

Aus dem Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung
der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel

***in vitro* - Identifizierung
fettassimilationsinhibierender Bioaktivität**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Dipl. oec. troph. **Niels Peter Möller**
aus Flensburg
Kiel, 2006

Gedruckt mit Genehmigung der Agrar- und Ernährungswissenschaftlichen
Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Dekan: Prof. Dr. J. Krieter

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Schrezenmeir

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. S. Wolffram

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Februar 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Literaturübersicht.....	3
2.1	<i>Das Metabolische Syndrom.....</i>	3
2.2	<i>Erhöhte postprandiale Triglyceridwerte und das Metabolische Syndrom... 4</i>	4
2.3	<i>Nahrungslipide und ihre Bedeutung für den humanen Stoffwechsel..... 5</i>	5
2.4	<i>Fettverdauung.....</i>	6
2.5	<i>Lipaseinhibition.....</i>	10
2.5.1	Lipase-hemmende Substanzen mikrobiologischer Herkunft.....	10
2.5.1.1	Orlistat.....	10
2.5.1.2	Weitere Lipase-hemmende Aktivität mikrobiologischen Ursprungs..	11
2.5.2	Lipase-hemmende Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft.....	12
2.5.2.1	Stand der Wissenschaft	12
2.5.2.2	Patentlage	15
2.6	<i>Fettresorption.....</i>	17
2.6.1	Passive Diffusion.....	18
2.6.2	Erleichterte Diffusion.....	18
2.6.3	Aktiver Transport	19
2.6.4	FABP.....	20
2.6.5	FATP	21
2.6.6	FAT/CD36.....	22
2.6.7	Postprandialer Triglyceridstoffwechsel in der Mukosazelle	23
2.7	<i>Inhibition der Fettresorption.....</i>	24
2.8	<i>PPARs und ihre Liganden – Modulatoren des Fettsäurestoffwechsels 24</i>	24
2.8.1	Aufbau.....	24
2.8.2	Wirkungsmechanismus	25
2.8.3	PPAR-Typen	26
2.8.4	PPAR γ -Agonisten und -Antagonisten	27
2.8.5	PPAR α -Agonisten und -Antagonisten	29
2.9	<i>Caco-2 Zellen.....</i>	31
3	Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft	33
3.1	<i>Material und Methoden.....</i>	33

3.1.1	Kommerzielle Proben	33
3.1.2	Eigene Extrakte	46
3.1.2.1	Ausgangsmaterialien	46
3.1.2.2	Extraktionsverfahren.....	48
3.1.3	Selektionsverfahren im Verlauf des Screenings	49
3.1.4	Testung auf Lipase inhibitorische Aktivität.....	50
3.1.4.1	Herstellung der Testlösungen	50
3.1.4.2	Lipasebestimmung mit Methylresorufin als Substrat (Methylresorufinmethode)	52
3.1.4.3	Lipasebestimmung mit Triolein als Substrat (Trioleinmethode).....	54
3.1.4.4	Bestimmung der alkalischen Phosphatase (unspezifische Hemmung)	57
3.1.5	Surface Plasmon Resonance Spektroskopie (SPR)	59
3.1.6	Statistik.....	60
3.2	<i>Ergebnisse zur Lipaseinhibition</i>	61
3.2.1	Enzymatische Aktivitätsbestimmungen	61
3.2.1.1	Wirkung von Orlistat auf die Lipaseaktivität.....	61
3.2.1.2	Wirkung eines Trioleinzusatzes auf die Lipaseaktivität.....	62
3.2.1.3	Wirkung der Testsubstanzen auf die Enzymaktivitäten.....	63
3.2.1.3.1	Ergebnisse der Methylresorufinmethode.....	63
3.2.1.3.2	Ergebnisse der Trioleinmethode	66
3.2.1.3.3	Ergebnisse der Bestimmung der alkalischen Phosphatase	69
3.2.2	ID ₅₀ von Lapachotee (<i>Tabebuia impetiginosa</i>).....	69
3.2.3	Ergebnisse zur SPR.....	72
3.3	<i>Diskussion Lipasehemmung</i>	73
3.3.1	Methodik der Lipaseaktivitätsbestimmung	73
3.3.2	Bilanz des Screenings	73
3.3.3	SPR	77
3.3.4	Anwendung Lipase-hemmender Testsubstanzen.....	78
3.3.5	Fazit.....	80
4	Modulation des Fettsäuretransportes in Caco-2 Zellen durch natürliche und synthetische PPAR α - und PPAR γ -Liganden	81
4.1	<i>Materialien</i>	81
4.1.1	Caco-2 Zellen.....	81
4.1.2	Medien und Lösungen für die Versuche mit Caco-2 Zellen	81
4.1.3	Reagenzien für den MTT-Test zur Untersuchung der Vitalität.....	83
4.2	<i>Methoden</i>	83
4.2.1	Subkultivierung von Caco-2 Zellen.....	83

4.2.2	Lagerung (Langzeitkonservierung).....	84
4.2.3	Zellzahlbestimmung	84
4.2.4	Fettsäureaufnahme	85
4.2.4.1	Kultivierung der Caco-2 Zellen vor dem Assay zur Fettsäureaufnahme	85
4.2.4.2	Herstellung der Ligandenkonzentrationsreihen.....	85
4.2.4.3	Herstellung der Versuchsmedien.....	87
4.2.4.4	Erfassung der Palmitinsäureaufnahme unter Einfluss der PPAR- Liganden	87
4.2.4.5	Assay für die Gesamtpalmitinsäureaufnahme.....	90
4.2.4.6	Assay für die unspezifische Bindung	90
4.2.5	RNA-Isolation.....	92
4.2.6	Qualitative RT-PCR	93
4.2.7	Bestimmung freier Fettsäuren im FCS	96
4.2.8	MTT-Vitalitätstest	96
4.2.9	Statistik.....	97
4.3	<i>Ergebnisse Fettsäureaufnahme.....</i>	98
4.3.1	Palmitinsäureaufnahme unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten Troglitazone	98
4.3.2	Palmitinsäureaufnahme unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten GW1929.....	100
4.3.3	Palmitinsäureaufnahme unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten GW1929 und des PPAR γ -Antagonisten GW9662	102
4.3.4	Palmitinsäureaufnahme unter Einfluss des PPAR α -Agonisten GW7647 und des PPAR α -Antagonisten MK886	104
4.3.5	Qualitative RT-PCR	106
4.3.6	Bestimmung freier Fettsäuren im FCS	106
4.3.7	MTT-Test	107
4.4	<i>Diskussion Fettsäureaufnahme</i>	108
4.4.1	Caco-2 Zellen als <i>in vitro</i> -Modell	108
4.4.2	Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen unter Einfluss verschiedener PPAR γ - und PPAR α -Liganden.....	108
4.4.2.1	Transportproteine in Enterozyten und deren Beteiligung an der Fettsäureaufnahme	109
4.4.2.2	Beteiligung von PPAR-Liganden an der Fettsäureaufnahme	110
4.4.2.3	Einfluss möglicher Nebenwirkungen auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen.....	114
4.4.2.4	Inkubationszeit und Ligandenkonzentrationen.....	115
4.4.2.5	Fettsäureangebot	115
4.4.3	Fazit.....	116

5	Zusammenfassung.....	117
6	Abstract.....	119
7	Literaturverzeichnis.....	121
8	Anhang.....	137
8.1	<i>Ergebnisse der Enzymatik.....</i>	<i>137</i>
8.1.1	Ergebnisse ermittelt mit der Methylresorufinmethode.....	137
8.1.2	Ergebnisse ermittelt mit der Trioleinmethode.....	156
8.1.3	Ergebnisse der Bestimmungen der alkalischen Phosphatase.....	159
8.2	<i>Chemikalien.....</i>	<i>166</i>
8.2.1	Chemikalien für die Enzymatik.....	166
8.2.2	Chemikalien für die Zellkultur.....	166
8.2.3	Chemikalien für die Fettsäureaufnahme.....	167
8.2.4	Chemikalien für die qualitative Genexpression.....	167
8.3	<i>Einwegmaterialien.....</i>	<i>168</i>
8.3.1	Einwegmaterialien für die Enzymatik und die Zellkultur.....	168
8.3.2	Einwegmaterialien für die qualitative Genexpression.....	169
8.4	<i>Laborgeräte.....</i>	<i>169</i>
8.4.1	Laborgeräte für die Enzymatik.....	169
8.4.2	Laborgeräte für die Zellkultur.....	169
8.4.3	Laborgeräte für die qualitative Genexpression.....	170
8.5	<i>Verwendete Abkürzungen.....</i>	<i>170</i>

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Kriterien zur Erfüllung des Metabolischen Syndroms nach IDF 2005 [3]	3
Tab. 2:	Lipase-hemmende Effekte durch pflanzliche Extrakte und Verbindungen pflanzlicher Herkunft <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	12
Tab. 3:	Chemische Verbindungen mit Lipase inhibitorischen Eigenschaften	15
Tab. 4:	Für Lipasehemmung patentierte Pflanzenextrakte und Reinsubstanzen aus Pflanzen.....	15
Tab. 5:	Die FABP-Familie und ihre Expression in verschiedenen Geweben (modifiziert nach Storch und Thumser, 2000) [151]	21
Tab. 6:	Die FATP-Familie und ihre Expression in verschiedenen Geweben (modifiziert nach Stahl, 2004) [156]	22
Tab. 7:	Untersuchte Extraktionen mit alkoholischen Lösungsmitteln	34
Tab. 8:	Untersuchte CO ₂ -Extrakte	40
Tab. 9:	Untersuchte wässrige Fertigextrakte	42
Tab. 10:	Untersuchte Reinsubstanzen	43
Tab. 11:	Untersuchte Proteine, Proteinisolate und -hydrolysate.....	44
Tab. 12:	Untersuchte Oleoresine und Öle.....	45
Tab. 13:	Untersuchte Ätherische Öle	45
Tab. 14:	Ausgangsmaterialien für die Herstellung verschiedener Eigenextraktvarianten	46
Tab. 15:	Pipettierschema für die Probeninkubation bei der Trioleinmethode.....	56
Tab. 16:	Mit der Surface Plasmon Resonance auf Lipasebindung untersuchte Testsubstanzen	60
Tab. 17:	Anteil der Proben mit inhibitorischer Aktivität von > 50% bei der 1/100-Verdünnung (Methylresorufinmethode), geordnet nach Substanzklassen (kommerzielle Proben) ...	63
Tab. 18:	Anteil der Proben mit inhibitorischer Aktivität von > 50% bei der 1/100-Verdünnung (Methylresorufinmethode), geordnet nach Extraktionsverfahren (Eigenextrakte)	64
Tab. 19:	Die 24 effektivsten Lipase-hemmenden Testsubstanzen, Methylresorufinmethode (1/100-Verdünnung)	65
Tab. 20:	Lipaseinhibition (%) mittels Methylresorufinmethode (1/100-Verdünnung) bei Anwendung verschiedener Extraktionsverfahren.....	66
Tab. 21:	Lipaseinhibitionen (%), Methylresorufin- und Trioleinmethode) und Inhibition der alkalischen Phosphatase der 24 wirksamsten Testsubstanzen bei der 1/100- Verdünnung	68
Tab. 22:	Ergebnisse zu Untersuchungen mit der Surface Plasmon Resonance Spektroskopie	72
Tab. 23:	Eingesetzte Ligandenkonzentrationen in den Versuchen zur Palmitinsäureaufnahme.....	86

Tab. 24:	Primer für die RT-PCR	94
Tab. 25:	Lipaseaktivität in Gegenwart von alkoholischen Testsubstanzen, Methylresorufinmethode	137
Tab. 26:	Lipaseaktivitäten in Gegenwart von CO ₂ -Extrakten, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)	141
Tab. 27:	Lipaseaktivität in Gegenwart von wässrigen Fertigextrakten, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)	143
Tab. 28:	Lipaseaktivität in Gegenwart von Reinsubstanzen, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)	144
Tab. 29:	Lipaseaktivität in Gegenwart von Proteinen, Proteinisolaten und -hydrolysaten, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)	145
Tab. 30:	Lipaseaktivitäten in Gegenwart von Oleoresinen/Ölen, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)	146
Tab. 31:	Lipaseaktivität in Gegenwart von Ätherischen Ölen, Methylresorufinmethode	146
Tab. 32:	Lipaseaktivität in Gegenwart verschiedener Eigenextraktvarianten, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)	146
Tab. 33:	Lipaseaktivitäten in Gegenwart von alkoholischen Testsubstanzen, Trioleinmethode (in % Inhibition)	156
Tab. 34:	Lipaseaktivitäten in Gegenwart von wässrigen Fertigextrakten, Trioleinmethode (in % Inhibition)	157
Tab. 35:	Lipaseaktivität in Gegenwart von CO ₂ -Extrakten, Trioleinmethode (in % Inhibition) ..	157
Tab. 36:	Lipaseaktivität in Gegenwart von Oleoresinen und Ölen, Trioleinmethode (in % Inhibition)	157
Tab. 37:	Lipaseaktivität in Gegenwart von Eigenextrakten, Trioleinmethode (in % Inhibition) ..	158
Tab. 38:	Aktivität der alkalischen Phosphatase in Gegenwart alkoholischer Fertigextrakte (in % Inhibition)	159
Tab. 39:	Aktivität der alkalischen Phosphatase in Gegenwart von CO ₂ -Extrakten (in % Inhibition)	159
Tab. 40:	Aktivität der alkalischen Phosphatase in Gegenwart wässriger Fertigextrakten (in % Inhibition)	159
Tab. 41:	Aktivität der alkalischen Phosphatase in Gegenwart von Oleoresinen und Ölen (in % Inhibition)	160
Tab. 42:	Aktivität der alkalischen Phosphatase in Gegenwart von Eigenextrakten (in % Inhibition)	160

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Einflussfaktoren für die Entstehung des Metabolischen Syndroms	4
Abb. 2:	Intestinale Triglyceridhydrolyse, mukosale Fettsäureabsorption und Lipoproteinfreisetzung [51].	7
Abb. 3:	Die intestinale Triglyceridhydrolyse durch das Lipase/Colipase/Gallensalz-System [53]8	
Abb. 4 :	Aktivierung der Lipase durch die Colipase an der Öl-Wasser-Grenzfläche [49].	9
Abb. 5:	Die α/β -Hydrolasefaltung von Lipasen [56]. Pfeile: β -Faltblattstrukturen; Balken: α -Helices; N: N-terminales Ende; C: C-terminales Ende; Ser, Asp/Glu (Pankreaslipase: Asp), His: katalytische Triade.	9
Abb. 6:	Strukturformel Tetrahydrolipstatin (Orlistat) [61]	11
Abb. 7:	Struktureller Aufbau der PPAR [168], DBD: DNA-Bindungsdomäne, LBD: Ligandenbindungs- und Dimerisierungsdomäne, AF1: Ligandenunabhängige Aktivierungsdomäne, AF2: ligandenabhängige Aktivierungsdomäne	25
Abb. 8:	Modulation der Genexpression durch das RXR/PPAR-Heterodimer, L: PPAR-Ligand, RA: Retinsäure [139]	25
Abb. 9:	Strukturformel von Troglitazone	29
Abb. 10:	Strukturformel von GW1929	29
Abb. 11:	Strukturformel von GW9662	29
Abb. 12:	Strukturformel GW7647	30
Abb. 13:	Strukturformel MK886 [187]	30
Abb. 14:	Fließschema des Screeningverfahrens	49
Abb. 15:	Prinzip der Lipaseaktivitätsbestimmung mit Methylresorufin als Substrat [208]	52
Abb. 16:	Prinzip der Lipaseaktivitätsbestimmung mit Triolein als Substrat	55
Abb. 17:	Prinzip der Surface Plasmon Resonance	59
Abb. 18:	Wirkung von Orlistat auf die Lipaseaktivität (Methylresorufin- und Trioleinmethode, $\bar{x} \pm SEM$)	61
Abb. 19:	Einfluss von Triolein auf die Lipaseaktivität (Triolein- und Methylresorufinmethode $\bar{x} \pm SEM$)	62
Abb. 20:	% Lipasehemmungen ($\bar{x} \pm SEM$) unter Einfluss verschiedener Eigenextraktvarianten von Lapachotee, Methylresorufinmethode	70
Abb. 21:	% Lipasehemmung ($\bar{x} \pm SEM$) durch eine Extraktion mit 100% Ethanol aus Lapachotee.	71
Abb. 22:	Struktur des Dehydrochalkons Phloridzin [215]	76
Abb. 23:	Triterpengrundgerüst der Saponine, Glycyrrhithinsäure: Disaccharid-Zuckerrest an Position C3 [216]	77

Abb. 24: Inhaltsstoffe des Lapachotees [220], 1: Lapachol, 2: Dehydro-a-Lapachone, 3: a-Lapachone, 4: β -Lapachone, 5-7: Naphto-[2,3- β]furan-4,9-Dione, 8: Dehydro-iso-a-Lapachone	79
Abb. 25: Fliessschema der Versuchsdurchführung bei der Fettsäureaufnahme.....	89
Abb. 26: Gesamtaufnahme, unspezifische Bindung und Nettoaufnahme von ^3H -Palmitinsäure in Caco-2 Zellen unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten Troglitazone in verschiedenen Konzentrationen (n = 6).	99
Abb. 27: Gesamtaufnahme, unspezifische Bindung und Nettopalmitinsäureaufnahme von ^3H -Palmitinsäure in Caco-2 Zellen unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten GW1929 in verschiedenen Konzentrationen (n = 4).	101
Abb. 28: Gesamtaufnahme, unspezifische Bindung und Nettoaufnahme von ^3H -Palmitinsäure in Caco-2 Zellen unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten GW1929 und des PPAR γ -Antagonisten GW9662 in verschiedenen Konzentrationen (n = 11-12)...	103
Abb. 29: Gesamtaufnahme, unspezifische Bindung und Nettopalmitinsäureaufnahme von ^3H -Palmitinsäure in Caco-2 Zellen unter Einfluss des PPAR α -Agonisten GW7647 und des PPAR α -Antagonisten MK886 in verschiedenen Konzentrationen (n = 8-11).	105
Abb. 30: Gelelektrophoretische Auswertung der RT-PCR von β -Aktin (1), GAPDH (2), FATP4 (3), FABP1 (4), FABP2 (5), FABP6 (6) und PPAR γ (7)	106
Abb. 31: Lapachobaum (Taheebobaum, <i>Tabebuia impetiginosa</i>)	165

1 Einleitung und Problemstellung

In den vergangenen zwei Jahrzehnten haben Veränderungen der Ernährung, des Lebensstils und der Umweltbedingungen weltweit zu einem epidemieartigen Anstieg von Übergewicht und Diabetes Typ 2 geführt [1,2]. Das Zusammentreffen verschiedener Risikofaktoren für koronare Herzerkrankungen wie abdominale Adipositas und Diabetes Typ 2 sowie deren Folgeerkrankungen Hypertonie, Dyslipoproteinämie und verfrühte Atherosklerose wird unter dem Begriff 'Metabolisches Syndrom' oder 'Syndrom X' zusammengefasst, da diesen Erkrankungen eine Insulinresistenz gemeinsam ist [3,4,5].

Zahlreiche Studien haben einen Zusammenhang zwischen postprandialer Hyperlipämie und der Inzidenz der Insulinresistenz festgestellt [6,7,8]. Ein verzögerter Einstrom von Nahrungsfetten in das Lymph- bzw. Blutkompartiment führt zu einer Senkung der postprandialen Triglyceride (pp TG), bewirkt eine Verbesserung des postprandialen Lipidprofils sowie der Insulinresistenz und senkt das Risiko einer koronaren Herzerkrankung [9,10]. Die Hemmung der Fettverdauung durch Orlistat (Tetrahydrolipstatin) - einem selektiven und effizienten Inhibitor der Pankreaslipase [11] - führte in Humanstudien zu einer Senkung der pp TG-Werte [12,13]. Mit der Hemmung der pp TG-Anstiege assoziiert war eine Senkung des Nüchtern LDL-Cholesterinspiegel. Eine weitere Möglichkeit, wodurch eine Verzögerung des Einstroms von Nahrungsfetten in das Blutkompartiment erreicht werden kann, besteht in der Hemmung des intestinalen Fettsäuretransportes in und durch die Enterozyten.

Aufgrund der mit dem metabolischen Syndrom assoziierten steigenden Kosten für das Gesundheitswesen wird nach Möglichkeiten zur Prävention und Beeinflussung des Metabolischen Syndroms gesucht. Funktionelle Lebensmittel und Nahrungsergänzungsmittel stellen eine vielversprechende Möglichkeit dar, dem Metabolischen Syndrom präventiv oder therapeutisch entgegenzuwirken [14].

Zielsetzung dieser Arbeit sollte es sein, Substanzen zu identifizieren, die die Fettassimilation inhibieren durch

1. Hemmung der Pankreaslipase bzw.
2. Hemmung des Fettsäuretransportes in Enterozyten.

Auf Lipase-hemmende Eigenschaft wurden Pflanzenextrakte, Reinsubstanzen pflanzlicher Herkunft und Peptide getestet. Bei pflanzlichen Proben sollte dabei ein besonderes Augenmerk auf die Substanzklassen und das Extraktionsverfahren gelegt werden, um Rückschlüsse auf die Art chemischer Verbindungen zu ziehen, die für Lipase-hemmende Effekte verantwortlich sind, um Strategien für eine spätere Isolierung der Wirkstoffe zu entwickeln.

1 Einleitung und Problemstellung

Zur Frage der Modulation der Fettsäureaufnahme wurden synthetische PPAR γ - und PPAR α -Liganden ausgewählt, welchen eine bedeutende Rolle in der Regulierung des Fettstoffwechsels zugeschrieben wird [15-17]. Diese sollten auf eine konzentrationsabhängige Wirkung untersucht werden. Als Versuchsmodell wurde die vielfach für die Untersuchung intestinaler Transportvorgänge eingesetzte Zelllinie Caco-2 gewählt [18-20].

2 Literaturübersicht

2.1 Das Metabolische Syndrom

Das Metabolische Syndrom ist gekennzeichnet durch eine Gruppierung von Risikofaktoren für koronare Herzerkrankungen und beschreibt das gemeinsame Auftreten von Glucoseintoleranz oder Typ 2 Diabetes mit einer abdominalen Adipositas und/oder Dyslipoproteinämie und essentieller arterieller Hypertonie [21]. In der Literatur wird das Metabolische Syndrom zuweilen auch als Insulinresistenz-Syndrom, Syndrom X oder Tödliches Quartett bezeichnet [22,23]. Die letzte Einschätzung der Kosten zur Behandlung allein von Diabetes Typ 2 in Deutschland wurde 1998 durch die CORE-2-Studie (*Costs of Diabetes in Europe – Type 2*) ermittelt und belief sich auf 16,1 Mrd. € [24].

In einer aktuellen Definition des Metabolischen Syndroms der IDF werden die Unterschiede von ethnischen Gruppen bei der Prognose für Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen berücksichtigt [3] (Tab. 1). Danach wird der Taillenumfang bei der Bestimmung des WHR zur Diagnose des zentralen Übergewichts an die verschiedenen ethnischen Gruppen angepasst.

Tab. 1: Kriterien zur Erfüllung des Metabolischen Syndroms nach IDF 2005 [3]

Symptom	Kriterium
Zentrale Adipositas	BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ und/oder Taillenumfang für WHR* Frau: $\geq 80 \text{ cm}$ Mann: $\geq 94 \text{ cm}$
<i>+ zwei der folgenden Kriterien</i>	
Erhöhte Triglyceridwerte	Triglyceride $> 150 \text{ mg/dL}$
Reduzierte HDL-Cholesterolverte	HDL-Cholesterol Frau: $< 40 \text{ mg/dL}$ Mann: $< 50 \text{ mg/dL}$
Erhöhter Blutdruck	Systolisch: $\geq 130 \text{ mm Hg}$ Diastolisch: $\geq 85 \text{ mm Hg}$
Insulinresistenz	Nüchtern Plasmaglucose $\geq 100 \text{ mg/dL}$

* Kriterium für Europäer

Das Metabolische Syndrom hat multifaktorielle Ursachen (Abb. 1). Im Überfluss vorhandene, leicht erhältliche, energiedichte und wohlschmeckende Lebensmittel führen in westlichen Industrienationen zu einer exzessiven Kalorienzufuhr und dem damit häufig verbundenen Übergewicht [25]. Daneben sind genetische Prädispositionen [26], Stress [27] und eine überwiegend sitzende Tätigkeit bzw. verminderte physische Aktivität [28] weitere Gründe für die Entwicklung der Symptomatik des Syndroms. Die molekularen Mechanismen, die zur

Entstehung der Insulinresistenz führen, werden derzeit noch intensiv untersucht [29]. Eine zentrale Rolle wird den Fettsäuren zugemessen, die nüchtern aus dem Fettgewebe und pp aus den triglyceridreichen Lipoproteinen, insbesondere aus den Chylomikronen, in denen das Nahrungsfett im Blut erscheint, freigesetzt werden.

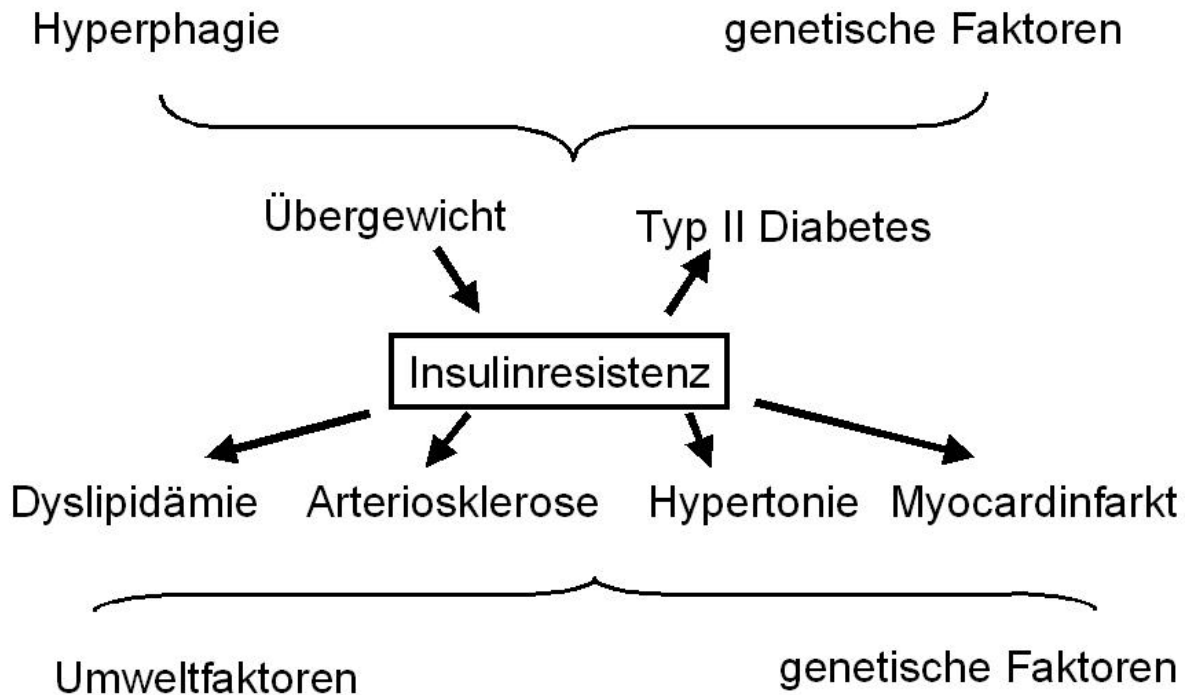


Abb. 1: Einflussfaktoren für die Entstehung des Metabolischen Syndroms

Dementsprechend besteht eine starke Assoziation zwischen abdominell betontem Übergewicht und Typ 2 Diabetes [30]. Eine Therapie setzt deshalb primär bei einer Gewichtsreduktion an. Eine Verbesserung der Insulinsensitivität kann durch Gewichtsreduktion [31], erhöhte physische Aktivität [32] oder auch mittels spezifischer Wirkstoffe erzielt werden [32].

2.2 Erhöhte postprandiale Triglyceridwerte und das Metabolische Syndrom

Zahlreiche Studien haben sich in der Vergangenheit mit dem Zusammenhang zwischen dem Metabolischen Syndrom und dem Lipoproteinstoffwechsel beschäftigt. Alle diese Studien betonen die Häufigkeit des Vorkommens von Hypertriglyceridämie in der Pathologie verschiedener Elemente des Metabolischen Syndroms. Die meisten dieser Untersuchungen widmeten sich jedoch ausschließlich den Nüchterntriglyceridwerten, nur wenige ermittelten das pp Lipidprofil. Serumtriglyceridwerte werden hauptsächlich durch Ernährungsgewohnheiten beeinflusst. Maßgeblich beteiligt an der Entstehung hoher Serumtriglycerid-

spiegel und freier Fettsäuren ist der in westlichen Industrienationen weit verbreitete übermäßige Fettverzehr [2].

Bei gesunden Menschen erscheint vier bis fünf Stunden nach Verzehr einer standardisierten fetthaltigen Mahlzeit ein pp Triglyceridmaximum [33,34,35]. Personen, die regelmäßig Mahlzeiten zu sich nehmen, sind deshalb über weite Strecken des Tages pp Stoffwechselbedingungen ausgesetzt [36]. In verschiedenen Humanstudien wurde ein eindeutiger Zusammenhang zwischen erhöhten pp Serum-TG-Werten und Übergewicht [37] sowie der Insulinresistenz [6,7,8] festgestellt. Schrezenmeir *et al.* [6] identifizierte eine gesteigerte Triglyceridantwort auf eine standardisierte Fettmahlzeit bei Personen mit einem erhöhten Risiko für das Metabolische Syndrom. Diese Gruppe wurde als 'High Responder' bezeichnet im Gegensatz zu 'Normal Respondern', denjenigen Personen, die eine 'normale Triglyceridantwort' aufweisen. Zahlreiche Arbeitsgruppen haben darüber hinaus eine eindeutige Assoziation zwischen erhöhten pp Serum-TG-Werten und Arteriosklerose nachgewiesen [9,38,39,40,10,33]. Die Entstehung atherosklerotischer Läsionen am Endothel muss deshalb mit Störungen im pp Stoffwechsel von TG-reichen Lipoproteinen und deren Remnants in Verbindung gebracht werden [41].

Erhöhte pp Serum-TG-Werte sind nachweislich auf einen erhöhten Einstrom von Nahrungsfetten in das Blutkompartiment und nicht auf eine gesteigerte VLDL-Produktion der Leber zurückzuführen. In einem frühen Stadium des Metabolischen Syndroms scheint die Chylomikronen-Clearance durch eine gesteigerte Aktivität der Lipoproteinlipase und vor allem der hepatischen Lipase verstärkt zu sein [42,6]. Im fortgeschrittenen Stadium des metabolischen Syndroms, in dem Typ 2 Diabetes und Insulinmangel auftreten, ist die TG-Clearance verzögert [7].

Aufgrund der eindeutigen Assoziation zwischen erhöhten pp TG-Werten und verschiedenen Symptomen des Metabolischen Syndroms ist die Verzögerung des Einstroms von Nahrungsfetten in das Blutkompartiment und somit die Senkung von pp TG-Peaks ein wichtiges Ziel, v.a. in der Prävention und Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen.

2.3 Nahrungslipide und ihre Bedeutung für den humanen Stoffwechsel

Nahrungslipide liegen zu 98% in Form von Triglyceriden vor; freies Cholesterin, Cholesterinester, Pflanzensterole und Phospholipide machen den restlichen Teil aus [43]. Der überwiegende Teil der Nahrungstriglyceride besteht aus langkettigen Fettsäuren (LCFAs), denen vielfältige Funktionen zugeschrieben werden. Neben ihrer Funktion als Energielieferanten sind sie Bestandteil der Cholesterinester und Phospholipide. Die mehrfach ungesättigten langkettigen Fettsäuren sind darüber hinaus Ausgangssubstanz für regulatorische Prostaglandine, Leukotriene und Thromboxane, membranbildende Phospho-

und Glycolipide [44]. Zum anderen beeinflussen die LCFAs die Expression von Genen, die in den Lipidmetabolismus und die Zelldifferenzierung involviert sind. Im Fettgewebe werden sie in Form von Triacylglycerinen gespeichert, in vielen anderen Geweben liefert das durch die β -Oxidation von Fettsäuren gewonnene Acetyl-CoA die notwendige metabolische Energie. Die meisten Fettsäure-oxidierenden Gewebe sind selbst nicht oder nur geringfügig in der Lage, Fettsäuren zu bilden und müssen diese aus dem Blutkreislauf aufnehmen. Die Fettsäuren stammen hauptsächlich aus dem Fettgewebe und werden an Albumin gebunden transportiert [45,44,46,47,48] oder aus dem Nahrungsfett, das in Chylomikronen im Blut erscheint, von wo sie über die Lipoproteinlipase herausgespalten werden. Die aus dem Darmlumen aufgenommenen Fettsäuren werden in den Enterozyten bevorzugt in Triacylglycerine eingebaut und in Form von Chylomikronen an das Lymphsystem abgegeben. Die aus dem Blut in die Zelle peripherer Gewebe resorbierten Fettsäuren unterliegen überwiegend der β -Oxidation oder werden in Phospholipide eingebaut [47]. Sie liefern dadurch bei Bedarf die notwendige Energie für die Aktivität beispielsweise des Herzens und der Skelettmuskulatur [44]. Ein kleiner Teil der im Muskel oxidierten Fettsäuren wird durch die Hydrolyse der intramuskulären Triglyceride geliefert, der größte Teil jedoch wird aus dem Blut genommen.

2.4 Fettverdauung

Nahrungsfette kommen nach Verzehr in Kontakt mit Lipasen (E.C. 3.1.1.3) des Gastrointestinaltraktes. Das Schlüsselenzym für den Fettabbau und somit auch für die Fettabsorption ist die pankreatische Lipase¹. Sie verrichtet den grössten Teil der Triglyceridhydrolyse. Nach ihrer Produktion in den Azinuszellen des exokrinen Pankreas wird die Lipase mit dem Pankreassekret durch den Ductus pancreaticus in den Dünndarm abgegeben. Im Pankreassaft repräsentiert die Lipase etwa 3% des Proteinanteils.

Während der intestinalen Triglyceridhydrolyse werden die Fettsäuren bevorzugt an den Positionen sn-1 und sn-3 entfernt, wobei Fettsäuren an der 2. Position am Glycerol verestert bleiben (Abb. 2). Die Pankreaslipase spaltet Triglyceride mit kurz- und mittelkettigen Fettsäuren deutlich schneller als Triglyceride mit langkettigen Fettsäuren. Darüber hinaus weist die Pankreaslipase eine wesentlich höhere Aktivität gegenüber Substraten wie langkettigen Triglyceriden im Vergleich zu wasserlöslichen Substraten auf. Lediglich ein kleiner Teil von ungefähr 5-10% gelangt - wahrscheinlich aufgrund der Unzugänglichkeit für Lipasen - in den Dickdarm.

¹ Im weiteren Verlauf der Arbeit wird als Synonym für die Pankreaslipase der Begriff Lipase verwendet, wenn nicht anders erwähnt.

Konjugierte Gallensäuren, sog. Gallensalze, sind essentiell für die Lipaseaktivität. Ein Mangel an Gallensalzen verringert die Fettabsorption. Wie Abb. 3 zeigt, setzt sich die Lipase zunächst an die Oberfläche der Fetttröpfchen. Durch physiologische Gallensalz-Konzentrationen (8-10 mmol/L) kommt es zur spontanen Bildung von Mizellen. Darüber hinaus 'reinigen' die Gallensalze die Lipidtröpfchen von weiteren Nahrungsbestandteilen wie Ballaststofffasern, Cellulose und Glykoproteinen [49] und schützen sowohl die native Struktur der Lipase als auch die Öl-Wasser-Grenzschicht vor einer Trennung durch ungefaltete Proteine [50].

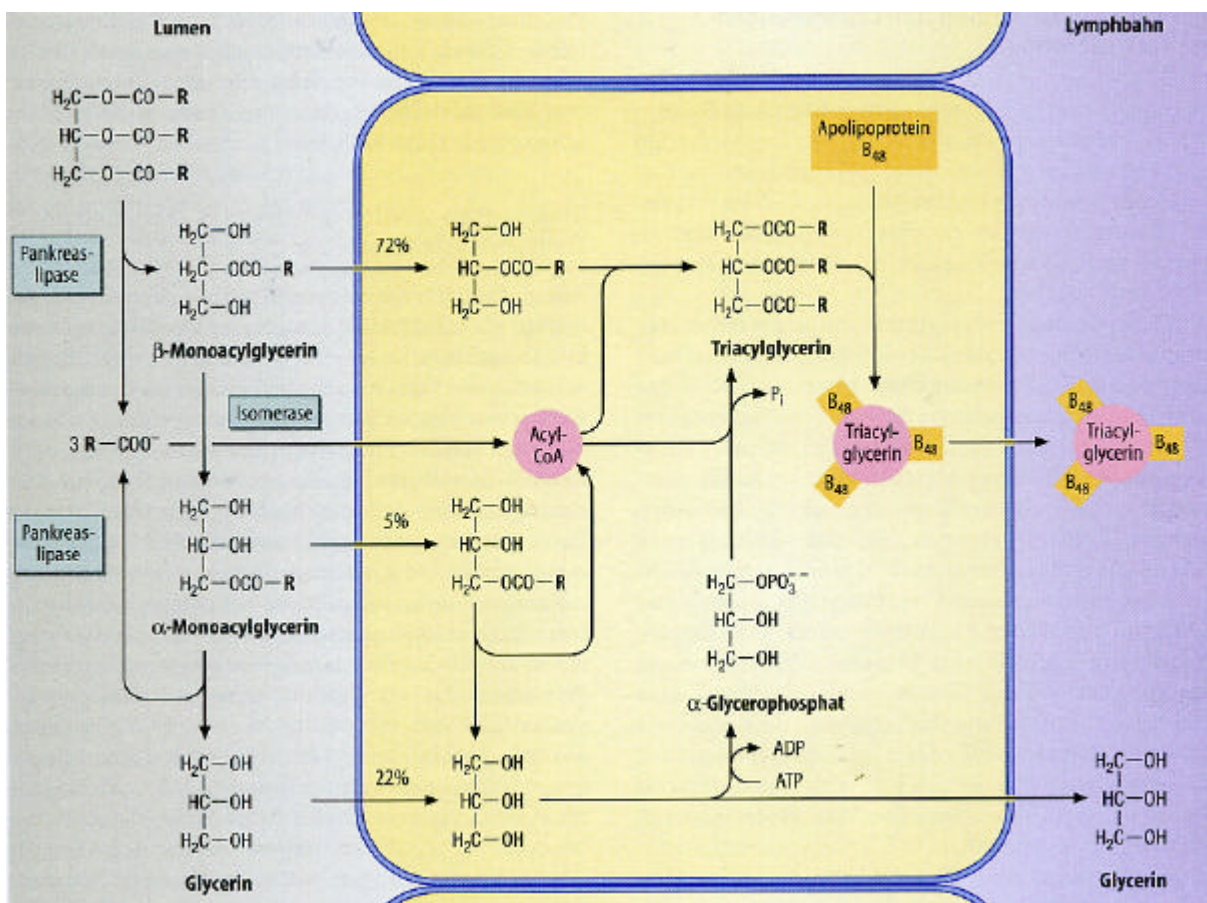


Abb. 2: Intestinale Triglyceridhydrolyse, mukosale Fettsäureabsorption und Lipoproteinfreisetzung [51].

Erst in Gegenwart der Colipase, dem essentiellen Protein-Cofaktor der Lipase mit 96 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 10 kDa, wird der hemmende Effekt der Gallensalze auf die Lipaseaktivität wieder aufgehoben, indem die Colipase die Verankerung der Lipase an der Oberfläche der Gallensäuremizellen ermöglicht. Die Lipase dringt nicht in das Lipidtröpfchen ein, sondern übt als grenzflächenaktives Enzym seine Aktivität in der Öl-Wasser-Emulsion des Chymus an der Oberfläche des Lipidtröpfchens aus. Somit ist die

Größe und die Beschaffenheit der Grenzfläche zwischen wässriger und öliger Phase entscheidend für die Hydrolyserate der intestinalen Lipolyse.

Der optimale pH-Wert für die Pankreaslipase liegt im Bereich zwischen 6,5 – 9,0 und ist somit dem pH-Wert des umgebenen Mediums im Dünndarm von 6,2 – 8,1 angepasst [52].

