsie wurde für ca. eine Stunde ein Druckverband angelegt und das Bein mit einem Kühlkissen gekühlt. Die Probanden ruhten danach insgesamt ca. 1,5 -2 Stunden und waren angehalten, das Bein in den nächsten drei Tagen zu entlasten und keinen Sport zu treiben.

3.11 Aufarbeitung des Biopsiematerials

3.11.1 Testversuch mit getrennter zytoplasmatischer- und nukleärer Fraktion

In der primären Testphase der Proteinextraktion aus den Fettbiopsien wurde zunächst eine Trennung zwischen zytoplasmatischer Fraktion und Kernfraktion angestrebt. Ausgangsmaterial war eine Fettbiopsie, die standardisiert nach Entnahme mit physiologischer Kochsalzlösung gespült worden war und anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Es wurde ein Kit zur differentiellen Extraktion zytoplasmatischer und nukleärer Proteine verwendet (nuclear extract kit, active motif, Carlsbad, California, USA), welches unter anderem Phosphatase- und Proteaseinhibitoren enthält. Das Gewebe wurde im hypotonen Puffer des Kits in Gegenwart von Phosphataseinhibitoren aufgetaut und zum Zellaufschluss der Potter-Homogenisator verwendet. Nach Abtrennung der zytoplasmatischen Fraktion wurden Proteaseinhibitoren zugesetzt und die nukleäre Fraktion mit einem Lysispuffer in Gegenwart von Proteaseinhibitoren extrahiert. Anschließend wurde eine

Proteinkonzentrationsmessung durchgeführt und die Proteinextrakte nach Denaturierung in einen SDS-haltigen Ladepuffer auf zwei SDS-Polyacrylamid-Gele (10%) aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Gel wurde mit Coomassie-Brilliant Blue angefärbt. Es zeigte in der zytoplasmatischen Fraktion ein Bandenmuster mit einer starken Bande bei ca. 68kDa, die wahrscheinlich durch Albumin, welches in den nicht ganz frei gespülten Blutresten der Biopsie enthalten war, zustande kam. Es konnte so davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der gemessenen Proteinkonzentration durch Albumin verursacht wurde.

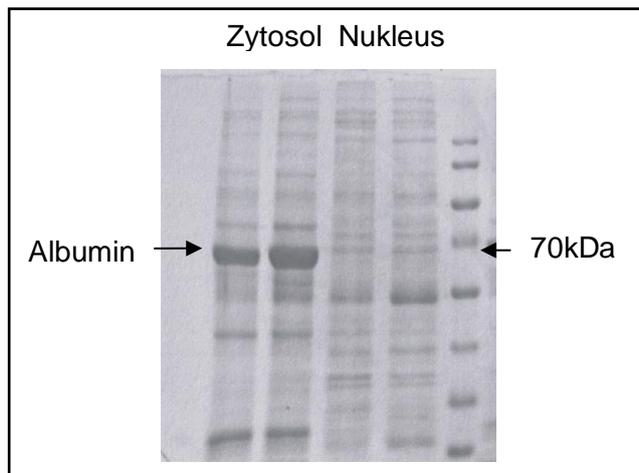


Abbildung 6 Darstellung des Färbegels mit der Albuminbande bei 68kDa (eigene Darstellung)

Das zweite Gel mit identischem Probenmaterial wurde im semi-dry Western-Blot-Verfahren geblottet. Hierbei wurde das Gel nach Beendigung der Elektrophorese in Kathodenpuffer equilibriert. Die Membran wird in Methanol aktiviert und in einen Transferstapel aus Whatman-Papieren verbracht, die in SDS- und Argininhaltigem Kathodenpuffer bzw. Anodenpuffern, die aus verschiedenen Konzentrationen von Methanol bestehen, eingetaucht wurden. Der Aufbau des Transferstapels ist wie folgt: 5 Whatmanpapiere in Kathodenpuffer, Gel, PVDF-Membran, 4 Whatmanpapiere in Anodenpuffer 2, 2 Whatmanpapiere in Anodenpuffer 1. An die Graphitelektroden, zwischen die der Transferstapel gelegt wird, wurde eine Spannung von 100mA für eine Stunde angelegt. Die Membran wurde nach anschließender Blockierung mit 5% Milch in TBST (Tris-buffered saline with Tween 20) erst mit Antikörpern gegen S6K1 inkubiert und dann mit Antikörpern gegen das Haushaltsprotein β -Actin. Hierbei zeigte sich, dass die Trennung zwischen Kern- und Zytoplasmafraktion nicht komplett stattgefunden hatte. Es fanden sich auch zytoplasmatische Proteine, wie das β -Actin, in den Kernbanden wieder.

In einem nächsten Versuch wurde frisches Gewebe unmittelbar nach Entnahme aufgearbeitet. Dieses wurde ebenfalls mittels active motif kit und Potter-Homogenisator in eine nukleäre und eine zytosolische Fraktion aufgetrennt. Es wurde dann im Western-Blot wieder die Trennung der beiden Fraktionen vergleichend untersucht. In der zytosolischen Fraktion konnte β -Actin nachgewiesen werden, während es in der nukleären Fraktion nicht detektierbar war, so dass von einer besseren Trennung der Fraktionen im Versuch mit einer nicht gefrorenen Biopsie ausgegangen werden konnte. In einem weiteren Versuch wurde eine Fettgewebsbiopsie nach Entnahme in zwei Fraktionen unterteilt. Die erste Fraktion wurde routinemäßig mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und schockgefroren. Die zweite Fraktion wurde mit TBST gespült, dem Phosphataseinhibitoren zugesetzt worden waren. Diese Probe wurde nach dem Spülen ebenfalls schockgefroren. Für einen Western Blot wurde ein SDS-Gel auf beiden Hälften mit identischen Proben bestückt. Zur Markierung der Mitte wurde ein vorgefärbter Marker aufgetragen, der nach Transfer auf die Membran eine exakte Teilung ermöglichte. Eine Membranhälfte wurde mit einem S6K1- Antikörper und die andere Hälfte mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte S6K1 (p-S6K1) inkubiert. Vergleichend zeigte sich, dass im Zytosol die phosphorylierte Form der S6K1 deutlich geringer als die totale S6K1 detektierbar war. In der Kernfraktion war erwartungsgemäß keine S6K1 nachweisbar. Im Vergleich der zytosolischen Fraktionen der beiden Biopsien konnte in der direkt nach Entnahme mit Phosphataseinhibitor gespülten Probe deutlich mehr phosphorylierte S6K1 nachgewiesen werden.

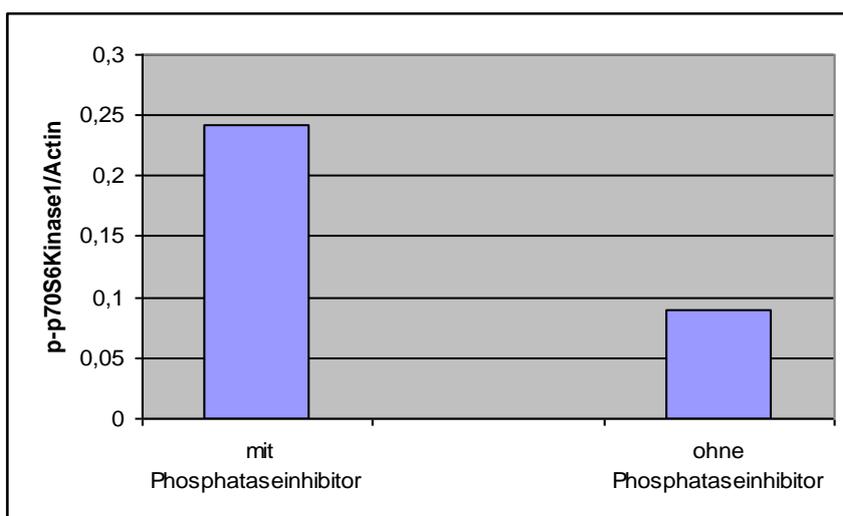


Abbildung 7a Darstellung des Versuchs für phospho-p70S6K1 nach Spülen mit/ohne Phosphataseinhibitor (eigene Darstellung)

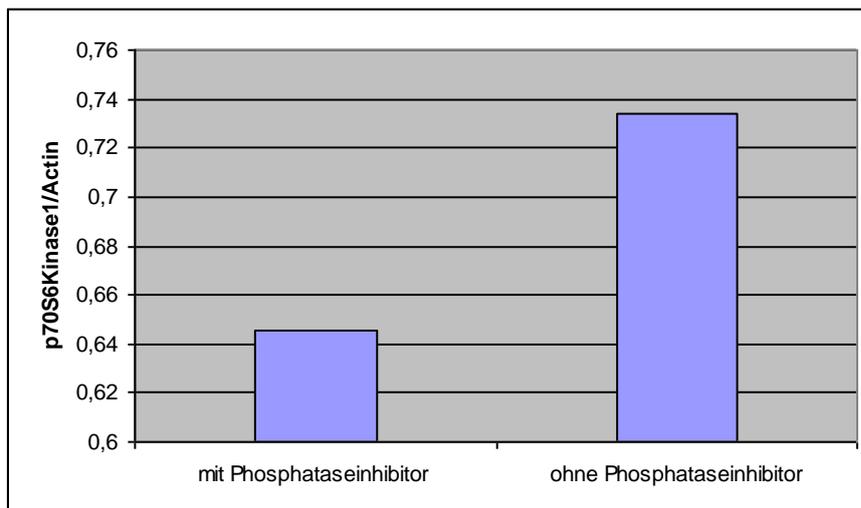


Abbildung 7b Darstellung des Versuchs für p70S6K1 nach Spülen mit/ohne Phosphataseinhibitor (eigene Darstellung)

Zusammenfassend zeigte sich, dass eine gute Trennung von zytosolischer und nukleärer Fraktion bei gefrorenen Proben nicht möglich war. Dies wurde durch den Nachweis von β -Actin in den Kernextrakten im Western Blot nachgewiesen. Die Spülung mit Phosphataseinhibitoren unmittelbar nach Entnahme der Biopsien zeigte zwar bessere Ergebnisse in der Darstellung der p-S6K1, sie war aber praktisch nicht mehr durchführbar, da die meisten Fettbiopsien schon mit physiologischer Kochsalzlösung gespült und schockgefroren vorlagen.

3.11.2 Testversuch mit Benutzung verschiedener Homogenisatoren

Da die Trennung von zytosolischer und nukleärer Fraktion mit gefrorenem Probenmaterial nicht einwandfrei möglich war, wurde für eine Totalextraktion aus den Biopsien eine Methode etabliert. Als Lysepuffer wurde RIPA-Puffer (Radioimmunoprecipitation assay) genutzt, dem Phosphatase- und Proteaseinhibitoren schon beim Auftauen der Probe beigefügt wurden. Es wurden dann verschiedene Homogenisatoren vergleichend getestet. Zum einen wurde wieder der Potter-Homogenisator verwendet. Zusätzlich wurde ein Teil der Proben sonifiziert. Dies wurde außerdem für mehrere Fettmengen getestet. So wurden für 300mg Fett, 400mg, 500mg und 600mg Fett jeweils die empfohlene dreifache Menge an RIPA-Puffer (vol/weight) verwendet und die daraus resultierende Proteinkonzentration verglichen. Zum anderen Teil wurde der Ultra-Turrax als Homogenisator verwendet. Hier wurde ebenfalls ein Teil

der Proben zusätzlich sonifiziert und die Ausbeuten verglichen. Zusätzlich wurde wegen relativ geringer Proteinkonzentrationen in den Fettgewebslysaten der Einsatz von Lysis-Puffer auf 2- und 1,5-fache Volumina reduziert. Hierbei zeigte sich, dass die Unterschiede der Proteinkonzentration zwischen sonifizierten und nicht sonifizierten Proben sehr gering waren. Für den Potterhomogenisator musste eine größere Menge Fett verwendet werden, als für den Ultra-Turrax um eine ähnliche Proteinkonzentration zu erhalten. Der Ultraturrax zeigte somit prozentual die höchste Proteinausbeute, was auch dadurch zu erklären war, dass bei der Verwendung des Ultra-Turrax auch Kernproteine im Lysat enthalten waren, die bei Verwendung des Potter-Homogenisators nach Zentrifugation im Sediment vorlagen.

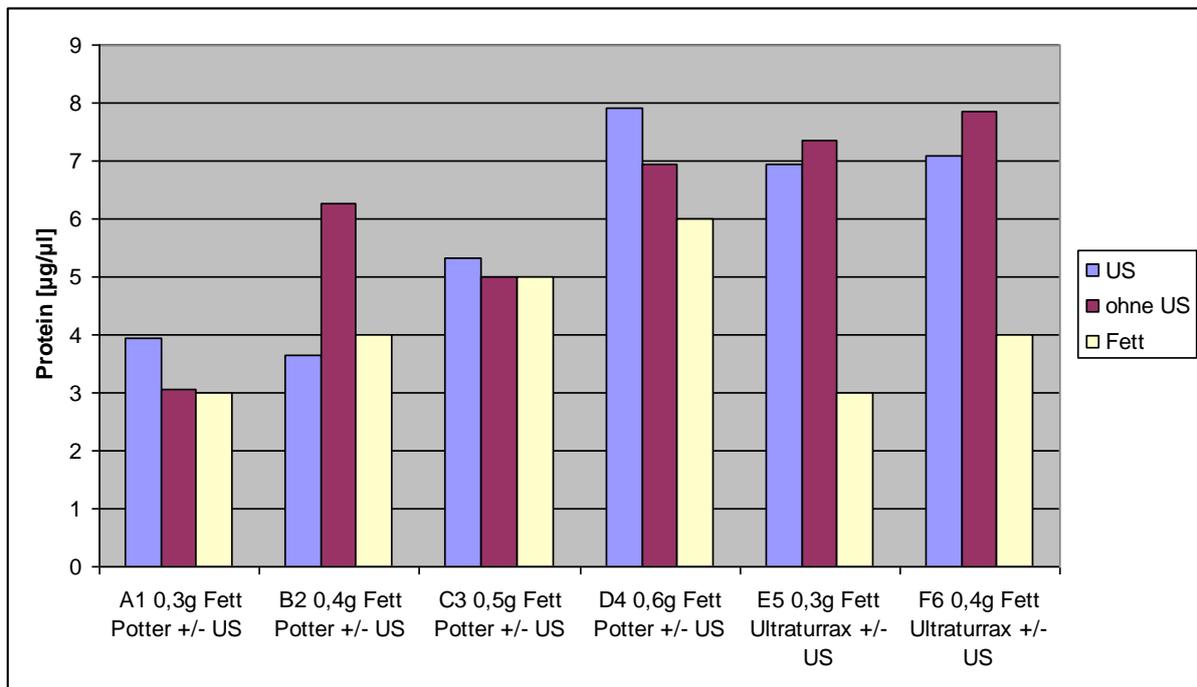


Abbildung 8 Darstellung der Proteinkonzentrationen aus unterschiedlichen Extraktionsmethoden (eigene Darstellung)

3.11.3 Proteinextraktion mit RIPA-Puffer

Zunächst wurde eisgekühlter RIPA-Puffer (Radioimmunoprecipitation assay) in vorgekühlte Reaktionsgefäße pipettiert. Die Menge des Puffers war abhängig von dem Gewicht des Biopsiematerials. Es wurde die 1.5fache Menge an RIPA-Puffer verwendet. Die Fettbiopsieproben wurden bis zu ihrer unmittelbaren Bearbeitung auf Trockeneis gelagert. Sämtliche Schritte der Proteinextraktion wurden auf Eis durchgeführt. Die

Homogenisierung erfolgte, indem die Probe in das Reaktionsgefäß mit dem RIPA überführt wurde. Darauf folgte die sofortige Homogenisierung mit dem Ultra-Turrax (IKA T10 basic, Staufen, Deutschland). Anschließend wurde die Probe in ein 2ml Reaktionsgefäß überführt und in der auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (Centrifuge 5417R, eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 20.800g für 20min zentrifugiert. Die Probe zeigte nach Abschluss der Zentrifugation einen dreischichtigen Aufbau: das Sediment, das Proteinlysate und oben eine Fettschicht. Um diese Schichten nicht wieder zu kontaminieren, wurde das Protein-Total-Lysat mit einer 2ml-Spritze und Kanüle abgezogen und in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Die Lysate wurden bis zu ihrer weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

RIPA-Puffer	Menge
100mM Tris-Cl, pH 7,4/ 300mM NaCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland)	5 ml
10% NP40 (Nonidet P40 Substrate, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)	1 ml
Aqua dest.	3,6 ml
10% Na-Deoxycholat (Appli-Chem, Darmstadt, Deutschland)	250 µl
Complete Mini EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets (Roche, Mannheim, Deutschland)	1 Tabl
PhosStop Phosphatase Inhibitor cocktail tablets(Roche, Mannheim, Deutschland)	1 Tabl.
200mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluorid) in Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	50 µl

Tabelle 4 Zusammensetzung des verwendeten RIPA-Puffers (eigene Darstellung)

3.11.4 Testversuche mit den Muskelbiopsien

Zu Beginn wurde versucht, die Muskelbiopsien, ähnlich wie die Fettbiopsien mit dem Ultra Turrax und RIPA-Puffer zu homogenisieren. Hierzu wurden zu jedem Muskelbiopsat (ca. 0,01g) 400µl RIPA-Puffer auf Eis in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde versucht, die Probe mit dem Ultra-Turrax zu homogenisieren. Die Muskelfasern konnten jedoch von dem Gerät nicht effektiv aufgeschlossen werden.

3.11.5 Proteinextraktion der Muskelbiopsate mittels Kugelmühle

In einem weiteren Versuch wurde jede Probe auf Eis mit 400µl RIPA Puffer versetzt in einem speziellen Reaktionsgefäß, welches 5 Metallkügelchen enthielt. Das Reaktionsgefäß wurde dann in eine Kugelmühle eingesetzt. In der Kugelmühle wurden die Proben dann jeweils 2 mal für je 30 Sekunden homogenisiert und danach jeweils 30 Sekunden gekühlt. Anschließend wurden die Proben in neue Reaktionsgefäße überführt und 20 Minuten bei 20800g bei einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Abschließend wurde das Proteinlysate in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert. Das Sediment wurde ebenfalls gesondert bei -80°C gelagert.

3.12 Proteinkonzentrationsmessung

Die Proteinkonzentration aus den Fettbiopsie-Protein-Lysaten und den Muskelbiopsie-Proteinlysaten wurde mittels einer BSA-Standardkurve unter Verwendung eines BCA Protein Assays (BCA Protein Assay, Thermo Scientific, Rockford, USA) durchgeführt. Hierbei findet in einem alkalischen Medium eine Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} statt, welches durch die Bicinchoninsäure selektiv kolorimetrisch detektiert werden kann. Das Produkt zeigt eine lineare Absorption bei 562 nm mit steigender Proteinkonzentration und ermöglicht eine spektrophotometrische Bestimmung von Proteinen in wässriger Lösung. (www.piercenet.com/files/1296as8.pdf abgerufen am 30.12.2009). Zunächst wurde eine Standardreihe als Eichkurve hergestellt in den Konzentrationen 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125mg/ml BSA in RIPA-Puffer sowie RIPA-Puffer als „blank“. Diese wurden in Triplikaten in eine 96well Platte pipettiert mit jeweils 5 µl pro well. Die Proteinextrakte wurden 1:10 in RIPA-Puffer verdünnt und je 5 µl für Triplikate eingesetzt. Um die Reaktionslösung herzustellen wurde BCA Lösung A mit Lösung B im Verhältnis 50:1 gemischt. Nach Zugabe von je 100 µl Reaktionslösung pro well, kurzem Mischen mit den Proben auf einem horizontalen Schüttler (Heidolph DSG 304/M4, Schwabach,

Deutschland) und 30min Inkubation bei 37°C erfolgte die photometrische Messung bei 562 nm (Wallac 1420 Victor 2, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) und die Berechnung der Proteinkonzentration anhand der Standardreihe.

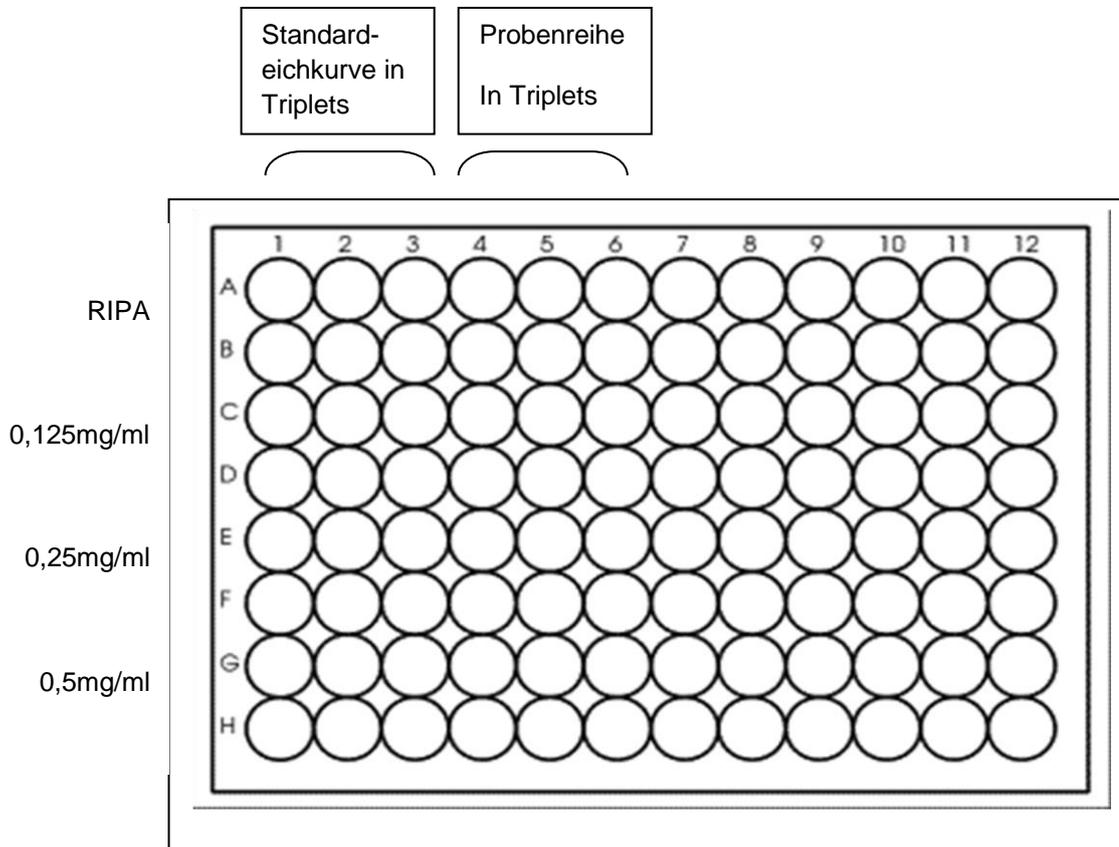


Abbildung 9 Pipettierschema Proteinkonzentrationsmessung (eigene Darstellung)

	Menge
BCA Lösung A (Pierce, Rockford, IL, USA)	10ml
BCA Lösung B (Pierce, Rockford, IL, USA)	200 µl

Tabelle 5 Verwendete Mengen BCA Lösung (eigene Darstellung)

3.13 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese)

Um die Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufzutrennen, wurde zur Denaturierung Natriumdodecylsulfat (SDS) verwendet. Die Proteine dissoziierten in Polypeptiduntereinheiten mit gleichmäßig negativer Ladung, die während der Elektrophorese zum positiven Pol in Abhängigkeit ihrer Größe im vernetzten Polyacrylamidgel wanderten. (Sambrook JF, 2001) Die Vernetzung der Acrylamidketten wurde gestartet durch freie Radikale, die bei der Reaktion von Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammonpersulfat (APS) gebildet werden. (Sambrook JF, 2001). Die polymerisierten Acrylamide wurden vernetzt durch N,N' Methylenbisacrylamid (UK, 1970) Für Gele mit 1,5mm Stärke wurde eine Kammer aus 2 Glasplatten mit entsprechenden Spacern zunächst mit dem Trenngel nach Polymerisationsstart zu 3/4 gefüllt und mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 30 Minuten Polymerisationszeit wurde das Isopropanol mit Filterpapier abgenommen und die Oberfläche des Gels kurz mit Reinstwasser gespült. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel mit einer geringeren Acrylamidkonzentration (5%) gegossen und ein 15 Well Kamm eingeführt für die Bestückung des Gels mit den Proteinproben nach Polymerisation. Bei der Gelelektrophorese für die Analyse von mTOR wurde ein Gel mit drei Schichten verwendet. Da das mTOR-Molekül mit 289kD relativ groß ist und das benötigte Haushaltsprotein Gapdh mit 37kD sehr viel kleiner ist, wurde ein unteres Trenngel mit 10% gegossen. Nach dessen Polymerisation wurde ein 7,5%-Acrylamidgel darauf gegeben. Das hier verwendete Sammelgel musste mit einer geringeren Konzentration von 4% Acrylamid eingesetzt werden, damit mTOR es passieren kann. Es wurden Proteinmengen von 50µg Protein pro Well eingesetzt. Dazu wurden die Proben entsprechend ihrer Konzentration mit Reinstwasser verdünnt und mit Proteinprobenpuffer nach Waki versetzt. Das Gesamtvolumen betrug 24µl pro Ansatz. Der Probenpuffer enthielt Dithiothreitol (DTT) zur Aufspaltung der Disulfidbrücken in der Proteinstruktur. Zusätzlich wurde ein biotinylierter Marker verwendet, um später die Proteingröße auf der Membran ablesen zu können. Zur Denaturierung wurden die Proben und der biotinylierte Marker für 5 Minuten auf 95°C erhitzt (ependorf Mastercycler, Hamburg, Deutschland). Nach Einspannen der Gele in eine Gelelektrophoresekammer mit Proteingellaufpuffer in 1:10 Verdünnung wurde der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen. Die Taschen des Gels wurden dann mit den denaturierten Proben und zusätzlich mit einem Proteinmarker bestückt, welcher während der Elektrophorese die Auftrennung nach Größe der Protein-

Banden anzeigte. Mittels Gelelektrophorese (Power Pac 200, Mini-Protean-Tetra-Electrophoresis-System, Bio Rad, Hercules, CA, USA) erfolgte zunächst die Aufkonzentration der Banden im Sammelgel bei 80V und nach ca. 30 min die weitere Auftrennung der Proteine bei 120V.

Trenngel	10%	7,5%	9%
Aqua bidest.	7,2 ml	8,7 ml	7,8 ml
Lower Tris (1,5M) pH 8,8 (Trishydroxyaminomethan, Merck, Darmstadt, Deutschland)	4,5 ml	4,5 ml	4,5 ml
Acrylamid 30% (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	6,0 ml	4,5 ml	5,4 ml
SDS 10% (Natriumdodecylsulfat, Merck, Darmstadt, Deutschland)	180 µl	180 µl	180 µl
APS 10% (Ammoniumpersulfat, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)	180 µl	180 µl	180 µl
TEMED (Tetramethylethyldiamin, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)	12 µl	12 µl	12 µl

Tabelle 6 Herstellung der Trenngele, zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe (eigene Darstellung)

Sammelgelgel	5%	4%
Aqua bidest.	4,0 ml	4,2 ml
Upper Tris (0,5M) pH 6,8 (Trishydroxyaminomethan, Merck, Darmstadt, Deutschland)	735 µl	735 µl
Acrylamid 30%, (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	1,0 ml	0,8 ml
SDS 10% (Natriumdodecylsulfat, Merck, Darmstadt, Deutschland)	58,8 µl	58,8 µl
APS 10% (Ammoniumpersulfat, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)	58,8 µl	58,8 µl
TEMED (Tetramethylethyldiamin, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)	5,88 µl	5,88 µl

Tabelle 7 Herstellung der Sammelgele, zur Aufkonzentration der Proteinbanden (eigene Darstellung)

	Lower Tris (1,5M)	Upper Tris (0,5M)
Tris-Base (Trishydroxyaminomethan, Merck, Darmstadt, Deutschland)	45,43 g	15,15 g
aqua dest.	Ad 200 ml	Ad 200 ml
HCl 37% (Merck, Darmstadt, Deutschland)	Ad pH 8,8	Ad pH 6,8
aqua dest	Ad 250 ml	Ad 250ml

Tabelle 8 Zusammensetzung von Tris (1,5M) und Tris (0,5M) zur Herstellung der Gele (eigene Darstellung)

10x Laufpuffer	Menge
Glycin (Merck, Darmstadt, Deutschland)	72 g
Tris Base (Trishydroxyaminomethan, Merck, Darmstadt, Deutschland)	15 g
SDS (Natriumdodecylsulfat, Merck, Darmstadt, Deutschland)	5 g
Aqua dest	ad 450 ml
HCl 37% (Merck, Darmstadt, Deutschland)	ad pH 8,6
Aqua dest	ad 500 ml

Tabelle 9 Zusammensetzung des Laufpuffers in der Gelelektrophoresekammer (eigene Darstellung)

6x Proteinprobenpuffer	Menge
Tris-HCl pH 6,8 (1M) (Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland)	3 ml
SDS (Natriumdodecylsulfat, Merck, Darmstadt, Deutschland)	1,2 g
Pyronin Y 1% (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)	0,6 ml
DTT (Dithiothreitol, Roche, Mannheim, Deutschland)	0,462 g
Glycerol 86% (Merck, Darmstadt, Deutschland)	7 ml

Tabelle 10 Zusammensetzung des Proteinprobenpuffers (eigene Darstellung)

3.14 Immunoblot mittels Transferkammer

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine PVDF Membran (Immobilon P, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) mittels Elektroblothing (Hoefer, Transphor, Amersham pharmacia biotech, San Francisco, California, USA) (Towbin H, 1979). Hierzu wurde das Polyacrylamidgel in Towbinpuffer equilibriert und in eine Gelhalterkassette verbracht, die in Towbin-Puffer in der Reihenfolge (+kodierte Gitter) - Schwamm –Whatman 3mm Papier – PVDF-Membran – Gel – Whatman 3mm Papier - Schwamm - (-kodierte Gitter) aufgebaut wurde. (Sambrook JF, 2001)

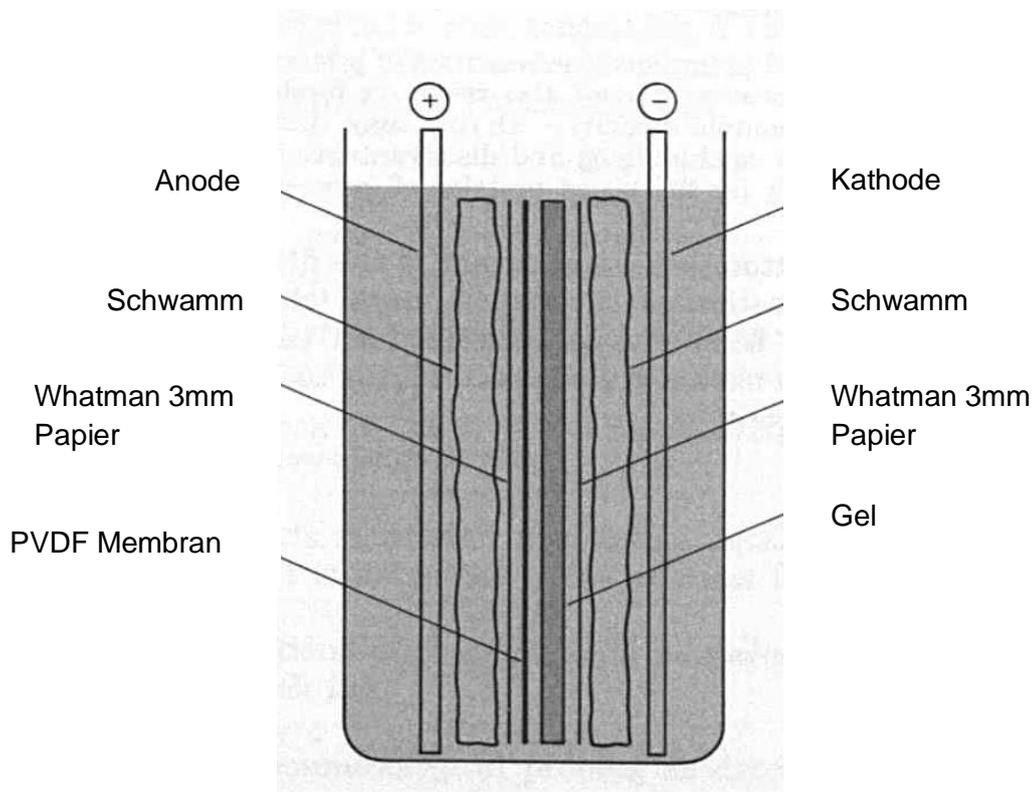


Abbildung 10 Aufbau der Gelhalterkassette nach Sambrook (Sambrook JF, 2001)

Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer für 2min in Methanol aktiviert und anschließend in Towbinpuffer equilibriert. Das Gel wurde aus den Glasplatten genommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel für 1 min in Towbin-Puffer equilibriert. Die Gelhalterkassette wurde in die Transferkammer mit Towbin-Puffer überführt, in der das Elektroblothing bei 0,97A bei 4°C für 1 ½ h (3h beim Blotting von mTOR) erfolgte.

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren und damit die Sensitivität und Spezifität der Immunodetektion zu verbessern wurde eine TBST-Lösung mit 5% Milchpulver verwendet. (Sambrook JF, 2001). Die Blockierung erfolgte für 1h bei Raumtemperatur auf einem Tumbling Table (Biometra WT 12, Göttingen, Deutschland). Anschließend wurde die überschüssige Blockierungslösung für 3 mal 5 Minuten mit TBST-Lösung abgewaschen und von der Membran der Abschnitt mit dem biotinylierten Größenstandard-Marker abgetrennt. Die Membran wurde dann noch einmal auf der Höhe von 70kDa -erkennbar als rote Bande auf dem mitgelaufenen Protein Marker- respektive zwischen der 70kDa und der 55kDa Bande durchgeschnitten. Um den Transfer auf die Membran zu überprüfen, wurden die Polyacrylamidgele nach dem Blotten mit Coomassie Brilliant Blue 30 Minuten angefärbt (Sambrook JF, 2001) und über Nacht entfärbt. Anschließend erfolgte die Fotodokumentation.