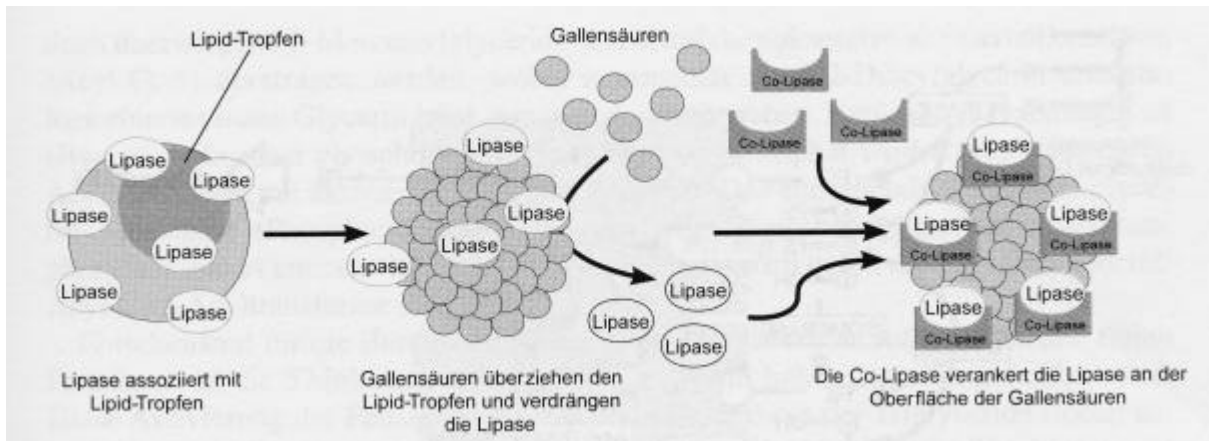


Abb. 3: Die intestinale Triglyceridhydrolyse durch das Lipase/Colipase/Gallensalz-System [53]

Das Molekulargewicht der Pankreaslipase beträgt ~51 kDa. Die Aminosäurestruktur wird in eine N-terminale (1-336) und in eine C-terminale (337-449) Domäne unterteilt. Sowohl die N- als auch die C-terminale Region weisen Lipid-Bindungsdomänen auf [49]. Die Interaktion der Colipase findet an der C-terminalen Domäne der Lipase statt. Diese Interaktion ist in wässriger Lösung eher schwach, wobei das aktive Zentrum vom sogenannten 'Deckel' verschlossen bleibt. Bei Kontakt mit der Lipidoberfläche steigt die Interaktion zwischen Colipase und ihrer Bindungsdomäne in der N-terminalen Region der Lipase stark an. Dabei kommt es zu einer drastischen Änderung der Konformation, wobei durch die Öffnung des 'Deckels' der Zugang für das Substrat zum aktiven Zentrum der Lipase ermöglicht wird (Abb. 4) [54].

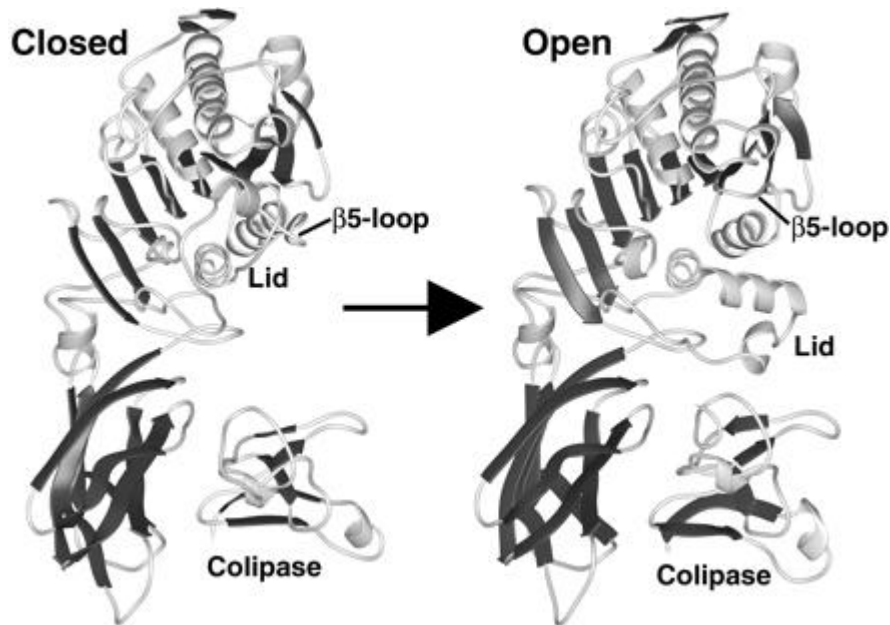


Abb. 4 : Aktivierung der Lipase durch die Colipase an der Öl-Wasser-Grenzfläche [49].

Die dreidimensionale Struktur der Lipase weist ein charakteristisches Faltungsmuster auf, die α/β -Hydrolase Faltung [55]. Diese besteht aus acht antiparallel angeordneten β -Faltblattstrukturen, die durch α -Helices miteinander verbunden sind (Abb. 5).

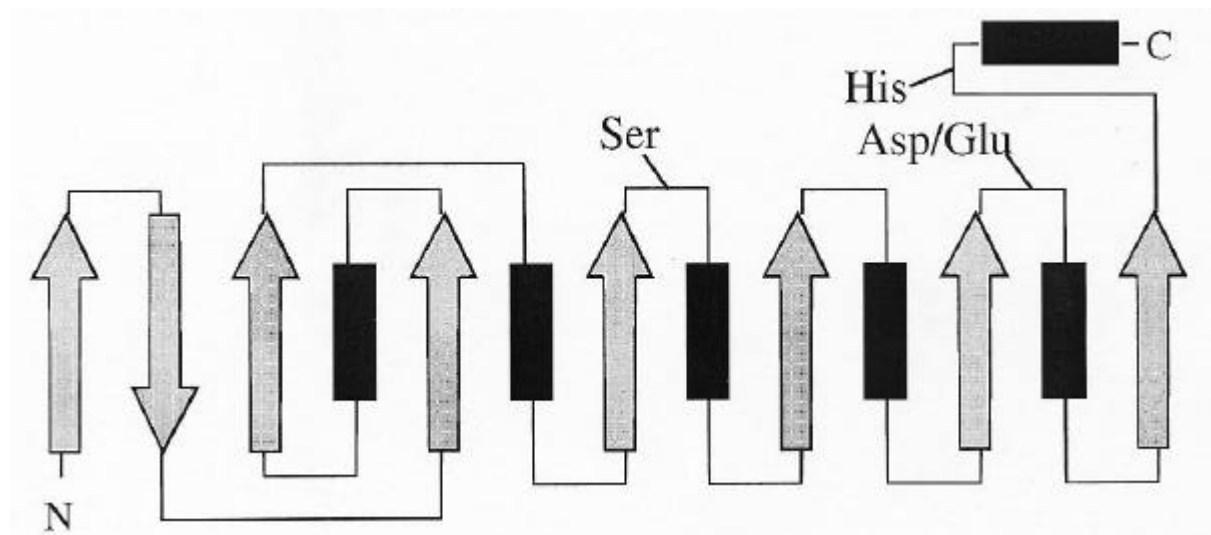


Abb. 5: Die α/β -Hydrolasefaltung von Lipasen [56]. Pfeile: β -Faltblattstrukturen; Balken: α -Helices; N: N-terminales Ende; C: C-terminales Ende; Ser, Asp/Glu (Pankreaslipase: Asp), His: katalytische Triade.

Das katalytische Zentrum der Lipase wird von den drei Aminosäuren Ser¹⁵², Asp¹⁷⁶ und His²⁶³ gebildet (Abb. 5), welche die sogenannte katalytische Triade der Lipase darstellen [57]. Der Reaktionsmechanismus beginnt mit einem nukleophilen Angriff des Serins an das

Substrat, was zur Bildung eines tetraedrischen Zwischenproduktes führt. Nach Abspaltung des Alkohols (z.B. Glycerol) entsteht ein Acyl-Enzym-Komplex, an den ein Wassermolekül bindet. Aus dem so entstandenen tetraedrischen Zwischenprodukt geht dann die Fettsäure hervor [58].

2.5 Lipaseinhibition

Eine Möglichkeit der medikamentösen Behandlung von Übergewicht bzw. zur Unterstützung bei einer geplanten Gewichtsabnahme stellt die Lipaseinhibition dar. Ein inaktiviertes Lipasemolekül ist nicht mehr in der Lage, Nahrungstriglyceride in freie Fettsäuren und Monoacylglyceride aufzuspalten. Nahrungsfette bleiben somit teilweise unverdaut, können nicht mehr zur Fettassimilation herangezogen werden und werden mit dem Stuhl ausgeschieden [59]. Damit wird auch eine Verringerung der pp TG-Konzentration erreicht [13,12]. Eine Lipasehemmung kann grundsätzlich entweder durch Hemmung der Lipase oder der Colipase sowie deren Interaktion an der Öl-Wasser-Grenzfläche erzielt werden.

2.5.1 Lipase-hemmende Substanzen mikrobiologischer Herkunft.

2.5.1.1 Orlistat

Orlistat oder Tetrahydrolipstatin (THL, MG: 496) ist ein chemisch synthetisiertes hydrogeniertes Derivat von Lipstatin, einem natürlichen Stoffwechselprodukt des Bodenbakteriums *Streptomyces toxytricini* [11] (Abb. 6) und wird als Lipase-hemmender Wirkstoff in Form des Medikamentes Xenical® von Roche verschreibungspflichtig vertrieben. THL wirkt als Enzyminhibitor spezifisch auf die Lipase. Andere Verdauungsenzyme wie Amylase, Trypsin, Chymotrypsin und Phospholipase werden nicht gehemmt [60].

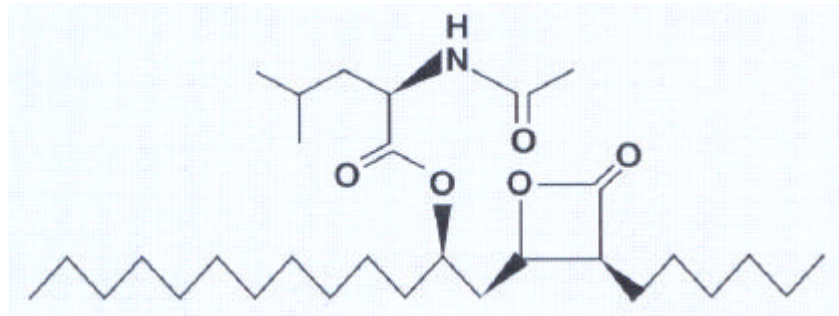


Abb. 6: Strukturformel Tetrahydrolipstatin (Orlistat) [61]

Nach Verabreichung einer fettreichen Mahlzeit zusammen mit Orlistat kommt es zu einer Verzögerung der Fettaufnahme und somit zu dem gewünschten senkenden Effekt auf die pp TG (vgl. 2.2). Aus diesem Grund können Lipase-inhibitorisch wirkende Substanzen sowohl zur Prävention als auch zur Behandlung der Insulinresistenz eingesetzt werden.

Hutton *et al.* [62] fassen die Ergebnisse von 28 kontrollierten klinischen Studien, in denen die Wirkung der Behandlung mit täglich 3×120 mg Orlistat untersucht wurde, zusammen. Unter heterogenen Bedingungen kam es dabei zu klinisch relevantem Gewichtsverlust von 5-10%, signifikanter Reduktion des LDL-Cholesterins, des Gesamtcholesterins sowie der Nüchtern- und der pp Triglyceride. Eine Nebenwirkung der Behandlung mit Orlistat ist das Auftreten von fettigem und öligem Stuhl. Ein Risiko dieses Fettstuhls ist die Malabsorption fettlöslicher Vitamine.

THL übt seine Lipase-hemmende Wirkung stöchiometrisch in einem Verhältnis 1:1 durch eine kovalente Bindung der sekundären Esterbindung des β -Lactonringes an Ser¹⁵² des Lipasemoleküls aus [63]. Nach diesem Modell führt die relative Stabilität der Bindung von THL an den Serinrest des aktiven Zentrums zu einer Verlegung des aktiven Zentrums [64].

2.5.1.2 Weitere Lipase-hemmende Aktivität mikrobiologischen Ursprungs

Slanc *et al.* [65] untersuchten 120 Methanol- und Dichlormethanextrakte von 60 verschiedenen holzschädigenden Pilzarten sowie 50 Methanol/Wasser-Extrakte von Makropilzen, um Mikro- und Makropilze zu identifizieren, die in der Lage sind, Lipase-hemmende Substanzen zu produzieren. Dabei stellten sie bei Extrakten aus *Tylophilus felleus* und *Hygrocybe conica* Lipasehemmungen von über 95% fest.

Ebelactone B, ein natürliches Stoffwechselprodukt aus *Streptomyces aburaviensis*, führte *in vitro* bei einer IC₅₀ von 8 ng/mL und bei pH 8 zu einer Lipasehemmung von mehr als 95%. *In vivo* wurde im Rattenversuch eine signifikante Erniedrigung der pp Serum-TG beobachtet [66].

2.5.2 Lipase-hemmende Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

2.5.2.1 Stand der Wissenschaft

Neben Tetrahydrolipstatin wurden Lipase-hemmende Wirkungen bei zahlreichen Pflanzenextrakten und Verbindungen pflanzlicher Herkunft gefunden, die *in vitro* auf ihre Wirkung auf die Pankreaslipase und z.T. auch *in vivo* im Tierversuch auf die pp TG-Spiegel untersucht wurden (Tab. 2).

Tab. 2: Lipase-hemmende Effekte durch pflanzliche Extrakte und Verbindungen pflanzlicher Herkunft *in vitro* und *in vivo*

Extrakt, bot. Name	Lipase-hemmung des Extraktes <i>in vitro</i>	Effekt des Extraktes <i>in vivo</i>	Isolierte Verbindung	Lipase-hemmung der isol. Verbindung <i>in vitro</i>	Effekt der isol. Verbindung <i>in vivo</i>	Referenz
Grün- und Oolongtee, <i>Thea sinensis</i> ²	+	-	-	-	-	[67]
Grünteextrakt AR25®, 25% Catechine, <i>Thea sinensis</i>	+	-	-	-	-	[68]
Oolongtee, <i>Thea sinensis</i>	+	Gewichtsreduktion bei Mäusen	-	-	-	[69]
<i>Thea sinensis</i>	-	-	Saponine	+	Verzögerte Gewichtszunahme, erniedrigte pp Plasma TG bei Mäusen	[70]
<i>Thea sinensis</i>	-	-	Catechine mit einem Galloylrest	+	Senkung der pp Serum TG bei Ratten	[71]
<i>Cassia mimosoides</i> L. var. <i>Nomame</i> Makino	+	-	Pheophorbid A	+	-	[67,72]
<i>Cassia nomame</i>	-	-	5 Flavandimere, Luteolin, polyphenols	+	-	[73]

² Bei Oolongtee handelt es sich um teilweise oxidierte Teeblätter. Grüntee bezeichnet die nicht-oxidierte und nicht-fermentierte Form von Blättern von *Thea sinensis*.

2 Literaturübersicht

Extrakt, bot. Name	Lipasehemmung des Extraktes <i>in vitro</i>	Effekt des Extraktes <i>in vivo</i>	Isolierte Verbindung	Lipasehemmung der isol. Verbindung <i>in vitro</i>	Effekt der isol. Verbindung <i>in vivo</i>	Referenz
<i>Cassia mimosoides</i> L.	-	-	Metallkomplexe mit Chlorophyllin, Verbindungen mit Porphyrinring	+	-	[72]
CT-II, Fraktion eines wässrigen Auszugs aus <i>Cassia nomame</i> (primär Proanthocyanidine)	-	geringere Gewichtszunahme bei Ratten	-	-	-	[74]
Ballonblume, wässriger Auszug aus <i>Platycodi radix</i>	+	Reduktion der pp Plasma TG bei Ratten	Saponinfraktion, Platycodin D	+	Verzögerter Anstieg von pp Serum TG bei Mäusen	[75,76]
Traubenkernextrakt, ethanolischer Extrakt aus Kernen von <i>Vitis vinifera</i>	+	-	-	-	-	[77]
wässriger Extrakt aus <i>Alpinia officinarum</i>	-	-	5-Hydroxy-7-(4'-Hydroxy-3'-Methoxyphenyl)-1-Phenyl-3-Heptanon	+	Senkung der pp Serum TG bei Mäusen	[78]
Methanolextrakt aus japanischer Yamswurzel, <i>Dioscorea nipponica</i>	+	-	Saponine Dioscin, Diosgenin	+	Erniedrigung der pp Serum TG bei Mäusen	[79]
<i>Caulerpa taxifolia</i>	+	-	Caulerpenyne	+	Verzögerter Einstrom von pp Plasma TG bei Ratten	[80]
<i>Cyclocarya paliurus</i>	+	Verzögerter Einstrom von pp Plasma TG bei Mäusen	-	-	-	[81]

2 Literaturübersicht

Extrakt, bot. Name	Lipase-hemmung des Extraktes <i>in vitro</i>	Effekt des Extraktes <i>in vivo</i>	Isolierte Verbindung	Lipase-hemmung der isol. Verbindung <i>in vitro</i>	Effekt der isol. Verbindung <i>in vivo</i>	Referenz
Salbei, <i>Salvia officinalis</i>	+	-	Carnosäure	+	Senkung von pp Serum TG bei Mäusen	[82]
Heißwasserextrakt aus der Wurzel von <i>Salacia reticulata</i>	+	Tendenz zur Gewichtsreduktion bei weiblichen, übergewichtigen Ratten	(-)-Epigallocatechin	+	-	[83]
-	-	-	Zitruspektin	+	-	[84]
<i>Citrus unshiu</i>	-	-	Hesperidin, Neohesperidin	+	Hesperidin: Erniedrigung der nüchtern Plasma TG bei Ratten	[85]
-	-	-	Phytinsäure, Myo-Inositolphosphat-ester	+	-	[86]
Weizen, <i>Triticum aestivum</i>	-	-	Protein	+	Erniedrigung der Nüchtern TG, gesteigerte Lipidexkretion im Fäzes bei Ratten	[87,88]
Keime aus Weizen, <i>Triticum aestivum</i>	-	-	Proteine, 24,4 und 27,4 kDa	+	-	[89]
Sojabohne, <i>Glycine max</i>	-	-	Proteine, 80 kDa	+	-	[90]
Wässriger Extrakt aus entfetteter Reiskleie	+	Reduktion der pp Plasma TG	-	-	-	[91,92]

Auch bei Substanzen tierischer Herkunft wurden Lipase-hemmende Effekte festgestellt. Protamin ist ein natürlich vorkommendes basisches Protein, welches aus Sperma verschiedener Fischarten gewonnen wird. Im Tierversuch mit Ratten senkte Protamin pp TG-Werte [93]. In einer Humanstudie konnte bei der Gabe von 0,1, 0,5 und 2,5 g Protamin aus Lachs im Vergleich zu einer Kontrollgruppe in einer gemischten flüssigen Mahlzeit kein Effekt auf die pp TG-Werte festgestellt werden [persönliche Mitteilung von

Jürgen Schrezenmeir]. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, dass Lipaseinhibitoren im Vergleich zu festen Mahlzeiten in flüssigen Mahlzeiten weniger stark wirken [94].

Kagawa *et al.* [95] beschreiben ein Hydrolysat vom bovinem Hämoglobin mit Lipase inhibitorischer Eigenschaft. Dieses Hydrolysat besteht hauptsächlich aus Peptiden mit drei oder vier Aminosäuren - die Spanne der Molekulargewichte liegt zwischen 100 und 1500 Dalton - und senkte die pp TG-Werte im Menschen. Als Substanz mit der stärksten Lipasehemmenden Wirkung wurde das Tetrapeptid VVYP identifiziert [95-97]. Tab. 3 gibt eine Übersicht über chemische Substanzen, die in *in vitro*-Studien eine Erniedrigung der Lipaseaktivität bewirkten. Z.T. wurde *in vivo* ein gewichtsreduzierender Effekt nachgewiesen.

Tab. 3: Chemische Verbindungen mit Lipase inhibitorischen Eigenschaften

Substanz	Lipasehemmung <i>in vitro</i>	Wirkung <i>in vivo</i>	Vorgeschlagener Wirkmechanismus	Referenz
Pluronic L-101	+	Vermin- derung des Körper- gewichts bei Ratten	Wirkung der hydrophoben, oberflächenaktiven Substanz auf den Gallensalz-Enzym-Coenzym- Komplex	[98,99]
Triacylglycerol-Analoge	+	-	Keine Angabe	[100]
Alkohole mit verschiedenen Kettenlängen	+	-	Adsorption des Alkohols an das Substrat, daraus resultierende Trennung des Substrates vom Enzym	[101]
Glyceryl Monooleat (Peceol®)	+	-	keine Angabe	[102]

2.5.2.2 Patentlage

Zahlreiche Patente wurden bisher angemeldet für die Eigenschaft verschiedener Pflanzenextrakte, die Pankreaslipase *in vitro* und *in vivo* zu hemmen (Tab. 4).

Tab. 4: Für Lipasehemmung patentierte Pflanzenextrakte und Reinsubstanzen aus Pflanzen

Patentnummer [Referenz]	Pflanzenname/Extrakt
JP2000103741 [103]	Mädesüss (<i>Filipendula ulmaria</i>) Gambir Guava (<i>Psidium guajaba L.</i>)
JP2001299272 [104]	Yacon
JP2001231500 [105]	<i>Myrcia sphaerocarpa</i> <i>Myrcia multiflora</i>

2 Literaturübersicht

Patentnummer [Referenz]	Pflanzenname/Extrakt
JP2001226274 [106]	Guave (<i>Psidium guajava</i> L.) Hundsgift (<i>Apocynum venetum</i> L.) Gurmar (<i>Gymnema sylvestre</i>) Gardenie (<i>Gardenia jasminoides</i> var. <i>grandiflor</i>)
JP2001120237 [107]	Zitronengras (<i>Cymbopogon citratus</i>) Piment (<i>Pimenta officinalis</i>) Zimt (<i>Cinnamomum</i>) Nelke (<i>Caryophylli flos</i>)
JP2001321166 [108]	Hopfen (<i>Humulus lupulus</i>)
JP2002275077 [109]	Yucca Ginsengwurzel (<i>Ginseng radix</i>) Jasmintee Hawthorne (<i>Crataegi fructus</i>) Astragaliwurzeltee Rooibuschtee Sojabohnenkeime (<i>Glycine max</i>) Ingwer (<i>Zingiber officinale roscoe</i>) Tochutea (aus Blättern von <i>Eucommia ulmoides</i> Oliver)
JP2002179586 [110]	<i>Rhodiola sacra</i>
JP2002308796 [111]	Lignin
JP2003026585 [112]	Luzerne (<i>Medicago sativa</i>) Stechpalme (<i>Ilex latifolia</i>) Geissblatt (<i>Lonicera japonica</i>) Pfefferminze (<i>Mentha piperita</i>) Nelke (<i>Caryophylli flos</i>) Efeu (<i>Hedera helix</i>) Olivenbaum (<i>Olea europaea</i>) Venezianisches Hundsgift (<i>Apocynum venetum</i>)
JP2003012536 [113]	Scheinrebe (<i>Ampelopsis cantoniensis</i>) <i>Engelhardtia chrysolepis</i> H.
JP2003342185 [114]	Astilbe (<i>Astilbe thunbergii</i>)
JP2003119150 [115]	Eukalyptus (<i>Eucalyptus globulus</i>)
WO03086436 [116]	Salbei (<i>Salvia officinalis</i>) Rosmarin (<i>Rosmarinus officinalis</i>)
JP2004292368 [117]	Catuaba (<i>Erythroxylum catuaba</i>)
JP2004161644 [118]	Matétee (<i>Ilex paraguariensis</i>)
JP2004168770 [119]	<i>Pipsissewa</i>
WO2005056034 [120]	<i>Ascophyllum nodosum</i>

2 Literaturübersicht

Patentnummer [Referenz]	Pflanzenname/Extrakt
WO2005056031 [121]	<i>Avocado (persea americana)</i> <i>Flacourtia inermis</i> <i>Pouteria campechiana</i> <i>Eugenia jambolana</i> <i>Syzygium jambos</i> <i>Syzygium samarangense</i>
JP2005289951 [122]	Guttaperchabaum (<i>Eucommia ulmoides</i>)
JP1090131 [124]	Weißer Pfingstrose (<i>Paeonia albiflora</i>) <i>Captis japonica</i> Amurcork tree (<i>Phellodendron amurense</i>) Pfingstrose (<i>Paeonia moutan</i>) Storchschnabel (<i>Geranium thunbergii</i>) <i>Sophora angustifolia</i> Arch angle Salbei (<i>Salvia officinalis</i>) Zaubernuss (<i>Hamamelis</i>) Birke (<i>Betula pendula</i>)
<u>Reinsubstanzen:</u>	
JP2003321351 [125]	Dihydrochalkone (Phloretin, Phloridzin)
JP2004137190 [126]	Curcumin (aus Curcuma)
JP3228664 [123]	(-)Epicatechin (-)Epigallocatechin
WO2005077384 [127]	Polyphenolfraktion aus Oolong tea

2.6 Fettresorption

Gallensalze und Phospholipide sind entscheidend beteiligt an der Bildung von vergrößerten, gemischten Mizellen, die die Produkte der Fetthydrolyse, Fettsäuren und Monoacylglycerol, im wässrigen Milieu des Dünndarms lösen. In gemischten Mizellen stellen Gallensäuren und hydrophile Teile der Monoglyceride sowie Fettsäuren den nach außen zur wässrigen Phase gerichteten Teil dar, wohingegen die lipophilen Teile nach innen gerichtet sind. Durch die Mizellenbildung wird der Transport der lipophilen Hydrolyseprodukte durch die wässrige 'unstirred water layer' zum Dünndarmepithel ermöglicht.

Die aus der Hydrolyse von Nahrungsfetten resultierenden Spaltprodukte werden in Form von Mizellen gelöst [128,129,130]. Die Löslichkeit der Lipide wird beeinflusst durch die Konzentration der gelösten Substanz, die Temperatur, den pH-Wert sowie ihre Polarität. Unmittelbar bei Kontakt mit der Bürstensaummembran dissoziieren die Mizellen.

Aufgrund des lipophilen Charakters der Fettsäuren wurde lange ausschließlich von einer freien Diffusion (passive Diffusion) in Enterozyten in Abhängigkeit des Konzentrations-

gefälles ausgegangen [46,131]. Die passive Diffusion und die erleichterte Diffusion werden als passiver Transport bezeichnet. Daneben wird heute die Beteiligung eines aktiven Transportes an der Fettsäureaufnahme diskutiert [45,44,131].

Von drei im Dünndarm exprimierten Proteinen wird angenommen, dass sie an der Fettsäureaufnahme beteiligt sind:

- das FABP (hierzu gehören das intestinale Fettsäure-Bindungsprotein FABP2, das sogenannte hepatische FABP1 sowie das FABP6) [132,133],
- das Fettsäure-Transportprotein (FATP4) [134] sowie
- die Fettsäure-Translocase (FAT/CD36) [135,136].

Im Folgenden wird auf die verschiedenen Transportmechanismen etwas detaillierter eingegangen.

2.6.1 Passive Diffusion

Die freie (passive) Diffusion kann in drei Teilschritte eingeteilt werden:

- die Adsorption,
- die Transmembranbewegung (*flip-flop*) sowie
- die Desorption [137].

Im Verlauf der Adsorption lagern sich die Fettsäuren an die äußere Schicht der Phospholipid-Doppelmembran an [137]. Die Transmembranbewegung wird auch als '*flip-flop*-Mechanismus' bezeichnet. Hierbei klappen nichtionisierte (protonierte) Fettsäuren entlang eines Konzentrationsgradienten von der äußeren zu der inneren Schicht der Phospholipid-Doppelmembran. Der *flip-flop*-Mechanismus kann mit hoher Geschwindigkeit ablaufen. Daher besteht die Annahme, dass der Fettsäurebedarf der Zelle allein durch diesen gedeckt werden könnte [137,138,139]. Er gewinnt bei einem höheren molaren Verhältnis von Fettsäuren zu Albumin an Bedeutung, wenn beispielsweise die Konzentration an ungebundenen Fettsäuren extrazellulär ansteigt [44,45]. Während der Desorption werden die Fettsäuren ins Innere der Zelle abgegeben [137].

2.6.2 Erleichterte Diffusion

Kleinfeld *et al.* [140-142] zweifeln die Theorie einer alleinigen Versorgung der Zellen mit Fettsäuren für deren Metabolismus durch passive Transportwege an.

Die erleichterte Diffusion beschreibt einen passiven Transport, der durch Trägermoleküle, sogenannte 'Carrier-Proteine' in der Membran, vermittelt wird. Dabei wird das zu transportierende Molekül durch diese Carrier-Proteine auf der einen Membranseite

gebunden, mittels dieser durch die Membran geleitet und auf der anderen Membranseite wieder freigesetzt. Die Transportrate hängt von der Zahl der Transporter sowie der Substratkonzentration ab und wird durch die Maximalgeschwindigkeit und einen Halbsättigungswert K_M charakterisiert. Die diese Transportform katalysierenden Carrier-Proteine verhalten sich wie Enzyme und zeigen eine Sättigungskinetik sowie eine Spezifität für strukturell ähnliche Stoffe, die sich auch gegenseitig kompetitiv hemmen können. Die erleichterte Diffusion unterscheidet sich vom aktiven Transport dadurch, dass sie nur in Abhängigkeit des Konzentrationsgefälles eines elektrochemischen Gradienten (Konzentrations- oder Ladungsgradient) transportiert und somit nicht energetisiert ist.

2.6.3 Aktiver Transport

Unter aktivem Transport versteht man immer den Transport gegen ein Konzentrationsgefälle, so dass für den aktiven Transport Energie aufgebracht werden muss.

FABP, FATP und FAT/CD36 wurden von verschiedenen Forschergruppen als mögliche Transportproteine für Fettsäuren bei Säugetieren identifiziert [44]. Ein Anstieg der zellulären Fettsäureaufnahme geht einher mit einer gesteigerten Expression dieser drei Transportproteine [44]. Am intrazellulären Fettsäuretransport von LCFAs durch das wässrige Cytosol sind ebenfalls verschiedene cytosolische Fettsäure-Bindungsproteine (FABP_C) beteiligt [143].

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass die Fettsäureaufnahme in verschiedenen Geweben auf zwei Komponenten gleichzeitig beruht, einem passiven und einem proteinvermittelten Transport (erleichterte Diffusion und/oder aktiver Transport), die in unterschiedlichem Ausmaß, abhängig vom Fettsäure-Albumin-Verhältnis und Zelltyp, an der Fettsäureaufnahme beteiligt sind [44,48,139].

An verschiedenen Geweben konnte eine Plateaubildung der Transportrate in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gezeigt werden [144,145] sowie die Hemmbarkeit der Fettsäureaufnahme durch proteinmodifizierende Substanzen [146,147], die kompetitive Hemmbarkeit der Aufnahme von langkettigen Fettsäuren [146,145] und die Hemmung der Fettsäureaufnahme durch eine vorangehende Denaturierung oder Proteasebehandlung der Zellen [131].

1979 wurde erstmals auf eine mögliche Beteiligung eines erleichterten Transport von LCFA in Enterozyten hingewiesen [148]. An isolierten Rattenadipozyten zeigten Abumrad *et al.* [144,146] die Inhibition des Fettsäuretransportes in Adipozyten durch proteinmodifizierende Substanzen und Phloretin. 1988 berichteten Stremmel *et al.* [149] von einem Transport-

protein in Enterozyten, welches durch den Einsatz spezifischer Antikörper nachweislich in die Fettsäureaufnahme involviert ist. Murota und Storch [150] gehen davon aus, dass bei niedrigen Konzentrationen an ungebundenen Lipiden die Fettsäure- und Monoacylglycerid-Aufnahme auf einen proteinvermittelten Prozess zurückgeführt werden kann, da die initiale Aufnahme von Ölsäure und 2-Monoacylglycerol in Caco-2 Zellen eine sättigbare Funktion ihrer monomeren Konzentration zeigen.

2.6.4 FABP

Ockner und Manning [143] beschreiben erstmals das intrazelluläre Fettsäurebindungsprotein FABP als cytoplasmatisches Protein, das langkettige Fettsäuren bindet [151].

Die wasserlöslichen gewebespezifischen Fettsäure-Bindungsproteine umfassen eine Gruppe sich ähnelnder Proteine, die sowohl im Dünndarm als auch in verschiedenen anderen fettsäuremetabolisierenden Geweben vorkommen, wie beispielsweise der Leber, dem Herzen und dem Fettgewebe (Tab. 5) [143]. Den FABPs wurden verschiedene Aufgaben zugeschrieben, die sich in drei hauptsächliche Aufgabengebiete unterteilen lassen:

- die Regulation von spezifischen Enzymen des Lipidmetabolismus [151],
- die Aufrechterhaltung des Fettsäuregehaltes von zellulären Membranen [151],
- die Regulation von fettsäureresponsiven Genen [151],
- Schutz der Zellen vor toxischen freien Fettsäuren [152] sowie
- Transport der freien Fettsäuren durch das Cytosol zu den Bestimmungspunkten [151].

Durch die Bindung von Fettsäuren an FABP wird zwischen intra- und extrazellulären Kompartimenten ein Gradient aufrechterhalten. Demzufolge wird angenommen, dass die Fettsäureaufnahme durch FABP stimuliert werden kann [131].

Bei dem FABP handelt es sich um ein 40-kDa Protein, die membrangebundene Form der Aspartat-Amino-Transferase. Die Fettsäureaufnahme bei verschiedenen Zelltypen konnte durch die Gabe eines Antikörpers gegen das Fettsäure-Bindungsprotein gehemmt werden [44,151]. Dies lässt vermuten, dass FABPs für die proteinvermittelte Aufnahme in die Zelle verantwortlich sind [44,151].

In den absorptiven Dünndarmzellen von Ratten konnte bisher die Expression von zwei FABPs, die beide gleichmäßig im Cytoplasma sowie in der Bürstensaummembran der proximalen Dünndarm-Enterozyten verteilt sind, nachgewiesen werden: FABP1 und FABP2 [143,153].

Tab. 5: Die FABP-Familie und ihre Expression in verschiedenen Geweben (modifiziert nach Storch und Thumser, 2000) [151]

FABP	Vorkommen in Geweben
FABP1 (L-FABP)	Leber, Dünndarm
FABP2 (I-FABP)	Dünndarm
FABP3 (H-FABP)	Herz, Gehirn
FABP4 (A-FABP)	Adipozyten
FABP5 (E-FABP)	Epidermis
FABP6 (IL-FABP)	Ileum
FABP7 (B-FABP)	Gehirn, zentr.Nervensystem
FABP8 (M-FABP)	peripheres Nervensystem
FABP9 (T-FABP)	Hoden

2.6.5 FATP

Lange wurde bei der Fettsäureaufnahme in die Dünndarm-Enterozyten von einer passiven Diffusion ausgegangen, bis Schaffer und Lodish 1994 einen neuen Fettsäure-Transporter beschrieben, das 63-kDa Fettsäure-Transportprotein (FATP) [134]. Bei den FATPs handelt es sich um eine große Familie von membranständigen Proteinen, deren Expression in zahlreichen Organen, z.B. Fettgewebe, Leber, Herzen und Nieren, nachgewiesen wurde und die in den Fettsäuremetabolismus dieser Organe involviert sind [154,155]. Abumrad [44] beschreibt die gewebeabhängige Regulation von FATP. Verschiedene Studien belegten eine Modulation der Expression des FATP durch PPAR γ - und PPAR α -Liganden im Dünndarm bei Mäusen [17,156].

Beim Menschen wurden sechs Vertreter der FATP-Familie identifiziert (Tab. 6) [154,156]. Als einziges FATP-Homolog in der apikalen Seite der Dünndarmenterozyten wurde das FATP4 nachgewiesen. Am stärksten wird das FATP4 in der Bürstensaummembran der Enterozyten des Jejunum und des Ileum exprimiert. Das Duodenum hingegen weist geringere Mengen auf. FATP4 konnte in keinem anderen Zelltyp des Dünndarms nachgewiesen werden [155,156]. Ho und Storch [129] wiesen erstmals die Expression von FATP4 in Caco-2 Zellen nach. Martin *et al.* [157] konnten erstmals das Fettsäure-Transportprotein FATP1 in Caco-2 Zellen nachweisen, wo es durch Retinoide coreguliert wird.

Tab. 6: Die FATP-Familie und ihre Expression in verschiedenen Geweben (modifiziert nach Stahl, 2004) [156]

FATP-Typ	Vorkommen im Gewebe
FATP1	Fettgewebe, Herz, Skelettmuskel, Gehirn
FATP2	Niere, Leber
FATP3	Lunge
FATP4	Dünndarm, Gehirn, Fettgewebe, Muskel
FATP5	Leber
FATP6	Herz

FATP4 weist eine klar definierte Substratspezifität auf. So spielt die Kettenlänge der Fettsäuren für den Fettsäuretransport eine entscheidende Rolle [155]. Fettsäuren mit einer Kettenlänge unter 10 C-Atomen wurden nicht transportiert. Gesättigte und ungesättigte LCFAs mit Kettenlängen von 10 bis 26 C-Atomen wurden hingegen effizient von FATP4 transportiert, wobei Palmitin- und Ölsäure bevorzugt wurden [155].

Der genaue Mechanismus der Aufnahme von LCFAs durch FATP4 konnte noch nicht geklärt werden. Es ist lediglich gesichert, dass FATPs integrale Membranproteine sind, die sich auf der Plasmamembran von Geweben befinden, die in den Fettsäuremetabolismus involviert sind. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Aufnahme von LCFAs direkt mit der Höhe der FATP-Expression korreliert [156]. Coe *et al.* [158] identifizierten das FATP1 Genprodukt als eine langkettige Acyl-CoA Synthetase und gehen davon aus, dass die Aufnahme von LCFAs an eine Esterifikation gekoppelt ist [158,159].

2.6.6 FAT/CD36

CD36 wurde 1993 von Harmon *et al.* [136] als Fettsäuretransportprotein identifiziert und seitdem als solches gut charakterisiert. CD36 ist auf die Fettsäure-Translokase (FAT) zurückzuführen [44,156] und ist ein membranständiges 88kDa Protein, welches auch als FAT/CD36 bezeichnet wird. FAT wurde in Ratten-Adipozyten nachgewiesen, wohingegen CD36 das im Menschen vorkommende Homolog darstellt [44]. FAT/CD36 ist Mitglied der Familie der Scavenger-Rezeptor B-Proteine, die die Eigenschaft besitzen, anionische Phospholipide, oxidierte LDL und apoptotische Zellen zu binden [44]. Die Expression von FAT/CD36 konnte vor allem in Geweben mit einer hohen metabolischen Kapazität für LCFAs beobachtet werden wie beispielsweise im Fett- und Muskelgewebe sowie im Dünndarm. Im Dünndarm wurde FAT/CD36 mRNA hauptsächlich in Zellen der Bürstensaummembran des Jejunum nachgewiesen, gefolgt vom Duodenum. Im Ileum wurden die geringsten Gehalte gemessen. Ein ähnliches Verteilungsmuster lässt sich bei Vertretern der FABP-Familie nachweisen [160]. Die Verabreichung von LCFAs führte zu einem Anstieg der FAT/CD36

mRNA im gesamten Dünndarm. Deshalb wird vermutet, dass dieser Fettsäure-Transporter an der Aufnahme von niedrig konzentrierten LCFAs in die Enterozyten beteiligt sind [44,160]. Die Gabe von Bezafibraten, einer Gruppe von hypolipidämischen Medikamenten, modulierte die Expression von FAT/CD36. Da der gleiche Effekt auch bei FABP beobachtet wurde, wird angenommen, dass FAT/CD36 und FABP in den Enterozyten coexprimiert werden [160] oder diese beiden Membran- und cytosolischen Proteine während der LCFA-Aufnahme Funktionen ausüben, die miteinander verknüpft sind bzw. sich gegenseitig ergänzen [44,160]. Bisher konnte jedoch die Beteiligung von FAT/CD36 an der LCFA-Aufnahme in die Dünndarmenterozyten noch nicht nachgewiesen werden [161].

2.6.7 Postprandialer Triglyceridstoffwechsel in der Mukosazelle

Die intestinal absorbierten Fettsäuren und Monoacylglycerine werden in der Mukosazelle zu Triglyceriden resynthetisiert bevor sie zu Chylomikronen aufgebaut und zunächst an das Lymphsystem abgegeben werden. Als Ausgangssubstanz bei der Reveresterung zu Triglyceriden dienen vorwiegend 2-Monoacylglyceride, wobei bei der Übertragung von Fettsäuren zwischenzeitlich 1,2-Diacylglycerid entsteht. Resorbiertes freies Glycerin wird zunächst ATP-abhängig zu Glycero-3-phosphat phosphoryliert, welches sukzessive durch Acyltransferasen mit Acyl-CoA reagiert. Die Phosphatidphosphatase überführt das resultierende 1,2-Diacyl-glycerol-3-phosphat zu 1,2-Diacylglycerin, welches durch die 1,2-Diacylglycerid:Acyl-CoA Acyltransferase zu Triglycerid umgesetzt wird.