10x TBST	Menge
Tris-Base (Trishydroxyaminomethan, Merck, Darmstadt, Deutschland)	24,2 g
Natrium-Chlorid(Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)	175,2 g
Aqua dest	ad 2l
HCl 37% (Merck, Darmstadt, Deutschland)	ad pH 8,0
Tween 20 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)	10 ml

Tabelle 11 Zusammensetzung TBST-Lösung (eigene Darstellung)

Towbin-Puffer	Menge
Glycin (Merck, Darmstadt, Deutschland)	28,82 g
Tris-Base (Trishydroxyaminomethan, Merck, Darmstadt, Deutschland)	6,6 g
SDS (Natriumdodecylsulfat, Merck, Darmstadt, Deutschland)	2 g
Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	300 ml
Aqua dest	ad 2l

Tabelle 12 Zusammensetzung Towbin-Puffer (eigene Darstellung)

Marker	Menge
PageRuler Prestained Protein ladder (Fermentas, Burlington, Ontario, Canada)	3 µl
Biotinylated Protein ladder (Cell signalling, Danvers, MA, USA)	10 µl

Tabelle 13 Verwendete Marker (eigene Darstellung)

Coomassie Färbelösung	Menge
Aqua bidest	90ml
Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	90ml
Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)	20ml
Coomassie Brilliant Blue (Serva, Heidelberg, Deutschland)	0,25g

Tabelle 14 Zusammensetzung Färbelösung (eigene Darstellung)

Entfärbelösung	Menge
Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)	150ml
Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)	35ml
Aqua bidest	Ad 500ml

Tabelle 15 Zusammensetzung Entfärbelösung (eigene Darstellung)

3.15 Detektion und densitometrische Quantifizierung

Um spezifische Proteinbanden sichtbar zu machen wurde zunächst ein entsprechender Primärantikörper auf die Membran gegeben, der an die Epitope der jeweiligen Zielproteine bindet. Diese Primärantikörper wurden entsprechend der jeweiligen Herstellerangaben in TBST-Lösung und 5% BSA verdünnt und inkubierten auf den Membranen über Nacht bei 4°C auf einem Horizontalschüttler. Auf den oberen Teil der Membran wurde der spezifische Antikörper für das Target-protein und auf den unteren Abschnitt der Membran der Antikörper für das Haushaltsprotein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zur semiquantitativen Auswertung gegeben. Nach Entfernen der überschüssigen Primärantikörper und dreimaligem Spülen der Membranen mit TBST-Lösung wurde zur Detektion ein Sekundärantikörper eingesetzt, der mit Horse-Radish-Peroxidase (Meerrettichperoxidase, HRP) konjugiert war (Sambrook, 2001). Der sekundäre Antikörper wurde in TBST-Lösung mit 5% Milch im Verhältnis 1:2000

verdünnt. Der Membranabschnitt mit dem biotinylierten Größenstandard-Marker wurde entsprechend mit einem HRP-gekoppelten Anti-Biotin-Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte nach einer Stunde Inkubation der Membranen mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur und nach dreimaligem Waschen mit TBST-Lösung durch Zugabe eines Detektionsreagens (20x LumiGlo, Cell Signaling, Danvers, MA, USA). Luminol wird hierbei unter alkalischen Bedingungen durch HRP oxidiert und dadurch in einen angeregten Zustand versetzt. Beim Übergang in den basalen Zustand wird Licht emittiert, welches über eine CCD-Kamera mittels der Image Reader LAS-1000 Pro v 2.1 software (Fujifilm, Tokyo, Japan) dargestellt wurde. Anhand des biotinylierten Größenstandards waren die Zielproteinbanden ablesbar. Im Vergleich mit dem Referenzprotein Gapdh konnte mittels der Analysesoftware AIDA Image Analyzer (Raytest, Straubenhardt, Deutschland) eine semiquantitative Auswertung erfolgen.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
p70S6 Kinase Antibody	Cell signaling (Danvers, MA, USA)	1:1000
mTOR (7C10) Rabbit mAb	Cell signaling (Danvers, MA, USA)	1:1000
GAPDH (14C10) Rabbit mAb	Cell signaling (Danvers, MA, USA)	1:1000
Rabbit Anti-Vps34	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)	1:100
Monoclonal Anti-PIK3R4 antibody	Sigma Aldrich (St.Louis, USA)	1:500
Anti-Rabbit IgG, HRP-linked Antibody	Cell signalling (Danvers, MA, USA)	1:2000
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell signalling (Danvers, MA, USA)	1:2000
Anti-Biotin HRP-linked Antibody	Cell signalling (Danvers, MA, USA)	1:1000

Tabelle 16 Verwendete Antikörper (eigene Darstellung)

3.16 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse der ermittelten Daten wurde das Softwareprogramm SPSS 14.0 verwendet. Die Daten wurden zunächst normalisiert. Hierzu wurde der CID1 als Basis genommen, mit dem die Daten des CID 2 und CID 3 verglichen werden konnten. Die statistische Analyse erfolgte mit der n-fachen Expression relativ zum CID 1. Es wurden das arithmetrische Mittel und der Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) berechnet, bzw. die Standardabweichung bei Probandencharakteristika. Die Variablen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung geprüft. Für die Ergebnisse der Auswertung der S6K1 konnte keine Normalverteilung festgestellt werden, so wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet, zum

Vergleich der Subgruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Für die Ergebnisse der Daten der hVps34, mTOR und AKT lag eine Normalverteilung vor, so dass eine einfaktorische ANOVA mit dem Posthoc-Test Bonferroni für normalverteilte Mittelwertvergleiche durchgeführt wurde. Der phosphorylierte Anteil von AKT (p-AKT) wurde als Prozentanteil des Gesamt-AKT (AKT) angegeben und stellt die Aktivität des AKT dar. Ein signifikanter Unterschied wurde anerkannt mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$.

4. Resultate

4.1 Einhaltung der Diäten und Akzeptanz

Die Energieaufnahme und die Beachtung der Interventionsvorgaben waren in allen Gruppen vergleichbar. Die Zufriedenheit mit den Nahrungssupplementen war in den Gruppen ähnlich. Die Diäten und Supplements wurden in allen Gruppen gut akzeptiert und relevante Nebenwirkungen konnten nicht beobachtet werden. Die Dropout-Rate lag bei 20% nach 6 Wochen (22 von 111 Teilnehmern nach 6 Wochen (Kontrolle/HF/HP/MIX $n=4/9/5/4$), nach 18 Wochen waren weitere 5 Teilnehmer ausgeschieden (Kontrolle/HF/HP/MIX $n=3/1/1/1$)).

4.2 Biomarker und Körperzusammensetzung

Das Körpergewicht und der BMI blieben in allen Gruppen unverändert im Laufe der Intervention. Die totale Körperfettmasse, die abdominale Fettmasse und der Leberfettgehalt zeigten einen abnehmenden Trend, der in allen Gruppen vergleichbar war. Dies lässt sich möglicherweise erklären durch eine Restriktion der Fettaufnahme von 30% in allen Gruppen. In der Hochproteindiät-Gruppe zeigte sich ein leichter, aber nicht signifikanter Anstieg der fettfreien Körpermasse um 2% (6 Wochen, $p=0,086$; 18 Wochen $p=0,076$).

4.3 Blutparameter, Blutdruck, Anthropometrie

Es zeigten sich in den verschiedenen Interventionsgruppen keine Unterschiede in den anthropometrischen Markern, dem Blutdruck, der indirekten Kalorimetrie, Routinelaborwerten inklusive Leberfunktionstests, Blutlipiden, inflammatorischen Markern (C-reaktives Protein, CRP; Plasminogen-aktivator-inhibitor, PAI-1) und zirkulierenden Adipokinen (Adiponektin und Leptin).

Charakterisierung des Probandenkollektivs	Kontroll Gruppe	Hoch-Ballaststoff Gruppe	Hoch Protein Gruppe	MIX Gruppe	P Wert
Match Variablen					
Alter- Jahren	54.6±8.4	52.8±11.8	55.3±10.4	55.2±7.7	0.74
Geschlecht – no. (%)					0.98
Weiblich	17	17	18	16	
Männlich	11	11	10	11	
Hüft Umfang - cm	102.1±8.7	99.0±8.3	101.2±11.5	100.0±12.7	0.70
Body mass index (kg/m ²)	31.4±3.3	31.4±2.9	31.5±4.0	31.0±3.7	0.96
Gebrauch von Lipidsenkern und/oder Antihypertensiver Medikation	14/28	13/28	14/28	14/27	0.72
Weitere Charakteristika					
Größe– m	1.68±0.09	1.69±0.10	1.68±0.11	1.68±0.08	0.93
Gewicht - kg	88.4±11.8	90.1±12.7	89.1±16.6	87.9±15.1	0.95
Fettmasse – kg	36.2±8.1	36.8±7.6	34.8±9.4	34.9±11.7	0.82
Fettfreie Masse – kg	52.1±12.0	52.2±10.7	54.2±12.3	52.9±9.5	0.92
Viszerales Fettgewebe – ml	141±59	117±66	140±59	153±97	0.34
Subkutanes Fettgewebe - ml	285±87	296±93	275±115	279±111	0.90
Leber Fettgehalt- %	8.7±10.7	7.1±9.0	5.9±5.7	9.4±11.4	0.77
Insulin Sensitivität – M-Wert	4.38±1.68	4.42±1.65	4.21±1.70	4.49±1.79	0.95
Endogene Glucose Produktion basal – xxx	1.62±0.14	1.61±0.16	1.59±0.18	1.56±0.18	0.76
Glukose Metabolismus (oGTT)					
NGM/IFG/IGT/IFG+IGT	14/9/0/5	17/9/0/2	11/10/3/4	15/6/2/4	0.40
Blutdruck– mm Hg					
Systolisch	140±14	143±20	134±18	137±14	0.27
Diastolisch	92±11	93±14	90±10	89±11	0.69
Respiratorischer quotient - xxx	0.80±0.10	0.76±0.06	0.79±0.07	0.79±0.07	0.34
Resting energy expenditure	1462±237	1488±278	1520±319	1428±248	0.64
Cholesterol -					
Total – mmol/L	5.2±1.1	5.4±1.4	5.2±1.1	5.5±0.8	0.65
HDL – mmol/L	1.3±0.3	1.4±0.4	1.2±0.3	1.4±0.3	0.10
LDL – mmol/L	3.3±0.9	3.6±1.2	3.3±0.8	3.5±0.7	0.64
Triglyzeride – mmol/L	1.1±0.4	1.1±0.4	1.5±1.0	1.2±0.8	0.92
Free fatty acids – mmol/L	0.6±0.2	0.7±0.3	0.7±0.2	0.6±0.2	0.55
HbA1c - %	5.0±0.3	5.1±0.4	5.1±0.3	5.2±0.3	0.45
Plasma glukose – mg/dl	87.9±8.4	83.6±7.3	84.9±6.9	85.5±6.5	0.18
Plasma insulin – mU/L	8.9±4.0	8.8±4.1	9.3±3.5	10.0±7.7	0.83
Serum Adiponektin – µg/ml	12.5±6.8	14.4±10.0	13.3±6.2	11.4±5.6	0.51
Serum Leptin - ng/mL	18.7±9.9	20.2±13.6	17.1±10.5	19.4±15.9	0.82

Tabelle 17 Darstellung der Basisdaten des Patientenkollektivs aus (Weickert, 2011)

4.4 Ergebnisse der Nahrungsintervention auf die Insulinsensitivität

In den euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamptests, die an allen drei Untersuchungstagen durchgeführt wurden, konnten durch Bestimmung des M-Wertes Veränderungen der Ganzkörper-Insulinsensitivität gemessen werden.

Die Veränderungen des M-Wertes im Verlauf der Intervention waren nach 6 Wochen signifikant beeinflusst. In der Ballaststoffgruppe hatte sich die Insulin-Sensitivität signifikant verbessert (M-Wert von $4,09 \pm 0,37$ auf $4,61 \pm 0,38$ $\text{mg min}^{-1} \text{kg}^{-1}$, $p=0,010$). In der Hochproteindiät-Gruppe dagegen hatte sich die Ganz-Körper-Insulinsensitivität signifikant verschlechtert (4.20 ± 0.38 auf 3.71 ± 0.36 $\text{mg min}^{-1} \text{kg}^{-1}$, $p=0,013$).

Es lag damit ein signifikanter Unterschied zwischen Ballaststoff- und Hochprotein-Diät Gruppe zum Zeitpunkt CID2 vor nach Bonferroni-Korrektur ($p=0,008$).

Die Intermediäre Ballaststoff/Protein-Gruppe zeigte nach 6 Wochen Intervention einen Anstieg der Insulinsensitivität um 10%, der jedoch nicht signifikant ist ($p=0,15$). In der Kontrollgruppe war keine Veränderung zu sehen. Nach 18 Wochen Intervention waren die Unterschiede zwischen der Hochprotein-Diät Gruppe und der Ballaststoffgruppe nicht mehr signifikant (ANOVA, $P=0.054$).

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte zum einen ein Nachlassen der Proteiningestion sein, was sich anhand der etwas nachlassenden Nitrogen/Kreatinin Ratio im Urin zeigte. Zum anderen könnte ein Anpassungsmechanismus stattgefunden haben: Die fettfreie Masse hatte tendenziell zugenommen, während die Bauchfettmasse tendenziell abnahm. Es könnte hier also zu einem adaptiven Mechanismus gekommen sein.

Die Insulinsensitivität in der Ballaststoffgruppe blieb auch nach 18 Wochen signifikant um 16% versus Baseline erhöht, was in diesem Zusammenhang bedeuten könnte, dass die Ingestion von unlöslichen Fasern eine länger anhaltende Wirkung auf die Insulinempfindlichkeit besitzt als die Proteiningestion.

Die endogene Glukoseproduktion im Nüchternzustand war verändert nach 6 Wochen Intervention (ANOVA, $p=0,005$) in Form eines leichten Anstiegs versus Baseline in der Hochproteindiät-Gruppe nach 6 und nach 18 Wochen. Die endogene Gukoseproduktion im Clamp-Test war bei allen Gruppen gleichermaßen supprimiert ($p<0,0001$ an allen CIDs).

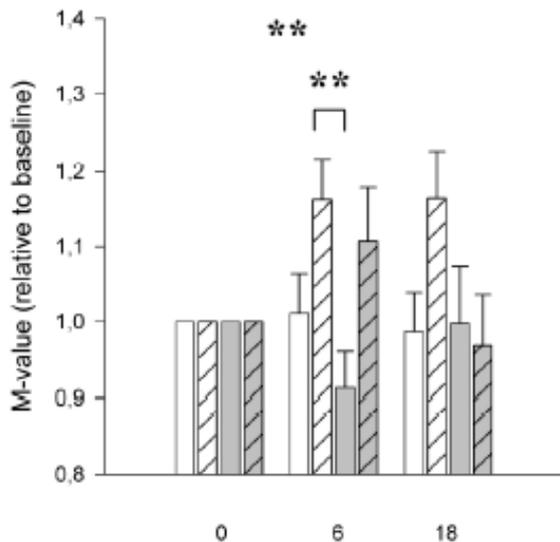


Abbildung 11 Veränderungen des M-Wertes nach 6 und 18 Wochen Intervention nach (Weickert, 2011)

Die sonstigen Marker für eine Insulinsensitivitätsveränderung wie HbA1c und Nüchtern-Insulin waren nicht verändert durch die Intervention. Die Ergebnisse aus den Oralen Glukosetoleranztests, der HOMA-IR (homeostasis-model-assessment for insulin-resistance) zeigte keine großen Unterschiede. Allein die Nüchtern-Glukosewerte ergaben leichte Unterschiede nach 6 Wochen Intervention (ANOVA, $p=0,045$; HP versus HF, $p=0,079$).

4.5 Ergebnisse der Laboranalyse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Western Blot Analyse des Hochprotein-Interventionsarmes im Vergleich zur Kontrollgruppe, zum Ballaststoff-Interventionsarm und zu der Intermediär-Ballaststoff/Proteingruppe dargestellt. Die Intervention dauerte insgesamt 18 Wochen, die sich in zwei Phasen - eine isokalorische (6 Wochen) und eine ad libitum Phase (12 Wochen) - aufteilte. In dieser Interventionsstudie nahmen übergewichtige Probanden jeweils zweimal am Tag Ernährungssupplemente zu sich, die in der Ballaststoffgruppe mit unlöslichen Fasern angereichert waren und in der Hochproteingruppe mit pflanzlichen und Molkeproteinen.

Die densitometrische Auswertung der durch Immunodetektion entstandenen Banden erfolgte anhand des Schwärzungsgrades, dargestellt als Integral/Area-Background. Die

Target-Proteine wurden normiert durch Quotientenbildung zwischen Target-Proteinintensität und der Intensität der Banden des Haushaltsproteins GAPDH. Die Werte des CID 1 wurden als Nullpunkt der Intervention festgesetzt und die normierte n-fache Veränderung der Proteinmenge relativ zum ersten Untersuchungstag ermittelt. Die Ergebnisse wurden dargestellt als prozentualer Proteingehalt Delta over baseline (DOB %).

	Diät	Mittelwert CID 2/1 +/- SEM	Mittelwert CID 3/1 +/- SEM
mTOR	Kontrolle	1,24 +/- 0,32	1,14 +/- 0,32
	Ballaststoffreich	1,43 +/- 0,44	1,26 +/- 0,38
	Hochproteindiät	0,96 +/- 0,15	1,26 +/- 0,29
	Intermediär	1,20 +/- 0,22	1,07 +/- 0,23
p70S6Kinase1	Kontrolle	0,92 +/- 0,14	0,99 +/- 0,20
	Ballaststoffreich	0,92 +/- 0,10	0,88 +/- 0,14
	Hochproteindiät	1,64 +/- 0,31	2,33 +/- 1,09
	Intermediär	0,98 +/- 0,28	1,23 +/- 0,60
AKT	Kontrolle	1,03 +/- 0,22	1,36 +/- 0,44
	Ballaststoffreich	1,47 +/- 0,64	0,87 +/- 0,18
	Hochproteindiät	1,19 +/- 0,15	1,11 +/- 0,29
	Intermediär	1,30 +/- 0,35	1,54 +/- 0,68
Phospho-AKT	Kontrolle	3,48 +/- 1,52	2,96 +/- 1,14
	Ballaststoffreich	1,58 +/- 0,59	1,38 +/- 0,28
	Hochproteindiät	1,67 +/- 0,83	1,25 +/- 0,58
	Intermediär	0,73 +/- 0,15	0,72 +/- 0,34
hVps34	Kontrolle	1,26 +/- 0,29	1,20 +/- 0,27
	Ballaststoffreich	1,39 +/- 0,36	1,24 +/- 0,24
	Hochproteindiät	1,36 +/- 0,14	1,26 +/- 0,31
	Intermediär	1,36 +/- 0,22	1,04 +/- 0,12

Tabelle 18 Absolute Ergebnisse der Western Blots (eigene Darstellung)

4.5.1 Mammalian target of rapamycin (mTOR)

Um die molekularen Auswirkungen einer Ballaststoffreichen versus Proteinreichen Ernährungsintervention zu analysieren wurde zunächst das zentrale Protein des Insulinsignalwegs mTOR untersucht. Nach Proteinextraktion aus den Fettgewebsbiopsien mittels RIPA-Lyse Puffer und Homogenisierung mittels Ultraturrax, wurde die Proteinkonzentration mit einem BCA-assay gemessen. Die Proteinkonzentration könnte beeinflusst worden sein, durch die Blutreste, die trotz Spülen der Biopsate mit physiologischer Kochsalzlösung nicht ganz beseitigt werden konnten. Wie in der Coomassie Brilliant Blue Färbung eines Gels nach der Elektrophorese dargestellt werden konnte, zeigte sich bei einer Größe von ca. 68kDa eine starke Bande, die vermeintlich durch Albumin entstanden sein könnte. Die Proteinextrakte sind mit der Western Blot Technik analysiert worden. Die Darstellung der Banden auf der PVDF-Membran zeigte sich für das Targetprotein mTOR als sehr schwach, trotz dreistündigem Transfer in der Wet Blot Transferkammer. In der densitometrischen und statistischen Analyse der Western Blots für mTOR zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Interventionsgruppen zum Zeitpunkt CID 2. Auch zum Zeitpunkt CID 3 gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied sowohl im direkten Vergleich der Interventionsgruppen, als auch in der Entwicklung der Ergebnisse innerhalb der Gruppen.