Bei der Inkorporierung der Triglyceride in Chylomikronen spielen das Apolipoprotein ApoB-48 und das mikrosomale Triglycerid-Transferprotein (MTP) eine entscheidende Rolle.

Apo-B 48 ist 240 kDa schwer und wird am rauhen Endoplasmatischen Reticulum (ER) der Intestinalzellen gebildet.

Bei dem MTP handelt es sich um ein heterodimeres Protein, welches aus einer 97-kDa Untereinheit mit der gesamten Lipid-Transferaktivität und einer 58-kDa multifunktionaler Disulfid-Isomerase besteht [162]. Lokalisiert ist das MTP in Enterozyten im Lumen des ER [163]. Die genaue Rolle des MTP beim Aufbau von apoB-haltigen Lipoproteinen wird noch untersucht. Nach derzeitiger Vorstellung soll es den Transport von Lipiden von der Membran des ER zur wachsenden Polypeptidkette im Lumen des ER vermitteln und eine korrekte Translokation und Faltung von ApoB gewährleisten [164]. Neben der zentralen Rolle im Verlauf der Chylomikronsynthese und -sekretion im Darm sowie der VLDL-Synthese und -sekretion in der Leber beschleunigt das MTP den Transport von Triglyceriden, Cholesterinestern und Phospholipiden zwischen Membranen [162].

2.7 Inhibition der Fettresorption

Die spezifische Inhibition eines oder mehrerer Glieder der Kaskade des pp TG-Stoffwechsels in der Mukosazelle wird seit mehr als einem Jahrzehnt als vielversprechendes pharmakologisches Angriffsziel zur Senkung von pp TG-Werten angesehen [59]. Besonders der Hemmung des MTPs als entscheidender Schritt der Lipoproteinsynthese und -sekretion wird vermehrt Aufmerksamkeit gewidmet. Die initiale Idee einer lipidsenkenden Therapie durch eine MTP-Inhibition beruht auf der Entdeckung, dass bei Personen mit einer Abetalipoproteinämie ein genetischer Defekt des MTPs vorliegt [165,166]. Daraus folgernd stellt auch die Hemmung des intestinalen Fettsäuretransportes in die Mukosazellen eine Möglichkeit dar, erhöhte pp TG-Spiegel zu senken [59].

2.8 PPARs und ihre Liganden – Modulatoren des Fettsäurestoffwechsels

Bei Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) handelt es sich um ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren, die zur Steroid-Thyroid-Hormonrezeptorfamilie gehören. PPARs spielen eine Schlüsselrolle bei verschiedenen zellulären Prozessen wie dem Lipidmetabolismus, der Adipogenese, der Glucosehomöostase, der Zellproliferation und der Zelldifferenzierung, indem sie die Expression von Schlüsselenzymen und Transportproteinen modulieren. Darüber hinaus ist ihr Einfluss auf die Expression von Proteinen, die an inflammatorischen Prozessen und der Immunabwehr beteiligt sind, beschrieben worden [15,167].

2.8.1 Aufbau

Wie alle Kernrezeptoren bestehen auch PPARs strukturell aus verschiedenen funktionellen Domänen (Abb. 7). An der NH₂-terminierten Region liegt die ligandenunabhängige Aktivierungsdomäne (AF-1), gefolgt von der DNA-Bindungsdomäne (DBD) mit zwei Zink-Fingern. Zur COOH-terminierten Region hin liegt zunächst die Liganden-Bindungs- und -Dimerisierungsdomäne (LBD-Dim.), bestehend aus 13 α -Helices und einem kleinen vierkardeligen β -Faltblatt. Abschließend folgt die ligandenabhängige Aktivierungsdomäne (AF-2). Diese Domäne ist an der Bildung der Rezeptor-Coaktivator-Bindungstasche beteiligt [167,168]. Die DBD und LBD sind die am höchsten konservierten Regionen der Rezeptorisoforamen. Die Liganden-Bindungstasche (Ligand Binding Pocket, LBP) der PPARs ist die größte im Vergleich mit anderen Kernrezeptoren, was den PPARs ermöglicht, mit einer großen Auswahl strukturell unterschiedlichen, natürlichen sowie synthetischen Liganden zu agieren [167].

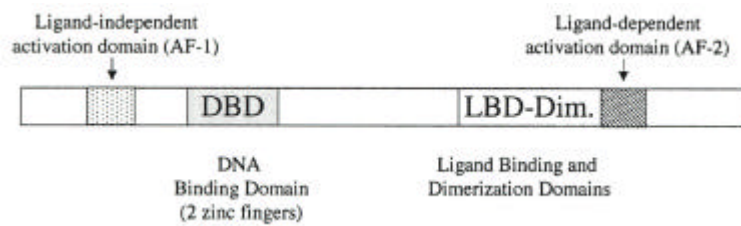


Abb. 7: Struktureller Aufbau der PPAR [168], DBD: DNA-Bindungsdomäne, LBD: Ligandenbindungs- und Dimerisierungsdomäne, AF1: Ligandenunabhängige Aktivierungsdomäne, AF2: ligandenabhängige Aktivierungsdomäne

2.8.2 Wirkungsmechanismus

Ihre Wirkung vermitteln PPARs im Zellkern. Sie regulieren die Expression ihrer Zielgene durch die Bindung an spezifische Peroxisome Proliferator Response Elements (PPREs) in der Enhancer-Region des Promoters (Abb. 8) [167,16]. Um an diese spezifischen PPRE binden zu können, müssen sie jedoch zunächst ein Heterodimer mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) bilden [167].

RXR kommt in drei verschiedenen Isomeren vor, RXR α , RXR γ und RXR δ und gehört, wie auch die PPARs, zu den Transkriptionsfaktoren. Sie alle werden durch den endogenen Agonisten 9-cis Retinoidsäure aktiviert [167]. Das PPAR/RXR-Heterodimer kann schon durch die Ligandenbindung an einen der beiden Rezeptoren aktiviert werden. Durch die simultane Bindung von Liganden an beide Rezeptoren gleichzeitig kann es zu einem additiven Effekt der Aktivierung kommen [167,169].

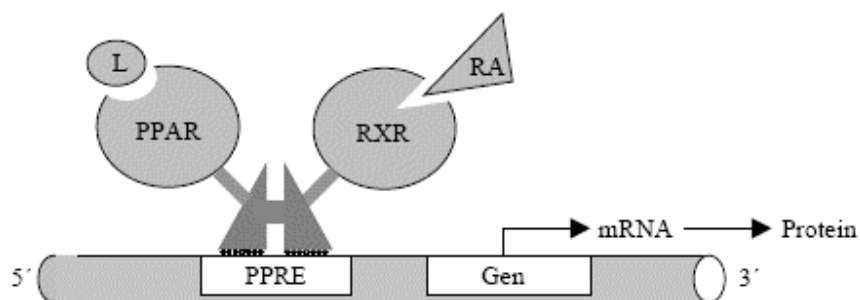


Abb. 8: Modulation der Genexpression durch das RXR/PPAR-Heterodimer, L: PPAR-Ligand, RA: Retinsäure [139]

Das PPAR/RXR-Heterodimer reagiert im Promotor der PPAR-Zielgenen mit den dort befindlichen PPAR-Response Elements (PPREs). Es handelt sich hierbei um eine Basensequenz des DR-1-elements (Direct Repeat) auf dem DNA-Strang, bestehend aus zwei Hexanukleotiden AGGTCA mit einer beliebigen Base (n) Abstand [167,170].

Um eine PPAR-vermittelte Ligandenwirkung zu entfalten, muss zunächst ein Ligand an das PPAR-Molekül binden, wodurch es zu einer Konformationsveränderung in der AF-1 Domäne der LBD kommt [15]. Diese Konformationsveränderung führt zu einer Rekrutierung von Coaktivator-Proteinen, die ganz unterschiedliche chemische Strukturen aufweisen können [171]. Das Bindungsschema dieser verschiedenen PPAR-Agonisten an die LBP ist trotz ihrer strukturellen Vielfalt immer gleich. Die funktionellen Säuregruppen der Agonisten bilden Wasserstoffbrücken in der LBP. Die Wasserstoffbrückenbindungen stabilisieren die Bindung zwischen der C-terminalen AF-2 Helix und dem konservierten Lysinrest auf der Rezeptoroberfläche [171]. Die PPAR-Antagonisten binden an das gleiche Epitop in der LBP wie die Agonisten. Die Antagonisten weisen ein größeres Volumen auf, wodurch sie vermutlich eine Repositionierung der AF-2 Helix und ein Ablösen der Coaktivatoren bewirken [171]. Antagonisten-gebundene Rezeptoren können ebenfalls Corepressor-Proteine binden [171]. Liganden aktivierte PPARs bilden nun Heterodimere mit anderen spezifischen Transkriptionsfaktoren, beispielsweise den RXRs, da sie als Monomer nicht an die DNA binden können. In Form dieses Heterodimers kann der PPAR/RXR-Komplex nun an das PPPE der DNA binden, wodurch es zu einer strukturellen Veränderung des Chromatins kommt und darauf folgend zu einer Veränderung der Transkriptionsrate bestimmter Zielgene [15]. Es gibt verschiedene Cofaktor-Proteine, sogenannte 'Coaktivatoren und Corepressoren', die über die Bindung an PPAR diese so beeinflussen können, dass sie den Transkriptionsprozess auslösen [167,15]. Die Coaktivatoren docken an der sog. *Hinge-Region* an [172]. Sie reagieren mit den ligandengebundenen Nuklearrezeptoren über ein konserviertes LXXLL-Motiv, was zu einer Veränderung ihrer Konfiguration und damit zu einer Transkriptionsaktivierung oder -hemmung führt [167,15,173]. Dadurch kann ein Coaktivator, beispielsweise das cAMP response element-binding protein (CBP), den Transkriptionsprozess steigern. Dies geschieht über eine Acetylierung der Histone, wodurch es zu einer für die Transkription zugänglicheren DNA-Form kommt [174].

2.8.3 PPAR-Typen

Drei Isoformen von PPARs sind bekannt, PPAR α , PPAR γ und PPAR δ , die jeweils von verschiedenen Genen codiert werden. Vom PPAR γ -Gen existieren wiederum drei RNA-Isoformen, γ 1, γ 2 und γ 3, die durch unterschiedliche Promotornutzung und Splicing hervorgebracht werden (15). PPAR γ 2 weist im Vergleich zu γ 1 und γ 3 am N-terminalen Ende 28 Aminosäuren mehr auf [172].

Die verschiedenen PPAR-Isoformen werden gewebespezifisch exprimiert. Das humane PPAR α -Gen liegt auf dem Chromosom 22 und wird hauptsächlich in Geweben mit einer

hohen β -Oxidationsrate exprimiert, wie beispielsweise der Leber, dem Herzen, der Niere und dem Skelett-Muskel. PPAR α ist aber auch in den Enterozyten sowie verschiedenen immunologischen Zellen wie den Monocyten, Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen sowie in atherosklerotischen Plaques zu finden [167,15,175]. Das PPAR γ -Gen liegt auf dem Chromosom 3 und wird hauptsächlich im Fettgewebe und in Zellen des Immunsystems exprimiert, wobei jedoch die drei Isoformen unterschieden werden müssen. PPAR γ 1 wird in vielen Geweben wie beispielsweise dem Herzen, der Lunge, dem Darm und der Niere exprimiert, während PPAR γ 2 im Fettgewebe und Makrophagen und PPAR γ 3 vornehmlich in Makrophagen und Darmepithelzellen vorkommen [15,169,176]. Das Gen für PPAR δ liegt auf dem Chromosom 6 und wird ubiquitär exprimiert mit besonders hohem Vorkommen im Gehirn, Fettgewebe und in der Haut. In letzter Zeit wird PPAR δ vermehrt in Zusammenhang mit Dickdarmkrebs, dem zentralen Nervensystem sowie der weiblichen Fertilität in Verbindung gebracht [167,169].

2.8.4 PPAR γ -Agonisten und -Antagonisten

PPARs sind Rezeptoren für natürliche (z.B. LCFAs und Prostaglandine) und synthetische Liganden (z.B. Thiazolidinedione - TZDs) [168,177]. Die Ligandenbindung findet im Inneren der Zelle statt, so dass die Liganden dieser Nuklearrezeptoren die Zellmembran passieren müssen [174].

Aufgrund der wichtigen Rolle der PPARs im Lipid-Metabolismus wurde die Suche nach natürlichen Liganden unter den Fettsäuren und Eicosanoiden begonnen, die dann auch tatsächlich als PPAR-Liganden identifiziert wurden [167]. Fettsäuren und PUFAs können schon in mikromolaren Konzentrationen durch Bindung an eine der drei PPAR γ -Isoformen eine Aktivierung dieser herbeiführen [167]. PUFAs, wie die Linol- und Linolensäure sowie deren Metabolite, die Eicosapentaensäure und das Prostaglandin 15-Deoxy-delta-12,14-Prostaglandin J2 (15d-PG J2) werden zu den natürlichen Liganden gezählt und binden mit einer besonders hohen Affinität [170,15].

Eine der wichtigsten Gruppen der synthetischen PPAR γ -Liganden sind die TZDs, die eine neue Wirkstoffklasse oraler Antidiabetika darstellen. Das zu dieser Gruppe gehörende Troglitazone wurde 1982 vom japanischen Pharmakonzern Sankyo entwickelt und 1997 als Rezulin[®] - dem ersten oralen Insulinsensitizer zur Behandlung von nicht insulinabhängigem Diabetes (NIDD) - auf den amerikanischen Markt gebracht, gefolgt von Pioglitazone und Rosiglitazone. Diese drei TZDs bewährten sich nicht nur als Blutglucose-senkende Mittel, sondern ebenfalls durch ihre günstigen Effekte auf die Reduktion von kardiovaskulären Risiken [178]. Jedoch traten bei Patienten nach Behandlung mit Troglitazone toxische

Leberschäden auf, so dass Troglitazone am 21. März 2000 wieder vom Markt genommen wurde [178]. Seitdem werden Pioglitazone und Rosiglitazone in Kombination mit Metformin oder Sulfonylharnstoff-Derivaten angewendet [179].

Durch die Aktivierung des nuklearen Transkriptionsfaktors PPAR γ modulieren TZDs die Expression vieler Proteine, die den Lipid- und Kohlenhydrat-Metabolismus regulieren [179]. TZDs besitzen eine sehr hohe Bindungsaffinität zu PPAR γ [180]. Die unterschiedliche Bindungsaffinität kann über die verschiedenen Kettensubstituenten erklärt werden, da das heterozyklische Grundgerüst aller TZDs aus Thiazolidin-2,4-dione besteht [177]. PPAR γ -vermittelt nehmen die TZDs Einfluß auf die Glucosehomöostase und die periphere Insulinresistenz, indem sie die Insulinsensitivität an Skelettmuskel- und Fettgewebszellen verbessern, die hepatische Glucoseausschüttung hemmen und die Zellfunktion der β -Zellen im Pankreas verbessern [15,177,179]. Aufgrund der hohen Expression von PPAR γ in den Adipozyten wird angenommen, dass die Wirkung der TZDs hauptsächlich Adipozyten-vermittelt erfolgt [181]. So kann beispielsweise die Wirkung der TZDs auf die Muskulatur über die Aktivierung von PPAR γ im Fettgewebe erfolgen [179].

Die Verteilung von omentalen zu subkutanen Körperfettdepots wird durch die Behandlung von Patienten mit TZDs moduliert, was nach Sewter und Vidal-Puig [172] zu einer gesteigerten Insulinsensitivität führen kann.

Die Verabreichung von Troglitazone führte über die Aktivierung von PPAR γ in Verbindung mit einer verbesserten Insulinsensitivität zu einer Stimulierung der Adipogenese und löste die Apoptose von reifen, Lipid-gefüllten Adipozyten aus. Die kleineren, neuen Präadipozyten waren insulinsensitiver [15]. Die erhöhte Präadipozytenbildung könnte ein zusätzlicher Grund für die Eliminierung zirkulierender freier Fettsäuren (FFA) sein, was der Wirkung der erhöhten FFA-Spiegel auf die Insulinsensitivität der Muskelzellen entgegenwirken könnte [172]. Des Weiteren könnten TZDs die Lipolyserate hemmen und die Fettsäureaufnahme in die Adipozyten erhöhen, was eine Senkung der Konzentration der FFA im Plasma zur Folge haben könnte [15,177].

PPAR γ bevorzugt mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise Linol- und Linolensäure, Arachidonsäure und Eicosapentaensäure als natürliche Liganden [167].

GW9662 (Abb. 11) wurde in Versuchen an humanen Zelllinien als selektiv wirksamer synthetischer PPAR γ - und PPAR δ -Antagonist identifiziert [182,183]. In der vorliegenden Arbeit wurden zusätzlich die PPAR γ -Agonisten Troglitazone (Abb. 9) und GW1929 (Abb. 10) [15] eingesetzt.

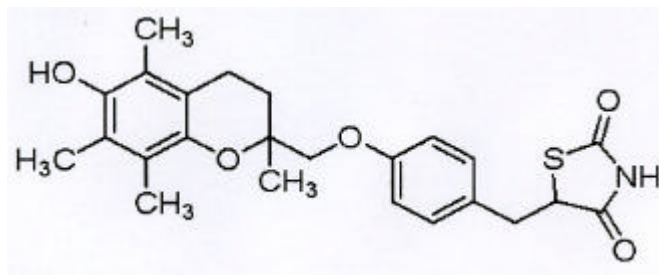


Abb. 9: Strukturformel von Troglitazone

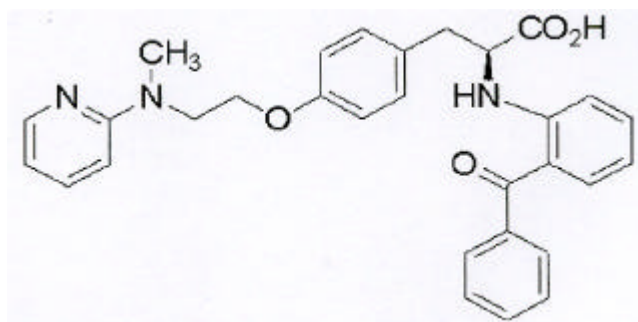


Abb. 10: Strukturformel von GW1929

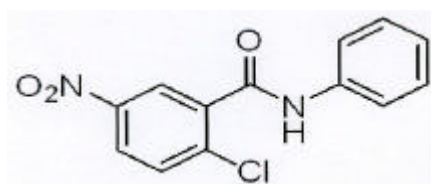


Abb. 11: Strukturformel von GW9662

2.8.5 PPAR α -Agonisten und -Antagonisten

PPAR α wird vor allem in der Leber, dem Herzen, den Muskeln sowie in den Enterozyten exprimiert [168] und nimmt eine zentrale Stellung bei der Regulation der zellulären Aufnahme, Aktivierung und β -Oxidation von Fettsäuren ein. So induziert PPAR α die Expression der beiden Proteine FATP und FAT im Darm, die am Fettsäuretransport durch die Zellmembran beteiligt sind [167,17]. Ein aktivierter PPAR α führt zu einer erhöhten Transkription der Acyl-CoA-Synthase für langkettige Fettsäuren [167]. PPAR α fördert darüber hinaus die Ketonkörper-Synthese und damit das Einsparen von Glucose [168]. PPAR α dient als Rezeptor für eine Klasse von strukturell sehr unterschiedlichen Komponenten [167]. Zu seinen natürlichen Liganden zählen gesättigte und ungesättigte Fettsäuren sowie von Fettsäuren abgeleitete Komponenten, wie beispielsweise die von der Arachidonsäure über den Lipoxigenase-Weg abgeleiteten Eicosanoide, zu denen die 8-(S)-

Hydroxyeicosatetraensäure gehört, die an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist [175,168]. Zu den synthetischen Liganden von PPAR α gehören Komponenten der Familie der Fibrate, wie beispielsweise Clofibrate, Fenofibrate sowie Bezafibrate und ihre Derivate. Fibrate sind hypolipidämische Medikamente, die zur Behandlung von Dyslipidämie eingesetzt werden [168]. Bei dem PPAR α -Liganden GW7647 (Abb. 12) handelt es sich um einen Agonisten, der eine höhere Subtyp-spezifische Affinität aufweist [175].

GW7647 ist ein wirksamer PPAR α -Agonist, der nach Verabreichung bei Dyslipidämie im Tiermodell eine lipidsenkende Wirkung zeigte. Muoio *et al.* [184] untersuchte GW7647 auf seinen Effekt auf den Ölsäure-Metabolismus in humanen Skelettmuskelzellen in den Konzentrationen 0,01, 0,1 und 1 $\mu\text{mol/L}$ über einen Zeitraum von 48 h. Dabei wurde eine starke dosisabhängige Steigerung der β -Oxidation von Ölsäure sowie eine Hemmung der Veresterung von Ölsäure zu Triacylglyceriden beobachtet [184].

GW7647 stellt bei der Untersuchung von PPAR α in humanen Zelllinien vermutlich einen wirksamen chemischen Liganden dar [185,183]. Außerdem erwies sich MK886 als wirksamer und selektiver PPAR α -Antagonist (Abb. 13) [186].

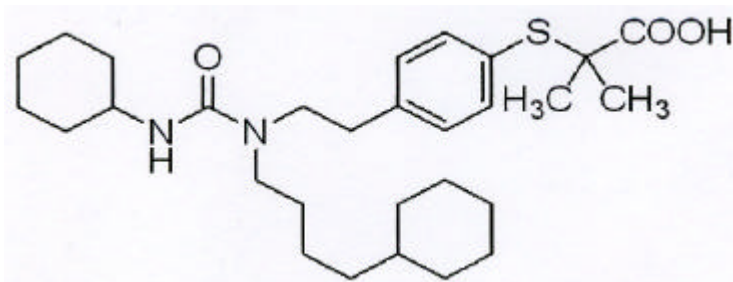


Abb. 12: Strukturformel GW7647

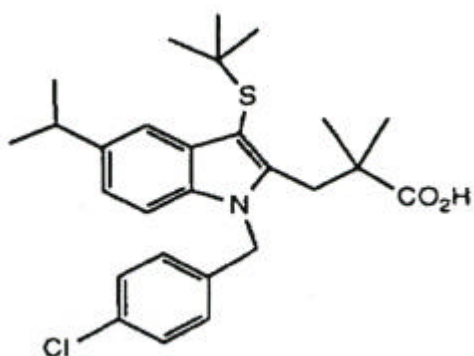


Abb. 13: Strukturformel MK886 [187]

2.9 Caco-2 Zellen

Caco-2 Zellen wurden 1974 aus einem Kolonkarzinom eines 72-jährigen Patienten isoliert [20] und stellen seit dem ein weit verbreitetes Zellkulturmodell für Untersuchungen zu intestinalen Transport- und Stoffwechselprozessen dar [19,18]. Sie ist die am besten charakterisierte humane Darm-Zelllinie hinsichtlich des Lipid-Metabolismus und besitzt viele Funktionen, die mit der Lipid-Absorption, dem Lipid-Transport sowie dem Lipid-Metabolismus zusammenhängen. Die Caco-2 Zellen sind in Kultur adhärent und entwickeln nach Erreichen der Konfluenz spontan Eigenschaften, die denen von Dünndarmzellen in struktureller und funktioneller Hinsicht entsprechen [188,189,19].

1988 untersuchten Chantret *et al.* (188) 20 verschiedene Zelllinien hinsichtlich charakteristischer Eigenschaften des Dünndarmepithels, wobei lediglich die Caco-2 Zelle diese Eigenschaften zeigten. Die Differenzierung dieser Zelllinie ist durch die folgenden Merkmale charakterisiert:

- Ausbildung von *tight junctions*, die für den Stoffaustausch zwischen den Zellen verantwortlich sind und nach Abschluss des Zellwachstums zur Bildung der kuppelförmigen *domes*, eine Art Halbzyst, führen. Die Bildung dieser '*domes*' beruht auf der Akkumulation sekretorischer Produkte zwischen der basolateralen Molekularschicht und dem Boden der Kulturschale [190,188,191,192,189,193,19].
- Das Vorhandensein einer apikalen Bürstensaummembran [188,19]
- Das Vorhandensein von bürstensaummembrangebundenen Hydrolasen, wie beispielsweise der Saccharase-Isomaltase, Aminopeptidase N und der alkalischen Phosphatase (lokalisiert an der apikalen Membranschicht der Enterozyten) [188].

Ähnlich den intestinalen Epithelzellen können die Caco-2 Zellen sowohl von der apikalen als auch von der basolateralen Membranseite Fettsäuren absorbieren und metabolisieren (194,195). Intrazellulär erfolgt die Reveresterung der Fettsäuren zu Triglyceriden oder zu Phospholipiden (47,196), die Synthese und Sekretion von Lipoproteinen [197,198,199,200] sowie die Synthese von Cholesterinestern [201].

Die Aufnahme der Fettsäuren und der Monoacylglyceride in die Caco-2 Zellen geschieht einerseits über passive Diffusion [129,145] und andererseits über einen proteinvermittelten Transportprozess [129,18]. Die Aufnahme der Fettsäuren in die Caco-2 Zellen unterliegt einer Sättigungskinetik, ist temperaturabhängig und lässt sich kompetitiv und durch proteinmodifizierende Substanzen hemmen [129,145]. Ho und Storch [129] konnten zeigen, dass die Aufnahme langkettiger freier Fettsäuren und Monoacylglyceride in Caco-2 Zellen aufgrund ihrer gegenseitigen kompetitiven Hemmung möglicherweise über dieselben Membrantransporter erfolgt.

Im Dünndarmepithel kommen die beiden FABP-Isoformen FABP1 und FABP2 vor [202,129,47,195]. Die Expression von Fettsäure-Bindungsproteinen in Caco-2 Zellen wird kontrovers diskutiert. Levin *et al.* [47] konnten in Caco-2 Zellen lediglich die Expression des FABP1 nachweisen. Darimont *et al.* [202] führten den Beweis für die Expression des FABP1 in Caco-2 Zellen und weisen auf eine Abhängigkeit der Expression des FABP2 von verschiedenen Kultivierungsbedingungen der Caco-2 Zellen hin. Demnach wurde in undifferenzierten Caco-2 Zellen keine FABP2-mRNA nachgewiesen, wohingegen deren Expression am 10. Tag Postkonfluenz nachgewiesen werden konnte und bis zum 24. Tag Postkonfluenz langsam anstieg [202]. Ebenso konnte FABP2-mRNA in Caco-2 Zellen nachgewiesen werden, bei deren Wachstum Kollagen zugegeben wurde. Hier war eine geringe Expression des Proteins bereits am 3. Tag Postkonfluenz nachweisbar und stieg dann langsam an. Wurde Kollagen während der Differenzierung zugegeben, wiesen die Caco-2 Zellen nur sehr geringe Gehalte an FABP2-mRNA auf [202]. Kollagen wird in Zellkulturen verwendet, um die Adhäsion der Zellen zu erleichtern. Vermutlich unterbindet Kollagen die Selektion derjenigen Subpopulationen von Zellen, die einen geringeren Gehalt an FABP2 aufweisen [202].

Zahlreiche Studien beschrieben eine fehlende FABP2-Expression in den Caco-2 Zellen [47,195,153,203]. Daraus lässt sich schließen, dass FABP2 für Caco-2 Zellen nicht essentiell ist, um Nahrungs- oder Serum-Lipide (langkettige Fettsäuren) zu absorbieren und zu metabolisieren und dass humorale Faktoren (z.B. Hormone) oder expressionssteuernde Faktoren in der Zellkultur fehlen.

Transportproteine werden in Caco-2 Zellen darüber hinaus in Abhängigkeit von der Passagerate unterschiedlich stark exprimiert [204].

In zahlreichen Studien wurde die Eignung der Caco-2 Zellen für Untersuchungen zu Fettsäuretransport- und Stoffwechselprozessen in Enterozyten überprüft. Levin *et al.* [47] postulieren, dass die Caco-2 Zelllinie ein geeignetes Modell für die Untersuchung sowohl der Polarität von Fettsäuretransport und -metabolismus in Dünndarmzellen, als auch für die Rolle der intrazellulären Fettsäure-Bindungsproteine in diesen Prozessen darstellt [47].

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

3.1 Material und Methoden

Bei der Auswahl des Untersuchungsmaterials stand im Vordergrund, möglichst viele Proben *in vitro* auf ihre Lipase-hemmende Wirkung zu untersuchen. Sekundär wurde gezielt nach Extrakten aus lipidreichen Pflanzen und Pflanzenteilen gesucht, da dort als möglicher Schutz- bzw. Abwehrmechanismus der Pflanze vor Abbau von Fettspeichern durch endogene Lipasen oder Fraßschädlinge am ehesten Lipase-hemmende Substanzen zu vermuten sind. Aus diesem Grund waren diejenigen Extraktvarianten von großem Interesse, in deren Herstellungsprozessen vermehrt lipophile Substanzen aus dem pflanzlichen Ausgangsmaterial herausgelöst werden, vor allem CO₂-Extrakte, Oleoresine/Öle und ethanolische Extrakte.

Insgesamt wurden 560 Proben untersucht. 292 Extrakte und Proteinisolate wurden in gebrauchsfertiger Form von Firmen³ bezogen. Zusätzlich wurden aus 69 Ausgangsmaterialien vier verschiedene Extraktvarianten hergestellt (n = 268).

3.1.1 Kommerzielle Proben

Bei den käuflichen Proben handelte es sich um Oleoresine/Öle, Ätherische Öle, CO₂-Extrakte, alkoholische und wässrige Extrakte, Proteine und Peptide pflanzlicher und tierischer Herkunft sowie Reinsubstanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft (Tab. 7 - Tab. 13).

CO₂-Extrakt:

Nach Zerkleinerung der Pflanzenteile werden diese bei hohem Druck von 7,3 – 35 MPa und 35 - 40°C mit überkritischem CO₂ besprüht. Durch die dabei auftretende beachtliche Erhöhung der Dichte und der Dielektrizitätskonstanten (kennzeichnet die Löseeigenschaft) läßt sich das Lösungsvermögen steigern. Nach Trennung des Lösungsmittels von dem Rückstand wird der Druck gesenkt und das CO₂ verdampft [205].

Oleoresin:

Oleoresine sind mittels organischer Lösungsmittelextraktion gewonnene Extrakte aus Samen, Wurzeln, Blättern oder Früchten, die färbende oder geschmackgebende Wirkung haben. 'Oleo' verweist auf den in fast allen Oleoresinen enthaltenen Anteil an Öl und

³ Industriell gefertigte Testsubstanzen werden im Folgenden mit 'kommerziell' oder 'käuflich' bezeichnet

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

ätherischem Öl, 'Resin' bezieht sich auf die ebenfalls extrahierten Harze, Wachse und sekundären Wirkstoffe [206].

Ätherisches Öl:

Ätherische Öle sind sehr heterogene Stoffgemische flüssiger, leicht flüchtiger lipophiler Pflanzeninhaltsstoffe mit charakteristischem Geruch und aromatischem, bitterem oder scharfem Geschmack. Ätherische Öle lassen sich vollständig verdampfen und hinterlassen dabei auf Papier keinen charakteristischen 'Fettfleck' [207].

Lipase-inhibitorische Wirkung von kommerziell erhältlichen Proben wurde *in vitro* von 140 Extraktionen mit alkoholischen Lösungsmitteln (Tab. 7), 54 CO₂-Extrakten (Tab. 8), 31 wässrigen Extrakten (Tab. 9), 30 Reinsubstanzen (Tab. 10), 19 Proteinen/Peptiden pflanzlicher und tierischer Herkunft (Tab. 11), 15 Oleoresinen/Ölen (Tab. 12) und 3 ätherischen Ölen (Tab. 13) bestimmt. Bei kommerziell erhältlichen alkoholischen Extraktionen wurden Alkoholkonzentrationen von 15-100% eingesetzt.

Tab. 7: Untersuchte Extraktionen mit alkoholischen Lösungsmitteln

Botanischer Name	Bezeichnung	% Ethanol (v/v) / Lsg.mittel während der Extraktion	Verwendete(s) Ethanollösung (% v/v) / Lsg.mittel im Test	Hersteller
	Propolis, natürliche Mischung aus Bienenharz und Baumknospen	86	90	Herbamed
	Propolis, natürliche Mischung aus Bienenharz und Baumknospen, gesammelt von Bienen in Deutschland	unbekanntes Extraktionsmittel	100	A Natura
	Pyrethrum, Gemisch aus verschiedenen Chrysanthemenarten	64	70	Herbamed
	Boonekamp	-	44	Boonekamp
	Jägermeister	-	44	Jägermeister
	Kümmerling	-	44	Kümmerling
	Underberg	-	44	Underberg
	Wolfsberry	Alkohol und Wasser in unbekanntem Konzentrationen, Trockenextrakt wasserlöslich	Wasser	Phytoline

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	% Ethanol (v/v) / Lsg.mittel während der Extraktion	Verwendete(s) Ethanollösung (% v/v) / Lsg.mittel im Test	Hersteller
	Yaona	unbekanntes Extraktionsmittel	30	Elexier
<i>Aconitum napellus L.</i>	Eisenhut, Echter	43	50	Herbamed
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Roskastanie	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Roskastanie	Methanol- + Ethanolextrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis
<i>Agni casti fructus</i>	Keuschlammfrüchte, Mönchspfeffer	60	60	Extraktchemie
<i>Allium sativum L.</i>	Knoblauch	100	100	Frutarom
<i>Aloe barbardensis</i>	Aloe-Vera, 10-fach Konzentrat	unbekanntes Extraktionsmittel	100	A Natura
<i>Althaeae radix</i>	Eibisch, Echter	25	30	Frutarom
<i>Anethum graveolens</i>	Dill	62	60	Herbamed
<i>Angelica officinalis</i>	Angelikawurzel	100	100	Phytoline
<i>Anisum</i>	Anis	62	60	Herbamed
<i>Armoracia</i>	Meerrettich	62	60	Herbamed
<i>Arnica montana</i>	Arnika	89	90	Herbamed
<i>Artemisia vulgaris L.</i>	Beifuss, Gemeiner	62	70	Herbamed
<i>Asparagi radix</i>	Spargel	30	30	Frutarom
<i>Avena sativa</i>	Hafer	unbekannt	100	Dragoco
<i>Bellis perennis</i>	Gänseblümchen	50	50	Herbamed
<i>Betula Pedula</i>	Birke	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Bryonia dioica</i>	Zaunrübe, Rote	43	50	Herbamed
<i>Calendula officinalis</i>	Ringelblume	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Camellia sinensis</i>	Grüntee	Methanol- + Ethanolextrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis
<i>Camellia sinensis</i>	Grüntee, Charge 1	80	80	Frutarom
<i>Camellia sinensis</i>	Grüntee, Charge 2	80	80	Frutarom
<i>Capsella Bursa-Pastois</i>	Hirtentäschel	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Capsicum frutescens</i>	Chili	100	100	Frutarom
<i>Cardamomum</i>	Kardamom	89	90	Herbamed
<i>Caryophylli flos</i>	Gewürznelke	100	100	Chemische Fabrik Dr. Hetterich

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	% Ethanol (v/v) / Lsg.mittel während der Extraktion	Verwendete(s) Ethanollösung (% v/v) / Lsg.mittel im Test	Hersteller
<i>Castanea vesca</i>	Kastanie	67	70	Herbamed
<i>Centaurea cyanus</i>	Kornblume	62	70	Herbamed
<i>Centaurea cyanus</i>	Kornblume	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Chamomillae recutica L.</i>	Kamille	50	50	Frutarom
<i>Chelidonii herba</i>	Schöllkraut	60	60	Extraktchemie
<i>Cichorium intybus</i>	Zichorie	65	70	Herbamed
<i>Cimicifuga racemosa</i>	Traubensilberkerze	Methanol- + Ethanol-extrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis
<i>Cimicifugae radix</i>	Traubensilberkerze, Wurzel	60	60	Extraktchemie
<i>Cinnamomum</i>	Zimt	69	70	Herbamed
<i>Citrus aurantium dulcis</i>	Orangenschalen	Ethanol-Wasser- Gemisch, wasserlöslicher Extrakt	1% Gummi Arabicum-Lsg.	Plantextrakt
<i>Cotinus coggygria scop</i>	Perückenstrauch	Alkohol und Wasser in unbekannten Konzentrationen	50	Phytoline
<i>Crataegus laevigata</i>	Weißdorn	45	50	Frutarom
<i>Crataegus laevigata</i>	Weißdorn	Methanol- + Ethanol-extrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis
<i>Crataegus laevigata</i>	Weißdornblätter mit Blüten	70% Methanol	70	Finzelberg
<i>Cucumis sativus</i>	Gurke	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Dioscorea villosa L.</i>	Wilde Yams	62	70	Herbamed
<i>Dulcamara</i>	Nachtschatten, Bittersüßer	30	30	Extraktchemie
<i>Echinaceae purpureae</i>	Sonnenhutkraut, Purpur	45	50	Extraktchemie
<i>Eleutherococcus</i>	Taigawurzel	30	30	Frutarom
<i>Eleutherococcus</i>	Taigawurzel	45	50	Extraktchemie
<i>Equisetum arvense</i>	Schachtelhalm	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Eucalyptus globulus</i>	Eukalyptus	100	100	Chemische Fabrik Dr. Hetterich
<i>Euphorbia cyparissias L.</i>	Zypressen- wolfsmilch	62	70	Herbamed

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	% Ethanol (v/v) / Lsg.mittel während der Extraktion	Verwendete(s) Ethanollösung (% v/v) / Lsg.mittel im Test	Hersteller
<i>Flor de piedra</i>	Steinblüte	69	70	Herbamed
<i>Fumaria officinalis L.</i>	Erdrauch	43	50	Herbamed
<i>Galega officinalis</i>	Geissraute	62	70	Herbamed
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgo	Alkohol und Wasser in unbekannten Konzentrationen	50	Phytoline
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgo	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Ginseng radix</i>	Ginseng	60	60	Finzelberg
<i>Ginseng radix</i>	Ginseng	50	50	Frutarom
<i>Ginseng radix</i>	Ginseng	80	80	Frutarom
<i>Guajacum</i>	Guajak	85	90	Herbamed
<i>Hamamelis virginiana</i>	Zaubernuss	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Harpagophyti procumbens radix</i>	Teufelskralle	60	60	Extraktchemie
<i>Hedera helix L.</i>	Efeu	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Hedera helix L.</i>	Efeu	40	50	Frutarom
<i>Humulus lupulus</i>	Hopfen	40	40	Finzelberg
<i>Hyperici herba</i>	Johanniskraut	80% Methanol	80	Finzelberg
<i>Hyperici herba</i>	Johanniskraut	Methanol- + Ethanol-extrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis
<i>Ilex paraguariensis, Charge 1</i>	Matétee	15	20	Frutarom
<i>Ilex paraguariensis, Charge 2</i>	Matétee	15	20	Frutarom
<i>Juglans</i>	Walnuss	62	60	Herbamed
<i>Piper methysticum</i>	Kava-Kava	95	95	Finzelberg
<i>Lavendula</i>	Lavendel	64	60	Herbamed
<i>Lawsonia inermis</i>	Henna rot	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Leonurus cardiaca</i>	Mutterkraut, Chinesisches	40	50	Frutarom
<i>Leonuri herba</i>	Mutterkraut, Chinesisches	40	40	Extraktchemie
<i>Magnolia officinalis</i>	Magnolie	Alkohol und Wasser in unbekannten Konzentrationen	50	Phytoline
<i>Majorana</i>	Majoran	64	65	Herbamed