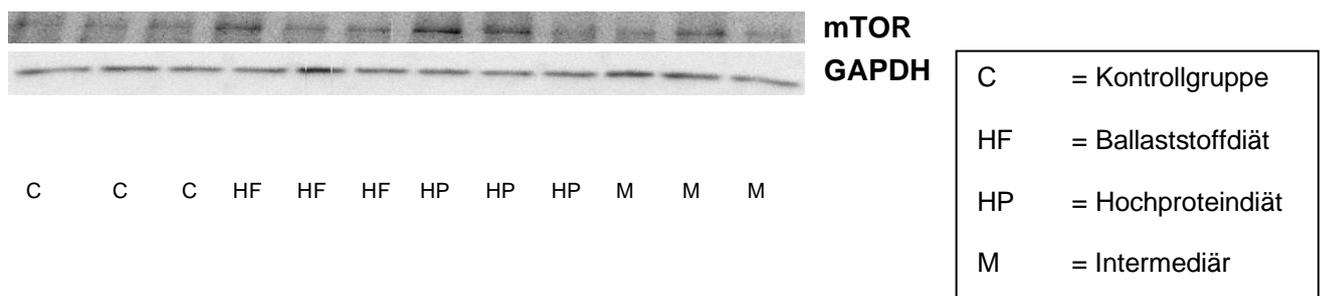


Abbildung 12a Darstellung der Immunodetektionsbanden von mTOR (eigene Darstellung)

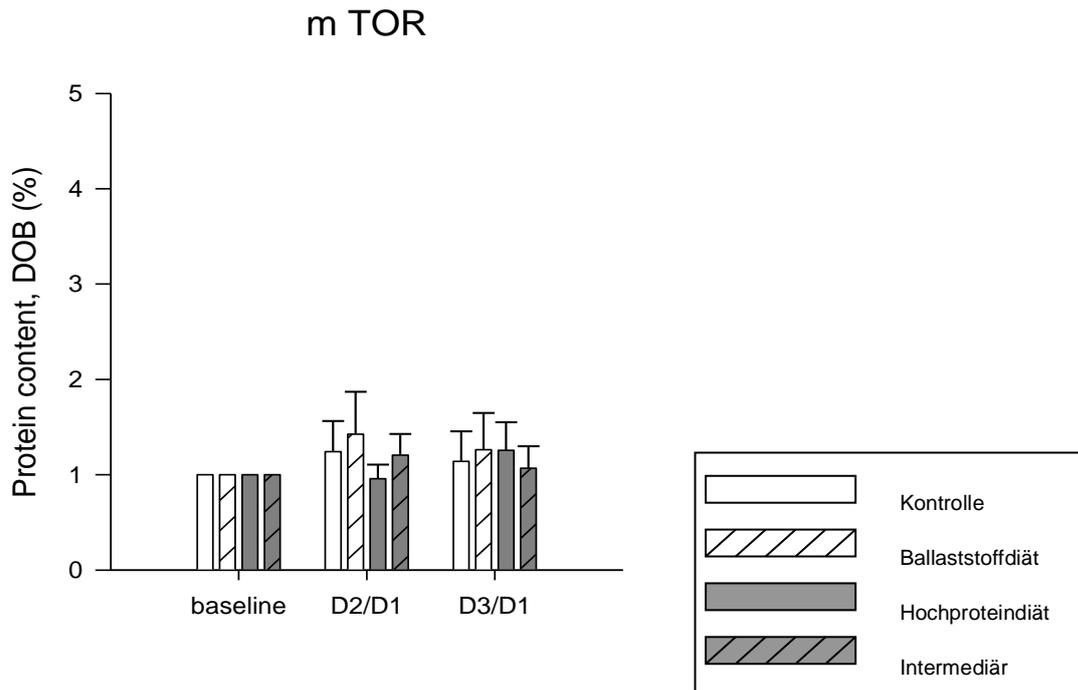


Abbildung 12b Darstellung der Proteinexpression von mTOR (eigene Darstellung)

4.5.2 p70S6 Kinase 1 (S6K1)

Ein ganz anderes Bild ergab sich stattdessen bei der mTOR- nachgeschalteten S6K1. Im euglykämisch-hyperinsulinämischen Clamp konnte eine Verschlechterung der Insulinsensitivität in der Hochproteindiätgruppe im Sinne einer Insulinresistenz zum Zeitpunkt CID 2 festgestellt werden, wohingegen die Insulinsensitivität in der Hoch-Ballaststoffgruppe sich verbesserte. Diese klinischen Daten konnten auf Proteinexpressionsebene verifiziert werden.

Nach sechs Wochen isokalorischer Phase konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem Hochprotein-Diät Arm und der Ballaststoffreichen Gruppe festgestellt werden ($p=0,026$). Zum Zeitpunkt des zweiten Untersuchungstages (CID2) war die S6K1 in der Hochproteingruppe signifikant höher als in der Ballaststoffreichen Gruppe. Des Weiteren war die S6K1 nach sechs Wochen isokalorischer Diät in der Hochproteingruppe höher als in der Intermediär Gruppe. Dies war jedoch nur ein Trend ($p=0,053$). Der Gehalt an S6K1 war in der Hochproteingruppe auch höher als in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt zweiter Untersuchungstag. Dies war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,073$),

möglicherweise erklärt durch die geringe Fallzahl. Nach einer Interventionsdauer von 18 Wochen, zum Zeitpunkt CID 3, war in Assoziation zu der Messung der Insulinsensitivität auch auf Proteinexpressionsebene eine Verminderung der Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen sichtbar. Auch in der Entwicklung der Ergebnisse zwischen dem CID 2 und CID 3 war in der Hochproteindiätgruppe keine deutliche Veränderung sichtbar.



Abbildung 13a Darstellung der Immunodetektionsbanden der p70S6Kinase1 (eigene Darstellung)

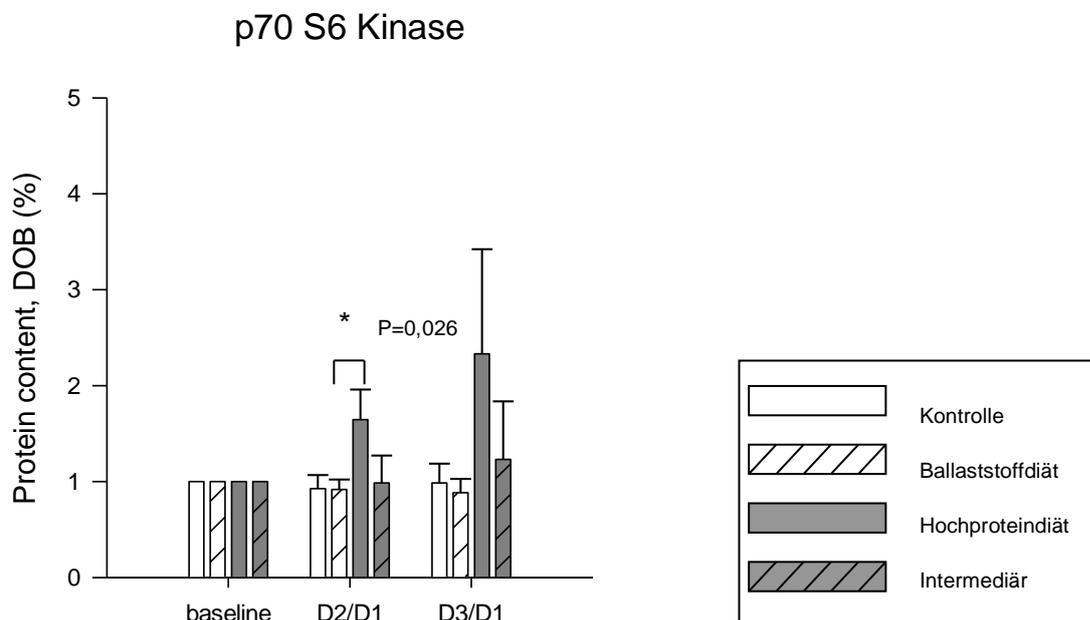


Abbildung 13b Darstellung der Proteinexpression der S6K1 (eigene Darstellung)

4.5.3 Proteinkinase B / AKT

Mit der Proteinkinase B/AKT wurde ein weiteres dem mTOR nachgeschaltetes Protein untersucht. In der Annahme, dass AKT sich ähnlich wie die S6K1 verhalten würde, wurden die Western Blots auf dieses Target hin untersucht. Hier konnte zum Zeitpunkt CID 2 kein signifikanter Unterschied zwischen der Hochballaststoff Gruppe und der Hochproteindiät Gruppe gezeigt werden. Auch in der Entwicklung zum CID 3 innerhalb der Gruppen und im Vergleich der unterschiedlichen Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der Proteinexpression von AKT nachgewiesen werden. Dies könnte bedingt sein durch die interindividuellen Unterschiede in der Bandenqualität in den Western Blots.

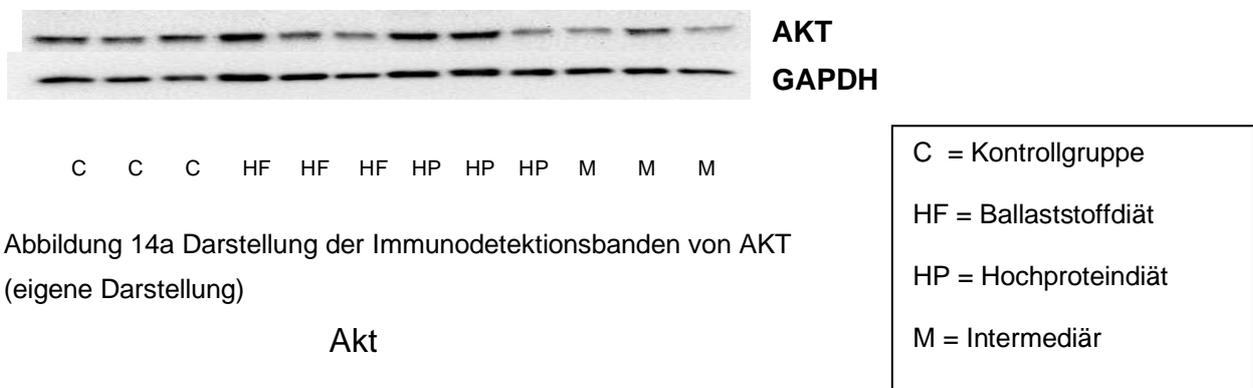


Abbildung 14a Darstellung der Immunodetektionsbanden von AKT (eigene Darstellung)

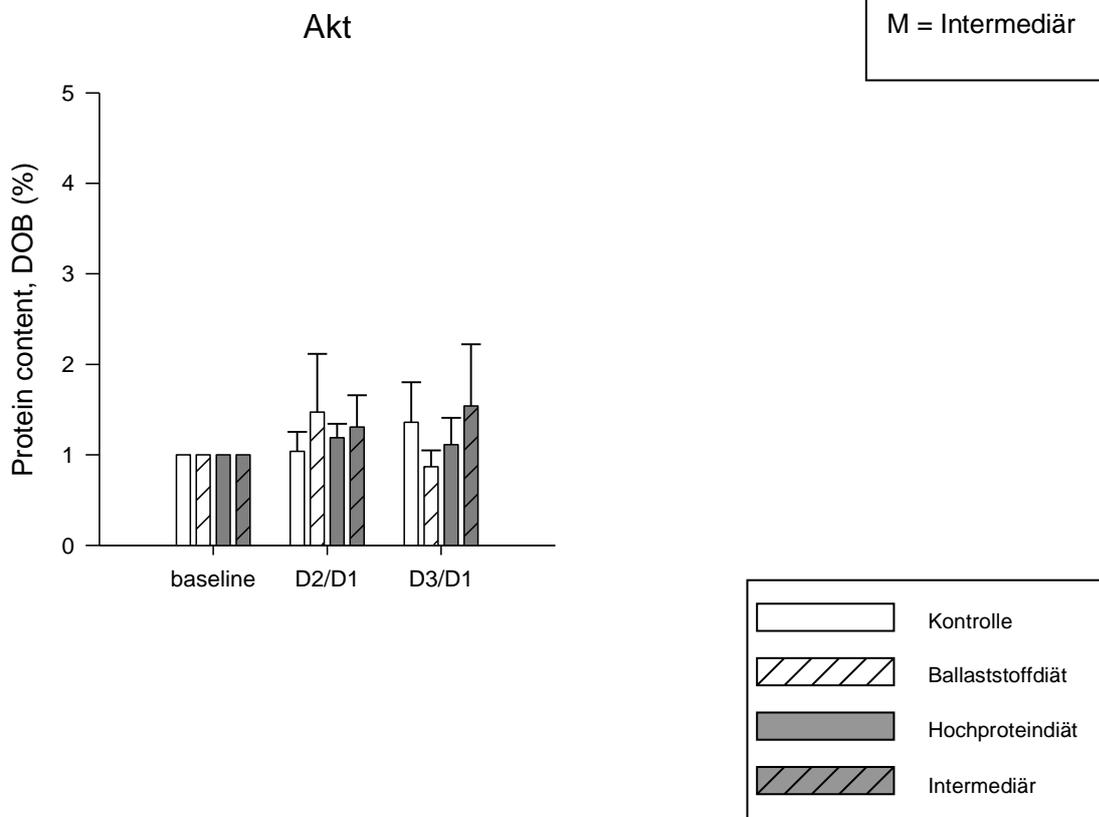


Abbildung 14b Darstellung der Proteinexpression von AKT (eigene Darstellung)

4.5.4 Phosphorylierte Form der Proteinkinase B / AKT

Auch die phosphorylierte Form von AKT wurde untersucht, um den Aktivierungsgrad der AKT zu ermessen. Die Proteinexpression von phosphoryliertem AKT wurde berechnet aus dem Quotienten von phospho-AKT/AKT.

Bei nur sehr schwachen Banden in der Immunodetektion konnte insgesamt kein relevanter Unterschied in der relativen Proteinexpression der phosphorylierten Proteinkinase B/ AKT zwischen den Interventionsgruppen oder innerhalb der Gruppen und deren Entwicklung vom CID 2 zu CID 3 festgestellt werden. Beim Vergleich der Ergebnisse aus der densitometrischen Analyse der Banden wurden sehr unterschiedliche Werte festgestellt, so dass die Standardabweichungen relativ hoch waren.

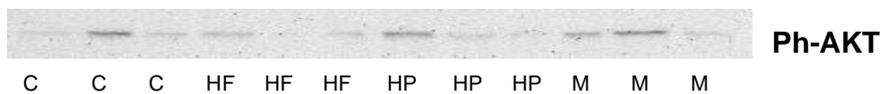
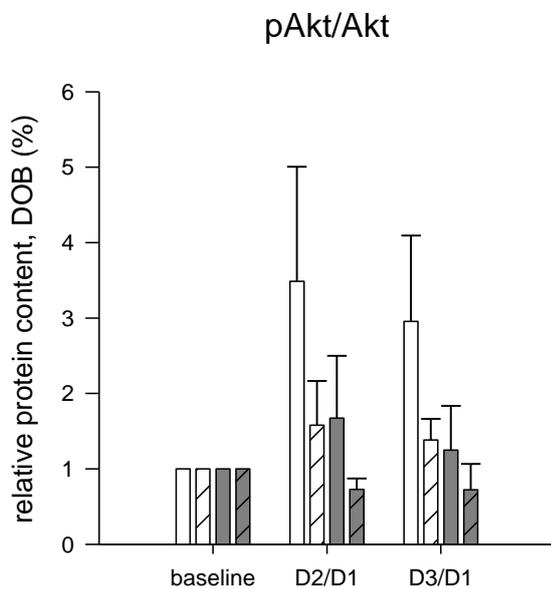


Abbildung 15a Darstellung der Immunodetektionsbanden des phosphorylierten AKT (eigene Darstellung)

C = Kontrollgruppe
 HF = Ballaststoffdiät
 HP = Hochproteindiät
 M = Intermediär



Kontrolle
 Ballaststoffdiät
 Hochproteindiät
 Intermediär

Abbildung 15b Darstellung der relativen Proteinexpression von phospho-AKT (eigene Darstellung)

4.5.5 Human vacuolar protein sorting 34 (hVps34)

Das human vacuolar protein sorting 34 (hVps34) ist eine Klasse III PI3Kinase, von der eine direkte Aminosäureninduzierte Aktivierung des mTOR angenommen wird. Bisher liegen nur wenige Studien vor. Direkte Studien am Menschen wurden bisher noch nicht durchgeführt. In Assoziation zu dem Anstieg der Insulinresistenzparameter auf molekularer (S6K1) und klinischer Ebene (Insulinsensitivitätsminderung im Clamp) wurde ein Anstieg des hVps34 in der Hochproteindiätgruppe angenommen. Diese Annahme konnte im Western Blot nicht bestätigt werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt CID 2 oder CID 3 festgestellt werden. Auch die Entwicklung innerhalb der Gruppen, insbesondere der Hochproteindiätgruppe, zeigte keine relevanten Unterschiede.

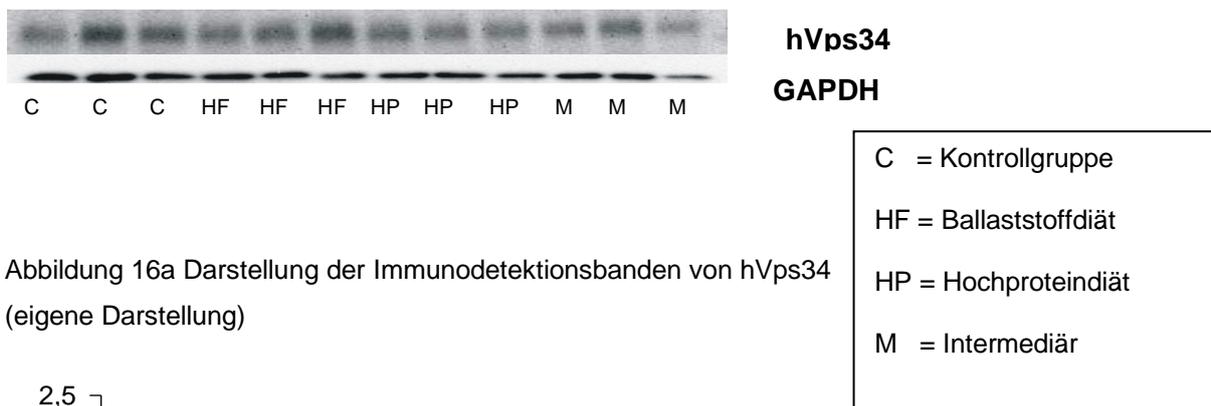


Abbildung 16a Darstellung der Immunodetektionsbanden von hVps34 (eigene Darstellung)

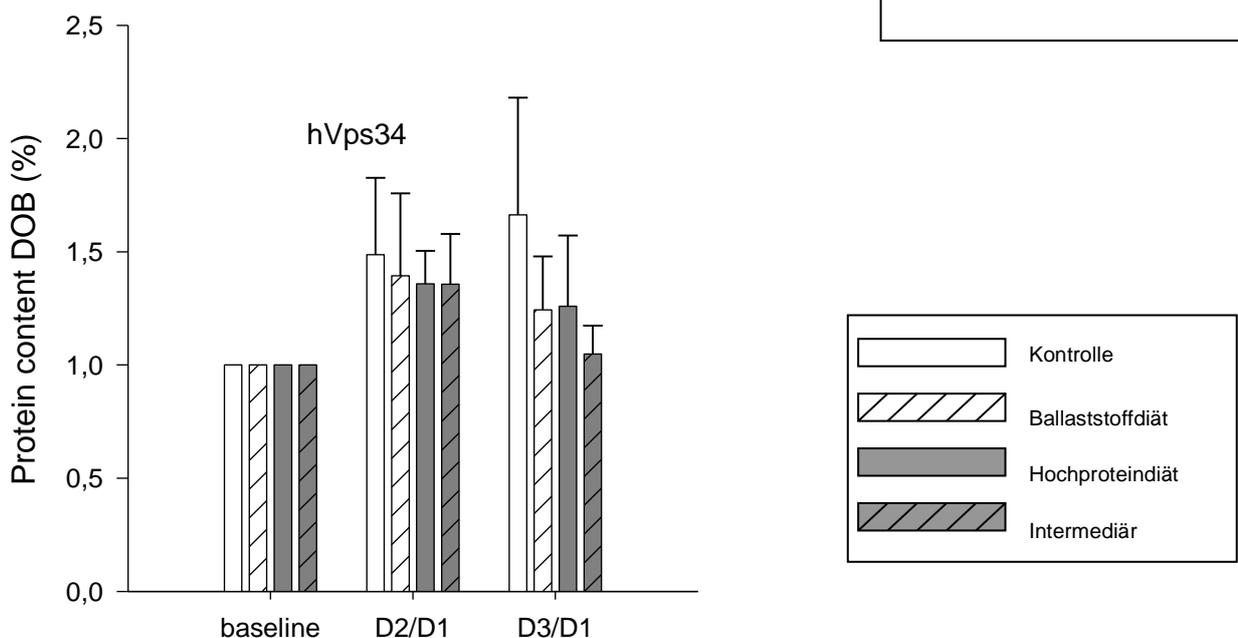


Abbildung 16b Darstellung der Proteinexpression von hVps34 (eigene Darstellung)

4.5.6 Sirtuin 1 (SIRT1)

Das Sirtuin1 beeinflusst den Insulinsignalweg positiv, indem es die Insulinsekretion induziert. Es reguliert außerdem IRS 1 und 2 und die AKT-Aktivierung. SIRT 1 wirkt sich ebenfalls auf die Adiponektinexpression aus und schützt somit gegen eine Insulinresistenz. SIRT 1 könnte somit ein potentielles therapeutisches Target bei Bestehen einer Insulinresistenz sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde das SIRT1 in Skelettmuskelbiopsien von übergewichtigen Probanden untersucht, die einer Ernährungsintervention unterzogen waren. Gemäß den Ergebnissen aus den Clamp-Studien dieser Arbeit, in der sich in der Hochproteingruppe eine Insulinresistenzentwicklung zeigte und in der Ballaststoffgruppe hingegen eine Verbesserung der Insulinsensitivität, war eine Zunahme der SIRT1 Konzentration in der Ballaststoffgruppe versus eine verringerte Konzentration des SIRT1 in der Hochproteingruppe. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Im Vergleich der Kontrollgruppe zeigte sich in der Mixgruppe jedoch eine signifikante Erhöhung des SIRT 1, und zwar in der ersten Muskelbiopsie, die direkt nach der Intervention, also nach 12 Wochen supplementierter Ernährung, Dieser Effekt war nach der Auswaschphase von weiteren 12 Wochen ohne spezieller Ernährung der Probanden rückläufig.

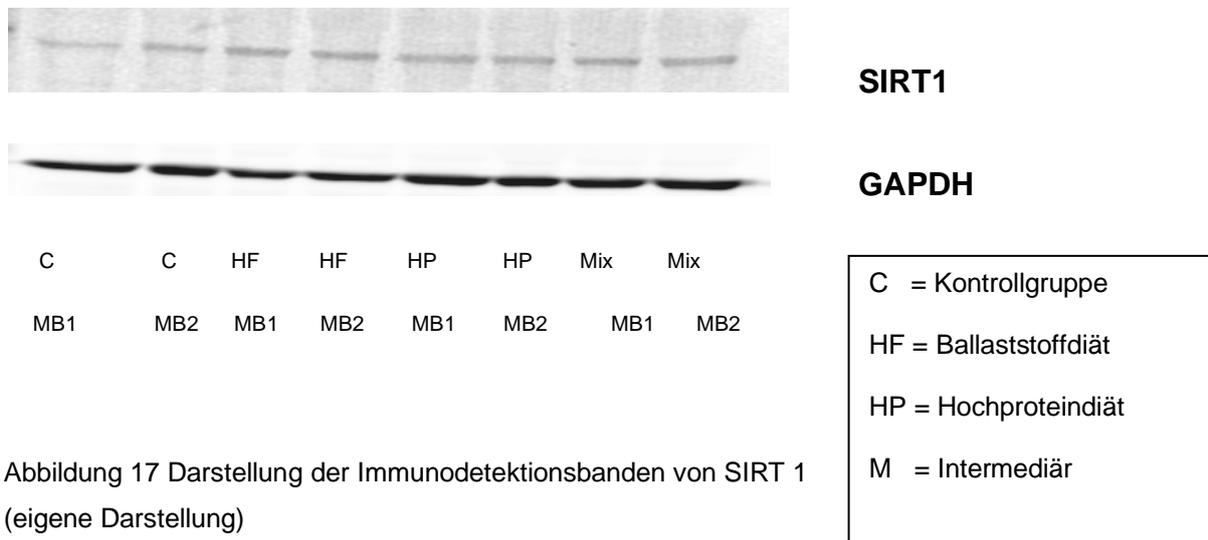


Abbildung 17 Darstellung der Immunodetektionsbanden von SIRT 1 (eigene Darstellung)

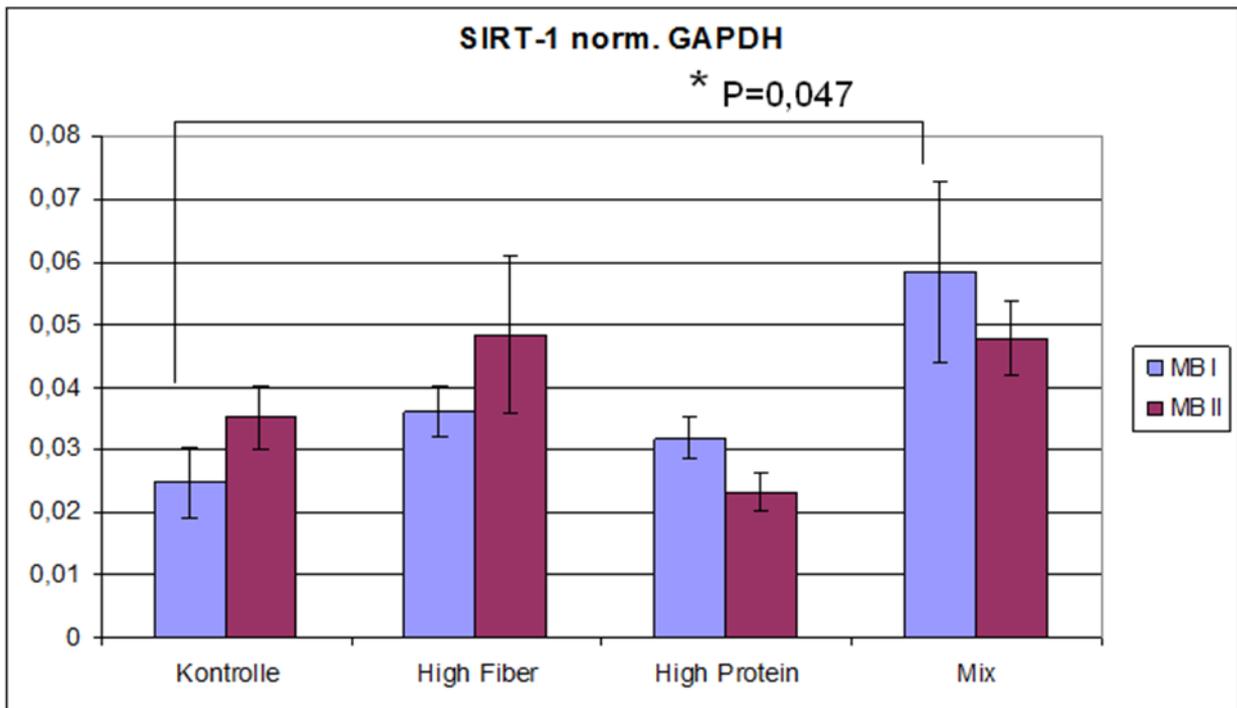


Abbildung 18 Sirtuin 1 normalisiert gegen GAPDH (eigene Darstellung)

5. Diskussion

Diese Studie ist insofern besonders, als dass die Effekte einer isoenergetischen Proteinreichen versus einer Ballaststoffreichen Ernährung auf klinischer und molekularbiologischer Ebene direkt miteinander verglichen wurden. Zur Messung metabolischer Effekte wurde eine Kombination von Gold-Standard Methoden angewendet, die aufgrund ihrer Komplexität in größeren und länger dauernden Studien bislang seltener genutzt wurden. Die meisten Studien konnten nur indirekte Schätzungen einer Veränderung der Insulinsensitivität eruieren mittels HOMA-IR, HbA1c und Veränderungen der Nüchternplasmaglukose, die jedoch für geringe Differenzen nicht sensitiv genug erscheinen (Samaha et al, 2003; Jenkins et al, 2008; Sacks et al, 2009; Gannon et al, 2003; Lau et al, 2005). Andere Studien, die eine Proteingestion über einen noch längeren Zeitraum an menschlichen Probanden durchgeführt haben, zeigten, dass nach einer Studiendauer von 12 Wochen Abnehmphase und 52 Wochen follow up in einer Hochproteingruppe (34% der Energie) versus einer Hoch-Kohlenhydratgruppe (64% der Energie) kein signifikanter Gewichtsunterschied in beiden Gruppen vorlag. Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Lipide, CRP, Insulin, Glukose und Homozystein

waren in beiden Gruppen durch den ähnlichen Gewichtsverlust verbessert. (Clifton et al, 2008). Due et al untersuchten dagegen 50 übergewichtige und adipöse Probanden, die 6 Monate eine streng kontrollierte diätetische Intervention befolgten, aufgeteilt in eine ad libitum Gruppe und zwei Fettreduzierte Gruppen: Eine davon war Hoch-Proteinreich (25% der Energie) und eine Medium Proteinreich (12% Energie). Es konnte gezeigt werden, dass nach einem follow up von 12 Monaten der Gewichtsverlust in den Gruppen vergleichbar war, jedoch die Hochproteingruppe eine höhere Reduktion an intraabdomineller Fettmasse zeigten. (Due et al, 2004). Auch Farnsworth et al untersuchten die Veränderungen der Körperzusammensetzung an übergewichtigen Probanden in einer Hochproteingruppe (27% der Energie) versus einer Standardproteingruppe über einen Zeitraum von 12 Wochen Energierestriktion. (Farnsworth et al, 2003). Sie konnten zeigen, dass der Gewichtsverlust und die totale Fettmasse in beiden Gruppen ähnlich waren, die fettfreie Masse bei Frauen in der Hochproteingruppe jedoch besser erhalten war als in der Standardproteingruppe. Layman et al konnten ebenso darlegen, dass eine Proteinreiche Ernährung (30% der Energie) gegenüber einer Kohlenhydratreichen Ernährung zu einem vergleichbaren Verlust an Fettmasse führte. Jedoch kam es zu einer signifikanten Fett/Fettfreie Masse ratio, in der die Hochproteingruppe der untersuchten Frauen einen höheren Verlust an Fettmasse zugunsten der Fettfreien Masse zeigte. (Layman et al, 2003). In allen genannten Studien basierten die Verbesserungen kardiovaskulärer Marker und der Surrogatparameter für die Insulinresistenz auf einem durch erhöhte Proteiningestion induzierten Gewichtsverlust. Gerade diesen Gewichtsverlust versuchten wir durch die Einhaltung eines isoenergetisch geführten Regimes zu vermeiden, um die Veränderung der Insulinsensitivität durch Proteine darzustellen, sowohl im klinischen Setting, als auch auf molekularer Ebene. Der Proteingehalt war in anderen Studien vergleichbar zu unserer HP-Gruppe mit ca. 25% der Energie. In unserer Studie zeigte die Hochproteingruppe einen leichten Anstieg der Fettfreien Körpermasse um 2%. Die totale Körperfettmasse, die abdominelle Fettmasse und der Leberfettgehalt zeigten einen abnehmenden Trend, der in allen Gruppen vergleichbar war. Dies lässt sich möglicherweise erklären durch eine Restriktion der Fettaufnahme von 30% in allen Gruppen.

Wir präsentieren in der PROFIMET-Studie insofern neue Ergebnisse, die zeigen, dass ein erhöhter Anteil von Protein in einer isokalorisch gehaltenen Diät bei gleichbleibendem Körpergewicht innerhalb einer relativ kurzen Zeit von 6 Wochen zu einer signifikanten Verschlechterung der Insulinsensitivität führt. Die Differenz in der Ganz-Körper-

Insulinsensitivität zwischen den Gruppen liegt bei 25% zum Zeitpunkt des zweiten Untersuchungstages nach 6 Wochen Interventionsdauer. Nach weiteren 12 Wochen einer ad libitum Phase, in der die Probanden sich nicht mehr streng Proteinreich ernährt haben, aber weiter die Protein Supplemente zu sich nahmen, ist dieser Effekt abgemildert. So zeigen auch die Biomarker eine verminderte Einhaltung der diätetischen Vorgaben an. Angesichts eines zum Teil hohen Dropouts in anderen Studien (50% Drop out Rate bei Due et al (Due et al, 2004)) stellt sich die Frage nach der Verträglichkeit und der Sicherheit von Hochproteindiäten. Bernstein et al postulierten, dass eine langfristige Proteinreiche Ernährung bei gesunden Menschen zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion führt. Ebenso folgerten sie, dass eine hohe Proteinzufuhr, bestehend aus tierischen oder vegetarischen Proteinen, zu einem schnelleren Verlauf eines chronischen Nierenversagen führen kann (Bernstein et al, 2007). Martin et al hingegen konnten keine signifikante Evidenz für einen wesentlichen Effekt einer Proteinreichen Ernährung auf die Nierenfunktion bei gesunden Personen zeigen (Martin et al, 2005).

Die Quelle der Proteine, sei es pflanzlich oder tierisch, scheint jedoch hierbei eine große Rolle zu spielen. Das Hochprotein-Supplement in unserer Studie setzte sich v.a. aus Molkeprotein und proteinreichen Gemüsen zusammen. Die Trockenpulver wurden von den Probanden mit Milch zu einem Shake gemischt. Die Korrelation zwischen der Konzentration der Aminosäuren und insbesondere der verzweigtkettigen Aminosäuren und dem BMI sowie der Entstehung einer Insulinresistenz sind lange bekannt (Felig et al, 1969). Neuere Studien von Wang et al konnten an einer normoglykämischen Probandenkohorte mit 2422 Teilnehmern (beobachteter Zeitraum von 12 Jahre) das Risiko einen Typ 2 Diabetes mellitus in Abhängigkeit von dem metabolischen Profil zu entwickeln darlegen. Fünf verzweigtkettige und aromatische Aminosäuren wiesen hierbei in Abhängigkeit vom Alter, BMI und Nüchtern glukosewert eine besondere Risikosteigerung auf: Isoleucin, Leucin, Valin, Tyrosin und Phenylalanin. Eine Kombination von drei dieser AS ging in dieser Kohorte mit einem über 5-fach gesteigerten Risiko für die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus einher (Wang et al, 2011). In weiteren Subanalysen der PROFIMET-Studie wurde die Konzentration der Aminosäuren (AA) und der verzweigtkettigen Aminosäuren (BCAA) in den Blutplasmaproben, die vor dem Beginn des EHC entnommen wurden, mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) gemessen. Nach einer nächtlichen Nüchternphase von 10 Stunden Dauer wiesen die Aminosäuresignaturen von Glutaminsäure, Cystein und Leucin signifikante Differenzen

zwischen übergewichtigen (BMI >25 und <30 kg/m²) und adipösen (BMI>30 kg/m²) Probanden auf. Weitere Unterschiede zwischen der Konzentration der unverzweigten versus verzweigt-kettigen Aminosäuren konnten gezeigt werden bei der Unterteilung der Probandenkohorte anhand des Leberfettgehalts (IHL >5,56% bei 40% der Probanden) oder anhand der viszeralen Fettmasse (>4,7 L bei 40% der Probanden). Die Effekte im Zusammenhang mit der nicht-viszeralen Fettmasse oder dem BMI hingegen waren lediglich als moderat einzustufen. Die Tryptophan ratio war signifikant unterdrückt bei den adipösen Probanden im Vergleich zu den übergewichtigen Probanden, jedoch bezogen auf die unterschiedlichen Ernährungsinterventionsgruppen beim Ausgangszustand in vergleichbarer Höhe. In der HF-Gruppe zeigt sich jedoch nach 6-wöchiger isokalorischer HF-Intervention eine signifikante Verbesserung (p=0.42), die nach der 12-wöchigen 2. Interventionsphase allerdings wieder auf das Ausgangslevel zurückfiel. In allen anderen Interventionsgruppen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Tryptophan-ratio (Hattersley et al, 2014).