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	% Ethanol (v/v) / Lsg.mittel während der Extraktion	Verwendete(s) Ethanollösung (% v/v) / Lsg.mittel im Test	Hersteller
<i>Malve silvestris</i>	Malve	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Matricaria chamomilla</i>	Kamille	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Melissa officinalis</i>	Zitronenmelisse	Methanol- + Ethanolextrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis
<i>Mentha piperita</i>	Pfefferminz	Methanol- + Ethanolextrakt, % unbekannt	100	Cognis
<i>Mentha piperita</i>	Pfefferminz	100	100	Chemische Fabrik Dr. Hetterich
<i>Momordica balsamica</i>	Balsamapfel	50	50	Herbamed
<i>Nasturtium officinale</i>	Brunnenkresse	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Olea europaea</i> , 20% standardisierter Trockenextrakt	Olivenbaum	Methanol- + Ethanolextrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis
<i>Olea europaea</i> , 12% standardisierter Trockenextrakt	Olivenbaum	Methanol- + Ethanolextrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis
<i>Olea europaea</i> , Charge 1	Olivenbaumblätter	80	80	Frutarom
<i>Olea europaea</i> , Charge 2	Olivenbaumblätter	80	80	Frutarom
<i>Olea europaea</i> , Charge 3	Olivenbaumblätter	80	80	Frutarom
<i>Orthosiphonis folium</i>	Orthosiphonblätter	60	60	Extraktchemie
<i>Panax ginseng</i>	Ginseng, Sibirischer	Methanol- + Ethanolextrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer ⁴	Cognis
<i>Papaver rhoeas</i>	Klatschmohn	51	50	Herbamed
<i>Passiflora incarnata</i>	Passionsblume	Methanol- + Ethanolextrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis
<i>Passiflora incarnata</i>	Passionsblume	60	75	Frutarom
<i>Paullinia cupana</i>	Guarana	Ethanol-Wasser-Gemisch, wasserlöslicher Extrakt	1% Gummi Arabicum-Lsg.	Plantextrakt

⁴ 50 mmol/L BICIN-Puffer + 1% Gummi Arabicum, pH 8,0

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	% Ethanol (v/v) / Lsg.mittel während der Extraktion	Verwendete(s) Ethanollösung (% v/v) / Lsg.mittel im Test	Hersteller
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Gartenbohne	62	70	Herbamed
<i>Pinus silvestris</i>	Kiefer	65	65	Herbamed
<i>Potentilla anserina</i>	Gänsefingerkraut	63	65	Herbamed
<i>Primula veris</i>	Schlüsselblume	64	70	Herbamed
<i>Primula veris</i>	Schlüsselblume	40	50	Frutarom
<i>Prunus africanus</i>		67	65	Herbamed
<i>Rhododendron ferrugineum</i>	Rhododendron	89	90	Herbamed
<i>Ruscus aculeatus</i>	Mäusedorn- wurzelstock	60	60	Extraktchemie
<i>Ruta</i>	Weinraute	64	65	Herbamed
<i>Sabalisa serrulatae</i>	Sägepalme Früchte	60	60	Extraktchemie
<i>Sanguinaria</i>	Blutwurz	66	65	Herbamed
<i>Sarothamnus scoparius</i>	Besenginster	63	60	Herbamed
<i>Schisandrae fructus</i>	Spaltkölbchen, Chinesisches	20	20	Frutarom
<i>Sennae fructus</i>	Senna	70	70	Finzelberg
<i>Sepia gruneris</i>		90	90	Herbamed
<i>Serpyllum</i>	Quendel	63	65	Herbamed
Silybinrest, Rückstand nach Silibinherstellung	Mariendistel	unbekannt	100	Panjin Green Biological Development
Silymarin	Mariendistel, Silymarin-Konzentrat 50,6-56,0%	unbekannt	1. 100 2. 60	Extraktchemie
<i>Smilax officinalis</i>	Sarsaparilla	67	70	Herbamed
<i>Solanum melangenum</i>	Aubergine	62	60	Herbamed
<i>Solidaginis herba</i>	Goldrutenkraut, Echtes	30	30	Extraktchemie
<i>Solidaginis herba</i>	Goldrutenkraut	60	60	Finzelberg
<i>Symphytum</i>	Beinwell	43	45	Herbamed
<i>Syzygium cumini Skeels</i>	Jambulbaum	62	70	Herbamed
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	Lapachotee	62	70	Herbamed
<i>Tabernanthe iboga</i>	lboga	unbekanntes Extraktionsmittel	30	Elexier
<i>Tanacetum vulgare</i>	Rainfarn	64	65	Herbamed
<i>Taraxacum officinale</i>	Löwenzahn, übererdiger Teil	Methanol- + Ethanol-extrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	% Ethanol (v/v) / Lsg.mittel während der Extraktion	Verwendete(s) Ethanollösung (% v/v) / Lsg.mittel im Test	Hersteller
<i>Taraxacum officinale</i>	Löwenzahn, Wurzel	Methanol- + Ethanolextrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis
<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	Gamander, Echter	62	70	Herbamed
<i>Thymus vulgaris</i>	Thymian	66	65	Herbamed
<i>Tormentillae rhiz.</i>	Tormentil-wurzelstock	60	60	Extraktchemie
<i>Trifolium pratense</i>	Rotklee, 8% standardisierter Trockenextrakt	Methanol- + Ethanolextrakt, % unbekannt	100	Cognis
<i>Urticae radix</i>	Brennnesselkraut	70	70	Finzelberg
<i>Uvae ursi</i>	Bärentraubenblätter	unbekanntes Extraktionsmittel	60	Extraktchemie
<i>Valerianae radix</i>	Baldrianwurzel	70	70	Finzelberg
<i>Viola tricolor</i>	Stiefmütterchen	unbekannt	Propylenglykol	A Natura
<i>Vitis vinifera</i>	Traubenkernextrakt	Methanol- + Ethanolextrakt, % unbekannt, Extrakt wasserlöslich	BICIN-Puffer	Cognis
<i>Voacanga africana</i>	Voakanga	unbekanntes Extraktionsmittel	30	Elexier

Tab. 8: Untersuchte CO₂-Extrakte

Botanischer Name	Bezeichnung	Lieferant
	Galbanum	Flavex
<i>Acorus calamus</i>	Kalmuswurzel	Flavex
<i>Actinidia chinensis</i>	Kiwisamen	Flavex
<i>Allium sativum</i>	Knoblauch	Flavex
<i>Anethum graveolens</i>	Dillsamen	Flavex
<i>Anethum sowa</i>	Dillsamen	Flavex
<i>Azadirachta indica</i>	Niemsamen	Flavex
<i>Borago officinalis</i>	Borretschsamen	Flavex
<i>Boswellia serrata</i>	Weihrauch	Flavex
<i>Calendula officinalis</i>	Ringelblumen	Flavex
<i>Capsicum annum</i>	Paprika	Flavex
<i>Capsicum frutescens</i>	Chili, 5% Capsaicinoide	Flavex
<i>Capsicum frutescens</i>	Chili, 10% Capsaicinoide	Flavex

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	Lieferant
<i>Carum carvi</i>	Kümmel	Flavex
<i>Chamomilla recutita</i>	Kamillenblüten -se ⁵	Flavex
<i>Chamomilla recutita</i>	Kamillenblüten -to ⁶	Flavex
<i>Chamomilla recutita</i>	Kamillenblüten -to (ökol.*)	Flavex
<i>Cinnamomum ceylanicum</i>	Zimtrinde	Flavex
<i>commiphora abyssinica</i>	Myrrhe	Flavex
<i>Coriandrum sativum</i>	Koriander	Flavex
<i>Cryptocaria massoia</i>	Massoiarinden	Flavex
<i>Daucus carota</i>	Karottensamen	Flavex
<i>Elettaria cardamomum</i>	Kardamom -to	Flavex
<i>Elettaria cardamomum</i>	Kardamom -se	Flavex
<i>Elettaria cardamomum</i>	Kardamom -se (ökol.)	Flavex
<i>Hibiscus abelmoschus</i>	Moschussamen	Flavex
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Sanddornfruchtfleisch	Flavex
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Sanddornsamen	Flavex
<i>Humulus lupulus</i>	Hopfen	Flavex
<i>Humulus lupulus</i>	Hopfen	Nateco2
<i>Illicium verum</i>	Sternanis	Flavex
<i>Iris pallida</i>	Iriswurzel, 1% Irone	Flavex
<i>Iris pallida</i>	Iriswurzel, 3% Irone	Flavex
<i>Juniperes communis</i>	Wacholderbeeren -se	Flavex
<i>Melissa officinalis</i>	Melissenblätter	Flavex
<i>Mentha piperita</i>	Pfefferminzblätter	Flavex
<i>Myristica fragrans</i>	Muskatblüte	Flavex
<i>Myristica fragrans</i>	Muskatnuss	Flavex
<i>Oenothera biennis</i>	Nachtkerzensamen	Flavex
<i>Origanum majoranum</i>	Majoranblätter	Flavex
<i>Origanum vulgare</i>	Origanoblätter, Phenoltyp	Flavex
<i>Origanum vulgare</i>	Origanoblätter, Terpinoltyp	Flavex
<i>Petroselinum crispum</i>	Petersilie	Flavex
<i>Piper methysticum</i>	Kava-Kavawurzel	Flavex
<i>Piper nigrum</i>	Pfeffer	Flavex
<i>Rosa canina</i>	Hagebutte	Flavex
<i>Rosa canina</i>	Hagebuttensamen	Flavex
<i>Salvia officinalis</i>	Salbei	Flavex

⁵ Selektive CO₂-Extraktion: führt überwiegend zur Extraktion leicht flüchtigen Verbindungen

⁶ Totale CO₂-Extraktion: führt neben flüchtigen auch zur Extraktion von schwer flüchtigen Verbindungen

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	Lieferant
<i>Salvia triloba</i>	Salbei	Flavex
<i>Tanacetum parthenium</i>	Mutterkraut	Flavex
<i>Thymus vulgaris</i>	Thymian -se	Flavex
<i>Thymus vulgaris</i>	Thymian -to	Flavex
<i>Usnea barbata</i>	Bartflechten	Flavex
<i>Vanilla planifolia</i>	Vanille	Flavex

* aus ökologischem Landbau

Tab. 9: Untersuchte wässrige Fertigextrakte

Botanischer Name	Bezeichnung	Bemerkung	Lieferant
	Tee Extr. getrocknet, 285133		Plantextrakt
	Tee Extr. getrocknet, 290177		Plantextrakt
<i>Agnus castus</i>	Mönchspfeffer	unbekanntes Lösungsmittel, Extrakt wasserlöslich	Cognis
<i>Apium graveolens</i>	Sellerie		Frutarom
<i>Avena sativa</i>	Hafer		Frutarom
<i>Avena sativa</i>	Hafer	Extraktionsmittel unbekannt	Dragoco
<i>Camellia sinensis</i>	Grüntee		Plantextrakt
<i>Carvum carvi</i>	Kümmel		Frutarom
<i>Cinnamomum</i>	Zimt Extr. Getr.		Plantextrakt
<i>Citrus aurantium</i>	Orangenblütenwasser		A Natura
<i>Cynarae folium</i>	Artischocke, Blätter		Finzelberg
<i>Cynara scolymus</i>	Artischocke, Lipei®		Steiner Arzneimittel
<i>Domianae folium</i>	-		Frutarom
<i>Echinaceae purpureae herba</i>	Sonnenhutkraut, Purpur	Saftgewinnung durch mechanische Pressung	Frutarom
<i>Garcinia cambogia</i>	Garcinia		Plantextrakt
<i>Gentianae luteae radix</i>	Enzian		Frutarom
<i>Hapagophyti radix</i>	Teufelskrallenwurz		Finzelberg
<i>Hydrocotyli asiat. herba</i>	Gotu Kola		Frutarom
<i>Ilex paraguariensis</i> , geröstet, Extrakt getrocknet	Maté		Plantextrakt
<i>Ilex paraguariensis</i> , grün, Extrakt getrocknet	Maté		Plantextrakt
<i>Medicaginis herba</i>	-		Frutarom
<i>Melissae folium</i>	Melisse		Frutarom

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	Bemerkung	Lieferant
<i>Paullinia cupana</i>	Guarana		Billmann
<i>Rosa damascena</i>	Rosenwasser		A Natura
<i>Rubi idaei folium</i>	Himbeere		Frutarom
<i>Salicis cort</i>	Weidenrinde		Frutarom
<i>Taraxaci herba</i>	Löwenzahn		Frutarom
<i>Thymus vulgaris</i>	Thymian		Frutarom
<i>Uvae ursi folium</i>	Bärentraubenblätter	Extraktionsmittel unbekannt	Extraktchemie
<i>Uvae ursi folium</i>	Bärentraubenblätter		Finzelberg
<i>Vitis vinifera</i>	Traubenkerne		Dragoco
<i>Vitis vinifera folium</i>	Weinrebe		Frutarom

Tab. 10: Untersuchte Reinsubstanzen

Bezeichnung	Verwendetes Lösungsmittel	Lieferant (Best.nr.)
Allantoin	1. 100% Ethanol 2. BICIN-Puffer	A Natura
Apigenin*	BICIN-Puffer + 1% Methylcellulose	Phytolab
Apigenin-7-o-Glucosid*	100% Ethanol	Phytolab
Apiin*	100% Ethanol	Phytolab
p-Arbutin	1. 100% Ethanol 2. BICIN-Puffer	BioChemika (10960)
α -Bisabolol	100% Ethanol	A Natura
Borneol	BICIN-Puffer + 1% Methylcellulose	Aldrich (251925)
β -Caryophyllen	BICIN-Puffer + 1% Methylcellulose	Aldrich (W22,520-7)
Dihydromethysticin*	BICIN-Puffer + 1% Methylcellulose	Phytolab
Eugenol	BICIN-Puffer + 1% Methylcellulose	Aldrich (E5,179-1)
Gallensäure Monohydrat	100% Ethanol	Phytolab
Dinatrium Glyzyrrhetinsäure	BICIN-Puffer	Cognis
Monoammonium Glyzyrrhetinsäure	100% Ethanol	Cognis
18- β -Glyzyrrhetinsäure	100% Ethanol	Cognis
18- β -Glyzyrrhetinsäure Kaliumsalz	BICIN-Puffer	Cognis
18- β -Glyzyrrhetinsäure Zinksalz	100% Ethanol	Cognis
Lapachol	100% Ethanol	Aldrich (75490)
Ligustilid*	BICIN-Puffer + 1% Methylcellulose	Phytolab
R-(+)-Limonen	BICIN-Puffer + 1% Methylcellulose	Fluka (62118)
Meristim (1%-ig)	1. 100% Ethanol 2. BICIN-Puffer	A Natura
Myristicin	BICIN-Puffer + 1% Methylcellulose	Sigma (M9411)

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Bezeichnung	Verwendetes Lösungsmittel	Lieferant (Best.nr.)
Phloretin	100% Ethanol	Sigma (P-7912)
Quercetin Dihydrat*	0,1 N NaOH	Phytolab
Rutoside*	0,1 N NaOH	Phytolab
Sabinenhydrat	BICIN-Puffer + 1% Methylcellulose	Fluka (96573)
Silibinin	100% Ethanol	Sigma (S-0417)
Silibinin, wasserlöslich	BICIN-Puffer	Phytolab
Silichristin	50% Ethanol	Phytolab
Silidianin	50% Ethanol	Phytolab
Terpineol	BICIN-Puffer + 1% Methylcellulose	Aldrich (W30,451-4)

* <15 mg Substanz vorhanden (vgl. 3.1.4)

Tab. 11: Untersuchte Proteine, Proteinisolate und -hydrolysate

Botanischer Name	Bezeichnung	Lieferant
-	Beefextrakt	Hartge Ingredients
-	Ca-Caseinat	Bayerische Milchindustrie
-	Lab Caseinat 30/60	Bayerische Milchindustrie
-	Lab Caseinat 90/110	Bayerische Milchindustrie
-	Na-Caseinat	Bayerische Milchindustrie
-	Casein CE90STL, enzymatisch hydrolysiert	DMV
-	Fleischpepton	Hartge Ingredients
-	Molkenproteinkonzentrat WE80BG, enzymatisch hydrolysiert	DMV
-	Säure-Caseinat 90/110	Bayerische Milchindustrie
-	Säure-Caseinat 30/60	Bayerische Milchindustrie
-	Seidenprotein, hydrolysiert	A Natura
<i>Glycine max</i>	Sojamehl SE50BT, enzymatisch hydrolysiert	DMV
<i>Glycine max</i>	Sojapepton	Hartge Ingredients
<i>Glycine max</i>	Sojaprotein SE70M, enzymatisch hydrolysiert	DMV
<i>Lupinus luteus</i>	Lupinenproteinisolat	Georg Breuer
<i>Oryza sativa</i>	Reisprotein	Remy-Industries
<i>Triticum aestivum</i>	Weizengluten WGE80M, enzymatisch hydrolysiert	DMV

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	Lieferant
<i>Triticum aestivum</i>	Weizengluten WGE80GP, enzymatisch hydrolysiert	DMV
<i>Zea mays</i>	Maisgluten CGE60M, enzymatisch hydrolysiert	DMV

Tab. 12: Untersuchte Oleoresine und Öle

Botanischer Name	Bezeichnung	Lieferant
<i>Alga</i>	Algenöl	A Natura
<i>Aloe barbadensis</i>	Aloe-Vera-Öl	A Natura
<i>Apium graveolens</i>	Sellerie	Henry Lamotte
<i>Arctium lappa officinalis</i>	Klettenwurzelöl	A Natura
<i>Arnica montana</i>	Arnikaöl	A Natura
<i>Capsicum annum</i>	Paprikaextrakt	Flavex
<i>Capsicum frutescens</i>	Capsicum, 20% Capsaicinoide	Henry Lamotte
<i>Carum carvi</i>	Kümmel	Paul Kaders
<i>Corylus avellana</i>	Haselnussaroma	Flavex
<i>Persea americana</i>	Avocado	A Natura
<i>Petroselinum crispum</i>	Petersilie	Paul Kaders
<i>Pimenta officinalis</i>	Piment	Henry Lamotte
<i>Sabalae serulatae fructus</i>	Salbalfrüchte	Finzelberg
<i>Salvia officinalis</i>	Salbei	Paul Kaders
<i>Zea mays</i>	Maiskeimöl	Unilever

Tab. 13: Untersuchte Ätherische Öle

Botanischer Name	Bezeichnung	Lieferant
<i>Cananga odorata</i>	Ylang-Ylang	Elexier
<i>Cupressus sempervirens</i>	Zypresse	Elexier
<i>Vetiveria zizanioides</i>	Vetiver	Elexier

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

3.1.2 Eigene Extrakte

3.1.2.1 Ausgangsmaterialien

Aus insgesamt 69 Proben wurden vier verschiedene Extraktvarianten ⁷ hergestellt (Tab. 14). Unter den 69 Ausgangsmaterialien für die Herstellung verschiedener Extraktvarianten befanden sich 41 Rückstände der Öl- und Apfelsaftpressung. Die Pelletbruchstücke wurden im Labor mit Hilfe von Mühlen zerkleinert und anschließend mit Sieben auf eine Korngröße von max. 2 mm gebracht.

Teeblätter, Teespäne, Tabakblätter und Blätter der Strauchtagetes wurden ohne weitere Hilfsmittel im Labor im Mörser zerkleinert.

In Körnern und Samen von Getreide und Leguminosen wird durch die Keimung das Gleichgewicht der Enzymaktivitäten ('steady state') durch Synthese von Enzymen, Enzyminhibitoren und -aktivatoren neu eingestellt. Da für den Einfluß der Keimung auf die Lipaseaktivität bisher noch keine systematischen Untersuchungen vorliegen, wurden Lipaseaktivitäten bei Weizen, Gerste, Roggen, weißen Bohnen, grünen Erbsen und Soja an den Keimungstagen 0, 1 und 3 Tagen bestimmt. Die Ausgangsmaterialien von Weizen, Gerste, Roggen, weißen Bohnen, grünen Erbsen und Soja wurden im ungekeimten Zustand in Form von Körnern bzw. Samen zugesandt und im Labor durch Grobzerkleinerung mit einem Hammer und Feinzerkleinerung mit einer Kaffeemühle zu feinem Mehl verarbeitet. Für die Keimungsstadien a) 1 Tag Keimung und b) 3 Tage Keimung wurden jeweils fertige Mehle verwendet.

Tab. 14: Ausgangsmaterialien für die Herstellung verschiedener Eigenextraktvarianten

Botanischer Name	Bezeichnung	Lieferant
	Strauchtagetes ²	selbst geerntet
<i>Arachis hypogaea</i> ¹	Erdnuss	Cognis
<i>Arctium lappa</i> ¹	Klette	Cognis
<i>Brassica napus</i> L. spp. <i>Oleifera</i> Metzg. ¹	Raps, Sorte A	Cognis
<i>Brassica napus</i> L. spp. <i>Oleifera</i> Metzg. ¹	Raps, Sorte C	Cognis
<i>Brassica napus</i> L. spp. <i>Oleifera</i> Metzg. ¹	Raps, Sorte P	Cognis
<i>Brassica nigra</i>	Senfmehl	Kräuterpflug
<i>Calendula officinalis</i> ¹	Ringelblume	Cognis
<i>Camellia sinensis</i> ²	Japan Grüntee	Libertee
<i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i> ²	Pu-erh	ABO Pharma
<i>Cannabis sativa</i> ¹	Hanf Saat, Sorte A	Cognis

⁷ die im Labor hergestellten Extrakte werden im Folgenden mit 'Eigenextrakte' bezeichnet

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	Lieferant
<i>Cannabis sativa</i> ¹	Hanfsaat, Sorte B	Cognis
<i>Carum carvi</i> ¹	Kümmel	Cognis
<i>Cocos nucifera</i> L. ¹	Kokosnuss	Cognis
<i>Corylus avellana</i> ¹	Haselnuss	Cognis
<i>Cucurbita pepo</i> , Sorte A ¹	Kürbiskerne	Cognis
<i>Cucurbita pepo</i> , Sorte B ¹	Kürbiskerne	Cognis
<i>Cuphea wrightii</i> ¹	Köcherblume	Cognis
<i>Cynoglossum officinale</i> ¹	Hundszunge	Cognis
<i>Echinops ritro</i> , Sorte A ¹	Kugeldistel	Cognis
<i>Echinops ritro</i> , Sorte B ¹	Kugeldistel	Cognis
<i>Echinops ritro</i> , Sorte C ¹	Kugeldistel	Cognis
<i>Echinops ritro</i> , Sorte D ¹	Kugeldistel	Cognis
<i>Glycine max</i>	Soja, 0 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Glycine max</i>	Soja, 1 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Glycine max</i>	Soja, 3 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Helianthus annuus</i> ¹	Sonnenblumenkeime, Sorte A	Cognis
<i>Helianthus annuus</i> ¹	Sonnenblumenkeime, Sorte B	Cognis
<i>Hordeum vulgare</i>	Gerste, 0 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Hordeum vulgare</i>	Gerste, 1 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Hordeum vulgare</i>	Gerste, 3 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Ilex paraguariensis</i> ²	Matétee	Libertee
<i>Juglans nigra</i> ¹	Walnuss, Sorte S	Cognis
<i>Juglans nigra</i> ¹	Walnuss, Sorte H	Cognis
<i>Linum usitatissimum</i> ¹	Lein	Cognis
<i>Linum usitatissimum</i> ¹	Öllein, Sorte A	Cognis
<i>Linum usitatissimum</i> ¹	Öllein, Sorte B	Cognis
<i>Linum usitatissimum</i> ¹	Öllein, Sorte C	Cognis
<i>Mallotus philippinensis</i> ¹	-	Cognis
<i>Malus domestica</i> ¹	Apfeltrester	Cognis
<i>Nicotiana tabacum</i> ²	Rohtabakblätter	Van Eicken
<i>Nigella sativa</i> ¹	Schwarzkümmel	Cognis
<i>Oenothera biennis</i> ¹	Nachtkerze, Sorte A	Cognis
<i>Oenothera biennis</i> ¹	Nachtkerze, Sorte B	Cognis
<i>Panicum</i>	Hirse, 25% Gummi Arabicum	Frutarom
<i>Panicum</i>	Hirse	Frutarom
<i>Phaseolus</i>	Bohnen, weiße, 0 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Phaseolus</i>	Bohnen, weiße, 1 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Phaseolus</i>	Bohnen, weiße, 3 Tage Keimung	Kampffmeyer

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Botanischer Name	Bezeichnung	Lieferant
<i>Phaseolus</i>	Bohnen, weiße, 0 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Phaseolus</i>	Bohnen, weiße, ohne Angabe	Kampffmeyer
<i>Pisum sativum</i>	Erbsen, grüne, 0 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Pisum sativum</i>	Erbsen, grüne, 1 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Pisum sativum</i>	Erbsen, grüne, 3 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Prunus dulcis</i> ¹	Mandel	Cognis
<i>Rosa canina</i> ¹	Hagebuttenkerne	Cognis
<i>Secale cereale</i>	Roggen, 0 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Secale cereale</i>	Roggen, 1 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Secale cereale</i>	Roggen, 3 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Sesamum indicum</i> ¹	Sesam, Sorte A	Cognis
<i>Sesamum indicum</i> ¹	Sesam, Sorte B	Cognis
<i>Tabebuia impetiginosa</i> ²	Lapachotee	Libertee
<i>Triticum aestivum</i>	Weizen, 0 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Triticum aestivum</i>	Weizen, 1 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Triticum aestivum</i>	Weizen, 3 Tage Keimung	Kampffmeyer
<i>Triticum aestivum</i> ¹	Weizenkeime	Cognis
<i>Vitis vinifera</i> ¹	Traubenkerne, Sorte C	Cognis
<i>Vitis vinifera</i> ¹	Traubenkerne, Sorte S	Cognis
<i>Vitis vinifera</i> ¹	Traubenkerne, Sorte B	Cognis
<i>Zea mays</i> ¹	Maiskeime	Cognis

¹ Pellets (Rückstände der Öl- und Apfelsaftpressung)

² Blätter oder Spähne

3.1.2.2 Extraktionsverfahren

Bei den vier Extraktverfahren handelte es sich um jeweils eine wässrige Extraktion bei 37°C und bei 95°C sowie jeweils eine Extraktion mit 60% und 100% Ethanol (v/v) bei 37°C. Diese wurden wie folgt hergestellt:

200 mg zerkleinertes Ausgangsmaterial wurden in 1 mL Lösungsmittel gelöst und für 2 Stunden bei der entsprechenden Temperatur in einem Thermomixer intensiv geschüttelt. Danach erfolgte die Trennung der flüssigen Phase von den festen Bestandteilen durch eine Zentrifugation bei $6100 \times g$ über 10 Minuten (Biofuge B, Heraeus Christ, Eydam). Der Überstand wurde in einem Speed Vac Concentrator (SVC100H, Bachofer) vakuumgetrocknet.

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

3.1.3 Selektionsverfahren im Verlauf des Screenings

Um einen ersten Hinweis darauf zu bekommen, in welchem Probenmaterial sich Lipasehemmende Aktivitäten befinden, wurde eine schnell durchzuführende Methode mit Methylresorufin als Substrat gewählt (3.1.4.2). Dieser Test wurde mit $n = 2$, bei Substratmangel in $n = 1$, in vier Konzentrationen durchgeführt. Alle 560 Testsubstanzen wurden in vier Verdünnungen (unverdünnt, 1/2, 1/10, 1/100) auf Lipaseinhibition untersucht, ohne nebenbei die ID_{50} (Verdünnungsstufe bei halbmaximaler Lipasehemmung) zu bestimmen. Proben, die in dieser Bestimmungsmethode in der 1/100-Verdünnung eine deutliche Lipasehemmung von $\geq 50\%$ aufwiesen, wurden auf ihre Wirkung auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase ($n = 2$, 4 Konzentrationen) untersucht, um unspezifische Effekte auszuschließen. Eine Hemmung der alkalischen Phosphatase von $\geq 10\%$ in der 1/100-Verdünnung wurde als unspezifische Enzymhemmung gedeutet.

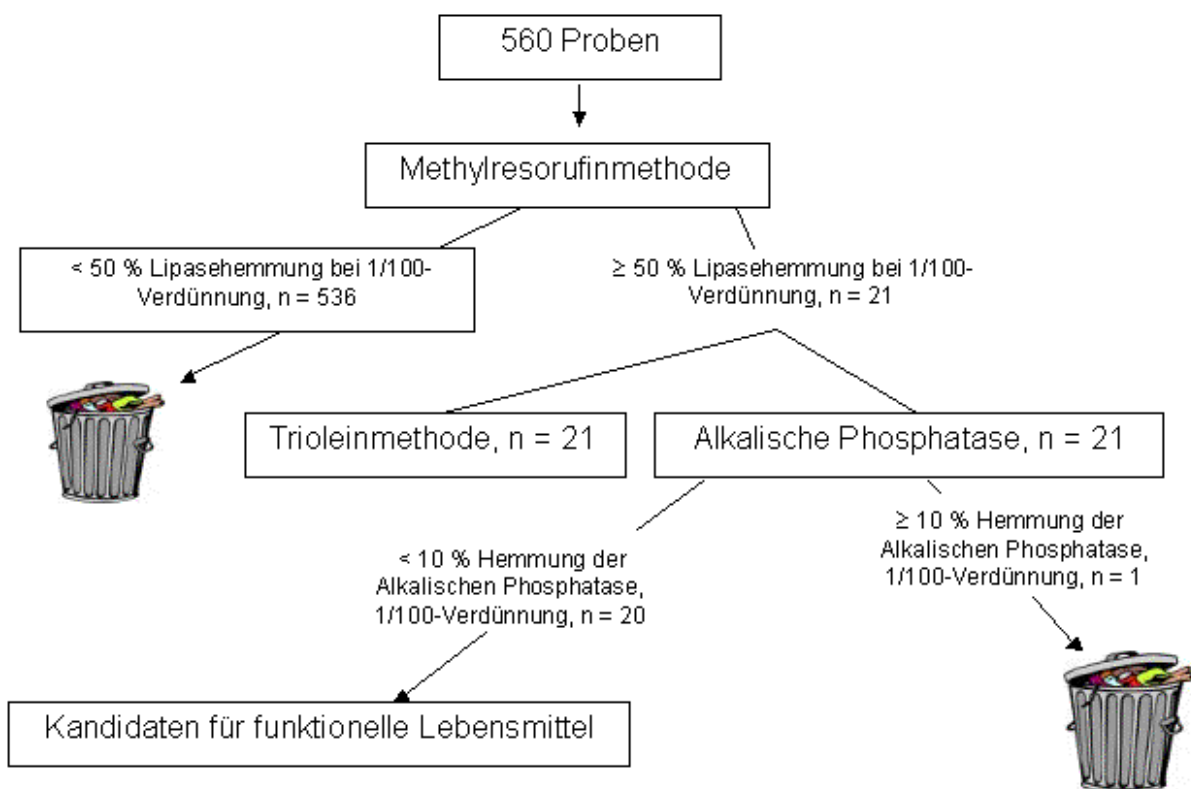


Abb. 14: Fließschema des Screeningverfahrens

Bei Ausschluss eines unspezifischen Effektes wurden zur Absicherung der Ergebnisse die Anzahl der Einzelversuche für die Tests auf Lipase mit der Methylresorufinmethode und alkalische Phosphatase auf $n = 5$ aufgestockt sowie die Lipaseaktivität mit einer zweiten

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Lipasebestimmungsmethode mit Triolein als Substrat in $n = 2$ und 4 Konzentrationen untersucht (Abb. 14).

Bei Pflanzenextrakten, die eine Lipase-hemmende Wirkung zeigten, wurde eine Literaturrecherche zu Inhaltsstoffen durchgeführt. Inhaltsstoffe, die als Reinsubstanz kommerziell zu erwerben waren, wurden ebenfalls mit der Methylresorufinmethode untersucht.

Von der Referenzsubstanz Orlistat und Lapachotee, einer der wirksamsten Lipase-hemmenden Testsubstanzen, wurden mit der Methylresorufin- und der Trioleinmethode ID_{50} -Werte (Konzentration, mit der eine 50%-ige Lipasehemmung erreicht wurde) ermittelt. Hierzu wurde die Anzahl an Konzentrationen der Testlösung auf neun bis elf erweitert. Für die Ergebnispaare (Konzentration vs. % Lipasehemmung) wurde eine nicht-lineare Kurvenanpassung ermittelt, über die die ID_{50} für die entsprechende Testsubstanz berechnet wurde (Table Curve 3D, Version 4.0, Systat Software Inc.).

3.1.4 Testung auf Lipase inhibitorische Aktivität

3.1.4.1 Herstellung der Testlösungen

Von dem getrockneten Extrakt wurden 200 mg in 1 mL des entsprechenden Lösungsmittels durch intensives Schütteln suspendiert. Nach einer Zentrifugation von $712 \times g$ (Biofuge B, Heraeus Christ, Eydam) für 5 min wurde der klare Überstand als unverdünnte Testlösung verwendet. Um eine dosisabhängige Wirkung festzustellen, wurden drei weitere Konzentrationen hergestellt: 1/2, 1/10 und 1/100. Mit Proben auf Protein- und Peptidbasis wurde in gleicher Weise verfahren, wobei ein 50 mmol/L BICIN (*N,N*-Bis(2-hydroxyethyl)glycine) Puffer (pH 8,0) mit 1% Gummi Arabicum (zur Stabilisierung der lipophilen Phase) als Lösungsmittel eingesetzt wurde.

Oleoresine/Öle sowie CO_2 -Extrakte benötigen zur Lösung des großen Anteils an lipophilen Substanzen den Zusatz eines Emulgators. Zu diesem Zweck wurden Ethanol, Phosphatidylcholin, Methylcellulose, Tween 80 und Gallensäuren auf ihre emulgierende Wirksamkeit überprüft. Methylcellulose erwies sich als wirksamster Emulgator und wurde den in den Enzymtests verwendeten Puffern 1%-ig zugesetzt.

Zähflüssige, pipettierbare Extrakte und Öle wurden 1/10 verdünnt. Bei stark viskösen und festen Proben wurden 100 mg der Substanz eingewogen und in 900 μ L Puffer mit 1% Methylcellulose gelöst. Die erhaltenen Lösungen wurden jeweils intensiv geschüttelt, 5 min bei 100 Watt mit Ultraschall behandelt und als 1/10-Konzentrationen verwendet. Um eine dosisabhängige Wirkung festzustellen, wurden drei weitere Konzentrationen untersucht: 1/50, 1/100 und 1/200.

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Zur Vorbereitung der Reinsubstanzen auf die Methylresorufinmethode wurden diese im Verhältnis 200 mg/mL Lösungsmittel eingewogen, intensiv geschüttelt und bei $1540 \times g$ für 10 min zentrifugiert (Biofuge B, Heraeus Christ, Eydam). Der Überstand wurde als unverdünnte Testlösung verwendet. Substanzen, von denen <15 mg vorlagen (in Tab. 10 mit * gekennzeichnet), wurden komplett in 1 mL Lösungsmittel aufgenommen. Einige der Reinsubstanzen wiesen eine überwiegend lipophile Struktur auf. Deshalb wurden diese Proben in BICIN-Puffer (50 mmol/L, pH 8,0) mit 1% Methylcellulose gelöst und zusätzlich für 5 min bei 100 Watt mit Ultraschall behandelt.

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

3.1.4.2 Lipasebestimmung mit Methylresorufin als Substrat (Methylresorufinmethode)

Das Prinzip der 'Methylresorufinmethode' ist in Abb. 15 dargestellt.

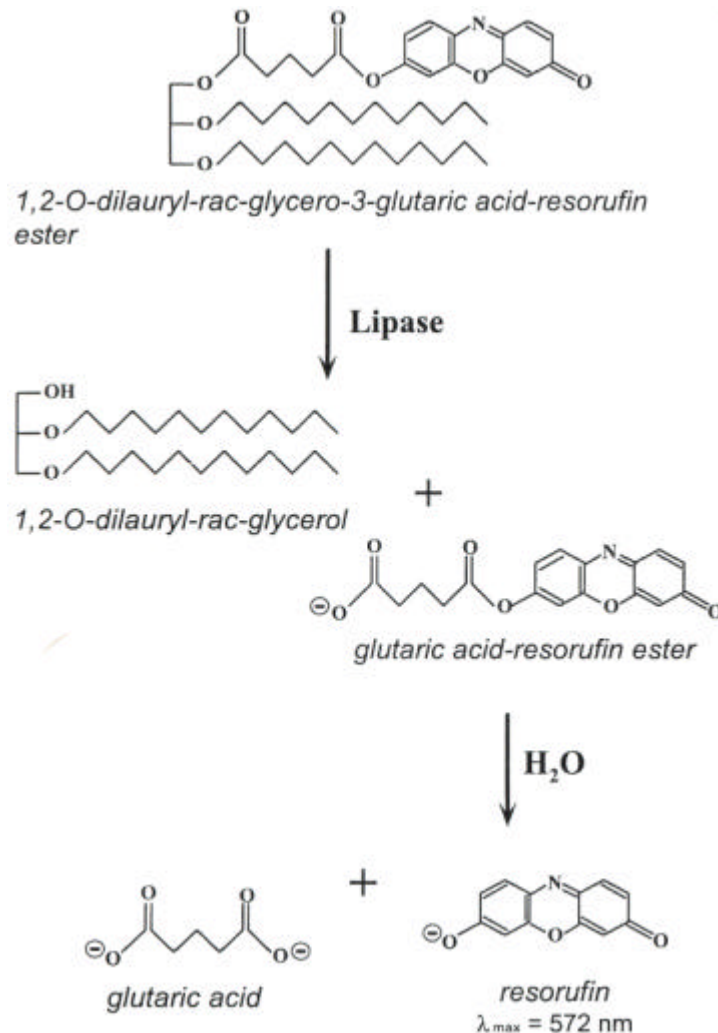


Abb. 15: Prinzip der Lipaseaktivitätsbestimmung mit Methylresorufin als Substrat [208]

Vorbereitung der Proben vor der Messung am Analyseautomat Konelab 20i:

Die Bestimmung der Lipaseaktivität fand im Konelab 20i (Kone) statt. Hierzu wurden folgende Reagenzien vorbereitet:

Reagenz 1 (Bestandteil des Lipase Colorimetric Assays von Roche):

- BICIN-Puffer (50 mmol/L), pH 8,0
- Colipase aus Schweinepankreas (≥ 1 mg/L)
- Natriumdesoxycholat (1,6 mmol/L)
- Calciumchlorid (10 mmol/L)

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Reagenz 2:

- 200 μL BICIN Puffer (50 mmol/L), pH 8,0 mit 1% Gummi Arabicum
- 25 μL Testlösung
- 25 μL einer 0,35 $\mu\text{mol/L}$ Pankreaslipaselösung

Die Pankreaslipaselösung wurde hergestellt durch Einwaage von 32,25 mg Lipasepulver (Sigma, porcine Lipase, 34% Protein) auf 10 mL des 50 mmol/L BICIN Puffers (pH 8,0) mit 1% Gummi Arabicum, Zentrifugation bei $1300 \times g$ für 10 min (Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech) und anschließender 1/5-Verdünnung des Überstandes mit dem Puffer. Reagenz 2 wurde 20 min bei 37°C auf einem Thermomixer behutsam geschüttelt, um eine Wechselwirkung von Lipase-hemmenden Substanzen mit der Lipase zu ermöglichen. Danach wurde mit pH-Indikatorpapier die Konstanz des pH-Wertes des Reagenz 2 überprüft.

Reagenz 3, als Emulsion vorliegend (Bestandteil des Lipase Colorimetric Assays von Roche):

- Tartrat-Puffer (10 mmol/L), pH 4,0
- 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-Methylresorufin)-ester (0,27 mmol/L)
- Taurodesoxycholat (8,8 mmol/L)

Messung im Konelab:

Das Pipettierschema im Autoanalyser sah folgendermaßen aus:

1. 60 μL Reagenz 1
2. 2 μL Reagenz 2 + 10 μL Spüllösung
3. 180 Sekunden Inkubation
4. 40 μL Reagenz 3
5. 120 Sekunden Inkubation

Es wurde eine Doppelbestimmung von jeder Probe durchgeführt. Als Kontrolle wurde in Reagenz 2 die Testlösung durch das jeweilige Lösungsmittel ersetzt. Die hierbei ermittelten Ergebnisse wurden 100% Enzymaktivität gleichgesetzt. Diese Kontrolle wurde in einer 6-fach Bestimmung ermittelt. Als Positivkontrolle wurde eine 10 mmol/L Orlistatlösung (entspricht einer 1/40-Verdünnung der Reinsubstanz Orlistat, Herstellung analog 3.1.4.1) verwendet. Diese Lösung wurde durch Einwaage des Pulvers einer Xenical[®]-Kapsel (Roche, enthält 120 mg Orlistat) in 24,24 mL BICIN Puffers (50 mmol/L), pH 8,0, mit 1% Gummi Arabicum hergestellt.

Bei Zugabe des Reagenz 3 spaltet die Lipase das Farbsubstrat 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-Methylresorufin)-ester in alkalischer Lösung zu 1,2-O-Dilauryl-rac-glycerin und

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

einem instabilen Zwischenprodukt, Glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester. Dieses zerfällt in dem alkalischen Milieu spontan zu Glutarsäure und Methylresorufin. Die Farbintensität des gebildeten roten Methylresorufins wurde photometrisch an 12 Messpunkten innerhalb von 83 Sekunden gemessen und ist direkt proportional der Lipaseaktivität.

Der Konelab 20i errechnet im linearen Anstieg der Aktivitätskurve die Extinktionsänderung pro Minute und multipliziert diese mit dem Festfaktor 1200 (durch interne und externe Kontrollen des Geräteherstellers Kone ermittelt), um die Enzymaktivität in Units (μM Substratumsatz / min) anzugeben.

Die am Autoanalyser ermittelten Werte der Mehrfachbestimmungen für die Proben und Orlistat wurden gemittelt, zu der 100% Enzymaktivitätskontrolle ins Verhältnis gesetzt und folgendermaßen als % Lipasehemmung ausgedrückt:

$$= 100 - \left(\frac{\text{Aktivität}_{\text{Probe}} (U)}{\text{Aktivität}_{\text{Kontrolle}} (U)} \times 100 \right)$$

3.1.4.3 Lipasebestimmung mit Triolein als Substrat (Trioleinmethode)

Das Prinzip der Trioleinmethode, in dessen Verlauf Ölsäuren aus dem physiologischen Substrat Triolein freigesetzt, mit Bathocuproin und Kupferionen komplexiert und photometrisch bestimmt werden, ist in Abb. 16 dargestellt.

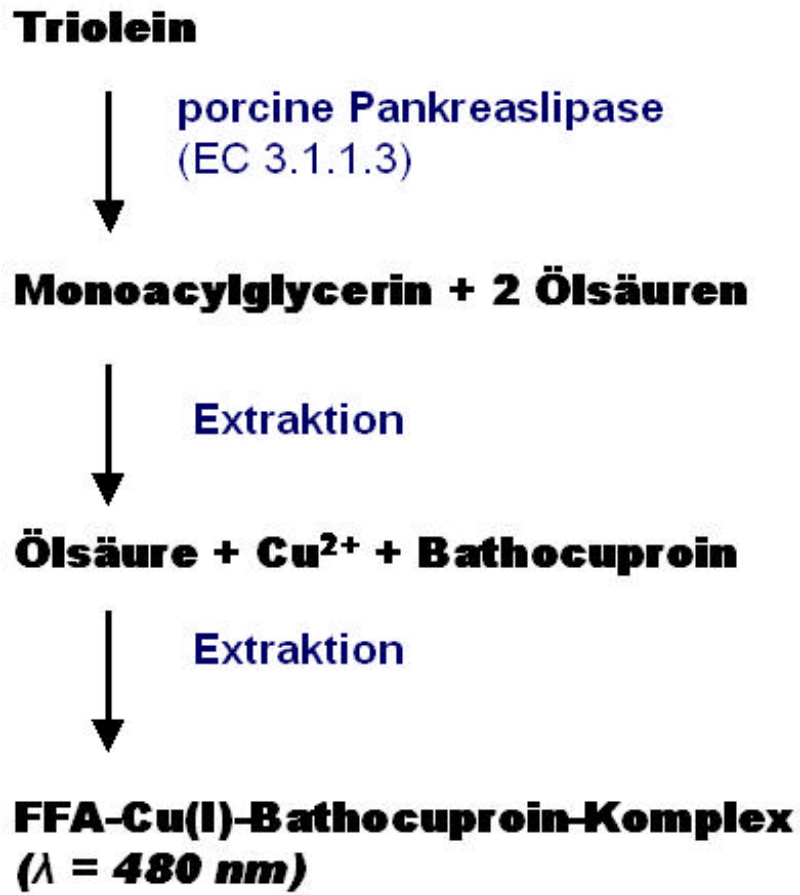


Abb. 16: Prinzip der Lipaseaktivitätsbestimmung mit Triolein als Substrat

Für den Inkubationsansatz (Tab. 15) wurden folgende Lösungen hergestellt.

- 'Reagenz 1' (Bestandteil des Fluitest Lip von Analyticon, Lichtenfels):
 - 26 mmol/L Tris Puffer, pH 9,2
 - 19 mmol/L Natriumdesoxycholat
 - 0,1 mmol/L Calciumchlorid
 - 0,3 mmol/L Triolein
 - 300 kU/L Colipase

Zu 1,5 mL dieses Reagenz wurden 13,27 mg Triolein gegeben, so dass sich eine Trioleinkonzentration von 1mmol/L ergab, die als 'Trioleinemulsion' im Inkubationsansatz eingesetzt wurde.

- Tris Puffer (26 mmol/L), pH 9,2
- Pankreaslipaselösung (0,601 µmol/L) in 26 mmol/L Tris Puffer pH 9,2
Die Pankreaslipaselösung wurde hergestellt durch Einwaage von 21,5 mg Lipasepulver (Sigma, porcine Lipase, 34% Protein) auf 10 mL 26 mmol/L Tris Puffer

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

(pH 9,2), Zentrifugation bei $1300 \times g$ für 10 min (Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech) und anschließender Verdünnung des Überstandes mit Puffer um den Faktor 22,7.

Tab. 15: Pipettierschema für die Probeninkubation bei der Trioleinmethode

	Tris-Puffer	Lösungsmittel	Testlösung	Orlistatlösung	Lipaselösung	Triolein-emulsion	Σ
μl							
Leerwert des Lösungsmittels	100	50	-	-	-	50	200
Leerwert der Testlösung	100	-	50	-	-	50	200
100% Aktivitätskontrolle	50	50	-	-	50	50	200
Probe	50	-	50	-	50	50	200
Orlistat	50	-	-	50	50	50	200

Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die 100% Aktivitätskontrolle und der 'Lösungsmittelleerwert' (s. Tab. 15) wurden in Dreifachbestimmung untersucht.

Als Positivkontrolle wurde eine 10 mmol/L Orlistatlösung (entspricht einer 1/40-Verdünnung der Reinsubstanz Orlistat, Herstellung s. 3.1.4.1) verwendet. Diese Lösung wurde durch Einwaage des Pulvers einer Xenical[®]-Kapsel (Roche, enthält 120 mg Orlistat) in 24,24 mL Tris Puffer 26 (mmol/L), pH 9,2 hergestellt.

Freie Fettsäuren und weitere lipophile Substanzen aus Probenmaterial mit einem hohen Anteil an lipophilen Substanzen (z.B. Oleoresine/Öle und CO₂-Extrakte) führen im Verlauf der Trioleinmethode auf gleiche Weise zur Bildung des Kupfer-Bathocuproin-Komplexes wie die von der Lipase aus Triolein freigesetzte 'Ölsäure'. Aus diesem Grund wurde ein 'Lösungsmittelleerwert' mit der Testlösung im Lösungsmittel, jedoch ohne Enzym ('Testlösungsleerwert') zur Ermittlung durchgeführt. Die gefundene Extinktion ist nicht auf die von der Lipase aus Triolein freigesetzte Ölsäure zurückzuführen.

Der Testansatz wurde zunächst für 30 Minuten bei 37°C behutsam in einem Wasserbad geschüttelt. Die Extraktion und Bestimmung der freigesetzten Ölsäure erfolgte nach Tsujita *et al.* (93). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 mL eines Chloroform/Heptan/Methanol-Gemisches (im Verhältnis 50:49:1) gestoppt. Hierbei wurden die freigesetzten freien Fettsäuren dem Reaktionsansatz durch intensives Schütteln für 10 min entzogen. Nach einer Zentrifugation ($1300 \times g$, 10 min, Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech) wurde ein Aliquot von 2 mL aus der unteren Chloroformphase genommen. Diesem Aliquot wurde 1 mL eines Kupferreagenz (94 mL Reinstwasser, 6 mL 1 N NaOH, 6,45 mmol/L Cu(NO₃)₂, 0,1 mol/L

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

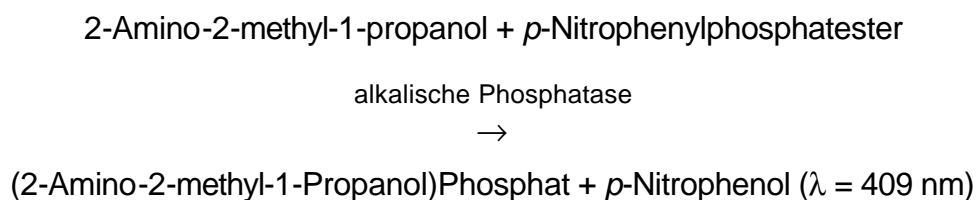
Triethanolamin, 33% (w/v) NaCl) zugefügt. Diese Mischung wurde für 10 min intensiv geschüttelt, um die gebildeten Kupfer-Fettsäurekomplexe zu extrahieren und zur Phasentrennung anschließend für 10 min bei $1300 \times g$ zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech). Vom Chloroform-Überstand (organische Phase) wurde 1 mL abgenommen und mit 1 mL Chloroform mit 0,1% (w/v) Bathocuproine and 0,05% (w/v) 3-tert-butyl-4-Hydroxyanisol versetzt und gemischt. Der entstandene Fettsäure-Kupfer-Bathocuproin-Komplex wurde schließlich photometrisch bei 480 nm in einem Standardphotometer (Uvikon 860, Kontron) bestimmt.

Der Lösungsmittelleerwert wurde von allen Proben abgezogen. Die jeweiligen um die Lösungsmittelleerwerte bereinigten Testlösungsleerwerte wurden von den bereinigten Probenwerten und bereinigten 100% Aktivitätskontrollen abgezogen. Die ermittelten Werte für die Proben und Orlistat wurden gemittelt, zu der 100% Enzymaktivitätskontrolle ins Verhältnis gesetzt und folgendermaßen als % Lipasehemmung ausgedrückt:

$$= 100 - \left(\frac{\text{Aktivität}_{\text{Probe}} (\text{Extinktion})}{\text{Aktivität}_{\text{Kontrolle}} (\text{Extinktion})} \times 100 \right)$$

3.1.4.4 Bestimmung der alkalischen Phosphatase (unspezifische Hemmung)

Der Reaktion liegt folgendes Schema zugrunde:



Bei Zugabe von alkalischer Phosphatase zu seinem Substrat *p*-Nitrophenylphosphatester setzt das Enzym das Substrat zu *p*-Nitrophenol und Phosphat um. Letzteres wird vom Alkohol aufgenommen. Die Bildung von *p*-Nitrophenol wird bei 409 nm gemessen.

Vorbereitung der Proben vor der Messung am Konelab 20i:

Die Messung der Proben fand im Konelab 20i statt. Hierzu wurden folgende Reagenzien vorbereitet:

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Reagenz 1 (Bestandteil des Bestimmungstest für die alkalische Phosphatase von Thermo Clinical Labsystems):

- 2-Amino-2-methyl-1-propanol, pH 10,4	0,44 mol/L
- MgSO ₄	2,5 mmol/L
- ZnSO ₄	1,25 mmol/L
- HEDTA	2,5 mmol/L
- NaN ₃	< 0,1%
- <i>p</i> -Nitrophenylphosphatester	80 mmol/L
- Natriumazid	< 0,1%

Reagenz 2:

- 200 µL eines 2,5 mmol/L HEDTA Puffers (pH 10,4) mit 0,44 mol/L 2-Amino-2-methyl-1-propanol
- 25 µL der Testlösung
- 25 µL einer 0,014 µmol/L alkalische Phosphatase-Lösung (1/500-Verdünnung einer alkalischen Phosphatase-Lösung [140 U/mL, Roche])

Reagenz 2 wurde für 20 Minuten bei 22°C behutsam in einem Thermomixer geschüttelt, um eine potenzielle Wechselwirkung von Wirkstoffen mit dem Enzym zu ermöglichen.

Messung im Konelab

Das Pipettierschema im Autoanalyser sah folgendermaßen aus:

1. 150 µL Reagenz 1
2. 300 Sekunden Inkubation
3. 3 µL Reagenz 2
4. 120 Sekunden Inkubation

Im Autoanalyser wurde eine Doppelbestimmung von jeder Probe durchgeführt. Als Kontrolle wurde in Reagenz 2 die Testlösung durch das jeweilige Lösungsmittel ersetzt. Die hierbei ermittelten Werte wurden als 100% Enzymaktivität angenommen. Als Positivkontrolle wurde ein Phosphatase Inhibitor Cocktail (Sigma, 1/100 verdünnt in HEDTA Puffer, 2,5 mmol/L, pH 10,4, mit 0,44 mol/L 2-Amino-2-methyl-1-propanol) untersucht.

Im linearen Bereich des Extinktionsanstiegs ermittelte der Autoanalyser innerhalb von 120 Sekunden fünf Meßpunkte. Aus dem daraus ermittelten Extinktionsanstieg pro Minute berechnete das Gerät die Enzymaktivität in Units/L.

Die am Autoanalyser ermittelten Werte der Mehrfachbestimmungen für die Proben und Orlistat wurden gemittelt, zu der 100% Enzymaktivitätskontrolle ins Verhältnis gesetzt und folgendermaßen als % Hemmung der alkalischen Phosphatase ausgedrückt:

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

$$= 100 - \left(\frac{\text{Aktivität}_{\text{Probe}} (U)}{\text{Aktivität}_{\text{Kontrolle}} (U)} \times 100 \right)$$

Um die unspezifischen Bedingungen von potenziell proteindenaturierenden Reagenzien auf das Enzym gleichzuhalten, wurde das Verhältnis zwischen Extraktrockensubstanz / μMol Enzym konstant gehalten. Dies führte zu einer 200-fachen Verdünnung aller Testlösungen vor der Untersuchung auf Inhibition der alkalischen Phosphatase.

3.1.5 Surface Plasmon Resonance Spektroskopie (SPR)

Im Verlauf des Lipasescreenings wurden beispielhaft an neun Lipase-hemmenden Testsubstanzen (Orlistat sowie acht Extrakte, Tab. 16) Bindungsstudien mit Hilfe der Surface-Plasmon-Resonanz-(SPR)-Spektroskopie durchgeführt. Dies ergibt Hinweise auf den Wirkungsmechanismus und erlaubt eine Umsetzung der Bindung in einem grösseren Maßstab zur Anreicherung der bindenden Substanzen. Hierbei wurde der Bindungspartner Lipase kovalent an eine Thiol-gekoppelte Gold-Dextranschicht auf einer Chipoberfläche gebunden und der zu prüfende Extrakt darüber geleitet (Abb. 17). Die Änderung in der Lichtbrechung zeigt an, ob und mit welcher Masse eine Substanz an das Enzym gebunden hat. Bindungen an die Gold-Dextran-Oberfläche werden in Response Units (RU) angegeben, wobei eine RU einem Pikogramm gebundener Substanz / Quadratmillimeter entspricht.

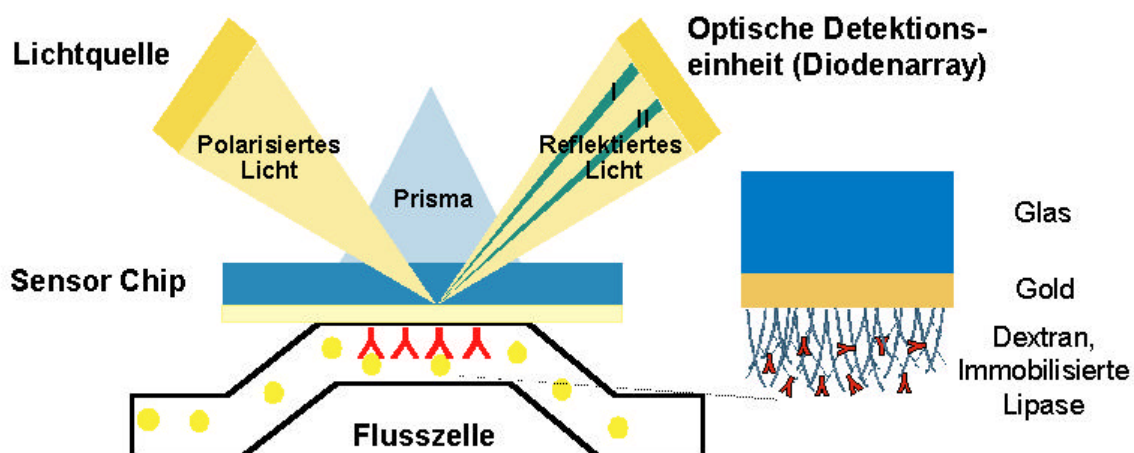


Abb. 17: Prinzip der Surface Plasmon Resonance

Die Bindung der Lipase an die Oberfläche des Chips wurde mit einer $0,35 \mu\text{mol/L}$ Lipaselösung erreicht. Die in Tab. 16 aufgeführten Testsubstanzen wurden mit der SPR untersucht.

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Tab. 16: Mit der Surface Plasmon Resonance auf Lipasebindung untersuchte Testsubstanzen

Botanischer Name	Testsubstanz	Extraktart
-	Orlistat, 10 mmol/L	-
Keime von <i>Triticum aestivum</i>	Weizenkeime	37°C wässriger Extrakt
<i>Flor de piedra</i>	Steinblüte	69% ethanolischer Extrakt
<i>Primula veris</i>	Schlüsselblume	50% ethanolischer Extrakt
<i>Uvae ursi</i>	Bärentraubenblätter	Extraktionsmittel unbekannt
<i>Cynoglossum officinale</i>	Hundszunge	37°C wässriger Extrakt
<i>Anisum</i>	Anis	62% ethanolischer Extrakt
<i>Ilex paraguariensis</i>	Matétee	20% ethanolischer Extrakt
<i>Arctium lappa</i>	Klette	37°C wässriger Extrakt

Die Konzentration der untersuchten Orlistatlösung betrug 10 mmol/L. Bei den untersuchten Extraktlösungen handelte es sich um 1/1000-Verdünnungen der nach 3.1.4 hergestellten unverdünnten Testlösungen.

3.1.6 Statistik

Alle Ergebnisse wurden mit Hilfe des Programms Excel 2000 (Microsoft) berechnet und als arithmetischer Mittelwert mit Standardabweichung in den Ergebnistabellen sowie mit Standard Error of Means (SEM) in Abbildungen angegeben. Im Sinne eines explorativen Testens wurde ein $p < 0,05$ im Student-t-Test als Signifikanzgrenze festgelegt und mit Hilfe des Programms SigmaPlot (Version 9.0, 2004, Systat Software GmbH) berechnet. Die Assoziation zwischen den Ergebnissen der beiden Lipasebestimmungsmethoden sowie zwischen den postprandialen Triglyceridanstiegen und den *in vitro* gemessenen Lipaseinhibitionen wurde durch ein lineares Regressionsmodell mit Hilfe des Statistikprogramms Statgraphics (Version 4.1, Mangulistics, 20852 Rockville, USA) ermittelt.

3.2 Ergebnisse zur Lipaseinhibition

3.2.1 Enzymatische Aktivitätsbestimmungen

3.2.1.1 Wirkung von Orlistat auf die Lipaseaktivität

Die alle Untersuchungen begleitenden 10 mmol/L Orlistatlösungen (entspricht einer 1/40-Verdünnung der Orlistatlösung) führten bei beiden Lipaseaktivitätsbestimmungsmethoden zu einer 98-100%-igen Lipaseinhibition (Abb. 18). Sowohl mit der Methylresorufin- als auch mit der Trioleinmethode ergab der Einsatz von Orlistat eine konzentrationsabhängige Hemmungskinetik (Abb. 18). Die ermittelte ID_{50} (Verdünnung der Orlistatlösung bei halbmaximaler Lipasehemmung) lag in der Methylresorufinmethode bei 1/7000 (entspricht einer 56 $\mu\text{mol/L}$ Orlistatlösung) und in der Trioleinmethode bei 1/10000 (entspricht einer 40 $\mu\text{mol/L}$ Orlistatlösung).

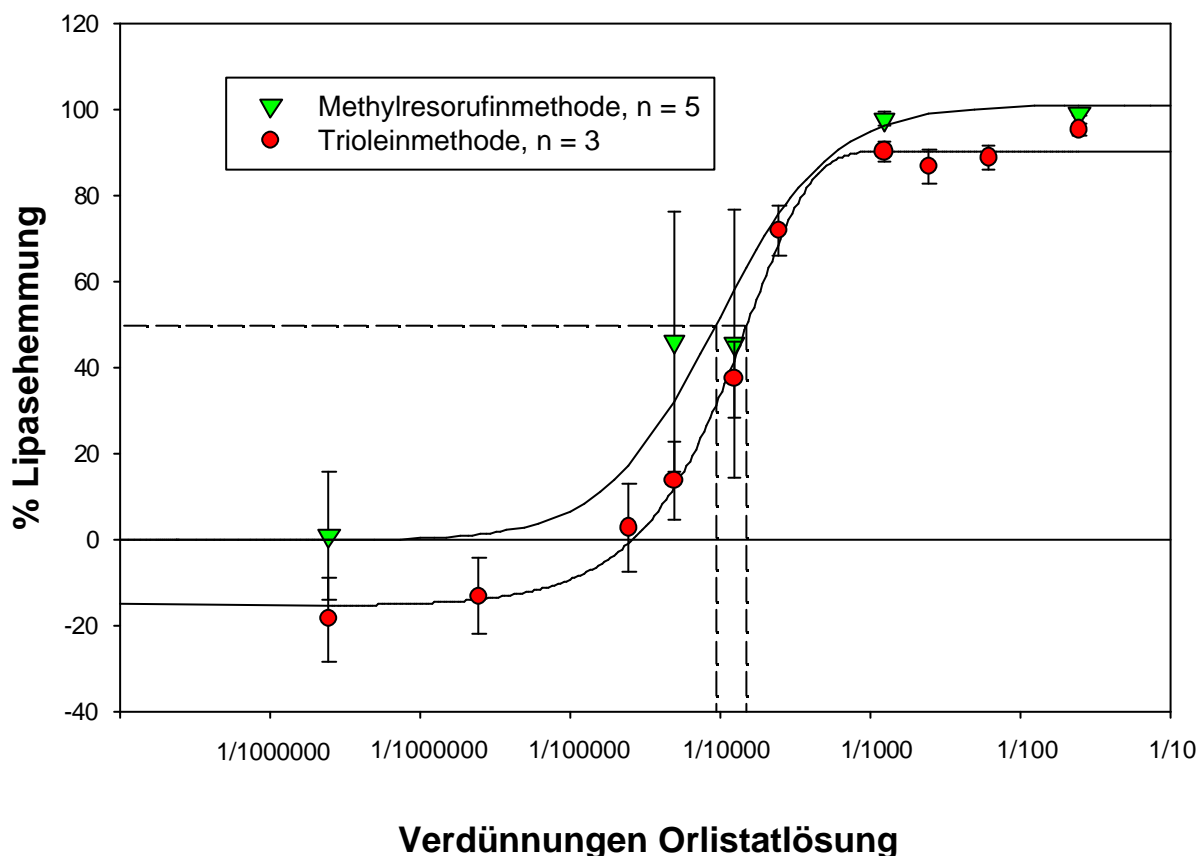


Abb. 18: Wirkung von Orlistat auf die Lipaseaktivität (Methylresorufin- und Trioleinmethode, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Die untersuchten Verdünnungen ergaben sich aus einer unverdünnten Lösung, die durch Einwaage des Pulvers einer Xenical[®]-Kapsel (Roche, enthält 120 mg Orlistat) in 24,24 mL BICIN Puffer (50 mmol/L), pH 8,0, mit 1% Gummi Arabicum hergestellt wurde. ID_{50} = Verdünnung der Orlistatlösung bei halbmaximaler Lipasehemmung; Me = Methylresorufinmethode, Tr = Trioleinmethode.

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

3.2.1.2 Wirkung eines Trioleinzusatzes auf die Lipaseaktivität

Die Oleoresine und Öle wiesen alle hohe Triglyceridgehalte auf. Diese werden der Lipase im Assay neben den vorgesehenen Substraten zusätzlich angeboten. Um zu überprüfen, ob ein Triglyceridzusatz mit den Proben zu einer Beeinflussung des Ergebnisses der Lipaseaktivitätstestung führt, wurde Triolein als Testsubstanz untersucht (Abb. 19).

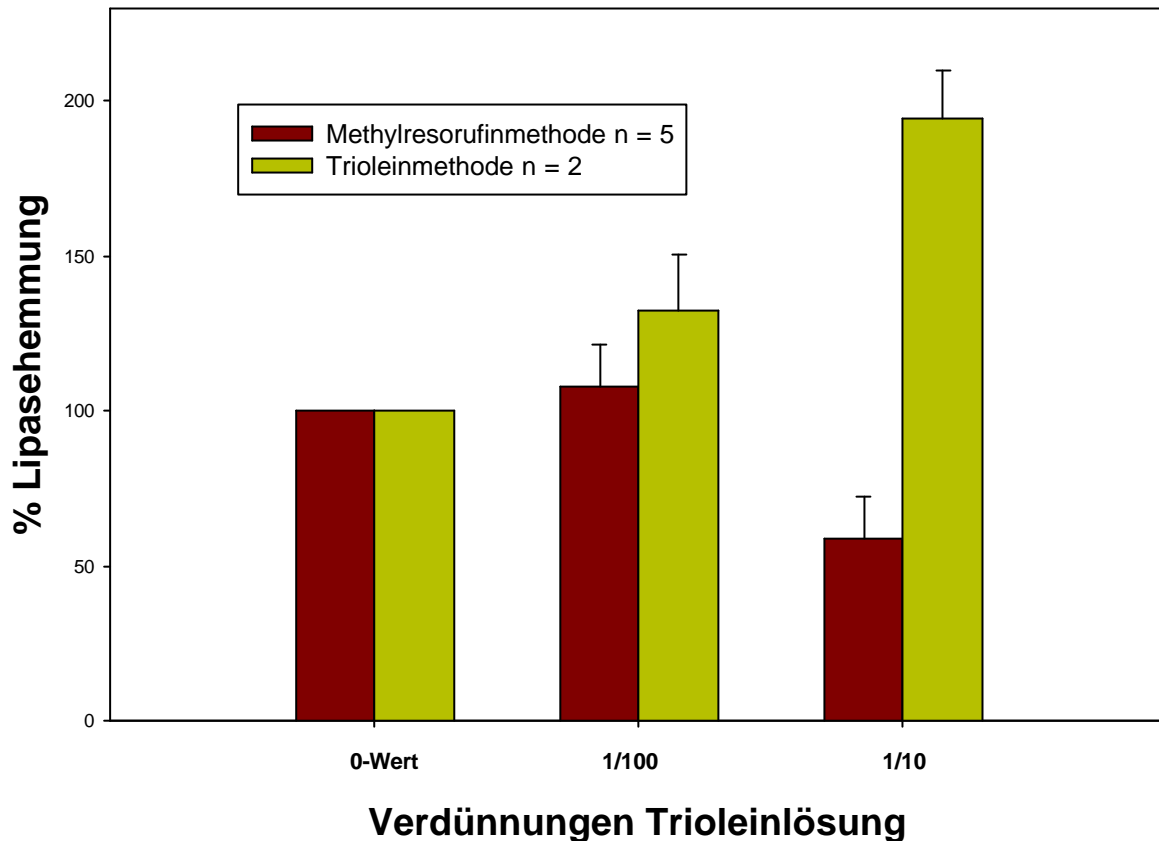


Abb. 19: Einfluss von Triolein auf die Lipaseaktivität (Triolein- und Methylresorufinmethode $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

Die untersuchten Verdünnungen ergaben sich aus einer Lösung, die durch lösen von 22,75 μg Triolein in 250 μL BICIN Puffer (50 mmol/L), pH 8,0, mit jeweils 1% Gummi Arabicum und Methylcellulose, und anschließendem Ultrabeschallen für 5min bei 100 Watt hergestellt wurden (entspricht einer 0,102 mmol/L Trioleinlösung) und entsprechend verdünnt wurden.

Im Vergleich zur Kontrolle führte Triolein mit der Methylresorufinmethode bei der 1/10-Verdünnung zu einer 41%-igen Verringerung der Lipaseaktivität ($p = 0,053$) und bei der 1/100-Verdünnung zu einer 8% höheren Lipaseaktivität ($p = 0,564$). In der Trioleinmethode bewirkte die Trioleinzugabe bei der 1/10-Verdünnung eine 94%-ige Steigerung ($p = 0,074$) und bei der 1/100-Verdünnung eine 32%-ige Steigerung ($p = 0,233$) der Lipaseaktivität.

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

3.2.1.3 Wirkung der Testsubstanzen auf die Enzymaktivitäten

3.2.1.3.1 Ergebnisse der Methylresorufinmethode

Die Ergebnisse aller 560 Proben befinden sich im Anhang (Tab. 25 - Tab. 32).

Zur Übersicht der Ergebnisse wurden die kommerziellen Proben nach Substanzklassen (Tab. 17) und alle Eigenextrakte nach Extraktionsverfahren unterteilt (Tab. 18). Als Kriterium für eine überdurchschnittliche Lipaseinhibition wurde eine Enzymhemmung von > 50% festgelegt.

In Tab. 17 wurden die kommerziell erhältlichen Testsubstanzen nach ihrem potentiellen Gehalt an lipophilen Substanzen angeordnet. Bei der 1/100-Verdünnung stellten Oleoresine/Öle (33%) die effektivste Substanzklasse dar, gefolgt von CO₂-Extrakten (13%).

Tab. 17: Anteil der Proben mit inhibitorischer Aktivität von > 50% bei der 1/100-Verdünnung (Methylresorufinmethode), geordnet nach Substanzklassen (kommerzielle Proben)

Substanzklasse	Anzahl verschiedener Proben	Probenanteil in % 1/100-Verdünnung
Oleoresine, Öle	15	33
Ätherische Öle	3	0
CO ₂ -Extrakte	54	13
Reinsubstanzen	30	0
Alkoholische Extrakte	140	0
Wässrige Extrakte	31	0
Proteine, Peptide	19	0
Gesamt	292	4

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Tab. 18 zeigt die Lipase inhibitorischen Aktivitäten der vier Extraktionsverfahren. Bei der 1/100-Verdünnung führten die Extraktionen mit 100% Ethanol zu den stärksten Lipase-hemmenden Effekten (12%), gefolgt von wässrigen Extrakten bei 37°C (1%).

Tab. 18: Anteil der Proben mit inhibitorischer Aktivität von > 50% bei der 1/100-Verdünnung (Methylresorufinmethode), geordnet nach Extraktionsverfahren (Eigenextrakte)

Extraktionsverfahren		Anzahl verschiedener Proben	Probenanteil in % 1/100-Verdünnung
Ethanolisch	100%	69	12
	60%	67	0
Wässrig	95°C	63	0
	37°C	69	1
Gesamt		270	4

Die 24 wirksamsten Proben aller insgesamt 560 Testsubstanzen, die noch bei der 1/100-Verdünnung starke Lipaseinhibitionen erzielten, wurden in Tab. 19 nach der Stärke ihrer Lipaseinhibition, ermittelt mit der Methylresorufinmethode, angeordnet.

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Tab. 19: Die 24 effektivsten Lipase-hemmenden Testsubstanzen, Methylresorufinmethode (1/100-Verdünnung)

Botanischer Name	Bezeichnung	Extraktionsverfahren / Substanzklasse	% Lipase-inhibition	n
<i>Carum Carvi</i>	Kümmel	Oleoresin	77 ± 4	5
<i>Malus domestica</i>	Apfel	100% ethanolischer Eigenextrakt	76 ± 6	5
<i>Juglans nigra</i>	Walnuss, Sorte H	100% ethanolischer Eigenextrakt	72 ± 29	5
<i>Capsicum frutescens</i>	Capsicum, 20 % Capsaicinoide	Oleoresin	71 ± 3	5
<i>Elettaria cardamomum</i>	Kardamom	CO ₂ -Extrakt	70 ± 14	5
<i>Allium sativum</i>	Knoblauch	CO ₂ -Extrakt	67 ± 12	5
<i>Calendula officinalis</i>	Ringelblume	100% ethanolischer Eigenextrakt	66 ± 12	5
<i>Ilex paraguariensis</i>	Matétee	37° wässriger Eigenextrakt	65	2
<i>Helianthus annuus</i>	Sonnenblumenkerne, Sorte B	100% ethanolischer Eigenextrakt	64 ± 7	5
<i>Echinops ritro</i>	Kugeldistel, Sorte D	100% ethanolischer Eigenextrakt	63 ± 13	3
<i>Pimenta officinalis</i>	Piment	Oleoresin	63 ± 12	5
<i>Hippophae rhamnoides</i>	Sanddornsamen	CO ₂ -Extrakt	61 ± 11	5
<i>Linum usitatissimum</i>	Leinsamen, Sorte A	100% ethanolischer Eigenextrakt	61 ± 10	5
<i>Arctium lappa</i>	Klette	100% ethanolischer Eigenextrakt	59 ± 18	5
<i>Persea americana</i>	Avocado	unverseifbarer Anteil der Frucht	59	2
<i>Calendula officinalis</i>	Ringelblume	CO ₂ -Extrakt	56 ± 19	5
<i>Thymus vulgaris</i>	Thymian	CO ₂ -Extrakt	55 ± 7	5
<i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i>	Pu-erh Tee	100% ethanolischer Eigenextrakt	55	2
<i>Chamomilla recutita</i>	Kamille	CO ₂ -Extrakt	54 ± 26	5
<i>Chamomilla recutita</i>	Kamille, öko ¹	CO ₂ -Extrakt	53 ± 27	5
<i>Sabalae serulatae fructus</i>	Salbalfrüchte	Oleoresin	51 ± 12	5
-	Propolis (A Natura)	Alkoholischer Extrakt	49 ± 11	5
<i>Vitis vinifera</i>	Traubenkerne	Wässriger Extrakt (kommerziell)	48 ± 21	5
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	Lapachotee	100% ethanolischer Eigenextrakt	47 ± 27	5

¹ aus ökologischen Landbau

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Unter den 24 wirksamsten Proben (Tab. 19) befinden sich neun Eigenextrakte. In Tab. 20 sind die Ergebnisse der vier Extraktionsverfahren dieser neun Proben, die mit der Methylresorufinmethode bei einer 1/100-Verdünnung der Proben ermittelt wurden, dargestellt. Die Extraktionen mit 100% Ethanol lieferten Extrakte mit den höchsten Lipasehemmungen.

Tab. 20: Lipaseinhibition (%) mittels Methylresorufinmethode (1/100-Verdünnung) bei Anwendung verschiedener Extraktionsverfahren

Botanischer Name	Ethanolische Extrakte		Wässrige Extrakte	
	100%	60%	95°C	37°C
<i>Malus domestica</i>	76 ± 6 (n=5)	-15 (n=1)	-23 (n=1)	2 ± 5 (n=5)
<i>Juglans nigra</i>	72 ± 29 (n=5)	-48 (n=1)	-106 (n=1)	19 ± 6 (n=5)
<i>Calendula officinalis</i>	66 ± 12 (n=5)	4 (n=2)	46 (n=2)	-9 ± 48 (n=5)
<i>Ilex paraguariensis</i>	41 (n=2)	-8 (n=1)	12 (n=2)	65 (n=2)
<i>Helianthus annuus</i>	64 ± 7 (n=5)	2 (n=1)	-50 (n=1)	-10 ± 24 (n=5)
<i>Echinops</i>	63 ± 13 (n=3)	37 (n=1)	-8 (n=1)	-7 ± 9 (n=5)
<i>Linum usitatissimum</i>	61 ± 10 (n=5)	7 (n=1)	-25 (n=1)	-7 ± 9 (n=5)
<i>Arctium lappa</i>	59 ± 18 (n=5)	-32 (n=1)	-6 ± 16 (n=4)	-10 ± 22 (n=5)
<i>Camellia sinensis var. assamica</i>	55 (n=2)	18 (n=2)	-	-5 (n=2)

Unter den ungekeimten und gekeimten Proben von Weizen, Gerste, Roggen, weißen Bohnen, grünen Erbsen und Soja erzielte keine Probe eine Lipasehemmung von >50% in einer der untersuchten Konzentrationen (Tab. 32).

3.2.1.3.2 Ergebnisse der Trioleinmethode

Die Ergebnisse aller mit der Trioleinmethode untersuchten Proben befinden sich im Anhang in den Tab. 33 - Tab. 37. Tab. 21 zeigt, dass bei lediglich acht der 25 Proben, die bei der Verwendung der Methylresorufinmethode die stärksten Lipasehemmung aufwiesen, entsprechend hohe Werte bei der Anwendung der Trioleinmethode gefunden wurden. Bei diesen acht Proben handelt es sich um:

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

- Thymian (*Thymus vulgaris*)
- Kümmel (*Carum Carvi*)
- Apfeltrester (*Malus domestica*)
- Capsicum (*Capsicum frutescens*)
- Kardamom (*Elettaria cardamomum*)
- Salbalfrüchte (*Sabalae serulatae fructus*)
- Matétee (*Ilex paraguariensis*) und
- Lapachotee (*Tabebuia impetiginosa*).

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Tab. 21: Lipaseinhibitionen (%; Methylresorufin- und Trioleinmethode) und Inhibition der alkalischen Phosphatase der 24 wirksamsten Testsubstanzen bei der 1/100-Verdünnung

Botanischer Name	Methylresorufin- methode	n	Triolein- methode	n	alkalische Phosphatase	n
<i>Carum Carvi</i>	77 ± 4	5	51 ²	2	9 ± 8	5
<i>Malus domestica</i>	76 ± 6	5	62 ²	2	-5 ± 10	5
<i>Juglans nigra</i>	72 ± 29	5	18	2	1 ± 6	5
<i>Capsicum frutescens</i>	71 ± 3	5	83 ²	2	-53 ± 11	5
<i>Elettaria cardamomum</i>	70 ± 14	5	78 ²	2	-4 ± 8	5
<i>Allium sativum</i>	67 ± 12	5	50	2	-16 ± 16	5
<i>Calendula officinalis</i> , Eigenextrakt	66 ± 12	5	-62	2	-1 ± 11	5
<i>Ilex paraguariensis</i> , Eigenextrakt	65	2	55 ²	2	42 ³	2
<i>Helianthus annuus</i>	64 ± 7	5	43	2	-1 ± 7	5
<i>Echinops ritro</i>	63 ± 13	3	26	2	9 ± 20	5
<i>Pimenta officinalis</i>	63 ± 12	5	28	2	-49 ± 30	5
<i>Hippophae rhamnoides</i>	61 ± 11	5	-56	2	-11 ± 11	5
<i>Linum usitatissimum</i>	61 ± 10	5	-6	2	1 ± 2	5
<i>Arctium lappa</i>	59 ± 18	5	12	2	-4 ± 7	5
<i>Persea americana</i>	59	2	-44	2	-10	2
<i>Calendula officinalis</i> , CO ₂ -Extrakt	56 ± 19	5	49	2	3 ± 4	5
<i>Thymus vulgaris</i>	55 ± 7	5	92 ²	2	-17 ± 28	5
<i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i>	55	2	16	1	6 ± 9	5
<i>Chamomilla recutita</i>	54 ± 26	5	38	2	-4 ± 23	5
<i>Chamomilla recutita</i> , öko ¹	53 ± 27	5	42	2	-81 ± 44	5
<i>Sabalae serulatae fructus</i>	51 ± 12	5	70 ²	2	-11 ± 11	5
Propolis	49 ± 11	5	9	2	0 ± 4	5
<i>Vitis vinifera</i>	48 ± 21	5	9	2	-4 ± 6	5
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	47 ± 27	5	68 ²	2	-7 ± 11	5

¹ aus ökologischem Landbau

² > 50%-ige Lipasehemmung in der Trioleinmethode

³ ≥ 10%-ige Hemmung der alkalischen Phosphatase

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

3.2.1.3.3 Ergebnisse der Bestimmung der alkalischen Phosphatase

Die Ergebnisse aller Bestimmungen der alkalischen Phosphatase sind in den Tab. 38 - Tab. 42 aufgezeigt. Die Kontrollen mit dem Alkalische Phosphatase Inhibitor Cocktail führten zu einer Enzymhemmung von $28 \pm 1 \%$. Aus Tab. 21 geht hervor, dass bei 23 der 24 wirksamsten Lipase-hemmenden Proben mit der Methylresorufinmethode eine Hemmung der alkalischen Phosphatase von $< 10\%$ festgestellt wurde. Lediglich bei dem Eigenextrakt aus Matétee (*Ilex paraguariensis*) wurde eine Hemmung der alkalischen Phosphatase von $\geq 10\%$ gefunden.

3.2.2 ID₅₀ von Lapachotee (*Tabebuia impetiginosa*)

In Abb. 20 und Abb. 21 sind die sigmoidalen Inhibitionskurven, die der Ermittlung der ID₅₀-Werte zugrunde gelegt wurden, für die Lapachoteeextrakte (*Tabebuia impetiginosa*) dargestellt. Die Extraktion mit 100% Ethanol erzeugte dabei die mit Abstand stärkste Lipaseinhibition (ID₅₀ = 1/116, Abb. 21), gefolgt von der Extraktion mit 60% Ethanol (ID₅₀ = 1/9, Abb. 20). Die wässrigen Extraktionen bei 37°C und 95°C erzielten die geringsten Lipasehemmungen (ID₅₀ = 1/3,2; Abb. 20). Unter Einfluss des Extraktes mit 100% Ethanol aus Lapachotee wurde in der Trioleinmethode eine ID₅₀ von 1/123 ermittelt (Abb. 21).