Auf molekularer Ebene scheint der mTOR Signalweg hierbei eine große Rolle zu spielen. In Aminosäureinfusionsstudien am Menschen konnte gezeigt werden, dass Aminosäuren in hoher Plasma-Konzentration (~4,6mmol/l) eine Insulinresistenz im Skelettmuskel induzieren (Krebs et al, 2002). Eine weitere Studie von Tremblay et al zeigte eine Überaktivierung des mTOR-Signalwegs, mit daraus resultierender erhöhter inhibitorischer Serin Phosphorylierung am IRS-1 unter einer verminderten Insulinwirkung an Aminosäuren-infundierten Probanden. (Tremblay et al, 2005). In einer Studie von Krebs et al, in der die Wirkung von Aminosäuren auf den Glukosemetabolismus mittels Verabreichung des mTOR Inhibitors Rapamycin versus Placebo analysiert wurde, konnte ein Anstieg der S6K1-Phosphorylierung mit konsekutiver inhibitorischer Phosphorylierung am IRS-1 Serin 636 und Serin 312 gezeigt werden. (Krebs et al, 2007). Weiterhin sind S6K knock-out Mäuse geschützt vor einer Nahrungsinduzierten Insulinresistenz (Um et al, 2004).

In der PROFIMET-Studie konnten wir einen signifikanten Anstieg der S6K1 in der Hochprotein-Diät Gruppe nach 6 Wochen und eine Angleichung der Werte im Vergleich zu den anderen Gruppen nach 18 Wochen Intervention feststellen. mTOR selber zeigte sich auf Proteinebene im Western Blot in unseren Ergebnissen als nicht signifikant verändert. Insgesamt zeigten sich uns jedoch sehr schwache Banden. Zusammen mit der doch eher als niedrig einzustufenden Fallzahl an Fettgewebsbiopsien könnte das eine

Ursache des Ergebnisses sein. Ursächlich für die schwachen Banden könnte das Ausgangsmaterial Fettgewebe sein

Drummond et al untersuchten mTOR an Muskelbiopsien von Typ 2 Diabetikern und gesunden Kontrollpersonen unter einer Aminosäureinfusion. Die verwendete Methodik des Western Blots ist der Methode, die wir verwendeten, sehr ähnlich (Drummond et al, 2008). So wurde die gleiche Protein-Konzentration von 50µg verwendet, es wurde der identische Antikörper verwendet, wir verwendeten einen minimal anders zusammengesetzten Probenpuffer (statt Mercaptoäthanol benutzten wir DTT), sowohl die Gruppe um Drummond als auch wir nutzten ein 7,5% SDS-PAGE zum Nachweis von mTOR. Dies spricht nicht per se gegen unsere Methodik, sondern könnte Ausdruck dafür sein, dass mTOR im Fettgewebe schwerer nachweisbar ist. Ein weiterer Punkt, der die schlechte Qualität der Banden von mTOR erklären könnte ist, dass das von uns verwendete Ausgangsgewebe aus nicht-insulinstimuliertem Fettgewebe von nüchternen Probanden besteht. Miller et al stellten mTOR an Skelettmuskelbiopsien von ob/ob versus wild type Mäusen unter Insulinstimulation dar und konnten sehr kräftige mTOR Banden darstellen (Miller et al, 2008). Die meisten hier aus anderen Studien zitierten Experimente wurden an Zellen oder Geweben durchgeführt, die akut mit Insulin oder Aminosäuren stimuliert wurden. In unserem Falle ist jedoch das subkutane Fettgewebe von nüchternen nicht-insulinstimulierten Probanden das Ausgangsmaterial, welche eine erhöhte Proteiningestion über einen vergleichsweise langen Zeitraum durchgeführt haben. Größere Effekte wären bei Verwendung von viszeralem Fettgewebe zu erwarten gewesen. Eine Biopsie dieses Fettkompartiments wäre jedoch in unserem Setting nicht möglich gewesen. Die mangelnde Stimulation und der nüchterne Ausgangszustand der Probanden, denen die Fettgewebsbiopsien entnommen wurden, könnte auch Ursache dafür sein, dass es uns kaum gelungen ist, phosphorylierte Faktoren der Insulinsignalkaskade darzustellen. Zwar wurden in der Auftauphase der Biopsate Phosphataseinhibitoren eingesetzt, dies könnte aber zu spät für eine effektive Inhibition gewesen sein. So zeigte es der Vorversuch in dieser Arbeit: Eine direkt nach der Entnahme mit einem Phosphataseinhibitor gespülte Probe lieferte eine deutlich höhere Menge von phospho-S6K1, im Vergleich zu einer Probe, die mit physiologischer Kochsalzlösung gespült wurde. Dieses Verfahren war jedoch angesichts der Tatsache, dass der Großteil der Biopsate vor Beginn der molekularbiologischen Versuche in der Studienambulanz schon entnommen war und standardisiert mit physiologischer Kochsalzlösung von Blutresten freigespült worden war, nicht mehr praktisch anwendbar.

Auch bei der aktivierten Form des AKT, dem phospho-AKT Ser 473, zeigten sich schwache Banden, die aufgrund hoher interindividueller Unterschiede eine große Standardabweichung zeigten. Es ergab sich keine signifikante Veränderung von phosphoryliertem AKT. Das totale AKT, normiert gegen das Haushaltsprotein Gapdh, zeigte zwar gut nachweisbare Banden; es ergab sich aber auch hier kein signifikanter Unterschied zu den einzelnen Diäten oder Zeitpunkten. Dies könnte wieder Fallzahlbedingt sein.

mTOR wird zum einen durch Aminosäuren und zum anderen durch Insulin aktiviert. Dies geschieht über den PI3Kinase/AKT Signalweg bei der Stimulierung durch Insulin. Hier sind die Faktoren TSC und Rheb involviert. Der Signalweg, der durch die direkte Stimulation mit Aminosäuren induziert wird, ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Hier könnte die Klasse III PI3 Kinase hVps34 als eine nutritiv regulierte Lipidkinase eine Rolle spielen. Wir untersuchten die Nahrungsinduzierte Veränderung des hVps34, dem Knotenpunkt der Insulinunabhängigen Regulation der S6K1. Die Klasse III PI3 Kinase hVps34 zeigte sich in anderen Studien als inhibiert unter Aminosäurenmangel, während unter Aminosäurezugabe die Aktivität gesteigert werden konnte (Dickinson et al, 2011). Dadurch, dass die hVps34-Aktivierung begleitend einhergeht mit einer gesteigerten Aktivität von S6K1, scheint diese Lipidkinase eine Rolle zu spielen bei der Signalsendung von Aminosäuren an mTORC1 (Nobukuni et al, 2005).

In den Western Blot Untersuchungen unserer Studie, in denen Fettbiopsien von Probanden unter verschiedenen Nährstoffsupplementen untersucht wurden, vermuteten wir einen Anstieg des hVps34 in der Hochproteingruppe im Vergleich mit der Ballaststoffreichen Gruppe oder der Kontrollgruppe. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Änderung des hVps34, trotz der sehr gut nachweisbaren Banden. Hier wären zum einen Untersuchungen mit einer höheren Fallzahl nötig. Zum anderen ist es sicher sinnvoll, den Mechanismus, über den Aminosäuren via hVps34 das mTOR aktivieren, erstmal weiter an Zellkulturen und Tiermodellen zu analysieren, um das komplexe Modell zu verstehen.

Interessant ist der Effekt, der sich aus der Kombination von einem erhöhten Ballaststoffanteil mit einem erhöhten Proteinanteil in der MIX-Gruppe ergibt. Hier konnte trotz eines Anteils von 20-25% Protein in der Makronährstoffkomposition weder eine Veränderung der Insulinsensitivität, noch ein Unterschied auf molekularer Ebene festgestellt werden, so dass die Ergebnisse hier vergleichbar zu der Kontrollgruppe waren. Eine verminderte Einhaltung der diätetischen Vorgaben in der Mixgruppe im

Vergleich zu den anderen Gruppen scheint unwahrscheinlich angesichts der vergleichbaren Motivation der Probanden und der Unterstützung zum Erreichen der Diätziele mittels der Nahrungssupplemente; sie kann jedoch nicht komplett ausgeschlossen werden. Auch die Analyse der Biomarker zeigt, dass die Nitrogen/Kreatinin ratio im Urin unverändert ist, der Anteil fäkaler Isolaveriansäure jedoch signifikant gestiegen ist, was auf eine signifikant erhöhte Proteinaufnahme in der Mixgruppe hindeutet. Der genaue Mechanismus hierfür bleibt unklar. Möglicherweise werden die Verdauung und die Absorption von Proteinen schon im Intestinum durch die Ballaststoffe verändert, so dass molekulare Signalwege durch den alterierten Metabolismus dann im Fettgewebe kaum eine Rolle spielen.

In unseren Untersuchungen zeigte sich das SIRT 1 in den Skelettmuskelbiopsien signifikant erhöht in der moderat-Ballaststoff/Proteingruppe (Mix-Gruppe), im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine SIRT 1-Aktivierung führt zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme und reduziert die Serinphosphorylierung von IRS-1, was zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität führt (Yoshizaki et al, 2009). Der Mechanismus, durch den die Mix-Diät einen Einfluss auf das SIRT ausübt, bleibt weitestgehend ungeklärt und bedarf sicherlich weiterer Erforschung. Ein anderer möglicher Zusammenhang zeigt sich in Bezug auf das Adiponektin, welches eine direkte Wirkung auf die Insulinsensitivität in der Leber und im Muskelgewebe hat und vor der Entwicklung einer Insulinresistenz schützen kann. SIRT 1 reguliert die Adiponektinexpression hoch, durch Deacetylierung von FoxO1, wodurch ein protektiver Effekt zustande kommt (Liang et al, 2009). Adiponektin im Serum zeigte sich in all unseren Gruppen als nicht signifikant verändert, wurde jedoch auf molekularer Ebene an den Muskelbiopsien nicht weiter untersucht. Möglicherweise würde sich hier ein Mechanismus darbieten können, das bleibt jedoch rein hypothetisch.

In der reinen Ballaststoffgruppe hingegen zeigte sich eine Verbesserung der Insulinsensitivität um 16%. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Studien überein, in denen ebenso ein günstiger Effekt von unlöslichen Ballaststoffen auf die Insulinsensitivität nachgewiesen werden konnte (Schulze et al, 2007; de Munter et al, 2007; Weickert et al, 2006) Der Mechanismus für den positiven Einfluss der unlöslichen Ballaststoffe auf die Insulinsensitivität ist noch weitestgehend ungeklärt. Es liegen zwar einige Studien vor, die die protektive Wirkung in Bezug auf die Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus untermauern (Liese et al, 2005; de Munter et al, 2007; Schulze et al, 2007), keine gibt jedoch eine zufrieden stellende Erklärung für den Mechanismus ab. Wir

konnten unter isokalorischen Bedingungen keine Veränderungen des Körpergewichtes, der Körperzusammensetzung, der inflammatorischen Marker oder der zirkulierenden Adipokine feststellen, so dass diese Faktoren für die Verbesserung der Insulinsensitivität unter der hier untersuchten cerealen Faser Diät nicht zur Erklärung dieses Phänomens beitragen. Die in anderen Studien bisher vorgeschlagenen Mechanismen durch Fasern sind eigentlich Merkmale der löslichen Fasern, wie Veränderungen der Blutfette, des Glykämischen Index, Gewichtsabnahme, Fermentation u.ä. Diese beeinflussen die Insulinsensitivität aber bei weitem nicht in so einem Ausmaß wie die unlöslichen Fasern und haben nicht diesen protektiven Effekt (Schulze et al, 2007). Die von uns verwendeten unlöslichen Getreidefasern verbesserten also die Insulinsensitivität mit einem bislang ungeklärten Mechanismus.

Die Stärken dieser Studie liegen in der Verwendung von isokalorischen Diäten mit einem identischen Fettgehalt und Anreicherung mit ausgesuchten Proteinen, v.a. Leucin. Die Supplemente sollten die Einhaltung der diätetischen Vorgaben unterstützen und somit die Unterschiede zwischen den Gruppen prominenter machen. Es wurden Methoden verwendet, um die Ernährung der Probanden zu steuern und zu unterstützen, beispielsweise durch die Ernährungsprotokolle und die Food Frequency Questionnaires (FFQ). Die Ernährungsempfehlungen wurden individuell an die Ergebnisse aus der Messung des Ruhegrundumsatzes angepasst. Es wurden Biomarker gemessen, um die Compliance der Probanden zu kontrollieren. Um die Insulinsensitivität zu messen wurden Goldstandard Methoden wie der euglykämisch-hyperinsulinämische Clamp verwendet. Die Untersuchung der Fettgewebsbiopsien und die Analyse der Muskelbiopsien wurden in Vorversuchen optimiert und standardisiert durchgeführt. Leider war jedoch eine Darstellung der phosphorylierten Elemente der Insulinsignalkaskade nicht möglich, dazu hätte man die entnommenen Biopsien mit einem Phosphatasehemmer spülen müssen, oder man hätte sie unmittelbar nach der Entnahme verarbeiten müssen, was aber praktisch schwer umsetzbar gewesen wäre. Man hätte den Vergleich des SIRT 1 im Fettgewebe und im Muskelgewebe ziehen können, jedoch war das Material zum Teil nicht ausreichend um alle Faktoren hinreichend darstellen zu können.

Weitere Limitationen der Arbeit könnten sein, dass die Probanden zwar durch die Supplemente dabei unterstützt wurden, die diätetischen Vorgaben einzuhalten, wir jedoch weniger Einfluss darauf hatten, was die Probanden ansonsten zu sich nahmen und wie sie sich zum Beispiel bewegten. Diese wurde zwar erfasst, entzog sich aber doch der exakten Steuerung, wie man sie zum Beispiel in einer isolierten Umgebung (zum

Beispiel auf einer Station) oder durch das Stellen der gesamten Nahrungsmittel optimieren könnte. Dies ist aber über einen so langen Zeitraum nicht praktisch anwendbar. Die Supplemente der Kontrollgruppe war an den Vorgaben der deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) orientiert. Diese enthält per se viele Ballaststoffe, so dass der Kontrast zwischen Hochballaststoff- und Kontrollgruppe nicht so dominant zu erwarten war. In Bonferroni-adjustierten Subanalysen zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr zwischen der Insulinsensitivität in der Hochballaststoffgruppe versus der Kontrollgruppe. Die Studie war jedoch hauptsächlich darauf ausgerichtet, Effekte einer Proteindiät gegenüber denen einer Ballaststoffdiät auf die Insulinsensitivität zu vergleichen.

Zusammenfassend konnten wir Effekte einer Ernährung, die reich an unlöslichen Ballaststoffen war, gegenüber einer Proteinreichen Ernährung auf die Insulinsensitivität darstellen. Diese Diäten waren isoenergetisch und Körpergewichtsstabil und die Verbesserung der Insulinsensitivität in der Ballaststoffgruppe zeigte sich hauptsächlich nach der strenger kontrollierten 6 Wochen Phase der Intervention. Auf molekularer Ebene konnte eine Verschlechterung der Insulinsensitivität in der Hochproteingruppe dargestellt werden. Um diese Effekte jedoch mehr hervorzuheben sind weitere Studien nötig, die auf molekularer Ebene einer höheren Fallzahl bedürfen und die Analyse weiterer Faktoren des Insulinsignalwegs, einschließlich der Darstellung phosphorylierter Faktoren, beinhalten sollte. Für das hVps34 sind grundlegende Studien zum Beispiel an Tiermodellen nötig, um den Mechanismus der Signaltransduktion von Aminosäuren an mTOR und assoziierte Faktoren besser verstehen zu lernen.

Unsere Daten weisen drauf hin, dass eine Proteinreiche Ernährung zu einer Insulinresistenz führen kann. Dies könnte Anwendung finden in der Prävention eines Diabetes mellitus Typ 2 bei übergewichtigen Personen, oder wenn bereits ein metabolisches Syndrom vorliegt.