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

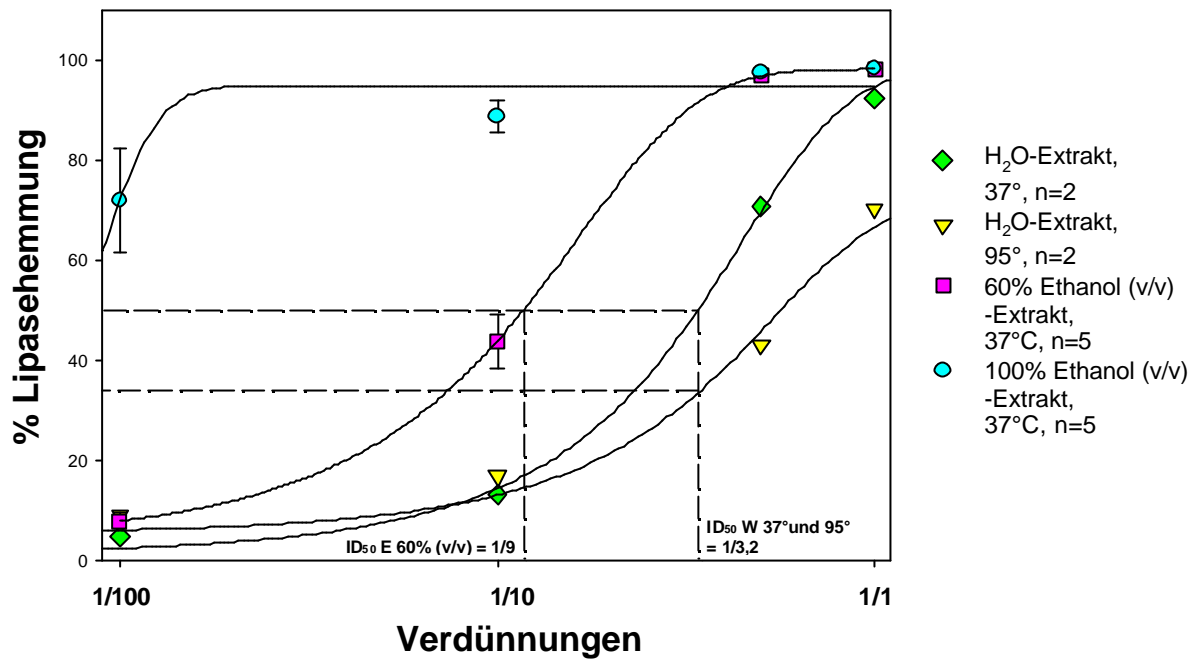


Abb. 20: % Lipasehemmungen ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) unter Einfluss verschiedener Eigenextraktvarianten von Lapachotee, Methylresorufinmethode

Die Verdünnungen ergaben sich aus einer unverdünnten Lösung, die durch Suspension von 200 mg des getrockneten Extraktes in 1 mL des entsprechenden Lösungsmittels hergestellt wurde. Nach einer Zentrifugation von $712 \times g$ für 5 min wurde der klare Überstand als unverdünnte Testlösung verwendet. ID₅₀ = Verdünnung des Extraktes, die zu einer halbmaximalen Lipasehemmung führte, E = Ethanol, W = Wasser.

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

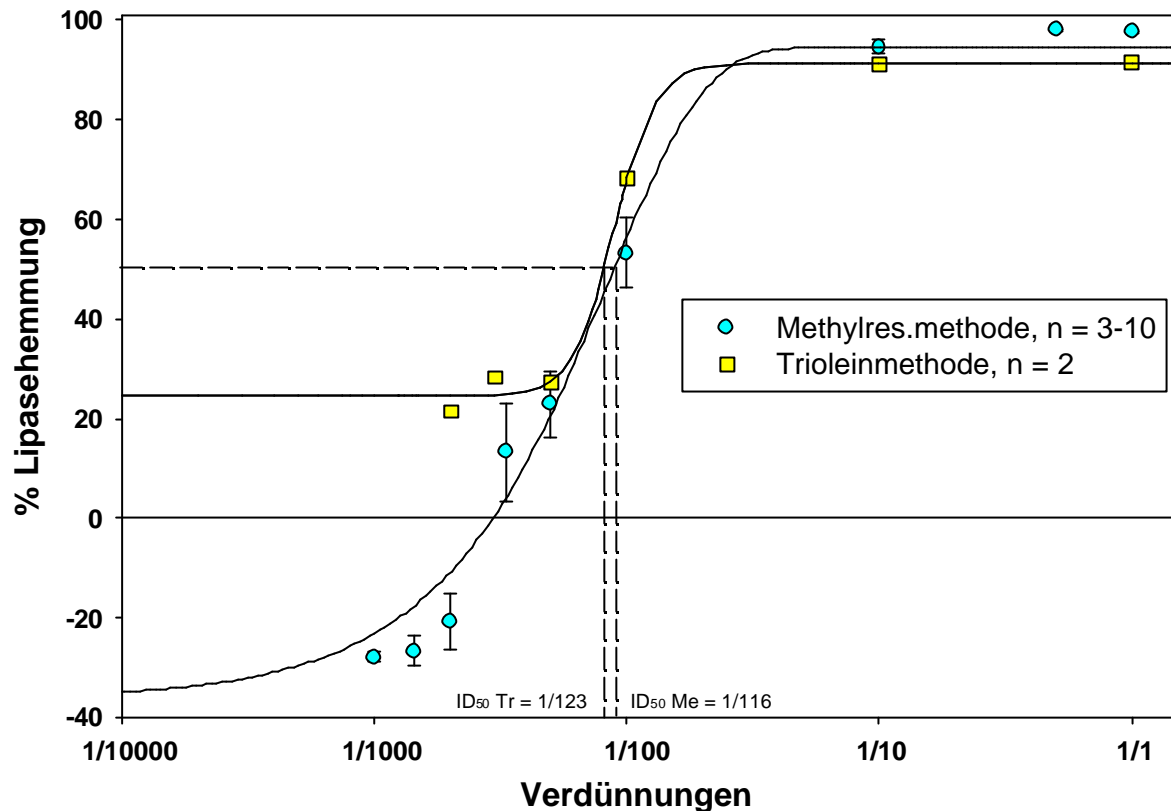


Abb. 21: % Lipasehemmung ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) durch eine Extraktion mit 100% Ethanol aus Lapachotee.

Die Verdünnungen ergaben sich aus einer unverdünnten Lösung, die durch Suspension von 200 mg des getrockneten Extraktes in 1 mL Ethanol (100%) hergestellt wurde. Nach einer Zentrifugation von $712 \times g$ für 5 min wurde der klare Überstand als unverdünnte Testlösung verwendet. Methylresorufin- (Me) und Trioleinmethode (Tr); ID₅₀ = Verdünnung des Extraktes, die zu einer halbmaximalen Lipasehemmung führte.

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

3.2.3 Ergebnisse zur SPR

In Tab. 22 sind die mit der SPR-Technologie untersuchten Extrakte nach den ermittelten Massen, die an die Lipase gebunden haben, aufgetragen. Die Substanzmenge wird durch die Stärke des Bindungssignals in Response Units (RU) angegeben. Die vorgeschaltete Bindung der Lipase an die Gold-Dextran-Oberfläche ergab eine Bindungsstärke von 1200 RU. Dies entspricht einer Substanzmenge von 1200 pg/mm² bzw. 0,024 pMol. Für Inhaltsstoffe von fünf Extrakten konnte der Nachweis einer Bindung an die Lipase geführt werden. Die Weizenkeime erzielten dabei die größte Bindung an die Lipase mit 728 Response Units (RU), gefolgt von Steinblüte (*Flor de piedra*, 457 RU), Schlüsselblume (*Primula veris*, 215 RU), Bärentraubenblättern (*Uvae Ursi*, 196 RU) und Hundszunge (*Cynoglossum officinale*, 128 RU). Für Anis (*Anisum*), Matétee (*Ilex paraguariensis*) und Klette (*Arctium lappa*) konnte keine Bindung an die Lipase nachgewiesen werden. Für Orlistat wurden 11,4 RU (entspricht 0,023 pMol gebundener Substanz) ermittelt.

Tab. 22: Ergebnisse zu Untersuchungen mit der Surface Plasmon Resonance Spektroskopie

Testsubstanz	Lipaseinhibition, unverdünnt (Methylres.)	ermittelte RU
<i>Triticum aestivum</i> , Keime	43 ± 20	728
<i>Flor de piedra</i>	76 ± 9	457
<i>Primula veris</i>	81 ± 13	215
<i>Uvae ursi</i>	78 ± 4	196
<i>Cynoglossum officinale</i>	56	128
Orlistat, 10 mmol/L	100	11,4
<i>Anisum</i>	53	0
<i>Ilex paraguariensis</i>	28	-4
<i>Arctium lappa</i>	78 ± 6	-92

3.3 Diskussion Lipasehemmung

3.3.1 Methodik der Lipaseaktivitätsbestimmung

Orlistat führte in beiden Lipasebestimmungsmethoden zu konzentrationsabhängigen Hemmungskinetiken (Abb. 18). Dies zeigt, dass sich beide Methoden prinzipiell für Untersuchungen von Lipase-inhibierenden Substanzen eignen. Die in Gegenwart von Testsubstanzen ermittelten Ergebnisse können nun zusätzlich auf die Ergebnisse der hochwirksamen Referenzsubstanz Orlistat bezogen werden.

Der Triglyceridzusatz durch Triolein hatte in beiden Lipasebestimmungsmethoden einen Einfluss auf die ermittelten Lipaseaktivitäten. Aufgrund der geringen Probenzahl war dieser Effekt jedoch in keinem Fall signifikant und in der 1/100-Verdünnung auch nominal nur noch wenig ausgeprägt (3.2.1.2, Abb. 19). In der Methylresorufinmethode ist die deutlich verringerte Lipaseaktivität bei der 1/10-Verdünnung vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, dass durch das kompetitive Substrat Triolein von der Lipase pro Zeiteinheit weniger Methylresorufin freigesetzt wurde. In der Trioleinmethode führte der Trioleinzusatz offenbar zu einer vermehrten Freisetzung von Ölsäure pro Zeiteinheit, wodurch die deutlich erhöhten Lipaseaktivitäten zu erklären sind. Aufgrund der geringen Interferenz bei der 1/100-Verdünnung können jedoch die Ergebnisse, die in Gegenwart von Oleoresinen und Ölen in der 1/100-Verdünnung mit der Methylresorufin- (Tab. 17, Tab. 30) und der Trioleinmethode (Tab. 36) erzielt wurden, mit den Ergebnissen aller anderen Testsubstanzen dennoch verglichen werden.

3.3.2 Bilanz des Screenings

Insgesamt wiesen 185 Proben aller 560 Testsubstanzen (33%) bei der jeweils niedrigsten Verdünnungsstufe von unverdünnt oder 1/10 eine > 50%-ige Lipasehemmung auf (Tab. 25 - Tab. 32). Für eine Anwendung in Form eines funktionellen Lebensmittels ist eine derart hohe Konzentration eines Pflanzenextraktes jedoch prinzipiell wenig aussichtsreich. Vergleicht man die hohe Anzahl an wirksamen Testsubstanzen mit den Ergebnissen anderer Studien, wird deutlich, dass ein Ergebnis dieser Art bei Untersuchungen von pflanzlichem Material durchaus nicht ungewöhnlich ist. Shimura *et al.* [67] stellten bei 51 von insgesamt 81 wässrigen Auszügen von Heilpflanzen (63%) eine Hemmung der Lipase von mehr >50% fest, während Bitou *et al.* [80] eine > 50%-ige Lipasehemmung bei 23 von 54 untersuchten Methanolextrakten (43%) verschiedener Algenarten dokumentierten.

Bei 23 der 24 wirksamsten Proben (ermittelt mit der Methylresorufinmethode in der 1/100-Verdünnung) blieb die Inhibition der alkalischen Phosphatase unter 10% (Tab. 21). Es kann

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

somit davon ausgegangen werden, dass die bei diesen 23 Proben in der Methylresorufin- und Trioleinmethode nachgewiesenen Lipase-hemmenden Wirkungen spezifisch sind. Lediglich unter Einfluss des Eigenextraktes aus Matéteeblättern wurde eine Hemmung der alkalischen Phosphatase von $\geq 10\%$ beobachtet, weshalb bei diesem Extrakt zumindest zum Teil eine unspezifische Enzymhemmung für die ermittelten Lipasehemmungen verantwortlich sein könnte.

Für acht der 24 wirksamsten Proben konnte die Lipasehemmung aus der Methylresorufinmethode auch durch eine $> 50\%$ -ige Lipasehemmung mit der Trioleinmethode bestätigt werden (Tab. 21). Dass mit beiden Methoden nicht die gleichen Ergebnisse erzielt wurden, liegt möglicherweise in der Wahl der Substrate und den oben genannten Interferenzen bei triglyceridhaltigen Extrakten (3.3.1) begründet. Im Vergleich zur Methylresorufinmethode, in der die Lipase Methylresorufin aus einem synthetischen Diglycerid freisetzt, wird der Lipase in der Trioleinmethode das physiologische Substrat Triolein angeboten.

Zu den 24 wirksamsten Testsubstanzen (Tab. 19) zählen Extrakte aus den grünen Blättern von Matétee, Thymian und Pu-erh-Tee. Ein Teil der starken Effekte dieser Proben könnte auf die Lipase-hemmende Wirkung von chlorophyllhaltigen Metallkomplexen zurückzuführen sein, von denen die Arbeitsgruppe Shimura *et al.* [72] berichtete. Die in Samen in hohen Konzentrationen anzutreffende Phytinsäure wurde von Knuckles [86] als Lipase-hemmend identifiziert, was einen Teil der Lipasehemmungen von Kümmel-, Sanddorn- und Leinsamen sowie von Sonnenblumen- und Traubenkernen erklären würde.

Die *in vitro* Lipase-hemmende Wirkung von Traubenkernextrakt wurde bereits von Moreno *et al.* [77] beschrieben. Für zwei der 24 wirksamsten Testsubstanzen, Avocado und Matétee, liegen bereits Patente vor, die die Verwendung bestimmter Fraktionen zum Zwecke der Lipasehemmung schützen [118,121].

Von einigen der effektivsten Lipase-inhibierenden Pflanzenextrakten (Tab. 19) wurden positive Wirkungen auf das Plasmalipidprofil und das Körpergewicht beschrieben, die auf einen verzögerten Einstrom von Nahrungsfetten in das Lymph- und Blutsystem oder eine Ausscheidung von Nahrungsfett mit dem Stuhl zurückgeführt werden könnten. Die Supplementierung mit Walnuss, dessen Extraktion mit 100% Ethanol in dieser Studie *in vitro* in einer 1/100-Verdünnung (Methylresorufinmethode) zu einer 72%-igen Inhibition der Lipase führte, bewirkte in verschiedenen Humanstudien eine Verbesserung des Nüchternplasmalipidprofils. Im Vergleich zu einer Cholesterin senkenden mediterranen Ernährung bewirkte die Verabreichung einer Mahlzeit mit ähnlichem Energiegehalt, in der jedoch 35% der Energie durch Walnuss ersetzt wurde, über sechs Wochen eine Erniedrigung des Gesamt- und des LDL-Cholesterins bei Personen mit Hypercholesterinämie [209]. Die Supplementierung

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

mit Walnuss, dessen Fettgehalt 18% einer Testmahlzeit repräsentierte, führte im Vergleich zu einer gewöhnlichen Testmahlzeit mit 36% Fettanteil bei 16 Testpersonen ohne abnormale Blutfettwerte nach einer dreiwöchigen Einnahme zu einer 5%-igen Senkung des Gesamt- und zu einer 9%-igen Senkung des LDL-Cholesterins [210]. Trotz einer Erhöhung der Energiezufuhr führte eine Supplementierung mit 48 g Walnuss über 6 Wochen bei hyperlipidemischen Patienten nicht zu einem erhöhten Körpergewicht [211].

Die Gabe eines wässrigen Pu-Erh Teeextraktes über 16 Wochen *ad libitum* führte im Tierversuch bei Ratten zu verminderten Cholesterin- und Triglyceridspiegeln [212]. Übergewichtige Personen, denen über 45 Tage eine Extraktkombination aus Matétee, Guarana (*Paullina cupana*) und Damiana (*Turnera diffusa*) in Form von Kapseln verabreicht wurde, verloren $5,1 \pm 0,05$ Kg Körpergewicht [213]. Bei keiner der Studien wurde jedoch der Fettgehalt des Stuhls untersucht.

Die Wirkungen von Knoblauch auf das Plasmalipidprofil werden kontrovers diskutiert, da kein eindeutiger Beweis für einen Cholesterin und Plasmalipoprotein senkenden Effekt geführt werden konnte [214].

Der Lipase-hemmende Effekt der Capsicum-Probe ist mit Vorsicht zu betrachten, da diese zur Standardisierung mit Sonnenblumenöl versetzt war und Sonnenblumenkerne alleine eine überdurchschnittlich hohe Lipasehemmung erzeugten (Tab. 19).

Lipase-hemmende Substanzen treten womöglich auch als Schutz- bzw. Abwehrmechanismus der Pflanze vor Abbau der Fettspeicher durch endogene Lipasen oder durch Frassschädlinge auf, insbesondere in Pflanzenteilen mit einem hohen Gehalt an lipophilen Substanzen. Strategie bei der Wirkstofffindung war deshalb unter anderem zu prüfen, ob Pflanzenteile und pflanzliche Proben mit einem hohen Fettgehalt einen höheren Anteil an Lipase-hemmenden Substanzen aufweisen. Außerdem sollten verschiedene Extraktionsverfahren angewendet werden, durch die Substanzen mit unterschiedlichen Fettlösungseigenschaften gewonnen werden (vgl. 3.1).

Anhand von Tab. 17 und Tab. 18 wird deutlich, dass Substanzklassen- bzw. Extraktionsvarianten mit einem hohen Anteil lipophiler Substanzen wie Oleoresine/Öle und CO₂-Extrakte, Extraktionen mit 100% Ethanol sowie die überwiegend lipophilen Reinsubstanzen eine höhere Lipase-hemmende Aktivität aufweisen als Extraktgruppen, in denen ein eher geringer bzw. gar kein Gehalt an lipophilen Substanzen zu vermuten ist, wie bei Proteinen, Peptiden und wässrigen Eigenextrakten.

Die hohen Lipasehemmungen, die mit der Methylresorufinmethode selbst bei 1/100-Verdünnungen bei neun der wirksamsten Eigenextrakten mit 100% Ethanol ermittelt wurden, konnten bei keiner der Proben mit einer anderen Extraktvariante erzielt werden (Tab. 20).

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass vorwiegend lipophile Substanzen für einen Lipase-hemmenden Effekt verantwortlich sind.

Die Vermutung, Lipase-hemmende Substanzen vor allem in pflanzlichen Proben mit einem hohen Gehalt an lipophilen Verbindungen anzutreffen, konnte bestätigt werden. Im Rahmen zukünftiger Screeningverfahren mit dem Ziel der Identifizierung Lipase-hemmender Aktivität können anhand der Ergebnisse der vorliegenden Studie gezielt die effektivsten Testsubstanzen und Extraktionsverfahren ausgewählt und miteinander kombiniert werden.

Bei den drei Reinsubstanzen, die bei der 1/10-Verdünnung eine > 50%-ige Lipasehemmung bewirkten (Tab. 28), liegt ebenfalls eine überwiegend lipophile Struktur vor. Bei Phloretin handelt es sich um das Aglykon des apfelspezifischen Polyphenols Phloridzin (Abb. 22), welches der Substanzklasse der Dehydrochalkone angehört. Dehydrochalkone wurden bereits von einer japanischen Arbeitsgruppe für den Zweck der Lipasehemmung patentiert [125] und sind vermutlich auch für einen Teil der starken Wirkung von Apfeltrester (Tab. 19) verantwortlich. Ein anderer Teil könnte auf den Pektingehalt von Äpfeln zurückzuführen sein. Dessen Lipase-hemmender Effekt wurde von Tsujita *et al.* [84] nachgewiesen.

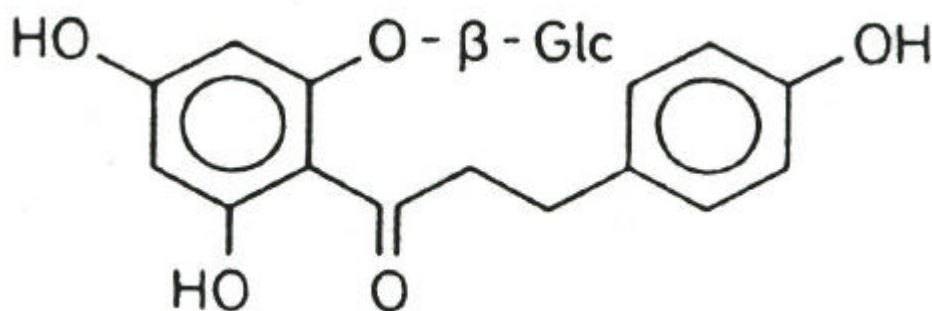


Abb. 22: Struktur des Dehydrochalkons Phloridzin [215]

Die Saponine 18- β -Glyzyrrhetinsäure (Grundgerüst der Saponine in Abb. 23) sowie deren Zinksalz werden aus Süßholz gewonnen und in der Lebensmittelindustrie als Lakritzzusatz verwendet. Han *et al.* [70,76] identifizierten die Saponinfraktionen aus *Camellia sinensis* und *Platycodi radix* als die für die Lipasehemmungen verantwortliche Wirkstoffgruppe von Extrakten aus den jeweiligen Pflanzen. Bei oraler Aufnahme von Saponinen wird für Warmblütler eine letale Dosis (LD_{50}) von 50-1000 mg/kg angegeben, was recht niedrig ist [216]. Die potentielle Toxizität der Saponine beruht auf ihrer starken Oberflächenaktivität, die auf die Anwesenheit von polaren und unpolaren Gruppen zurückzuführen ist. Einzelne Saponine besitzen *in vitro* und nach intravenöser Applikation eine stark hämolytische Wirkung [216]. Eine Anwendung in Form eines funktionellen Lebensmittels ist für

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

18-β-Glyzyrrhetinsäure deshalb nicht empfehlenswert. In Anbetracht dieser Ergebnisse sollten vor einer Anwendung von Lipase-hemmenden Reinsubstanzen generell Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt werden.

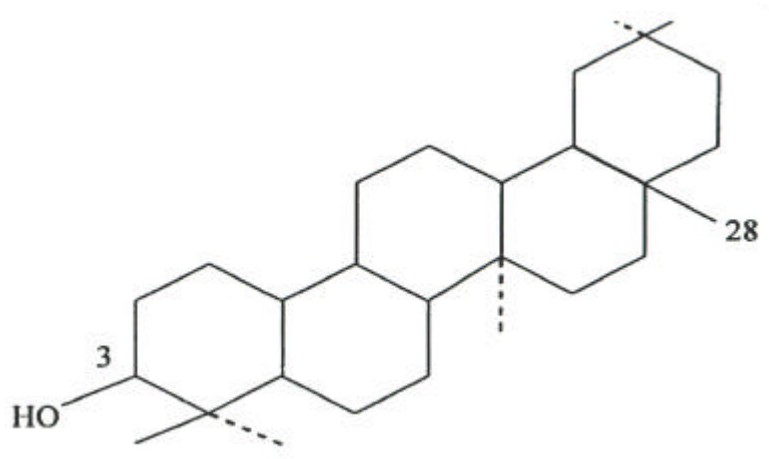


Abb. 23: Triterpengrundgerüst der Saponine, Glycyrrhizinsäure: Disaccharid-Zuckerrest an Position C3 [216]

Keiner der Eigenextrakte aus Weizen, Gerste, Roggen, weißen Bohnen, grünen Erbsen und Soja im ungekeimten sowie im gekeimten Zustand (1 und 3 Tagen Keimung) und aus Weizenkeimen alleine bewirkten in der vorliegenden Studie eine > 50%-ige Lipasehemmung. Diese Ergebnisse können allerdings nicht mit den von Satouchi *et al.* [90] und Borel *et al.* [89] beschriebenen Lipase-hemmenden Wirkungen von Weizenkeimen und -kleie bzw. Sojabohnen verglichen werden, da diese mit Proteinen, die aus der pflanzlichen Matrix isoliert wurden, erzielt wurden. Die in der vorliegenden Studie gewählten Extraktionsverfahren lassen nur geringe Ausbeuten von Proteinen aus diesen Materialien erwarten.

3.3.3 SPR

Der Nachweis der Bindung von Orlistat sowie Substanzen aus Lipase-hemmenden Extrakten an die Lipase konnte mit Hilfe der SPR-Spektroskopie geführt werden (Tab. 22). Die gebundenen Massen für die Lipase mit 0,024 pMol und für Orlistat mit 0,023 pMol verdeutlichen das Bindungsverhältnis von 1:1 dieser beiden Reaktionspartner wie es auch in der Literatur beschrieben wird [63] (vgl. 2.5.1.1).

Da für die Weizenkeime eine große Masse gebundener Substanz angezeigt wurde, kann vermutet werden, dass eine höhermolekulare Substanz, z.B. ein Protein - wie es von Tani *et al.* [87,88] und Borel *et al.* [89] berichtet wird - an die Lipase gebunden hat.

Orlistat geht mit der Lipase eine kovalente Bindung ein. Welche Art Bindung im Einzelfall bei den Pflanzenextrakten vorliegt und ob Interaktionen eventuell auch mit der Colipase eingegangen werden, müssten zukünftige Studien mit der SPR-Technologie zeigen. Nach oraler Zufuhr könnten Wirkstoffe in tieferen Darmabschnitten absorbiert werden. Dies könnte zu einer Begrenzung der Fettassimilation führen, was den Vorteil hätte, dass weniger Nebenwirkungen in Form von Fettstühlen auftreten. Außerdem muss geklärt werden, ob solche Wirkstoffe möglicherweise auch Interaktionen mit der in Leber und Fettgewebe lokalisierten Lipoproteinlipase eingehen. Allerdings sollte keine Inhibition der Lipoproteinlipase im Gefäßbett auftreten, da dies einen verzögerten Abbau der pp TG zur Folge hätte.

3.3.4 Anwendung Lipase-hemmender Testsubstanzen

In einer anschließenden Studie mit Wistarratten wurden Lipase-hemmende Proben untersucht. Hierbei konnte die Extraktion mit 100% Ethanol aus Lapachotee (*Tabebuia impetiginosa*) eine signifikante Erniedrigung der pp TG bewirken [persönliche Mitteilung von Jürgen Schrezenmeir]. Der aus der inneren Rinde des süd-amerikanischen Taheebobaums (Abb. 31) stammende Lapachotee wird sonnengetrocknet und unbehandelt in Form fein zermahlener Spähne (Abb. 33) auf den Markt gebracht. Wissenschaftlich konnten dem Lapachotee bisher zytotoxische Wirkungen auf Tumorzellen nachgewiesen werden [217-221]. Lapachotee enthält Taheebobaum-spezifische Inhaltsstoffe, bei denen es sich um Naphtochinonderivate mit einer überwiegend lipophilen Struktur handelt (Abb. 24). Die im Vergleich zu wässrigen Extrakten erhöhten Lipasehemmungen durch ethanolische Lapachoteeextrakte (Abb. 20) lassen auf eine mögliche Beteiligung lipophiler Substanzen an der Lipasehemmung schließen.

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

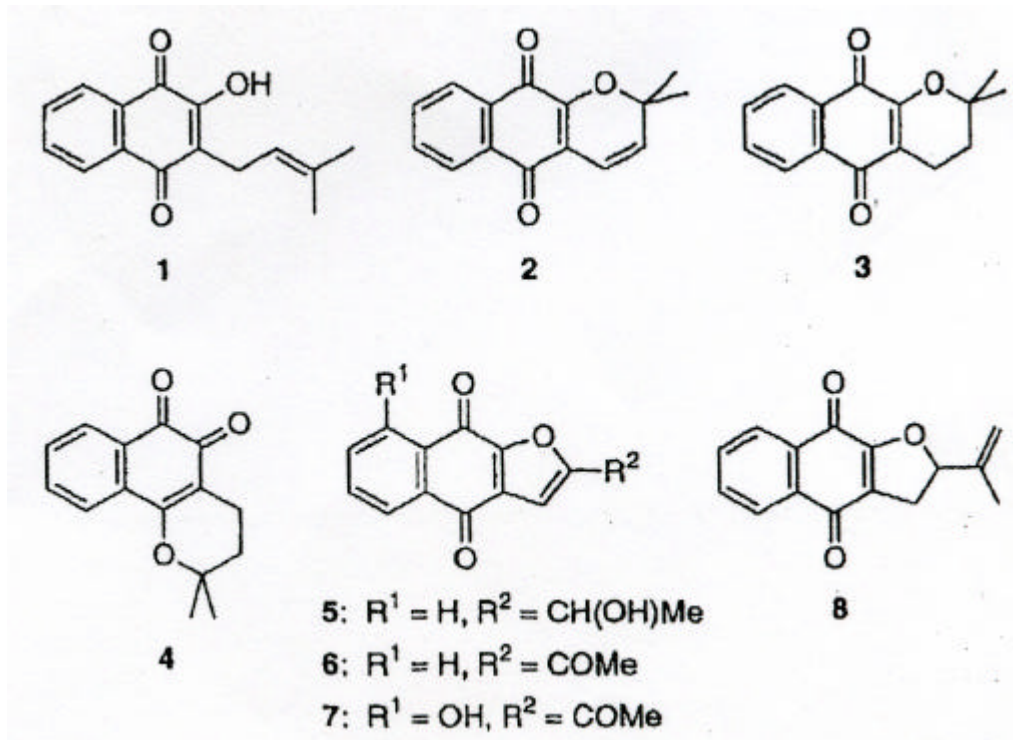


Abb. 24: Inhaltsstoffe des Lapachotees [220], 1: Lapachol, 2: Dehydro-a-Lapachone, 3: a-Lapachone, 4: β-Lapachone, 5-7: Naphto-[2,3-β]furan-4,9-Dione, 8: Dehydro-iso-a-Lapachone

Die Senkung der pp TG-Anstiege durch den Lapachoteeextrakt wurde im Tierversuch an 200 - 250 g schweren Ratten durch die Gabe von 20 mg Lapachoteeextrakt erreicht. Für eine 75 Kg schwere Person entspricht dies 6,6 g Extrakt bzw. 26,6 g Lapachorinde. Da ein Teebeutel ca. 2 g Tee enthält, würde ein ähnlicher Effekt aus mehr als 13 Lapachoteebeuteln herbeigeführt werden und ist daher mit einem Teeaufguß allein kaum erreichbar. Außerdem handelt es sich bei einem Teeaufguß um eine wässrige Extraktion, die einen deutlich geringeren Lipase-hemmenden Effekt erzielt (Abb. 20).

Bei 23 der 24 wirksamsten Testsubstanzen bei der 1/100-Verdünnung in der Methylresorufinmethode (Tab. 19) handelt es sich um Pflanzenextrakte. Ein pflanzlicher Lebensmittelzusatz sollte den Einstrom von Nahrungsfetten in Enterozyten lediglich verzögern anstatt diesen vollständig zu unterbinden, um nach Verzehr Fettstühle zu vermeiden. Ein solches funktionelles Lebensmittel würde den gewünschten gesundheitlichen Effekt auf die Insulinresistenz und das atherosklerotische Risiko durch die Senkung von pp TG-Spiegeln jedoch trotzdem ausüben.

Lipase-hemmende Substanzen können neben einer Anwendung in Form von funktionellen Lebensmitteln für das Metabolische Syndrom auch Verwendung in der Lebensmittelindustrie

3 Bestimmung Lipase inhibitorischer Aktivität von Extrakten und Substanzen pflanzlicher und tierischer Herkunft

finden als Mittel gegen Lebensmittelverderb und Ranzigkeit. Hierfür müssten Lipasehemmende Effekte allerdings auch gegenüber mikrobiellen Lipasen bestehen [56].

3.3.5 Fazit

Das *in vitro* Screening von Proben pflanzlicher und tierischer Herkunft auf Lipasehemmung sollte dem Zweck dienen, Substanzen oder Substanzgemische zu identifizieren, die in der Lage sind, eine Inhibierung der Pankreaslipase hervorzurufen. Untersuchungen von Extraktvarianten und Reinsubstanzen sollten helfen, die möglichen Wirksubstanzen einzunengen, um eine Strategie für deren Isolierung planen zu können. Testsubstanzen mit dieser Eigenschaft sollen in anschließenden Tierstudien auf ihre Wirkung auf die pp TG-Anstiege untersucht werden, um die Wirksamkeit unter physiologischen Bedingungen zu prüfen.

Insgesamt wurden 560 Testsubstanzen auf eine Lipasehemmung untersucht. Dazu wurden zwei Untersuchungsmethoden verwendet:

- 1) Eine schnelle Screeningmethode mit einem synthetischen Diglycerid als Substrat (Methylresorufinmethode) und
- 2) Die Trioleinmethode, die die Hemmung der Lipase bei Verwendung des physiologischen Substrates Triolein überprüft.

Den Ergebnissen dieser Studie zufolge befindet sich das größte Potential Lipasehemmender Verbindungen in pflanzlichen Auszügen mit einem hohen Anteil lipophiler Substanzen.

Unter den 24 wirksamsten Testsubstanzen mit der Methylresorufinmethode befindet sich eine Extraktion mit 100% Ethanol aus Lapachotee (*Tabebuia impetiginosa*). Diese konnte in einer weiteren institutsinternen *in vivo*-Studie an Ratten den gewünschten senkenden Effekt auf die pp TG-Anstiege ausüben [persönliche Mitteilung von Jürgen Schrezenmeir]. Folgestudien z.B. mit SPR und HPLC bleibt es vorbehalten, Wirkstoffe aus dem Lapachotee zu isolieren und zu identifizieren. Eine Humanstudie muss den senkenden Effekt von Lapachoteeextrakt auf die pp TG beim Menschen bestätigen, um die Voraussetzung für die Entwicklung von funktionellen Lebensmitteln für das Metabolische Syndrom zu schaffen.

4 Modulation des Fettsäuretransportes in Caco-2 Zellen durch natürliche und synthetische PPAR_a- und PPAR_g-Liganden

4.1 Materialien

4.1.1 Caco-2 Zellen

Die Caco-2 Zellen wurden über die Firma *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen.

Die Darstellung der einzelnen Chemikalien befindet sich im Anhang (8.2.2).

4.1.2 Medien und Lösungen für die Versuche mit Caco-2 Zellen

Kulturmedium: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
w 3,7 g/L NaHCO₃, w 4,5 g/L D-Glucose,
w 1,028 g/L stable glutamine, w/o Na-Pyruvate,
Low Endotoxin
+ 20% FCS (Fetal Calf Serum)
+ 1% Penicillin / Streptomycin
10000 U / 10000 µg/mL
+ 1% Amphotericin B
+ 1% NEAA (Non-Essential Amino Acids) 100×

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS):

137 mmol/L NaCl
2,7 mmol/L KCl
1,5 mmol/L KH₂PO₄
8 mmol/L Na₂HPO₄
pH 7,6

Trypsin/EDTA Lösung: (0,05% / 0,02% (w/v) in PBS w/o Ca²⁺, Mg²⁺)

Konservierungsmedium: DMEM
(für die Lagerung bei -80°C) + 30% FCS
+ 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

Liganden-Inkubations-Medien: eingesetzte Ligandenkonzentrationen

4 Modulation des Fettsäuretransportes in Caco-2 Zellen durch natürliche und synthetische PPAR(- und PPAR(-Liganden

<u>Versuchs-PBS:</u>	(Tab. 23) gelöst in 0,1% DMSO (siehe PBS) + 180 mmol/L CaCl ₂ + 48 mmol/L Mg Cl ₂
<u>Versuchsmedium I:</u> (Gesamtaufnahme)	PBS (siehe oben) + 10 mmol/L Sodium Taurocholate (Taurocholsäure), (minimum 95% TLC, synthesized from cholic acid) + 0,12 µmol/L tritiummarkierte (³ H)-Palmitinsäure gelöst in Ethanol ([9,10(n)- ³ H]-Palmitinsäure - Spezifische Aktivität 50 Ci/mmol, 1850 MBq/mmol - Radioaktive Konzentration 185 MBq/mL, 1 mCi/mL) + 329,88 µmol/L unmarkierte Palmitinsäure gelöst in Ethanol Endkonzentration an Ethanol: 0,5% (v/v)
<u>Stoppmedium I (4°C):</u>	PBS (siehe oben) + 0,5% Albumin Bovine Serum (BSA), (Fatty Acid free, Low Endotoxin, Cell Culture Tested)
<u>NaOH:</u>	1 N Natronlauge
<u>Versuchsmedium II:</u> (unspezifische Bindung)	PBS (siehe oben) + 10 mmol/L Sodium Taurocholate (Taurocholsäure), (minimum 95% TLC, synthesized from cholic acid) + 330 µmol/L unmarkierte Palmitinsäure gelöst in Ethanol + 0,1% Ethanol (v/v) Endkonzentration an Ethanol: 0,5% (v/v)

Trypsins inaktiviert und gleichzeitig teilweise das cytotoxische EDTA gebunden. Daraufhin wurden die Zellen durch sorgfältiges Suspendieren vereinzelt, in ein 50 mL Schraubröhrchen (Sarstedt) überführt und bei $86 \times g$ (Labofuge, Heraeus Sepatech) für 5 min zentrifugiert. Die Zellen wurden nun ein weiteres mal mit 10 mL PBS gewaschen und wiederholt bei $86 \times g$ für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und auf Gewebekulturflaschen ausgesät. Bei diesem Schritt der Subkultivierung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 70-90% 1/3 bis 1/4 verdünnt.

4.2.2 Lagerung (Langzeitkonservierung)

Um Versuchsfreiheit zu gewähren, wurden die durch Proliferation vermehrten Zellen (4.2.1) bei -80°C zwischengelagert. Die Lagerung dient dem Schutz der Zellen vor Kontamination und unterbindet die Stoffwechselaktivität sowie die Zellvermehrung vollständig und reversibel.

Die Zellen werden vor dem Einfrieren in ein spezielles Konservierungsmedium überführt (4.1.2), welches aus DMEM, FCS sowie der Schutzsubstanz Dimethylsulfoxid (DMSO) besteht. DMSO verhindert die Eiskristallbildung innerhalb und außerhalb der Zelle, die zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen führen würde.

Die Langzeitkonservierung der Caco-2 Zellen wurde bei einer Konfluenz von 70-90% durchgeführt. Zunächst erfolgte ein dreimaliges Spülen mit PBS. Danach wurden die Zellen mittels Trypsin/EDTA-Behandlung (10 min im Brutschrank) in der Gewebekulturflasche abgelöst, zweimal gewaschen (einmal mit serumhaltigen Kulturmedium zur Inaktivierung der Trypsin/EDTA-Lösung und einmal mit PBS zur Entfernung der Trypsin/EDTA-Reste) in das auf Eis vorgekühlte Konservierungsmedium überführt. Pro Kryoröhrchen (Nunc) wurden 1,5 mL Zellsuspension mit $2,6 \times 10^6$ Zellen gegeben. Eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox (Nunc) ermöglicht anschließend ein kontinuierliches Absenken der Temperatur der Kryoröhrchen von $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ bis auf -80°C , um die Vitalität der Zellen zu gewährleisten, die stark von der Abkühlungsgeschwindigkeit abhängt.

4.2.3 Zellzahlbestimmung

Vor dem Einfrieren der Zellen zum Zweck der Langzeitkonservierung ist es vorteilhaft, die Zellzahl im einzelnen Kryoröhrchen einzustellen. Auf dieser Grundlage kann später die gewünschte Zellzahl pro Well direkt ausgesät werden. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt.

Hierfür wird ein Aliquot (ca. 10 µl) der Zellsuspension zwischen ein Deckglas und die Zählkammer gegeben, wobei Kapillarkräfte die Suspension in den Zwischenraum ziehen. Jede der neun Felder der Neubauer-Zählkammer weist ein Volumen von 0,1 µl auf [222].

Um die Zellzahl pro mL der untersuchten Zellsuspension zu ermitteln, wurden vier dieser Felder anschließend ausgezählt, der Mittelwert gebildet und mit 10^4 multipliziert. Die Gesamtzellzahl ergab sich durch die Hochrechnung auf das Volumen der eingesetzten Zellsuspension.