6. Literaturverzeichnis

- Anderson JW, Zeigler JA, Deakins DA, Floore TL, Dillon DW, Wood CL, Oeltgen PR, Whitley RJ (1991). Metabolic effects of high-carbohydrate, high-fiber diets for insulin-dependent diabetic individuals. *Am J Clin Nutr*, Nov, 54(5), pp. 936-43.
- Backer J (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J*, 15 Feb, 410(1), pp. 1-17.
- Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N, Yudkin JS, Morris R, Zavaroni I, van Dam R, Feskens E, Gabriel R, Diet M, Nilsson P, Hedblad B; (EGIR), European Group For The Study Of Insulin Resistance (2002). Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin-resistance syndrome. *Diabetes Metab*, Nov, 28(5), pp. 364-76.
- Ballesteros-Pomar MD, Calleja-Fernández AR, Vidal-Casariego A, Urioste-Fondo AM, Cano-Rodríguez I. (2010). Effectiveness of energy-restricted diets with different protein: carbohydrate ratios: the relationship to insulin sensitivity. *Public Health Nutr*, Dec, 13(12), pp. 2119-26.
- Bernstein AM, Treyzon L, Li Z. (2007). Are high-protein, vegetable-based diets safe for kidney function? A review of the literature. *J Am Diet Assoc*, Apr, 107(4), pp. 644-50.
- Blander G, Guarente L (2004). The Sir2 Family of Protein Deacetylases. *Annual Review of Biochemistry*, Jul, pp. 417-435.
- Brinkworth GD, Noakes M, Keogh JB, Luscombe ND, Wittert GA, Clifton PM (2004). Long-term effects of a high-protein, low-carbohydrate diet on weight control and cardiovascular risk markers in obese hyperinsulinemic subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord*, May, 28(5), pp. 661-70.
- Byfield MP, Murray JT, Backer JM (2005). hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem*, 23 Sep, 280(38), pp. 33076-82.
- Clifton PM, Bastiaans K, Keogh JB (2009). High protein diets decrease total and abdominal fat and improve CVD risk profile in overweight and obese men and women with elevated triacylglycerol. *Nutr Metab Cardiovas Dis*, Oct, 19(8), pp. 548-54.
- Clifton PM, Keogh JB, Noakes M (2008). Long-term effects of a high-protein weight-loss diet. *Am J Clin Nutr*, Jan, 87(1), pp. 23-9.
- Cohen A, Hall MN (2009). An amino acid shuffle activates mTORC1.. *Cell*, 6 Feb, 136(6), pp. 399-400.
- Cornier MA, Dabelea D, Hernandez TL, Lindstrom RC, Steig AJ, Stob NR, Van Pelt RE, Wang H, Eckel RH (2008). The metabolic syndrome. *Endocr Rev*, Dec, 29(7), pp. 777-822.
- Dansinger ML, Gleason JA, Griffith JL, Selker HP, Schaefer EJ (2005). Comparison of the Atkins, Ornish, Weight Watchers, and Zone diets for weight

loss and heart disease risk reduction: a randomized trial.. JAMA, 5 Jan, 293(1), pp. 43-53.

- de Munter JS, Hu FB, Spiegelman D, Franz M, van Dam RM (2007). Whole grain, bran, and germ intake and risk of type 2 diabetes: a prospective cohort study and systematic review. PLoS Med, Aug, 4(8), p. e261.
- DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R (1979). Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab Gastrointest Physiol, Sep, 237(3), p. E214.
- Dickinson JM, Rasmussen BB (2011). Essential amino acid sensing, signaling, and transport in the regulation of human muscle protein metabolism. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, Jan, 14(1), pp. 83-8.
- Drummond MJ, Bell JA, Fujita S, Dreyer HC, Glynn EL, Volpi E, Rasmussen BB (2008). Amino acids are necessary for the insulin-induced activation of mTOR/S6K1 signaling and protein synthesis in healthy and insulin resistant human skeletal muscle. Clin Nutr, Jun, 27(3), pp. 447-56.
- Due A, Toubro S, Skov AR, Astrup A (2004). Effect of normal-fat diets, either medium or high in protein, on body weight in overweight subjects: a randomised 1-year trial.. Int J obes, Band 28, pp. 1283-1290.
- Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ (2005). The metabolic syndrome. Lancet, 22 Apr, 365(9468), pp. 1415-28.
- Emerging Risk Factors Collaboration, Wormser D, Kaptoge S, Di Angelantonio E, Wood AM, Pennells L, Thompson A, Sarwar N, Kizer JR, Lawlor DA, Nordestgaard BG, Ridker P, Salomaa V, Stevens J, Woodward M, Sattar N, Collins R, Thompson SG, Whitlock G, Danes (2011). Separate and combined associations of body-mas index and abdominal adiposity with cardiovascular disease: collaborative analysis of 58 prospective studies. Lancet, 26 Mar, 377(9771), pp. 1085-95.
- Farnsworth E, Luscombe ND, Noakes M, Wittert G, Argyiou E, Clifton PM (2003). Effect of a high-protein, energy-restricted diet on body composition, glycemic control, and lipid concentrations in overweight and obese hyperinsulinemic men and women. Am J Clin Nutr, Jul, 78(1), pp. 31-9.
- Felig P, Marliss E, Cahill GF Jr (1969). Plasma amino acid levels and insulin secretion in obesity. NEJM; 281(15):811-816.
- Feng RN, Zhao C, Wang C, Niu YC, Li K, Guo FC, Li ST, Sun CH, Li Y (2012). BMI is strongly associated with hypertension and waist circumference is strongly associated with type 2 diabetes and dyslipidemia in northern Chinese adults. J Epidemiol, 22(4), pp. 317-23.
- Fukagawa NK, Anderson JW, Hageman G, Young VR, Minaker KL (1990). High-carbohydrate, high-fiber diets increase peripheral insulin sensitivity in healthy young and old adults. Am J Clin Nutr, Sep, 52(3), pp. 524-8.
- Gannon MC, Nuttall FQ, Saeed A, Jordan K, Hoover H (2003). An increase in dietary protein improves the blood glucose response in persons with type 2 diabetes. Am J Clin Nutr, Oct, 78(4), pp. 734-41.

- GBD 2015 Obesity Collaborators, Afshin A, Forouzanfar MH, Reitsma MB, Sur P, Estep K, Lee A, Marczak L, Mokdad AH, Moradi-Lakeh M, Naghavi M, Salama JS, Vos T, Abate KH, Abbafati C, Ahmed MB, Al-Aly Z, Alkerwi A, Al-Raddadi R, Amare AT, Amberbir A, Amegah AK, Amini E, Amrock SM, Anjana RM, Ärnlöv J, Asayesh H, Banerjee A, Barac A, Baye E, Bennett DA, Beyene AS, Biadgilign S, Biryukov S, Bjertness E, Boneya DJ, Campos-Nonato I, Carrero JJ, Cecilio P, Cercy K, Ciobanu LG, Cornaby L, Damtew SA, Dandona L, Dandona R, Dharmaratne SD, Duncan BB, Eshrati B, Esteghamati A, Feigin VL, Fernandes JC, Fürst T, Gebrehiwot TT, Gold A, Gona PN, Goto A, Habtewold TD, Hadush KT, Hafezi-Nejad N, Hay SI, Horino M, Islami F, Kamal R, Kasaeian A, Katikireddi SV, Kengne AP, Kesavachandran CN, Khader YS, Khang YH, Khubchandani J, Kim D, Kim YJ, Kinfu Y, Kosen S, Ku T, Defo BK, Kumar GA, Larson HJ, Leinsalu M, Liang X, Lim SS, Liu P, Lopez AD, Lozano R, Majeed A, Malekzadeh R, Malta DC, Mazidi M, McAlinden C, McGarvey ST, Mengistu DT, Mensah GA, Mensink GBM, Mezgebe HB, Mirrakhimov EM, Mueller UO, Noubiap JJ, Obermeyer CM, Ogbo FA, Owolabi MO, Patton GC, Pourmalek F, Qorbani M, Rafay A, Rai RK, Ranabhat CL, Reinig N, Safiri S, Salomon JA, Sanabria JR, Santos IS, Sartorius B, Sawhney M, Schmidhuber J, Schutte AE, Schmidt MI, Sepanlou SG, Shamsizadeh M, Sheikhbahaei S, Shin MJ, Shiri R, Shiue I, Roba HS, Silva DAS, Silverberg JI, Singh JA, Stranges S, Swaminathan S, Tabarés-Seisdedos R, Tadese F, Tedla BA, Tegegne BS, Terkawi AS, Thakur JS, Tonelli M, Topor-Madry R, Tyrovolas S, Ukwaja KN, Uthman OA, Vaezghasemi M, Vasankari T, Vlassov VV, Vollset SE, Weiderpass E, Werdecker A, Wesana J, Westerman R, Yano Y, Yonemoto N, Yonga G, Zaidi Z, Zenebe ZM, Zipkin B, Murray CJL (2017). Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. *N Engl J Med*, 6 Jul, 377(1), pp. 13-27.
- Geypens B, Claus D, Evenepoel P, Hiele M, Maes B, Peeters M, Rutgeerts P, Ghoois Y (1997). Influence of dietary protein supplements on the formation of bacterial metabolites in the colon. *Gut*, Jul, 41(1), pp. 70-6.
- Ginde SR, Geliebter A, Rubiano F, Silva AM, Wang J, Heshka S, Heymsfield SB (2005). Air displacement plethysmography: validation in overweight and obese subjects. *Obes Res*, Band 13, pp. 1232-37.
- Grundy SM, Cleeman JI, Merz CN, Brewer HB Jr, Clark LT, Hunninghake DB, Pasternak RC, Smith SC Jr, Stone NJ; National Heart, Lung, and Blood Institute; Foundation, American College of Cardiology; Association, American Heart (2004). Implications of recent clinical trials for the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III guidelines. *Circulation*, 13 Jul, 110(2), pp. 227-39.
- Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL (2008). Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*, Dec, 29(24), pp. 2959-71.
- Hattersley JG, Pfeiffer AFH, Roden M, Petzke KJ, Hoffmann D, Rudovich N, Randeve HS, Vatish M, Osterhoff MO, Gögebakan Ö, Hornemann S, Nowotny

- P, Machann J, Hierholzer J, Loeffelholz Cv, Möhlig M, Arafat AM, Weickert MO (2014). Modulation of Amino Acid Metabolic signatures by supplemented isoenergetic diets differing in Protein and cereal fiber content. *J Clin Endocrinol Metab*, Dec, 99(12), pp. E2599-E2609.
- Hay N, Sonenberg N (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, 15 Aug, 18(16), pp. 1926-45.
 - Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibült O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Görg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J (1999). Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, Apr, 84(4), pp. 1483-6.
 - Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lin S, Rüegg MA, Hall A, Hall MN (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol*, Nov, 6(11), pp. 1122-8.
 - Jenkins DJ, Kendall CW, McKeown-Eyssen G, Josse RG, Silverberg J, Booth GL, Vidgen E, Josse AR, Nguyen TH, Corrigan S, Banach MS, Ares S, Mitchell S, Emam A, Augustin LS, Parker TL, Leiter LA (2008). Effects of a low-glycemic index or a high-cereal fiber diet on type 2 diabetes: a randomized trial. *JAMA*, 17 Dec, 300(23), pp. 2742-53.
 - Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M (2005). The metabolic syndrome: time for a critical appraisal. Joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*, Sep, 48(9), pp. 1684-99.
 - Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. 14 Dec, 444(7121), pp. 840-6.
 - Khamzina L, Veilleux A, Bergeron S, Marette A (2005). Increased activation of the mammalian target of rapamycin pathway in liver and skeletal muscle of obese rats: possible involvement in obesity-linked insulin resistance. *Endocrinology*, Mar, 146(3), pp. 1473-81.
 - Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, Latek RR, Guntur KV, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell*, Apr, 11(4), pp. 895-904.
 - Krebs M, Krssak M, Bernroider E, Anderwald C, Brehm A, Meyerspeer M, Nowotny P, Roth E, Waldhäusl W, Roden M (2002). Mechanism of amino-acid-induced skeletal muscle insulin-resistance in humans. *Diabetes*, Mar, 51(3), pp. 599-605.
 - Krebs M, Brunmair B, Brehm A, Artwohl M, Szendroedi J, Nowotny P, Roth E, Fürnsinn C, Promintzer M, Anderwald C, Bischof M, Roden M (2007). The mammalian target of rapamycin pathway regulates nutrient-sensitive glucose uptake in man. *Diabetes*, Jun, 56(6), pp. 1600-7.
 - Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A (1998). Severe earl-onset of obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet*, Jun, 19(2), pp. 155-7.

- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 15 Aug, 227(5259), pp. 680-5.
- Lau C, Faerch K, Glümer C, Tetens I, Pedersen O, Carstensen B, Jørgensen T, Borch-Johnsen K; study, Inter99 (2005). Dietary glycemic index, glycemic load, fiber, simple sugars, and insulin resistance: the Inter99 study. *Diabetes Care*, Jun, Band 6, pp. 1397-403.
- Layman DK, Shiue H, Sather C, Erickson DJ, Baum J (2003). Increased dietary protein modifies glucose and insulin homeostasis in adult women during weight loss. *J Nutr*, Feb, 133(2), pp. 405-10.
- Levantesi G, Macchia A, Marfisi R, Franzosi MG, Maggioni AP, Nicolosi GL, Schweiger C, Tavazzi L, Tognoni G, Valagussa F, Marchioli R; Investigators, GISSI-Prevenzione (2005). Metabolic syndrome and risk of cardiovascular events after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 19 Jul, 46(2), pp. 277-83.
- Liang F, Kume S, Koya D (2009). SIRT1 and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol*, Jul, 5(7), pp. 367-73.
- Liese AD, Schulz M, Fang F, Wolever TM, D'Agostino RB Jr, Sparks KC, Mayer-Davis EJ (2005). Dietary glycemic index and glycemic load, carbohydrate and fiber intake, and measures of insulin sensitivity, secretion and adiposity in the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Diabetes Care*, Dec, 28(12), pp. 2832-8.
- Ludwig D (2002). The glycemic index: physiological mechanisms relating to obesity, diabetes, and cardiovascular disease. *JAMA*, 8 May, 287(18), pp. 2414-23.
- Machann J, Thamer C, Schnoedt B, Stefan N, Haring HU, Claussen CD, Fritsche A, Schick F (2006). Hepatic Lipid Accumulation in Healthy Subjects: A Comparative Study Using Spectral Fat-Selective MRI and Volume-Localized ¹H-MR Spectroscopy Magnetic Resonance in Medicine. *Mag reson Med*, Band 55, pp. 913-17.
- Martin WF, Armstrong LE, Rodriguez NR (2005). Dietary protein intake and renal function. *Nutrition and Metabolism*, Sep, pp. 2-25.
- McAuley KA, Hopkins CM, Smith KJ, McLay RT, Williams SM, Taylor RW, Mann JI (2005). Comparison of high-fat and high-protein diets with a high-carbohydrate diet in insulin-resistant obese women. *Diabetologia*, Jan, 48(1), pp. 8-16.
- Miller AM, Brestoff JR, Phelps CB, Berk Z, Reynolds TH (2008). Rapamycin does not improve insulin sensitivity despite elevated mammalian target of rapamycin complex 1 activity in muscles of ob/ob mice.. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Band 295, pp. 1431-38.
- Moebus S, Stang A (2007). Das metabolisches Syndrom – ein umstrittenes diagnostisches Konzept. *Herz kardiovaskuläre Erkrankungen*, Oct, 32(7), pp. 529-540.
- Möhlig M (2007). Molekulare Zusammenhänge zwischen Übergewicht und Insulinresistenz - Habilitationsschrift zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Innere Medizin/Endokrinologie. Charité Universitätsmedizin Berlin.

- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 26 Jun, 387(6636), pp. 903-8.
- Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, Silvi S, Orpianesi C, Verdenelli MC, Clavel T, Koebnick C, Zunft HJF, Dore J, Blaut M (2006). Differences in Fecal Microbiota in Different European Study Populations. *Appl environment Microbiol*, Feb, 72(2), pp. 1027-33.
- Nobukuni T, Kozma SC, Thomas G (2007). hvps34, an ancient player, enters a growing game: mTOR Complex1/S6K1 signaling. *Curr Opin Cell Biol*, Apr, 19(2), pp. 135-41.
- Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkruis FJ, Thomas G (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase.. *PNAS*, Oct, 102(40), pp. 14238-43.
- Pardo PS, Boriek AM (2011). The physiological roles of Sirt1 in skeletal muscle. *Aging*, Apr, 3(4), pp. 430-7.
- Pyörälä M, Miettinen H, Laakso M, Pyörälä K (1998). Hyperinsulinemia predicts coronary heart disease risk in healthy middle-aged men: the 22-year follow-up results of the Helsinki Policemen Study. *Circulation*, 4 Aug, 98(5), pp. 398-404.
- Reaven G (2005). Why Syndrome X? From Harold Himsworth to the insulin resistance syndrome. *Cell Metab*, Jan, 1(1), pp. 9-14.
- Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Weickert MO (2006). Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease. *Clin Res Cardiol*, Mar, 95(3), pp. 136-47.
- Roden M (2004). How free fatty acids inhibit glucose utilization in human skeletal muscle. *News Physiol Sci*, Jun, Band 19, pp. 92-6.
- Sacks FM, Bray GA, Carey VJ, Smith SR, Ryan DH, Anton SD, McManus K, Champagne CM, Bishop LM, Laranjo N, Leboff MS, Rood JC, de Jonge L, Greenway FL, Loria CM, Obarzanek E, Williamson DA (2009). Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein and carbohydrates. *N Engl J Med*, 26 Feb, 360(9), pp. 859-73.
- Samaha FF, Iqbal N, Seshadri P, Chicano KL, Daily DA, McGrory J, Williams T, Williams M, Gracely EJ, Stern L (2003). A low-carbohydrate as compared with a low-fat diet in severe obesity. *NEJM*, 22 May, 348(21), pp. 2074-81.
- Sambrook JF, Russel DW (2001). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 3rd ed, Vol 1,2,3.
- Schulze MB, Schulz M, Heidemann C, Schienkiewitz A, Hoffmann K, Boeing H (2007). Fiber and magnesium intake and incidence of type 2 diabetes: a prospective study and meta-analysis. *Arch Intern Med*, 14 May, 167(9), pp. 956-65.
- Schunkert H, Moebus S, Hanisch J, Bramlage P, Steinhagen-Thiessen E, Hauner H, Weil J, Wasem J, Jöckel KH (2008). The correlation between waist

circumference and ESC cardiovascular risk score: data from the German metabolic and cardiovascular risk project (GEMCAS). *Clin Res Cardiol*, Nov;97(11):827-35.