4.2.4 Fettsäureaufnahme

Für die Versuche zur Untersuchung des Effektes von PPAR γ - und PPAR α -Liganden auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen wurde eine Methode zur Bestimmung des Fettsäuretransportes in CaCo-2-Zellen übernommen [223], die eine Optimierung der Methodik von Trotter *et al.* [145] sowie von Ho und Storch [129] bezüglich Ethanolkonzentration, Fettsäuresubstrat und Inkubationszeitraum der Versuchsmedien darstellt.

4.2.4.1 Kultivierung der Caco-2 Zellen vor dem Assay zur Fettsäureaufnahme

Die Caco-2 Zellen wurden vor der Ligandeninkubation über 15 Tage für den Assay zur Fettsäureaufnahme in 12-Wellplatten (Nunc) kultiviert.

Dafür wurden die Caco-2 Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und in 48 mL 37°C warmes Kulturmedium aufgenommen. Nach Suspendierung wurden die Zellen bei $86 \times g$ für 5 min zentrifugiert, mit warmem PBS gewaschen und nochmals zentrifugiert ($86 \times g$ für 5 min). Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 37°C warmes Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert.

Die Aussaat der Zellen aus den Kryoröhrchen (Passage 5-12) erfolgte auf die 12-Wellplatten in einer Dichte von ca. $3,5 \times 10^4$ Zellen/cm².

Das Medium (2 mL Kulturmedium/Well) wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Caco-2 Zellen erreichten die 100%-ige Konfluenz nach ca. 5 Tagen. Die Kultivierung erfolgte anschließend über 10 Tage postkonfluent, bevor über 48 h mit den Liganden inkubiert wurde.

4.2.4.2 Herstellung der Ligandenkonzentrationsreihen

Nach 10 Tagen Postkonfluenz wurden die Zellen zur Bestimmung der Fettsäureaufnahme unter Einfluss verschiedener PPAR γ - und PPAR α -Liganden für 48 h vor dem Assay mit den jeweiligen Liganden in verschiedenen Konzentrationen inkubiert (Tab. 23).

4 Modulation des Fettsäuretransportes in Caco-2 Zellen durch natürliche und synthetische PPAR(- und PPAR(-Liganden

Um die Vergleichbarkeit mit anderen institutsinternen Studien, die ebenfalls den Einfluss von PPAR-Liganden auf Stoffwechselfunktionen in Zellkultur untersuchten, zu wahren, wurden in der vorliegenden Arbeit die Ligandeninkubationszeit von 48 h sowie die Konzentrationen der PPAR γ -Liganden Troglitazone und GW1929 von diesen Studien übernommen, in denen die Ligandenwirkung an 3T3-L1 Adipozyten getestet wurde [224].

Die Konzentrationen des PPAR γ -Antagonisten GW9662, des PPAR α -Agonisten GW7647 sowie des PPAR α -Antagonisten MK886 wurden in Anlehnung an Publikationen gewählt (Tab. 23). Da sich in Vorversuchen beim Einsatz von 50 $\mu\text{mol/L}$ MK886 die Zellen während der 48 h Inkubation jedoch stark vom Boden der Kulturplatten lösten, wurden anstelle der 50 $\mu\text{mol/L}$ die von Huang *et al.* [186] eingesetzten 20 $\mu\text{mol/L}$ MK886 gewählt.

Die Stammlösungen wurden nach Herstellerempfehlung in reinem DMSO hergestellt. Die Konzentration an DMSO für die Inkubation der Zellen wurde durch Verdünnen mit Kulturmedium auf 0,1% eingestellt.

Tab. 23: Eingesetzte Ligandenkonzentrationen in den Versuchen zur Palmitinsäureaufnahme

Konzentrationen [nmol/L]	Troglitazone	GW1929	GW9662	GW7647	MK886
0	×	×	×	×	×
1	×	×			
10	×	×		×	
100	×	×		×	
1000	×	×	×	×	×
10000			×		×
20000					×
Referenz (verwendeter Zelltyp)			225 (Fibroblasten) 226 (CD4* und CD8* Zellen)	183 (HG5LN Zellen*) 186 (THP-1 Zellen*) 184 (humane primäre Skelettmuskelzellen)	227 (CV-1 und A549 Zellen*)

*

CD4, CD8	Glycoproteine, die primär in T-Helferzellen exprimiert werden
HG5LN	Durch 2-Schritt-Transfektion von humanen Hepatozyten erhaltene stabile Zelllinie
THP-1	human acute leukemia monocytes
CV-1	Fibroblasten aus Affennieren
A549	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom

4.2.4.3 Herstellung der Versuchsmedien

Die Versuchsmedien (I oder II) enthielten die langkettige Fettsäure Palmitinsäure, wurden am jeweiligen Versuchstag neu angesetzt und vor Versuchsbeginn auf 37°C erwärmt. Dadurch wurden die Fettsäuren im Medium gelöst sowie physiologische Bedingungen simuliert.

Versuchsmedium I:

Die Fettsäurekonzentration, der Ethanolgehalt und die spezifische Aktivität des Versuchsmediums I wurden durch Zusatz von tritiummarkierter und unmarkierter Palmitinsäure zum Medium eingestellt. Die Zugabe von markierter und unmarkierter Palmitinsäure erfolgte in Form einer ethanolischen Stammlösung zum Versuchsmedium [223].

Da in den Untersuchungen von Trotter *et al.* [145] die maximale Fettsäuretransportrate in Caco-2 Zellen bei einer Konzentration von 330 µmol/L errechnet wurde, wurde diese Fettsäurekonzentration gewählt. Die Lösung enthielt zusätzlich 10 mmol/L Taurocholsäure. Die spezifische Aktivität der Palmitinsäure im Versuchsmedium betrug 370 Bq/nmol (0,01 µCi/nmol).

Versuchsmedium II:

Dem Versuchsmedium II wurde ausschließlich unmarkierte Palmitinsäure in Form einer ethanolischen Stammlösung zugesetzt [223]. Die Konzentration wurde hier ebenfalls auf 330 µmol/L eingestellt, gelöst in 10 mmol/L Taurocholsäure.

In Voruntersuchungen hatte die in den Versuchsmedien I und II eingesetzte Ethanolkonzentration von 0,5% (v/v) keinen Einfluß auf die Fettsäureaufnahme. Diese Ethanolkonzentration ergab sich aus den zugesetzten Volumina der ethanolischen Stammlösung, in welchen die markierte und unmarkierte (Versuchsmedium I) bzw. die unmarkierte (Versuchsmedium II) Palmitinsäure gelöst waren.

In Anlehnung an physiologische Gallensäurekonzentration im Dünndarmlumen wurde die Taurocholsäurekonzentration bei der Versuchsmedien (I und II) auf 10 mmol/L, gelöst in PBS, eingestellt.

4.2.4.4 Erfassung der Palmitinsäureaufnahme unter Einfluss der PPAR-Liganden

Die Bestimmung der Palmitinsäureaufnahme in die Caco-2 Zellen erfolgte durch die Messung der in die Zellen aufgenommenen (Assay für die Gesamtpalmitinsäureaufnahme, 4.2.4.5) sowie der nach dem Versuch unspezifisch an die Zellen gebundenen Radioaktivität (Assay für die unspezifischen Bindung, 4.2.4.6). Zur Messung der initialen Fettsäureaufnahme wurden die Zellen über einen Zeitraum von exakt 10 Sekunden mit 500 µL des

4 Modulation des Fettsäuretransportes in Caco-2 Zellen durch natürliche und synthetische PPAR(- und PPAR(-Liganden

radioaktiven Versuchsmedium I inkubiert. Zur Messung der unspezifisch an die Zellwand gebundenen Fettsäuren wurden die Zellen über einen Zeitraum von exakt 10 Sekunden mit 500 µL des Versuchsmedium II inkubiert und anschließend mit dem radioaktiven Stoppmedium II behandelt. Die anschließend gemessene Radioaktivität des Versuches der unspezifischen Bindung wurde von der gemessenen Radioaktivität des Versuches der Gesamtaufnahme abgezogen. Das Ergebnis wurde als Gesamtfettsäureaufnahme interpretiert.

Abb.25 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der Versuchsdurchführung.

4 Modulation des Fettsäuretransportes in Caco-2 Zellen durch natürliche und synthetische PPAR(- und PPAR(-Liganden

Aussaat der CaCo-2 Zellen auf 12-Wellplatten

↓ 5 Tage

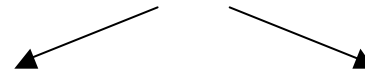
Konfluenz

↓ 10 Tage Postkonfluenz

Ligandeninkubation

↓ 48 h

Versuch (17 Tage nach Aussaat)



1 Gesamtaufnahme

- 3 x waschen mit 1 ml serumfreiem DMEM (37°C)
- 1,5 h Inkubation mit serumfreiem DMEM
- 3 x waschen mit 1 ml Versuchs-PBS (37°C)
- 10 sec Inkubation mit 500 µl Versuchsmedium I (³H-Palmitinsäure, 37°C)
- 1 ml Stoppmedium I (4°C)
- 3 x waschen mit 1 ml Stoppmedium I (4°C)
- 500 µl NaOH zum Lösen der Zellen



Aliquot von 300 µl zur Messung im β -Counter

2 Unspezifische Bindung

- 3 x waschen mit 1 ml serumfreiem DMEM (37°C)
- 1,5 h Inkubation mit serumfreiem DMEM
- 3 x waschen mit 1 ml Versuchs-PBS (37°C)
- 10 sec Inkubation mit 500 µl Versuchsmedium II (37°C)
- 1 ml Stoppmedium II (³H-Palmitinsäure, 4°C)
- 3 x waschen mit 1 ml Stoppmedium I (4°C)
- 500 µl NaOH zum Lösen der Zellen



Aliquot von 300 µl zur Messung im β -Counter

Abb. 25: Fließschema der Versuchsdurchführung bei der Fettsäureaufnahme

4.2.4.5 Assay für die Gesamtpalmitinsäureaufnahme

Die Versuche zur Fettsäureaufnahme erfolgten 17 Tage nach der Zellaussaat. Um Albumin- und eventuelle Fettsäurerückstände des Serums im Kultivierungsmedium zu entfernen, wurde vor der Versuchsdurchführung die Oberfläche der Zellen dreimal mit 1 mL serumfreiem DMEM (37°C) gespült und anschließend für 1,5 h in serumfreiem DMEM im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Albumin bindet Fettsäuren mit einer sehr hohen Affinität [228] und kann infolge dessen die Aufnahme der Fettsäuren in die Caco-2 Zellen verhindern. Ein Auslassen dieses Waschschruttes könnte die Versuchswerte somit verfälschen.

Unmittelbar vor dem Versuch wurde das serumfreie Medium abgezogen und die Oberfläche der Zellen dreimal mit 1 mL Versuchs-PBS (37°C) gespült, um DMEM-Reste vollständig zu entfernen (Abb. 25). Um einem frühzeitigen Ablösen der Zellen von den Wells entgegenzuwirken, wurde dieses Versuchs-PBS mit CaCl_2 sowie MgCl_2 supplementiert (4.1.2).

Die folgenden Schritte (Abb. 25) wurden zügig durchgeführt. Zunächst wurde das Versuchs-PBS abgezogen und das radioaktiv markierte Versuchsmedium I (37°C) mit der darin enthaltenen markierten und unmarkierten Palmitinsäure auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubationszeit von exakt 10 Sekunden. Danach wurde das Medium entfernt und sofort 1 mL des eiskalten Stoppmediums I (4°C) auf die Zellen gegeben, um eine weitere Fettsäureaufnahme weitestgehend zu verhindern. Daraufhin wurde die Oberfläche der Zellen dreimal mit 1 mL eiskaltem Stoppmedium I gespült, um die Zellen von allen anhaftenden Fettsäuren zu befreien.

Um die Zellen zu lysieren bzw. von den Wells zu lösen wurde abschließend 500 μl NaOH auf die Zellen gegeben (Abb. 25). Gründliches Suspendieren brachte eine homogene Zellsuspension hervor. Hiervon wurde ein Aliquot von 300 μl entnommen und in ein Szintillationsröhrchen überführt, mit 4 mL Szintillationsflüssigkeit versetzt und gut vermischt. In einem Szintillationszähler (β -Counter) wurde schließlich die radioaktive Strahlung der aufgenommenen Palmitinsäure gemessen. Als Maß für die Fettsäureaufnahme galten die gezählten Ereignisse pro Minute (counts per minute, *cpm*).

4.2.4.6 Assay für die unspezifische Bindung

Unspezifisch an die Zellwand der Caco-2 Zellen gebundene Palmitinsäure, die nach dem Assay durch das Spülen der Zellen mit dem Stoppmedium I nicht entfernt wurde, kann die Aufnahmewerte durch das Vortäuschen einer erhöhten Fettsäureaufnahme in die Zellen verfälschen. Um diese Fettsäuren zu ermitteln, wurde in einem separaten Versuch die unspezifische Bindung (Adhäsion) ermittelt. Durch Abzug der Werte dieses Versuchs von den Werten der Gesamtaufnahme kann auf die absolut in die Zellen aufgenommene

Palmitinsäure (aktiver Transport + durch Diffusion in die Zellen gelangte Palmitinsäure) geschlossen werden.

Um die unspezifische Bindung zu erfassen, wurden die Zellen mit dem Versuchsmedium II (37°C) inkubiert, welches in Ethanol gelöste unmarkierte Palmitinsäure enthielt (4.1.2). In diesem Assay wurde die radioaktiv markierte Palmitinsäure dem Stoppmedium II zugesetzt (4.1.2). Der Versuchsablauf der unspezifischen Bindung glich dem der Gesamtaufnahme (Abb. 25). Zunächst wurden die Zellen nach der Inkubation mit serumfreiem DMEM über 1,5 h dreimal mit PBS gespült. Anschließend wurde für 10 Sekunden das warme (ohne tritiummarkierte Palmitinsäure) auf die Zellen gegeben. Nach Entfernung des Versuchsmediums II wurde die Zelloberfläche mit eiskaltem Stoppmedium II (mit tritiummarkierter Palmitinsäure und mit einem Zusatz von BSA) behandelt, welches zügig wieder abgezogen wurde [145]. Durch die Kühlung des Stoppmediums II sollte die Aufnahme der tritiummarkierten Fettsäure in die Zellen vermindert werden. Durch die Zugabe von BSA (4.1.2) in das Stoppmedium II sollte die Aufnahme der Palmitinsäure in die Zellen zusätzlich verhindert werden. Analog dem Assay für die Gesamtpalmitinsäureaufnahme folgte ein dreimaliges Spülen mit eiskaltem Stoppmedium I (4.1.2, Abb. 25). Abschließend wurden die Zellen mit 500 µL NaOH lysiert, ein Aliquot von 300 µl dieser Zellsuspension mit 4 mL Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationsröhrchen gut vermischt und dieses im β -Counter gemessen. Die bei diesem Versuchsansatz ermittelten *cpm*-Werte wurden als unspezifisch gebundene Palmitinsäure interpretiert.

Für die verschiedenen Versuchsreihen wurden 4 bis 12 Einzelversuche durchgeführt.

Die Szintillationsmessungen in *cpm* wurden folgendermaßen in % Gesamtpalmitinsäureaufnahme, % unspezifische Bindung und daraus folgernd in % Nettopalmitinsäureaufnahme umgerechnet:

$$\frac{\text{Gesamtpalmitinsäureaufnahme in die Zellen} / \text{Well VersuchsmEDIUM I (cpm)}}{\text{pro Well inkubierte Radioaktivität VersuchsmEDIUM I (cpm)}} \times 100(\%)$$

-

$$\frac{\text{Gesamtpalmitinsäureaufnahme in die Zellen} / \text{Well Stoppmedium II (cpm)}}{\text{pro Well inkubierte Radioaktivität Stoppmedium II (cpm)}} \times 100(\%)$$

= % Nettopalmitinsäureaufnahme

4.2.5 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus Caco-2 Zellen wurde mit einer Silikat-Gel-Membran in einer Filtersäule als RNA-bindende Matrix durchgeführt, die für Mikrozentrifugation geeignet und mit separatem Auffanggefäß ausgestattet war und somit ein zügiges Durchführen der Binde-, Wasch- und Elutionsschritte ermöglichte. Das Extraktions-Kit wurde von der Firma Quiagen (RNeasy Mini Kit) bezogen und enthielt alle notwendigen Chemikalien und Hilfsmittel (8.2.4, 8.3.2). Die RNA-Extraktion erfolgte unter einem für RNA-Arbeiten separiertem Abzug. Nach 48 h wurde die Ligandeninkubation durch Abzug des Inkubationsmediums von den Wells gestoppt, die Caco-2 Monolayer 2 × mit PBS gewaschen und danach das PBS komplett abgezogen. Die Zelllyse in 6-Well-Platten erfolgte durch Auf- und Abpipettieren der Zellen nach Zugabe von 3 × 700 µL Lysispuffer (RNeasy-Mini-Kit, frisch versetzt mit 1%-igem 2-β-Mercaptoethanol). Die Lysate wurden in 15 mL-Röhren (Sarstedt) überführt, auf einem Reagenzglasschüttler geschüttelt, in 1,5 mL Rnase-freien Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

Im ersten Schritt der RNA-Isolation wurden die aufgetauten Lysate durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren homogenisiert und in Quiashredder-Säulen, die auf einem 2 mL Reaktionsgefäß platziert waren, überführt und durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 6625 × g homogenisiert. Dem Überstand, der keine unlöslichen Bestandteile enthielt, wurde 1 Volumen 70%-iger Ethanol (v/v) zugefügt. Nach Schütteln auf dem Reagenzglasschüttler wurden die Lysate auf Säulen gegeben, bei 6625 × g für 15 Sekunden zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im nächsten Schritt wurden 700 µL des Waschpuffers RW1 auf die Säulen pipettiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurde ein DNA-Verdau mit DNase durchgeführt: ein Gemisch aus 70 µL RDD und 10 µL DNase-Stock

wurde direkt auf die Mitte der Membran gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde erneut mit 350 µL RW1 Puffer 15 Sekunden zentrifugiert. Danach wurden die Auffanggefäße erneuert. Es folgten zwei Waschschrte mit jeweils 500 µL des Ethanol-Waschpuffers (RPE). Zunächst wurde wie beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurde der Durchfluss verworfen, erneut RPE-Puffer auf die Säulen gegeben und für 2 Minuten bei 6625 x g zentrifugiert. Das Auffanggefäß wurde verworfen und die Säulen in sterile, verschließbare 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt. Zum Schluss wurde die RNA mit 30 µL RNase-freiem Wasser bei 6625 x g eine Minute eluiert. Die Proben wurden sofort bei -80°C gelagert. Zur Überprüfung des Ergebnisses wurden Konzentration und Reinheit im Spektrophotometer bestimmt. Für die Konzentration der RNA gilt dabei:

$$\frac{\text{Extinktion}_{260 \text{ nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 40}{1000 \times \mu\text{g} / \mu\text{l}} = \mu\text{g RNA} / \mu\text{l}$$

Einen Anhalt über die Reinheit der RNA erhält man durch den Quotienten aus den Absorptionen (A_{260 nm}/ A_{280 nm}), der zwischen 1,7 und 1,9 liegen sollte. Die RNA-Integrität wurde mit Hilfe der Elektrophorese in einem Agarosegel kontrolliert, indem die 18S und 21S Bande dargestellt wurden.

4.2.6 Qualitative RT-PCR

Um den Nachweis zu erbringen, dass die Fettsäure-Bindungsproteine FABP1, FABP2 und FABP6, das Fettsäure-Transportprotein FATP4 sowie PPAR γ tatsächlich in den im Rahmen dieser Studie eingesetzten Caco-2 Zellen exprimiert werden, wurde eine Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) zum qualitativen Nachweis mit gelelektrophoretischer Auswertung durchgeführt.

Die spezifischen Oligonukleotid-Primerpaare für die nachzuweisenden Gene FABP1, FABP2, FABP6, FATP4 und PPAR γ sowie für die endogenen Kontrollgene β -Actin und GAPDH wurden den in Genbank™ publizierten Sequenzen entnommen. Es wurde darauf geachtet, dass die Primersequenzen zwischen 17 und 20 Basen lang waren (Tab. 24), einen GC-Gehalt von 50-60% aufwiesen, eine annähernd gleiche Schmelztemperatur hatten und eine Dimerbildung weitgehend ausgeschlossen war. Außerdem sollten sie am 3'-Ende ein C oder G haben, um eine bessere Bindung und Elongation zu erhalten. Die Primer sollten keine internen Sekundärstrukturen, wie z.B. Haarnadeln (hair pins) bilden, weil dies zu einer Reduzierung der Bindung an das Template führen würde. Außerdem dürfen die Primer nicht miteinander hybridisieren und sollten eine sehr geringe Komplementarität an ihren Enden besitzen, da dies zur Bildung von Primerdimeren führen könnte.

4 Modulation des Fettsäuretransportes in Caco-2 Zellen durch natürliche und synthetische PPAR(- und PPAR(-Liganden

Tab. 24: Primer für die RT-PCR

Gen	Primersequenz	Produktlänge
β-Actin	Forward 5' - atggtgggcatgggtcagaag - 3'	764 bp
	Reverse 5' - cactgtgtggcgtacaggtc - 3'	
GAPDH	Forward 5' - gggaaggtgaaggtcggagtc - 3'	508 bp
	Reverse 5' - acgataccaaagttgtcatggatg - 3'	
FATP4	Forward 5' - tggccaagctcgggtgtgg - 3'	416 bp
	Reverse 5' - gagtggttagagggggagg - 3'	
FABP1	Forward 5' - ggggtgcggaaatcgtgc - 3'	213 bp
	Reverse 5' - catggtattggtgattatgtc - 3'	
FABP2	Forward 5' - gacagcacttgaaggtagac - 3'	475 bp
	Reverse 5' - tacttgatgggtgaaataaatag - 3'	
FABP6	Forward 5' - ggcctccagcctcccagc - 3'	277 bp
	Reverse 5' - caccagcttcccgcctc - 3'	
PPAR γ	Forward 5' - accaacttgggatcagctcc - 3'	357 bp
	Reverse 5' - tgcatcctcacaagcatgaac - 3'	

Die Primer wurden bei der Firma MWG Biotech synthetisiert. Nach Erhalt wurden die lyophilisierten Primer mit destilliertem Wasser in einer Konzentration von 100 pmol/L aufgelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Für die PCR wurden pro Probe auf Eis ein Ansatz aus

- 2,5 μ L 10 \times PCR Puffer ohne Mg
- 0,5 μ L 10 mmol/L dNTPs
- 0,75 μ L 50 mmol/L MgCl₂
- 0,6 μ L Forward Primer
- 0,6 μ L Reverse Primer
- 0,125 μ L Taq DNA Polymerase
- 20 μ L RNase freies Wasser

zusammenpipettiert und 1,5 μ L Probe vorsichtig zugegeben.

Die Ansätze mit FABP2-, PPAR γ -, GAPDH- sowie β-Aktin-Primern durchliefen im Thermocycler folgendes Programm:

- 1) 3 min 94°C (primärer Denaturierungsschritt)
- 2) 30 sek 94°C (Denaturierung)
- 3) 30 sek 57°C (Primer-Annealing)
- 4) 45 sek 72°C (Gegenstrangsynthese)
- 5) 10 min 72°C

Die Schritte 2-4 wurden als Zyklus 35 mal wiederholt.

Der Ansatz mit dem FABP1-Primer durchlief im Thermocycler folgendes Programm:

4 Modulation des Fettsäuretransportes in Caco-2 Zellen durch natürliche und synthetische PPAR(- und PPAR(-Liganden

- 1) 3 min 94°C (primärer Denaturierungsschritt)
- 2) 30 sek 94°C (Denaturierung)
- 3) 30 sek 54°C (Primer-Annealing)
- 4) 45 sek 72°C (Gegenstrangsynthese)
- 5) 10 min 72°C

Die Schritte 2-4 wurden als Zyklus 35 mal wiederholt.

Die Ansätze mit FATP4- und FABP6-Primern durchliefen im Thermocycler folgendes Programm:

- 1) 3 min 94°C (primärer Denaturierungsschritt)
- 2) 1 min 94°C (Denaturierung)
- 3) 30 sek 64°C (Primer-Annealing)
- 4) 45 sek 72°C (Gegenstrangsynthese)
- 5) 30 sek 94°C (finale Gegenstrangsynthese)
- 6) 30 sek 62°C
- 7) 45 sek 72°C
- 8) 30 sek 94°C
- 9) 30 sek 60°C
- 10) 45 sek 72°C
- 11) 10 min 72°C

Die Schritte 2-4 und 5-7 wurden als Zyklus 5 mal wiederholt, die Schritte 8-10 je 30 mal.

Von den amplifizierten Produkten wurden je 15 µL mit 4 µL Loding buffer versetzt und dann je 16 µL auf ein DNA-Gel aufgetragen.

DNA-Gel

Für ein 50 mL Gel wurden 50 mL TAE-Puffer und 1 g Agarose zum Kochen gebracht und wieder abgekühlt, mit 3 µL Ethidiumbromid versetzt und in eine mit einem Kamm ausgestatteten Gelkammer gegossen. Die Gelkammer wurde in eine Elektrophoresekammer gesetzt, mit 1xTAE-Puffer aufgefüllt und genau 16 µL der Proben in die Taschen gefüllt. Als Größenmarker wurde 6 µL einer 1000 bp DNA Leiter (Invitrogen) mit aufgetragen. Bei einer Spannung von 90 Volt wurden die Proben 30-45 Minuten laufen gelassen. Bei allen PCR-Reaktionen wurden regelmäßig Negativkontrollen mitgeführt, um mögliche Kontaminationen des Reaktionsansatzes zu überprüfen. Das Ergebnis wurde photographisch festgehalten.

Als Positivkontrolle fungierte eine RNA-Probe aus humanen Duodenumzellen.

4.2.7 Bestimmung freier Fettsäuren im FCS

Um die im FCS enthaltenen freien Fettsäuren zu bestimmen, wurde der Wako NEFA C-Test, ein enzymatischer Farbttest zur quantitativen *in vitro*-Bestimmung der freien Fettsäuren in Serum und Plasma, an einem Autoanalyser für die klinische Chemie (Konelab 20i, Kone) durchgeführt.

Das Prinzip des Tests beruht auf drei Schritten. Im ersten Schritt werden die freie Fettsäuren (Non-Esterified-Fatty-Acids - NEFAs) unter Verbrauch von ATP mit CoA-SH durch die Acyl-CoA-Synthetase (ACS) in Acyl-CoA, AMP und Diphosphat überführt. Im zweiten Schritt werden Acyl-CoA und Sauerstoff durch die Acyl-CoA-Oxidase in 2,3-trans-Enoyl-CoA und Wasserstoffperoxid umgewandelt. Im dritten Schritt wird dieses Wasserstoffperoxid mit 4-Aminophenazon und 3-Methyl-N-Ethyl-N-(β -hydroxyethyl)anilin (MEHA) durch die Peroxidase in Chinonimin-Farbstoff und Wasser überführt. Die Intensität dieses roten Farbstoffes ist proportional der Konzentration unveresterter Fettsäuren in der Probe und wird bei 550 nm bestimmt.

Es wurden 6 Einzelmessungen in einer 5-fach-Bestimmung durchgeführt und anschließend der Mittelwert gebildet.

4.2.8 MTT-Vitalitätstest

Der MTT-Test ist ein quantitativer, nicht-radioaktiver, kolorimetrischer Assay und eignet sich für die Messung der Zytotoxizität von Substanzen. Der Test basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliumsalses (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid) - kurz MTT - zu lilafarbenen Formazankristallen durch Dehydrogenasen der Zellen. Die Absorption der Formazankristalle kann spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 550 bis 600 nm in einem Multiwell Spektrophotometer (ELISA reader) bestimmt werden. In diesem nm-Bereich absorbiert MTT nicht.

Je geschädigter die Zellen sind, desto weniger MTT-Reagenz wird durch intrazelluläre Dehydrogenasen in das farbige Reaktionsprodukt Formazan umgewandelt. Daher dient die Umwandlung von MTT als Maß für die metabolische Aktivität der Zellen [229].

Durch den MTT-Test wurde der Einfluss der PPAR γ - und PPAR α -Liganden und des DMSO-Gehaltes von 0,1% auf die Vitalität der Caco-2 Zellen überprüft. Für die Durchführung des Tests wurden Caco-2 Zellen in 96-Wellplatten ausgesät und für 15 Tage kultiviert. Es folgte die Ligandeninkubation über 48 h mit allen untersuchten Ligandenkonzentrationen. Der MTT-Test wurde am 17. Tag nach der Aussaat durchgeführt.

Dazu wurden den auf jedem Well befindlichen exakt 200 μ L Inkubationsmedium 20 μ L MTT-Reagenz (4.1.3) zugefügt und für 4 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde

das Medium sorgfältig von den Zellen abgezogen und auf jedes Well 100 µL Aufschlusslösung (saures Isopropanol) (4.1.3) gegeben. Durch intensives Schütteln (30 min) wird der während der Inkubation gebildete Farbstoff vollständig aus den Zellen herausgelöst und abschließend im ELISA reader auf den 96-Wellplatten bei 570 nm gemessen.

4.2.9 Statistik

Die Ergebnisse aus den Einzelversuchen wurden als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung (SD) in % zur gesamt eingesetzten Palmitinsäure angegeben. Diese wurden in den Abbildungen zum einen als Gesamtaufnahme zusammen mit der unspezifischen Bindung und zum anderen als sich daraus ergebende Nettopalmitinsäureaufnahme dargestellt.

Ein $p < 0,05$ im Student-t-Test wurde als Signifikanzgrenze festgelegt. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Programms SigmaPlot 9.0 2004 (Systat Software GmbH) durchgeführt.

4.3 **Ergebnisse Fettsäureaufnahme**

4.3.1 **Palmitinsäureaufnahme unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten Troglitazone**

Der PPAR γ -Agonist Troglitazone bewirkte mit Werten von 2,28 bis 2,55% Aufnahme des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes keine signifikanten konzentrationsabhängigen Unterschiede der Gesamtpalmitinsäureaufnahme (Abb. 26). Auch die unspezifisch an die Caco-2 Zellen gebundene Palmitinsäure mit Werten von 0,47 bis 0,68% des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes unterlag keinen signifikanten Schwankungen (Abb. 26). Troglitazone bewirkte darüber hinaus mit Werten von 1,81 bis 2,00% Aufnahme des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes keine signifikanten konzentrationsabhängigen Unterschiede der Nettopalmitinsäureaufnahme (Abb. 26).

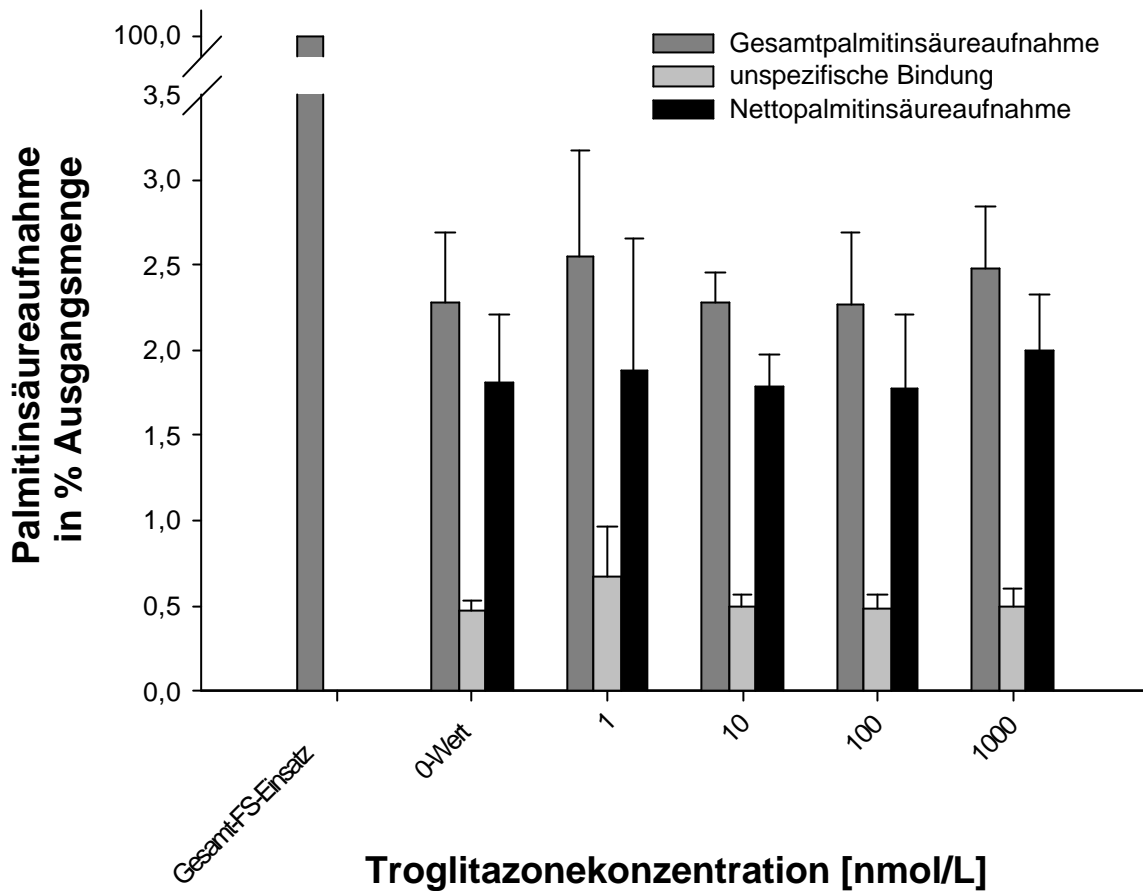


Abb. 26: Gesamtaufnahme, unspezifische Bindung und Nettoaufnahme von ^3H -Palmitinsäure in Caco-2 Zellen unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten Troglitazone in verschiedenen Konzentrationen (n = 6).

Die Ligandeninkubation erfolgte über einen Zeitraum von 48 h vor dem Assay mit den Troglitazone-Konzentrationen 1, 10, 100 und 1000 nmol/L. Für den Assay wurde jedes Well für 10 Sekunden mit 500 μl Versuchsmedium inkubiert. Die Palmitinsäurekonzentration des Versuchsmedums betrug 330 $\mu\text{mol/L}$. Die Palmitinsäureaufnahme wurde auf den Gesamtpalmitinsäureeinsatz je Well bezogen und in Prozent ausgedrückt. Dargestellt sind die Messung der Gesamtpalmitinsäureaufnahme (%), der unspezifischen Bindung (%) und der Nettopalmitinsäureaufnahme (%) ohne und unter Einfluss von Troglitazone. Die Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert \pm SD.

4.3.2 Palmitinsäureaufnahme unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten GW1929

Der PPAR γ -Agonist GW1929 bewirkte mit Werten von 2,32 bis 2,66% Aufnahme des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes keine signifikanten konzentrationsabhängigen Unterschiede der Gesamtpalmitinsäureaufnahme (Abb. 27). Auch die unspezifisch an die Caco-2 Zellen gebundene Palmitinsäure mit Werten von 0,50 bis 0,57% des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes unterlag keinen signifikanten Schwankungen (Abb. 27). GW1929 bewirkte darüber hinaus mit Werten von 1,82 bis 2,09% Aufnahme des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes keine signifikanten konzentrationsabhängigen Unterschiede der Nettopalmitinsäureaufnahme (Abb. 27).

4 Modulation des Fettsäuretransportes in Caco-2 Zellen durch natürliche und synthetische PPAR(- und PPAR(-Liganden

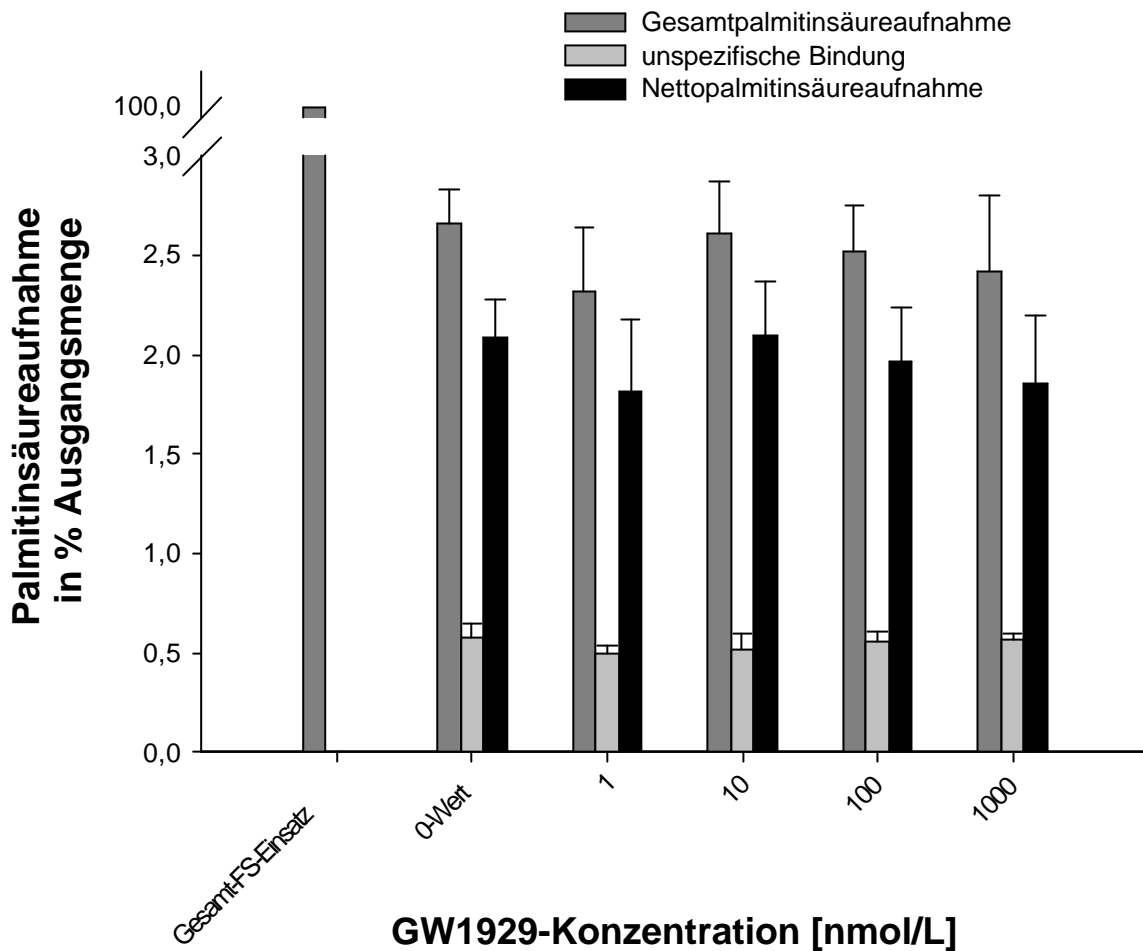


Abb. 27: Gesamtaufnahme, unspezifische Bindung und Nettopalmitinsäureaufnahme von ^3H -Palmitinsäure in Caco-2 Zellen unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten GW1929 in verschiedenen Konzentrationen (n = 4).

Die Ligandeninkubation erfolgte über einen Zeitraum von 48 h vor dem Assay mit den GW1929-Konzentrationen 1, 10, 100 und 1000 nmol/L. Für den Assay wurde jedes Well für 10 Sekunden mit 500 μl Versuchsmedium inkubiert. Die Palmitinsäurekonzentration des Versuchsmediums betrug 330 $\mu\text{mol/L}$. Die Palmitinsäureaufnahme wurde auf den Gesamtpalmitinsäureeinsatz je Well bezogen und in Prozent ausgedrückt. Dargestellt sind die Messung der Gesamtpalmitinsäureaufnahme (%), der unspezifischen Bindung (%) und der Nettopalmitinsäureaufnahme (%) ohne und unter Einfluss von GW1929. Die Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert \pm SD.

4.3.3 Palmitinsäureaufnahme unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten GW1929 und des PPAR γ -Antagonisten GW9662

Der PPAR γ -Agonist GW1929 und der PPAR γ -Antagonist GW9662 bewirkten mit Werten von 2,35 bis 2,73% Aufnahme des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes keine signifikanten konzentrationsabhängigen Unterschiede der Gesamtpalmitinsäureaufnahme (Abb. 28). Auch die unspezifisch an die Caco-2 Zellen gebundene Palmitinsäure mit Werten von 0,36 bis 0,44% des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes unterlag keinen signifikanten Schwankungen (Abb. 28). GW1929 und GW9662 bewirkten darüber hinaus mit Werten von 1,94 bis 2,29% Aufnahme des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes keine signifikanten konzentrationsabhängigen Unterschiede der Nettopalmitinsäureaufnahme (Abb. 28).