- See R, Abdullah SM, McGuire DK, Khera A, Patel MJ, Lindsey JB, Grundy SM, de Lemos JA (2007). The association of differing measures of overweight and obesity with prevalent atherosclerosis: the Dallas Heart Study. *J Am Coll Cardiol*, Aug, 50(8), pp. 752-9.
- Simmons W (1972). Urinary urea nitrogen/creatinine ratio as indicator of recent protein intake in field studies. *Am J Clin Nutr*, May, 25(5).
- Simon GE, Arterburn D, Rohde P (2011). Obesity, Depression and Health Services Costs Among Middle-Aged Women. *J Gen Intern Med*, Nov 26(11), pp. 1284-90.
- Sluijs I, Beulens JW, van der A DL, Spijkerman AM, Grobbee DE, van der Schouw YT (2010). Dietary intake of total, animal, and vegetable protein and risk of type 2 diabetes in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-NL study. *Diabetes Care*, Jan 33(1), pp. 43-8.
- Sun Y, Asnicar M, Saha PK, Chan L, Smith RG (2006). Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab*, May, pp. 379-86.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications (ribosomal proteins/radioimmunoassay/fluorescent antibody assay/peroxidase-conjugated antibody/autoradiography). *PNAS*, Sep, Band 76, pp. 4350-54.
- Tremblay F, Krebs M, Dombrowski L, Brehm A, Bernroider E, Roth E, Nowotny P, Waldhäusl W, Marette A, Roden M (2005). Overactivation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. *Sep*, 54(9), pp. 2674-84.
- Tremblay F, Jacques H, Marette A (2005). Modulation of insulin action by dietary proteins and amino acids: role of the mammalian target of rapamycin nutrient sensing pathway. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, Jul, 8(4), pp. 457-62.
- Tzatsos A, Kandror KV (2006). Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. *Mol Cell Biol*, Jan, 26(1), pp. 63-76.
- Um SH, Frigerio F, Watanabe M, Picard F, Joaquin M, Sticker M, Fumagalli S, Allegrini PR, Kozma SC, Auwerx J, Thomas G (2004). Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*, 9 Sep, 431(7005), pp. 200-5.
- Um SH, D'Alessio D, Thomas G (2006). Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab*, Jun, 3(6), pp. 393-402.
- Uthoff H, Staub D, Socrates T, Meyerhans A, Bundi B, Schmid HP, Frauchiger B (2010). PROCAM-, FRAMINGHAM-, SCORE- and SMART-risk score for

predicting cardiovascular morbidity and mortality in patients with overt atherosclerosis. *Vasa*. Nov;39(4), pp. 325-33.

- Vander Haar, E, Lee, S, Bandhakavi, S, Griffin, TJ, Kim, DH (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the AKT/PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biol*, Band 9, pp. 316-323.
- Wang TJ, Larson, MG, Vasan, RS, et al (2011). Metabolite Profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*; 17(4), pp. 448-453
- Weickert MO, Roden M, Isken F, Hoffmann D, Nowotny P, Osterhoff M, Blaut M, Alpert C, Gögebakan O, Bumke-Vogt C, Mueller F, Machann J, Barber TM, Petzke KJ, Hierholzer J, Hornemann S, Kruse M, Illner AK, Kohl A, Loeffelholz CV, Arafat AM, Möhlig M, Pfeiffer AF. (2011). Effects of supplemented isoenergetic diets differing in cereal fiber and protein content on insulin sensitivity in overweight humans. *Am J Clin Nutr*, Aug, pp. 459-71.
- Weickert MO, Loeffelholz CV, Roden M, Chandramouli V, Brehm A, Nowotny P, Osterhoff MA, Isken F, Spranger J, Landau BR, Pfeiffer AF, Möhlig M (2007). A Thr94Ala mutation in human liver fatty acid-binding protein contributes to reduced hepatic glycogenolysis and blunted elevation of plasma glucose levels in lipid-exposed subjects.. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Oct, 293(4), pp. 1078-84.
- Weickert MO, Möhlig M, Schöfl C, Arafat AM, Otto B, Viehoff H, Koebnick C, Kohl A, Spranger J, Pfeiffer AF (2006). Cereal fiber improves whole-body insulin sensitivity in overweight and obese women. *Diabetes Care*, Apr, 29(4), pp. 775-80.
- Weickert MO, Pfeiffer AF (2008). Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J Nutr*, Mar, 138(3), pp. 439-42.
- Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE (2000). Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*, Dec, 43(12), pp. 1498-506.
- World health organization (WHO) (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Ser*, 894(i-xii), pp. 1-253.
- Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 10 Feb, 124(3), pp. 471-84.
- Yan Y, Backer JM (2007). Regulation of class III (Vps34) PI3Ks. *Biochem Soc Trans*, Apr, 35(2), pp. 239-41.
- Yoshizaki, T, Milne, JC, Imamura, T, Schenk, S, Sonoda, N, Babendure, JL, Lu, JC, Smith, JJ, Jirousek, MR, Olefsky, JM (2009). SIRT1 exerts anti-inflammatory effects and improves insulin sensitivity in adipocytes. *Mol Cell Biol*, Mar, pp. 1363-74.

II Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1	Definition von Übergewicht und Adipositas nach WHO (eigene Darstellung nach WHO, 2000)
Tabelle 2	Beispiele für verschiedene Definitionen des Metabolischen Syndroms (eigene Darstellung nach Grundy, 2004; Balkau, 2002)
Abbildung 1	Struktur mTOR (Hay, 2004)
Abbildung 2	mTOR-Aktivierung (Wullschleger S, 2006)
Abbildung 3	S6K1-Aktivierung (Um, 2006)
Abbildung 4	Darstellung des Interventionsablaufes (eigene Darstellung)
Tabelle 3	Interventionsgruppen und ihre Zusammensetzung (eigene Darstellung)
Abbildung 5	Zeitliches Ablaufschema der Blutentnahmen (eigene Darstellung)
Abbildung 7a	Darstellung des Versuchs für phospho-p70S6K1 nach Spülen mit/ohne Phosphataseinhibitor (eigene Darstellung)
Abbildung 7b	Darstellung des Versuchs für p70S6K1 nach Spülen mit/ohne Phosphataseinhibitor (eigene Darstellung)
Abbildung 8	Darstellung der Proteinkonzentrationen aus unterschiedlichen Extraktionsmethoden (eigene Darstellung)
Tabelle 4	Zusammensetzung des verwendeten RIPA-Puffers (eigene Darstellung)
Abbildung 9	Pipettierschema Proteinkonzentrationsmessung (eigene Darstellung)
Tabelle 5	Verwendete Mengen BCA Lösung (eigene Darstellung)
Tabelle 6	Herstellung der Trenngele, zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe (eigene Darstellung)
Tabelle 7	Herstellung der Sammelgele, zur Aufkonzentration der Proteinbanden (eigene Darstellung)
Tabelle 8	Zusammensetzung von Tris (1,5M) und Tris (0,5M) zur Herstellung der Gele (eigene Darstellung)
Tabelle 9	Zusammensetzung des Laufpuffers in der Gelelektrophoresekammer (eigene Darstellung)
Tabelle 10	Zusammensetzung des Proteinprobenpuffers (eigene Darstellung)

Abbildung 10	Aufbau der Gelhaltekassette nach Sambrook (Sambrook, 2001)
Tabelle 11	Zusammensetzung TBST-Lösung (eigene Darstellung)
Tabelle 12	Zusammensetzung Towbin-Puffer (eigene Darstellung)
Tabelle 13	Verwendete Marker (eigene Darstellung)
Tabelle 14	Zusammensetzung Färbelösung (eigene Darstellung)
Tabelle 15	Zusammensetzung Entfärbelösung (eigene Darstellung)
Tabelle 16	Verwendete Antikörper (eigene Darstellung)
Tabelle 17	Darstellung der Basisdaten des Patientenkollektivs aus Weickert et al, 2011
Abbildung 11	Veränderungen des M-Wertes nach 6 und 18 Wochen Intervention nach Weickert et al 2011
Tabelle 18	Absolute Ergebnisse der Western Blots (eigene Darstellung)
Abbildung 12a	Darstellung der Immunodetektionsbanden von mTOR (eigene Darstellung)
Abbildung 12b	Darstellung der Proteinexpression von mTOR (eigene Darstellung)
Abbildung 13a	Darstellung der Immunodetektionsbanden der p70S6Kinase1 (eigene Darstellung)
Abbildung 13b	Darstellung der Proteinexpression der S6K1 (eigene Darstellung)
Abbildung 14a	Darstellung der Immunodetektionsbanden von AKT (eigene Darstellung)
Abbildung 14b	Darstellung der Proteinexpression von AKT (eigene Darstellung)
Abbildung 15a	Darstellung der Immunodetektionsbanden des phosphorylierten AKT (eigene Darstellung)
Abbildung 15b	Darstellung der relativen Proteinexpression von phospho-AKT (eigene Darstellung)
Abbildung 16a	Darstellung der Immunodetektionsbanden von hVps34 (eigene Darstellung)
Abbildung 16b	Darstellung der Proteinexpression von hVps34 (eigene Darstellung)
Abbildung 17	Darstellung der Immunodetektionsbanden von SIRT 1 (eigene Darstellung)
Abbildung 18	Sirtuin 1 normalisiert gegen GAPDH (eigene Darstellung)

III Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Friederike Müller, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

„Der Einfluss einer Proteinreichen versus Ballaststoffreichen Ernährungsintervention auf die Prävention des metabolischen Syndroms über den mTOR-Signalweg“

selbstständig und ohne nicht offen gelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

IV Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Friederike Müller hatte folgenden Anteil an folgender Publikation:

Weickert MO, Roden M, Isken F, Hoffmann D, Nowotny P, Osterhoff M, Blaut M, Alpert C, Gögebakan O, Bumke-Vogt C, Mueller F, Machann J, Barber TM, Petzke KJ, Hierholzer J, Hornemann S, Kruse M, Illner AK, Kohl A, Loeffelholz CV, Arafat AM, Möhlig M, Pfeiffer AF. (2011). Effects of supplemented isoenergetic diets differing in cereal fiber and protein content on insulin sensitivity in overweight humans. Am J Clin Nutr, Aug, pp. 459-71.

- Screening und Einschluß der PROFIMET-Proband*innen,
- Durchführung der klinischen Tests (Blutentnahmen, Fettbiopsie-Entnahme, euglykämischer-hyperinsulinämischer Clamp, Untersuchung der endogenen Glukoseproduktion in der Leber mittels stabiler Isotopen, BODPOD-Messungen, BIA-Messung)
- Durchführung der Proteinanalytik aus den Fettgewebs- und Muskelbiopsaten im Labor mittels Western Blot, Entwicklung und Durchführung der Proteinextraktion aus subkutanem Fettgewebe
- Aufbereitung der Laborergebnisse für die statistische Analyse

V Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VI Liste der Publikationen

Weickert MO, Roden M, Isken F, Hoffmann D, Nowotny P, Osterhoff M, Blaut M, Alpert C, Goegebakan O, Bumke-Vogt C, **Mueller F**, Machann J, Barber TM, Petzke KJ, Hierholzer J, Hornemann S, Kruse M, Illner AK, Kohl A, Loeffelholz CV, Arafat AM, Möhlig M, Pfeiffer AF. Effects of supplemented isoenergetic diets differing in cereal fiber and protein content on insulin sensitivity in overweight humans. *Am J Clin Nutr.* 2011 Aug;94(2):459-71.

Thiel P, Schmidt K, **Mueller F**, Ludewig K, Brunkhorst FM, Gensichen J. The Jena Sepsis Registry: a prospective observational registry for patients with severe sepsis or septic shock, supported by primary care. *Infection.* 2011;39(Suppl. 2):S138-9.

Schmidt K, Thiel P, **Mueller F**, Brunkhorst FM, Heintze C, Engel C, Oppert M, Meier-Hellmann A, Gerlach H, Schreiber T, Davydow SD, Brenk-Franz K, Schneider N, Gensichen J. Sepsis survivors monitoring and coordination in outpatient healthcare (SMOOTH): study synopsis. *Infection.* 2011;39 (Suppl. 2):S139.

Döcke S, von Loeffelholz C, Lock J, Möhlig M, Bumke-Vogt C, Hoppe S, Florian S, Morawietz L, Ringe S, Birkenfeld A, Isken F, Osterhoff M, Kruse M, **Mueller F**, Reinhart K, Neuhaus P, Weickert MO, Stockmann M, Pfeiffer AFH. Reduzierter Proteingehalt an: P 89 α : P 89AMPK und phosphorylierter: P 89 α : P 89AMPK (Thr 172) in Leberproben von Typ 2 Diabetikern im Vergleich zu Patienten mit gesundem Glukosemetabolismus: P 89. *Obesity Facts.* Oct 2012 3():41.

Schmidt K, Thiel P, Mehlhorn J, Schmuecker K, **Mueller F**, Gensichen J. Residuen kritischer Erkrankungen in der Hausarztpraxis. *Intensiv- und Notfallbehandlung, Jahrgang 37 - 3. Quartal (139 - 145)*

Schmidt K, Thiel P, **Mueller F**, Schmuecker K, Worrack S, Mehlhorn J, Engel C, Brenk-Franz K, Kausche S, Jakobi U, Bindara-Klippel A, Schneider N, Freytag A, Davydow D, Wensing M, Brunkhorst FM, Gensichen J; Smooth Study Group. Sepsis survivors monitoring and coordination in outpatient health care (SMOOTH): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2014 Jul 11;15:283.

Schmidt K, Worrack S, Von Korff M, Davydow D, Brunkhorst F, Ehlert U, Pausch C, Mehlhorn J, Schneider N, Scherag A, Freytag A, Reinhart K, Wensing M, Gensichen J; SMOOTH Study Group. Collaborators Bindara-Klippel A, Fleischmann C, Jakobi U, Kerth S, Kuhnsch H, **Mueller F**, Schelle M, Thiel P, Baenfer M, Gehrke-Beck S, Heintze C, Geist A, Schreiber T, Berhold C, Corea M, Freytag A, Gerlach H, Kuehnemund R, Lehmkuehl J, Lehmkuehl P, Reil L, Tiedemann G, Toissaint S, Veit S, Goldmann A, Oppert M, Keh D, Rademacher S, Spies C, Toepfer L, Klefisch F, Rohr U, Kern H, Sablotzki A, Oehmichen F, Pohl M, Meier-Hellmann A, Hamzei F, Engel C, Hartmann M, Hartog C, Graf J, Ollenschlaeger G, Schelling G. Effect of a Primary Care Management Intervention

on Mental Health-Related Quality of Life Among Survivors of Sepsis: A Randomized Clinical Trial. JAMA. 2016 Jun 28;315(24):2703-11.

Schmidt K, **Mueller** F, Thiel P, Brunkhorst F, Davydow DS, Engel C, Heintze C, Gensichen J. Smooth – Strukturierte Langzeitnachsorge für Patienten nach Sepsis. 45. Kongress für Allgemeinmedizin und Familienmedizin, Forum Medizin 21. Salzburg, 22.-24.09.2011. Düsseldorf: German Medical Science GMS Publishing House; 2011

Vortrag im Pre-Conference Workshop: Forschung in und mit Hausarztpraxen – ein Spagat zwischen wissenschaftlichem Goldstandard und Praxisalltag? Thema: Wie können Hausarztpraxen zur Studienteilnahme gewonnen werden? Evidenz und Fallbeispiele erfolgreicher Rekrutierungsstrategien. 45. Kongress für Allgemeinmedizin und Familienmedizin, 23.09.2011, Salzburg

Vortrag zum Thema „Surveillance of quality in rare versus common diseases in general practice“ an der EQuIP summer school, Research and Developments in Quality improvement in primary care, 28.08.-31.08.2011 in Ghent, Belgien

Vortrag im GCP-Grundkurs für Prüfer/Stellvertreter nach AMG, KKS der Medizinischen Hochschule Brandenburg (MHB) - Theodor Fontane, Brandenburg/Havel, 17.05.2019

VII Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei allen Personen bedanken, welche mich bei meinem Werdegang im DIfE sowie bei der Anfertigung der vorliegenden Arbeit unterstützt haben.

Ich möchte den Mitarbeiter*innen der Studienambulanz, Abteilung Klinische Ernährung im DIfE, Dr. med. Silke Hornemann, Andreas Wagner, Melanie Hannemann, Anja Henkel, Dr. Angela Kohl, Daniela Hoffmann herzlich danken für Ihre Unterstützung bei der Durchführung des klinischen Anteils und der Betreuung der Proband*innen.

Mein Dank gilt weiterhin allen technischen Mitarbeiter*innen sowie meinen Doktoranden-Kolleg*innen im DIfE, die mir bei der Labortätigkeit stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meinen Kolleg*innen Dr. rer. nat. Martin O. Osterhoff, Dr. med. Frank Isken[†], Dr. med. Özlem Gögebakan, Dr. med. Michael Kruse und PD Dr. med. Christian von Löffelholz danke ich sehr für die Unterstützung bei der Erarbeitung und beim Erlernen der Statistischen Analysen.

Frau Dr. rer. nat. Christiane Bumke-Vogt unterstützte mich mit großer Ausdauer und Geduld beim Erlernen, Etablieren und Durchführen der Laborarbeiten. Ich fühle mich ihr nicht nur durch die fachliche Zusammenarbeit, sondern vor allem freundschaftlich sehr verbunden und möchte ihr für dieses gemeinsame Wirken sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. med. Martin O. Weickert und meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Andreas F.H. Pfeiffer, zum einen für ihre Geduld und ihren Zuspruch in schwierigen Phasen der Doktorarbeit, vor allem jedoch für die hervorragende, gründliche, kritische und authentische wissenschaftliche Ausbildung, die ich durch diese Zusammenarbeit erhalten habe und von der ich in meiner weiteren beruflichen und wissenschaftlichen Laufbahn sehr nachhaltig profitiere.

Diese Doktorarbeit wäre ohne einige für mich sehr wichtige Menschen jedoch nie zu einem erfolgreichen Abschluss gekommen. Meinen Freund*innen und Kolleg*innen Jana, Ana, Johannes, Eva, Maren, Regina, Uwe, Franziska, Pia, Sabur und meinem besonderen Mentor und Freund Prof. Dr.Dr. Kurt J.G. Schmailzl möchte ich in ganz inniger Weise und sehr sehr herzlich für ihre unermüdliche menschliche Unterstützung, ihre Ehrlichkeit und Loyalität und ihr Verständnis danken!