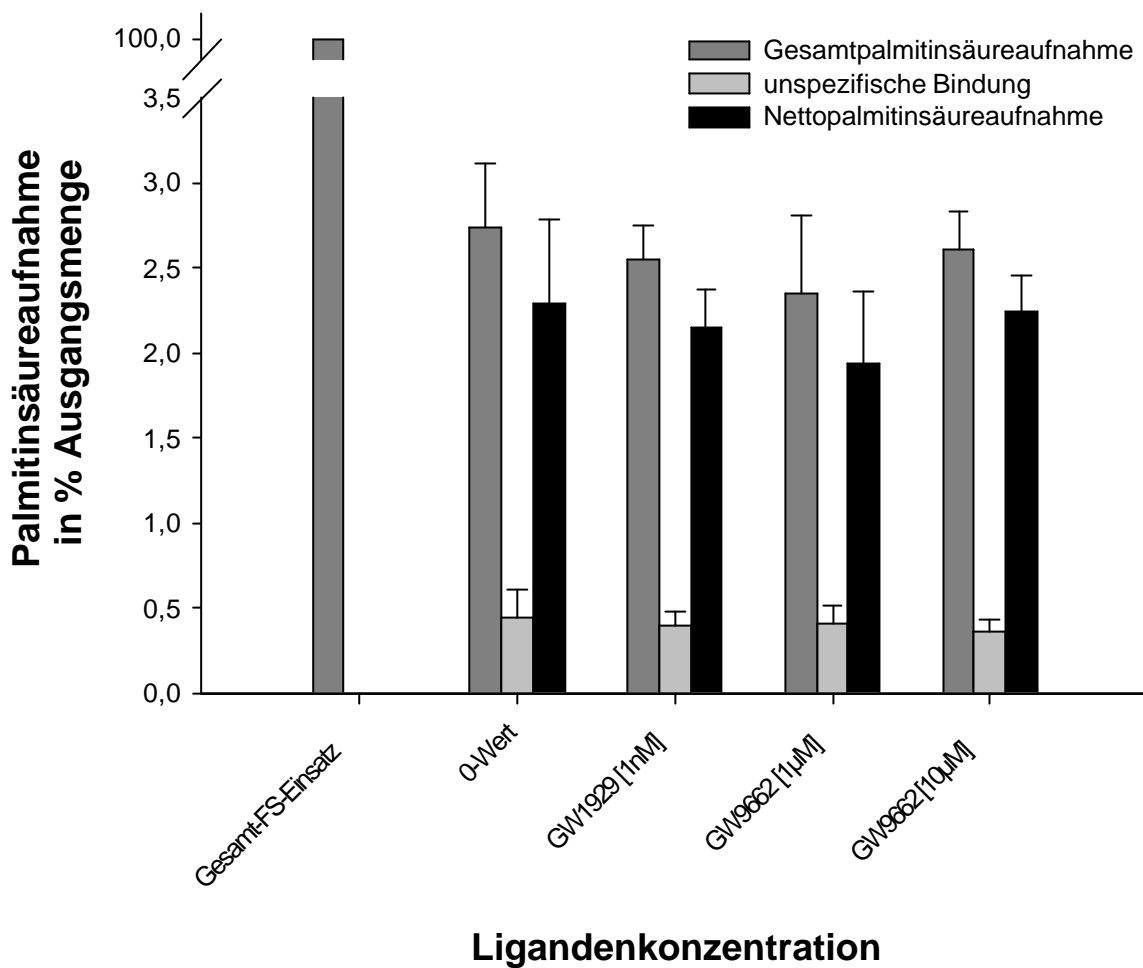


Abb. 28: Gesamtaufnahme, unspezifische Bindung und Nettoaufnahme von ^3H -Palmitinsäure in Caco-2 Zellen unter Einfluss des PPAR γ -Agonisten GW1929 und des PPAR γ -Antagonisten GW9662 in verschiedenen Konzentrationen (n = 11-12).

Die Ligandeninkubation erfolgte über einen Zeitraum von 48 h vor dem Assay mit 1 nmol/L GW1929 und den GW9662-Konzentrationen 1 und 10 $\mu\text{mol/L}$. Für den Assay wurde jedes Well für 10 Sekunden mit 500 μl Versuchsmedium inkubiert. Die Palmitinsäurekonzentration des Versuchsmediums betrug 330 mmol/L. Die Palmitinsäureaufnahme wurde auf den Gesamtpalmitinsäureeinsatz je Well bezogen und in Prozent ausgedrückt.

Dargestellt sind die Messung der Gesamtpalmitinsäureaufnahme (%), der unspezifischen Bindung (%) und der Nettopalmitinsäureaufnahme (%) ohne und unter Einfluss von GW1929 und GW9662. Die Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert \pm SD.

4.3.4 Palmitinsäureaufnahme unter Einfluss des PPAR α -Agonisten GW7647 und des PPAR α -Antagonisten MK886

Der PPAR α -Agonist GW7647 in den Konzentrationen 0,01 und 0,1 $\mu\text{mol/L}$ sowie der PPAR α -Antagonist MK886 bewirkten mit Werten von 2,38 bis 2,76% Aufnahme des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes keine signifikanten konzentrationsabhängigen Unterschiede der Gesamtpalmitinsäureaufnahme (Abb. 29). Auch die unspezifisch an die Caco-2 Zellen gebundene Palmitinsäure unter Einfluss aller PPAR α -Liganden unterlag mit Werten von 0,35 bis 0,51% des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes keinen signifikanten Schwankungen (Abb. 29).

Abb. 29 zeigt des Weiteren, dass der PPAR α -Agonist GW7647 bei der Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ mit einem Wert von 2,28% im Vergleich zum 0-Wert mit 2,76% des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes eine signifikante Hemmung der Gesamtpalmitinsäureaufnahme bewirkte ($p = 0,0012$).

GW7647 in den Konzentrationen 0,01 und 0,1 $\mu\text{mol/L}$ sowie MK886 bewirkten mit Werten von 2,00 bis 2,36% Aufnahme des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes keine signifikanten konzentrationsabhängigen Unterschiede der Gesamtpalmitinsäureaufnahme (Abb. 29).

Abb. 29 zeigt des Weiteren, dass GW7647 bei der Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ mit einem Wert von 1,90% im Vergleich zum 0-Wert mit 2,36% des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes eine signifikante Hemmung der Nettopalmitinsäureaufnahme bewirkte ($p = 0,027$).

4 Modulation des Fettsäuretransportes in Caco-2 Zellen durch natürliche und synthetische PPAR(- und PPAR(-Liganden

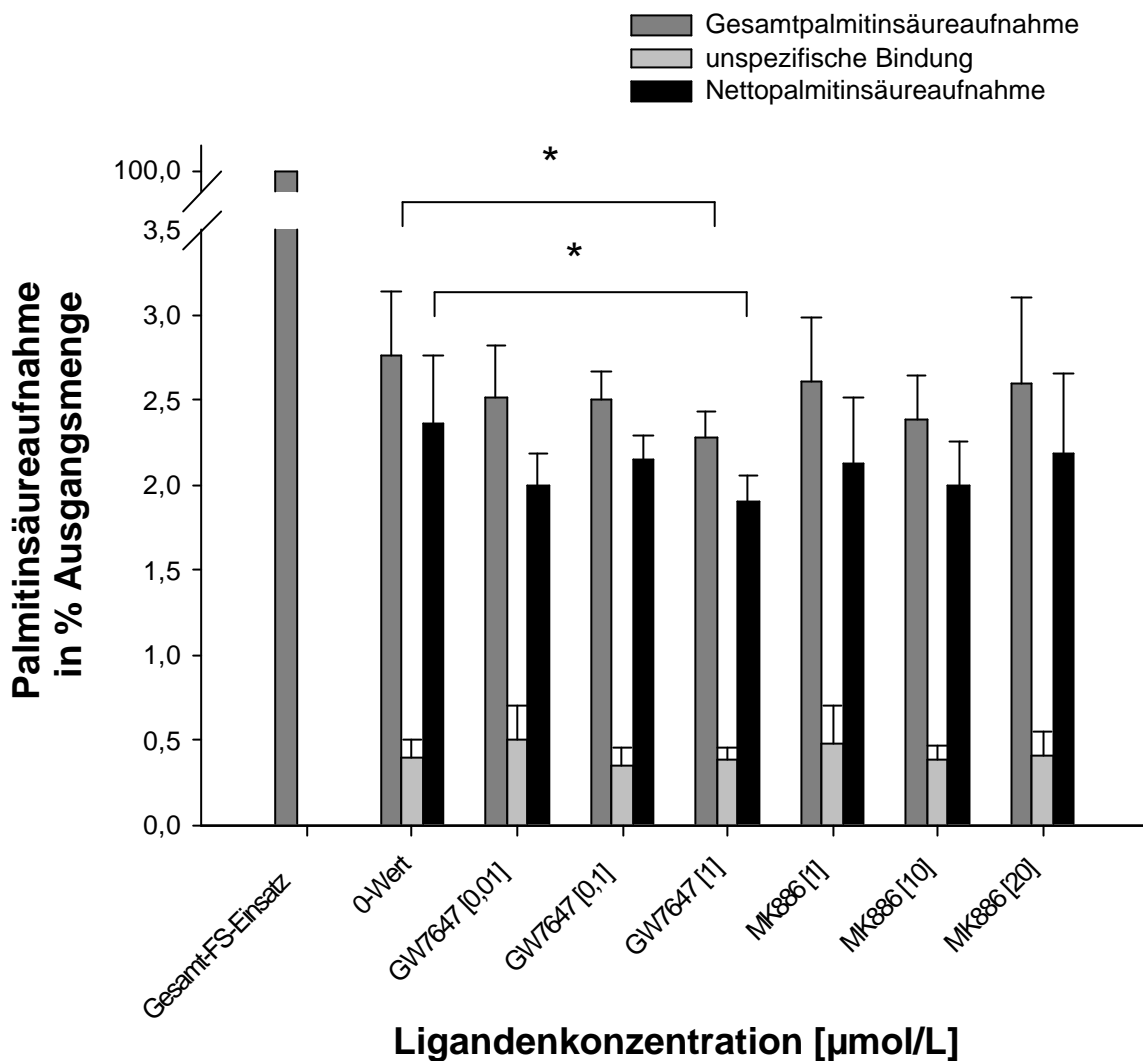


Abb. 29: Gesamtaufnahme, unspezifische Bindung und Nettopalmitinsäureaufnahme von ^3H -Palmitinsäure in Caco-2 Zellen unter Einfluss des PPAR α -Agonisten GW7647 und des PPAR α -Antagonisten MK886 in verschiedenen Konzentrationen (n = 8-11).

Die Ligandeninkubation erfolgte über einen Zeitraum von 48 h vor dem Assay mit den GW7647-Konzentrationen 0,01, 0,1 und 1 µmol/L sowie den MK886-Konzentrationen 1, 10 und 20 µmol/L. Für den Assay wurde jedes Well für 10 Sekunden mit 500 µl Versuchsmedium inkubiert. Die Palmitinsäurekonzentration des Versuchsmediums betrug 330 µmol/L. Die Palmitinsäureaufnahme wurde auf den Gesamtpalmitinsäureeinsatz je Well bezogen und in Prozent ausgedrückt. Dargestellt sind die Messung der Gesamtpalmitinsäureaufnahme (%), der unspezifischen Bindung (%) und der Nettopalmitinsäureaufnahme (%) ohne und unter Einfluss von GW7647 und MK886. Die Ergebnisse sind ausgedrückt als Mittelwert \pm SD. * Gesamtpalmitinsäureaufnahme: $p = 0,0012$, * Nettopalmitinsäureaufnahme: $p = 0,027$

4.3.5 Qualitative RT-PCR

Die Expression der Housekeeping-Gene β -Actin (1) und GAPDH (2), des Fettsäure-Transportproteins FATP4 (3), der Fettsäure-Bindungsproteine FABP1 (4) und FABP6 (6) sowie von PPAR γ (7) wurde mit Hilfe der qualitativen RT-PCR und anschließender gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte in Passage 10 der Caco-2 Zellprobe nachgewiesen (Abb. 30). Das Fettsäure-Bindungsprotein FABP2 konnte sowohl in dieser Passage als auch in den höheren Passagen 30-34 nur teilweise nachgewiesen werden.

Für den Nachweis, dass die gesuchten Gene generell im Dünndarm exprimiert werden und mit Hilfe dieser Methode nachweisbar sind, wurde zusätzlich eine Darmbiopsieprobe untersucht (Abb. 30).

Abb. 30 verdeutlicht, dass in der Probe der Darmbiopsie die Expression aller untersuchten Gene nachgewiesen wurde.

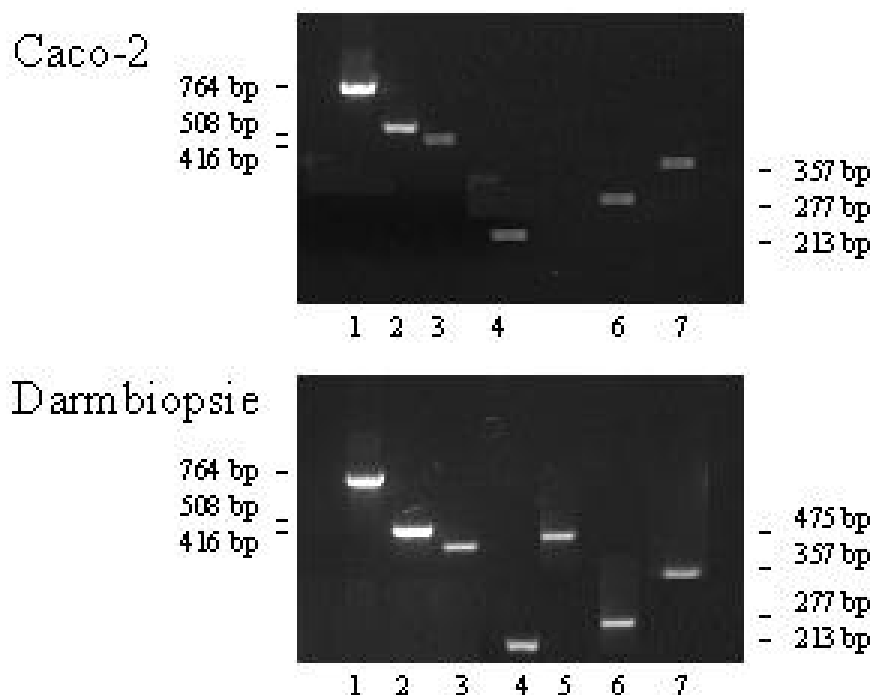


Abb. 30: Gelelektrophoretische Auswertung der RT-PCR von β -Aktin (1), GAPDH (2), FATP4 (3), FABP1 (4), FABP2 (5), FABP6 (6) und PPAR γ (7)

4.3.6 Bestimmung freier Fettsäuren im FCS

Im unverdünnten FCS wurde ein durchschnittlicher Gehalt von 0,117 mmol/L (\pm 0,007) freie Fettsäuren ermittelt.

4.3.7 MTT-Test

Die Ergebnisse des MTT-Tests zeigen, dass keine der verwendeten Ligandenkonzentrationen eine signifikante Zellschädigung der Caco-2 Zellen bewirkte.

4.4 Diskussion Fettsäureaufnahme

4.4.1 Caco-2 Zellen als *in vitro*-Modell

Caco-2 Zellen sind die am besten charakterisierte humane Darm-Zelllinie und wurden deshalb für die Untersuchungen der Modulation der Fettsäureaufnahme durch PPAR γ - und PPAR α -Liganden auf die Fettsäureaufnahme in Dünndarmzellen als *in vitro*-Modell gewählt. In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass sich Caco-2 Zellen für die Untersuchung des Fettsäuretransportes eignen [129,47,145,230].

In Vorversuchen wurden die Methoden von Trotter *et al.* [145] sowie Ho und Storch [129] optimiert. Hierbei wurde eine Kultivierungsdauer von 12 Tagen nach Konfluenz der Caco-2 Zellen als geeignet für die geplanten Versuche betrachtet. Nach diesem Zeitraum weisen die Zellen verschiedene strukturelle und funktionelle Eigenschaften auf, die auch für reife Epithelzellen des Dünndarms charakteristisch sind [19] (2.9). Direkt aus dem Dünndarm entnommene und kultivierte Epithelzellen weisen diese Eigenschaften nicht auf und eignen sich daher nicht für *in vitro*-Versuche [231]. Bei einer Kultivierungszeit von mehr als 12 Tagen kam es zum Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Wells. Womöglich ist die Sekretion proteolytischer Enzyme zwischen Zellteppich und Wellboden für dieses Phänomen verantwortlich [191,19].

In Vorversuchen wurde durch die verwendete Ethanolkonzentration kein Einfluß auf die Fettsäureaufnahme festgestellt, und bei der durchgeführten Inkubationszeit von 10 Sekunden kam es zu einer optimalen Aufnahmerate an Palmitinsäure in die Caco-2 Zellen [232].

4.4.2 Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen unter Einfluss verschiedener PPAR γ - und PPAR α -Liganden

Aufgrund des bedeutenden regulierenden Einflusses von PPAR γ - und PPAR α -Liganden auf den Fettstoffwechsel [15-17] war ein deutlicher Effekt der Testsubstanzen auf die intestinale Fettsäureaufnahme erwartet worden. Jedoch einzig der PPAR α -Agonist GW7647 zeigte bei der Konzentration von 1 $\mu\text{mol/L}$ eine signifikante Erniedrigung der Gesamtpalmitinsäureaufnahme sowie der Nettopalmitinsäureaufnahme. Die PPAR γ -Agonisten Troglitazone und GW1929, der PPAR γ -Antagonist GW9662, der PPAR α -Agonist GW7647 in den Konzentrationen 0,01 und 0,1 $\mu\text{mol/L}$ sowie der PPAR α -Antagonist MK886 blieben in der vorliegenden Studie ohne signifikante Modulation der Palmitinsäureaufnahme in Caco-2 Zellen.

4.4.2.1 Transportproteine in Enterozyten und deren Beteiligung an der Fettsäureaufnahme

Kontrovers wird diskutiert, ob überhaupt Fettsäure-Transportproteine an der Fettsäureaufnahme in Enterozyten beteiligt sind oder lediglich die passive Diffusion für diesen Vorgang verantwortlich ist [233,45,234]. Kamp *et al.* [138] schlagen vor, dass die passive Diffusion allein die fettsäuremetabolisierenden Organe versorgen kann. Dies muss aber nicht gleichzeitig bedeuten, dass an der Fettsäureaufnahme keine Transportproteine beteiligt sind. Des Weiteren wird angenommen, dass die passive Diffusion bei hohem Fettsäureangebot überwiegt, während bei geringen Fettsäuregehalten eine Versorgung durch einen aktiven Transport vorliegt [233].

Das FATP4 wird am stärksten in den Mikrovilli der Bürstensaummembran von Enterozyten des Jejunum und des Ileum exprimiert, wohingegen das Duodenum geringere Mengen aufweist. Da die Fettabsorption jedoch im Wesentlichen im proximalen Dünndarm abläuft, scheint eine Beteiligung des FATP4 an der intestinalen Fettsäureaufnahme eher unwahrscheinlich.

Um eine mögliche PPAR-vermittelte intestinale Fettsäureresorption aufzuklären, wären Folgeuntersuchungen an Caco-2 Zellen sinnvoll, aus denen die Beteiligung von Fettsäuretransportern an der Fettsäureaufnahme in Dünndarmzellen eindeutig hervorgeht. Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich dieser Problematik genähert, indem sie den Fettsäuretransport in Enterozyten *in vitro* ganz oder teilweise unterbanden.

Stremmel [149] inhibierte Fettsäure-Transportproteine in Versuchen zur Ölsäureaufnahme durch den Einsatz proteinspezifischer Antikörper. Dabei stellte er durch Inhibierung eines Fettsäure-Bindungsproteins, welches von ihm mit MFABP bezeichnet wurde, einen senkenden Effekt auf die Ölsäureaufnahme nicht nur an isolierten Zellen aus dem Jejunum von Ratten, sondern auch an einem isolierten Jejunumabschnitt fest [149].

Eine weitere Möglichkeit der Einflußnahme auf den aktiven Transport ist die Inhibierung des Energiestoffwechsels. Der Einsatz des Glycolyse- sowie des mitochondrialen ATPase-Inhibitors Oligomycin in Kombination mit Deoxyglucose zur Reduzierung des zellulären ATPs bewirkte an dem Caco-2-Klon TC7 eine Hemmung der Fettsäureaufnahme von 56% [18].

Die Senkung der Temperatur auf 4°C führte bei Ratten-Myocyten [235] und Caco-2 Zellen [18] zu einer > 90%-igen beziehungsweise ca. 80%-igen Hemmung der Fettsäureaufnahme, was auf eine Beteiligung eines aktiven Transportes an der Fettsäureaufnahme schließen läßt.

Stremmel *et al.* [236] berichten, dass die Bindung von [¹⁴C]-Ölsäure an Mikrovilli-Membranen aus dem Jejunum von Ratten temperaturabhängig durch einen Überschuss an eiskalter

unmarkierter Ölsäure inhibierbar ist und durch Hitzedenaturierung oder Trypsinbehandlung der Membranen gesenkt werden kann.

Die Wirkungslosigkeit der eingesetzten PPAR-Liganden auf die Fettsäureaufnahme könnte auf eine fehlende Expression von Proteinen, die möglicherweise an dem Fettsäuretransport in Caco-2 Zellen beteiligt sind, zurückzuführen sein. Auf dieser Vermutung basierend wurde eine Analyse des Expressionsprofils einiger relevanter Proteine in Caco-2 Zellen vorgenommen.

Mit Hilfe der RT-PCR-Analyse konnte die Expression der Fettsäure-Bindungsproteine FABP1 und FABP6, des Fettsäure-Transportproteins FATP4 sowie von PPAR γ in den Caco-2 Zellen der vorliegenden Studie nachgewiesen werden (4.3.5). Das Ausbleiben eines deutlichen Effektes auf die Fettsäureaufnahme kann demzufolge nicht auf eine fehlende Expression der genannten und möglicherweise am Transport von Fettsäuren beteiligten Proteine in der verwendeten Zelllinie zurückgeführt werden.

Das Fettsäure-Bindungsprotein FABP2 wurde im Rahmen der vorliegenden Studie am 12.Tag Postkonfluenz sowohl in Caco-2 Zellen der Passage 10 als auch in Zellen der Passagen 30-34 in 24 von 30 Proben nachgewiesen. In der Literatur wird ebenfalls uneinheitlich über die Expression des FABP2 in Caco-2 Zellen berichtet. Levin *et al.* [47] zeigten, dass die Caco-2 Zellen der Passagen 37 und 38 kein FABP2 exprimieren. Darimont *et al.* [202] konnten hingegen in Caco-2 Zellen neben FABP1 auch das FABP2 nachweisen.

4.4.2.2 Beteiligung von PPAR-Liganden an der Fettsäureaufnahme

Aufgrund der ermittelten Ergebnisse muss diskutiert werden, inwieweit Proteine, die möglicherweise an der Fettsäureaufnahme in Zellen des Dünndarms und des Fettgewebes beteiligt sind, überhaupt durch PPARs reguliert werden.

In der Literatur wird vielfach beschrieben, dass die Expression fettsäuretransportierender Proteine bestimmte DNA-Sequenzen, sogenannte PPRES (2.8.2), auf den Zielgenen benötigt.

Fronert *et al.* [237], Mochizuki *et al.* [238,239], Brouillette *et al.* [240] und Schachtrup *et al.* [241] wiesen entsprechende Genabschnitte der Proteine nach, an welche aktivierte PPAR/RXR-Heterodimere banden und dadurch die Expression von relevanten Fettsäuretransportproteinen modulierten.

Von Fronert *et al.* [237] wird ein funktionelles PPRE auf dem FATP-Gen in 3T3-L1 Zellen beschrieben, durch welches es nach Bindung von ligandenaktivierten PPAR α /RXR- und PPAR γ /RXR-Heterodimeren zu veränderten Expressionen der Fettsäuretransporter kam.

Mochizuki *et al.* [238,239] berichten von PPRE-Segmenten auf dem FABP1-Gen im Dünndarm von Ratten und in Caco-2 Zellen, an welche die PPAR α /RXR-Heterodimere binden und dadurch die Expression von FABP1 modulierten.

Brouillette *et al.* [240] fanden auf dem FABP1-Gen in Zellen der Leber und des Dünndarms ihrer Probanden PPREs, an die durch Fenofibrate aktivierte PPAR α banden.

Schachtrup *et al.* [241] wiesen in Rattenversuchen die Bindung aller drei PPAR-Isoformen an FABP1-PPRE nach. Dabei wurde die stärkste Bindung bei PPAR α festgestellt.

Allen oben erwähnten Forschergruppen bezeichnen die Existenz dieser speziellen DNA-Sequenzen auf den Zielgenen als unbedingte Voraussetzung für die Wirkung der PPARs auf die Expression von fettsäuretransportierenden Proteinen.

Mittels eines PPRE Reporter-gen-Assays untersuchten Allred und Kilgore [242] an einer normalen Säuger-Epithelzelllinie sowie an verschiedenen Krebszelllinien, darunter auch Caco-2 Zellen, die selektive Aktivierung von PPAR γ durch GW9662. Der Inkubationszeitraum vor dem Assay mit 1 μ mol/L GW9662 betrug 18 h. Während GW9662 in der normalen Säuger-Epithelzelllinie zu einer Erhöhung der PPRE-Aktivität führte, konnte in den verschiedenen Krebszelllinien lediglich ein vernachlässigbar schwacher Effekt nachgewiesen werden.

Den Ergebnissen dieser Studie zufolge muss der Frage nachgegangen werden, ob außer GW9662 auch die übrigen eingesetzten PPAR-Liganden in den Caco-2 Zellen der vorliegenden Arbeit überhaupt eine PPAR-vermittelte Wirkung auf die Fettsäureaufnahme haben.

Poirier *et al.* [133] wiesen einen stimulierenden Effekt von LCFAs auf die Expression von FABP1 in FABP1-transfizierten Caco-2 Zellen nach. Eine gesteigerte Expression von Fettsäure-Bindungsproteinen muss eine beschleunigte Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen nach sich ziehen. LCFAs werden zu den natürlichen PPAR α -Agonisten gezählt. Aus diesem Grund war die im Rahmen der vorliegenden Studie beobachtete Hemmung der Nettopalmitinsäureaufnahme unter Einfluss von 1 μ mol/L des PPAR α -Agonisten GW7647 nicht erwartet worden.

Unpublizierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Helwig *et al.* [persönliche Mitteilung von Ulf Helwig], in denen mit Transportergen-Assays die Aktivität von FABP2-Genvarianten in Gebärmutterhals-Krebszellen (HeLa-Zellen) untersucht wurden, zeigen keine Modulierbarkeit einer FABP2-Promotor-Variante A durch PPAR γ -Liganden, während eine B-Variante induzierbar war. Welche Variante die Caco-2 Zellen aufweisen, ist derzeit unbekannt. Sollte die Variante A vorliegen, kann dies zu einer fehlenden Modulierbarkeit beitragen.

FATPs werden zu den PPAR α regulierten Proteinen [243] gezählt. Ein modulierender Effekt auf die Expression des FATP4 durch einen der hier eingesetzten PPAR α -Liganden konnte jedoch bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Die Gesamtpalmitinsäureaufnahme wurde in Gegenwart von 1 $\mu\text{mol/L}$ GW7647 mit 2,28% gegenüber dem 0-Wert mit 2,76% der Aufnahme des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes signifikant inhibiert ($p = 0,0012$, Abb. 29). Die Nettopalmitinsäureaufnahme wurde unter Einfluss von 1 $\mu\text{mol/L}$ GW7647 mit 1,90% gegenüber dem 0-Wert mit 2,36% der Aufnahme des Gesamtpalmitinsäureeinsatzes signifikant gesenkt ($p = 0,027$, Abb. 29).

Huang *et al.* [186] und Seimandi *et al.* [183] beschrieben, dass es sich bei GW7647 um einen effektiven PPAR α -Agonisten handelt. Dieses sind jedoch die einzigen Male, dass in der Literatur Hinweise auf einen möglichen Effekt von GW7647 auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen erscheinen.

Einen Einfluss von PPAR α -Liganden auf die Expression von Genen, die an der Fettsäureaufnahme in Dünndarm-, Leber- und Fettgewebszellen beteiligt sind, wiesen Frohnert *et al.* [237], Motojima *et al.* [17] und Martin *et al.* [244] mittels *in vitro*- und *in vivo*-Studien nach.

Frohnert *et al.* [237] zeigten, dass in FATP-transfizierten 3T3-L1 Zellen das FATP-Gen durch PPAR γ - und PPAR α -Aktivierung in einem PPAR-Response-Element (PPRE)-vermittelte Mechanismus hochreguliert wird. In Gegenwart des PPAR γ -Agonisten Troglitazone (10 $\mu\text{mol/L}$) wurde in 3T3-L1 Zellen ein Anstieg der Ölsäureaufnahme beobachtet. Eine PPAR-abhängige Hochregulierung der FATP-Expression wurde durch Entfernung des PPRE nachgewiesen.

Motojima *et al.* [17] untersuchten die Regulation der Gen-Expression von FAT und FATP durch PPAR γ - und PPAR α -aktivierende Substanzen in der Leber und dem Darm von Mäusen sowie in Ratten-Hepatocyten der Fao-Zelllinie. Die Expression von FAT-mRNA wurde in der Leber und dem Darm von Mäusen und in den Ratten-Hepatocyten ausschließlich durch PPAR α -aktivierende Substanzen induziert. FATP-mRNA wurde gleichermaßen in der Leber und zu einem geringeren Maß im Darm induziert. Da kein Anstieg der mRNA von FAT und FATP in PPAR α -/- Mäusen nachgewiesen werden konnte, wird von einer wichtigen Rolle von PPAR α für die FAT- und FATP-Induktion in Hepatocyten ausgegangen. Im weißen Fettgewebe von übergewichtigen KKAY-Mäusen wurden FAT und FATP stärker durch die PPAR γ -Agonisten Troglitazone und Pioglitazone induziert als durch den PPAR α -Agonisten Clofibrate. An der gewebeabhängigen Expression von FAT und FATP sind jedoch sowohl PPAR γ als auch PPAR α beteiligt, womit sie auch in die zelluläre Fettsäureaufnahme involviert sind [17].

Martin *et al.* [244] berichten über die Induktion von FATP-mRNA in der Leber und im Darm von Ratten durch den Einsatz von Fibraten, die zu den PPAR α -Liganden zählen. Die FATP-Induktion im Darm zeigt eine auffällige Parallele zur Induktion von CD36 nach Fibrat-Gabe in diesem Gewebe. Des Weiteren wird über eine stark FATP-mRNA-induzierende Wirkung der Thiazolidinedione, die zu den PPAR γ -Liganden gehören, im Fettgewebe berichtet. Die selbe Arbeitsgruppe [244] erzielte in anschließenden Zellkulturstudien mit Hepatozyten und Preadipozyten ähnliche Ergebnisse. Die Induzierbarkeit von FATP-mRNA durch PPAR γ - und PPAR α -Agonisten korrelierte mit der gewebeabhängigen Verteilung der jeweiligen PPARs und war darüber hinaus mit einer Erhöhung der Fettsäureaufnahme assoziiert.

Poirier *et al.* [160] untersuchten das Expressionsprofil von FAT in verschiedenen Dünndarmabschnitten und berichten über ein höheres FAT-mRNA-Vorkommen im Jejunum als im Duodenum sowie ein niedriges Vorkommen im Ileum. Diese Verteilung des Fettsäure-Transporters entspricht dem Vorkommen der beiden Fettsäure-Bindungsproteine FABP1 und FABP2 in den verschiedenen Dünndarmabschnitten, woraus die Forschergruppe schließt, dass diese Proteine Aufgaben bei der intestinalen Fettsäureaufnahme ausüben, die sich gegenseitig ergänzen [160]. Darüber hinaus berichten Poirier *et al.* [160], dass nach Gabe einer Testmahlzeit mit einem hohen Anteil an LCFAs erhöhte FAT-mRNA-Werte sowie eine schwache aber signifikante Induktion des FAT-Proteins in der Plasmamembran messbar waren. Daraus folgerten sie, dass die FAT-Expression im Dünndarm durch Nahrungsfette reguliert wird, wobei die Fettsäurezusammensetzung eine entscheidende Rolle spielt. Die FAT mRNA-Level im Jejunum waren nach einer Testmahlzeit mit LCFAs 2,6-fach höher als bei einer Testmahlzeit mit mittelkettigen Fettsäuren (MCFAs). Der stimulierende Effekt von Bezafibraten sowohl auf FABP- als auch auf die FAT-Expression konnte nachgewiesen werden [160]. Sie diskutierten abschließend, dass Transportproteine in biologischen Membranen für die Aufnahme langkettiger Fettsäuren aus einer komplexen Nahrung notwendig sein könnten. Dafür spricht das hohe Vorkommen von FAT im oberen Teil der jejunalen Microvilli.

Bei der Untersuchung der Wirkung von GW7647 im Versuch an Mäusen konnten Poirier *et al.* [133] einen induzierenden Effekt auf die mRNA-Expression von FABP1 im Duodenum, nicht aber im Ileum, nachweisen. Auch fanden sie eine höhere FABP1-Expression bei PPAR α +/+ gegenüber PPAR α -/- Mäusen. Beides spricht für eine Rolle von PPAR α in der FABP1-Expression bei Mäusen. Analog regulierten LCFAs, die als natürliche Liganden für jede der drei PPAR-Isoformen gelten, ebenfalls die Expression der Fettsäure-Transporter hoch [133].

Ein modulierender Einfluss von PPAR-Liganden auf die Expression von Proteinen, die möglicherweise an der Fettsäureaufnahme beteiligt sind, ist deshalb unumstritten. Dies wird durch die signifikante Erniedrigung der Fettsäureaufnahme durch GW7647 bestätigt.

4.4.2.3 Einfluss möglicher Nebenwirkungen auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen

Zusatzuntersuchungen sollten Aufschluss darüber bringen, ob das Ausbleiben eines deutlichen Effektes der verschiedenen Konzentrationen an PPAR γ - und PPAR α -Liganden auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen durch Nebeneffekte hervorgerufen sein könnte.

Um die Möglichkeit auszuschliessen, dass potenziell im FCS des Kulturmediums enthaltene freie Fettsäuren als natürliche PPAR-Liganden eine PPAR-vermittelte Modulation des Fettsäuretransportes durch die synthetischen PPAR-Liganden überdeckt haben, wurde der Gehalt an unveresterten Fettsäuren im Kulturmedium mittels Wako NEFA C-Test gemessen. Die ermittelte Konzentration von 117 $\mu\text{mol/L}$ freier Fettsäuren im FCS liegt am unteren Referenzbereich sowohl für Männer (100-600 $\mu\text{mol/L}$) als auch für Frauen (100-450 $\mu\text{mol/L}$). Nach Berücksichtigung der 1/5-Verdünnung des FCS mit Kulturmedium in der vorliegenden Studie macht die Konzentration an freien Fettsäuren 23 $\mu\text{mol/L}$ aus. Der Gehalt an freien Fettsäuren liegt somit weit unterhalb physiologischer Fettsäurekonzentrationen. Von diesem Standpunkt aus betrachtet ist es sehr unwahrscheinlich, dass die im FCS enthaltenen LCFAs als natürliche PPAR-Liganden eine derart starke Wirkung auf die Fettsäureaufnahme ausgeübt haben.

Die ermittelte Konzentration an freien Fettsäuren im Kultivierungsmedium ist jedoch bezogen auf die Konzentrationen an den untersuchten synthetischen PPAR-Liganden im Assay durchaus nennenswert (vgl. Tab. 23). Eine Überdeckung einer PPAR-vermittelten Modulation der Fettsäureaufnahme durch die im FCS enthaltenen Fettsäuren ist daher durchaus denkbar.

Um eine mögliche Stimulation der PPARs durch LCFAs aus dem FCS komplett ausschließen zu können, müssten weitere Versuche mit dem Einsatz von kommerziell erhältlichem delipidiertem Serum durchgeführt werden.

Es wurde vermutet, dass das Ausbleiben eines deutlichen Effektes der PPAR-Liganden auf die Fettsäureaufnahme durch einen zytotoxischen Effekt der eingesetzten Konzentrationen der untersuchten Testsubstanzen, was eine erhöhte Permeabilität der Zellmembran zur Folge gehabt haben könnte, zu erklären ist.

Aus diesem Grund wurde mit Hilfe des MTT-Tests die Vitalität der Caco-2 Zellen nach der Inkubation mit den verschiedenen Ligandenkonzentrationen ermittelt. Dieser Test ergab keine signifikanten zytotoxischen Effekte der Ligandenkonzentrationen. Das Ausbleiben

eines modulierenden Effektes auf die Fettsäureaufnahme ist somit nicht auf eine zytotoxische Wirkung der Testsubstanzen zurückzuführen.

In der vorliegenden Studie wurden dem Kulturmedium Penicillin / Streptomycin, Amphotericin B und FCS zugesetzt. Lindl [222] weist darauf hin, dass Seren Inhibitoren (Bakterientoxine und Lipide) enthalten können, die im Einzelfall schwer einzuschätzende Nebenwirkungen haben können. Während der Durchführung der Zellkulturversuche der vorliegenden Arbeit wurden die beschriebenen Substanzen zur Verhinderung mikrobieller Kontaminationen eingesetzt und könnten somit negative Seiteneffekte auf die Zellen ausgeübt haben. Die Kultivierung von Caco-2 Zellen mit geringeren Gehalten an FCS oder ohne Zusatz von Penicillin / Streptomycin und Amphotericin B ist durchaus möglich [202,197], um mögliche Nebenwirkungen auszuschliessen.

4.4.2.4 Inkubationszeit und Ligandenkonzentrationen

In der vorliegenden Studie wurde die Dauer der Inkubation mit Liganden von 48 h in Anlehnung an eine institutsinterne Studie mit 3T3-L1 Adipozyten [224] gewählt, da zum Zeitpunkt der Methodenaufstellung zu den ausgewählten Liganden und der verwendeten Caco-2 Zelllinie keine veröffentlichten Studien bekannt waren.

Die Inkubationszeit von 48 h könnte für die Caco-2 Zelllinie und die untersuchten Liganden zu gering gewesen sein, um eine deutliche Beeinflussung der Fettsäureaufnahme in die Zellen zu bewirken.

Zur Ermittlung einer optimalen Inkubationszeit für die Untersuchungen zur Modulation der Genexpression durch die gewählten Liganden wäre es unter Umständen sinnvoll, weitere Studien mit einer Inkubationszeit von mehr als 48 h durchzuführen.

Die Ligandenkonzentrationen der vorliegenden Studie wurden ausnahmslos Publikationen übernommen, die an anderen Zelltypen als Caco-2 durchgeführt wurden. Cunard *et al.* [226] z.B. untersuchten die gewählten GW1929-Konzentrationen an CD4 und CD8 Zellen. Seimandi *et al.* [183] inkubierten HG5LN-Zellen mit 1 µmol/L GW7647. Es besteht die Möglichkeit, dass die verwendeten Ligandenkonzentrationen für Caco-2 Zellen zu hoch oder zu gering sind, um die gewünschten modulierenden Effekte auf die Genexpression zu bewirken.

4.4.2.5 Fettsäureangebot

Im Vergleich zu der großen Oberfläche des resorbierenden Teils des Dünndarms (ca. 3500 m²) ist die Oberfläche eines Wells der im Rahmen dieser Studie verwendeten 12-

Wellplatten mit ca. 3 cm² sehr gering. Auf den resorbierenden Dünndarmabschnitt bezogen entspricht die Fettsäuremenge, die im Assay den Caco-2 Zellen eines Wells zur Verfügung gestellt wurde, einer Fettmenge von 4,7 g, was durchaus realistisch für eine kleine fetthaltige Mahlzeit ist.

Unter physiologischen Bedingungen werden 90-95% der alimentär aufgenommenen Nahrungsfette im Dünndarm resorbiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit betrug die Nettopalmitinsäureaufnahme während eines 10 Sekunden-Versuches lediglich 1,8 bis 2,4%. Diese im Vergleich sehr geringen Werte decken sich jedoch mit Ergebnissen von Fettsäureaufnahmeversuchen anderer Zellkultur-studien mit Caco-2 Zellen [145].

4.4.3 Fazit

Eine signifikante Hemmung der Palmitinsäureaufnahme in Caco-2 Zellen konnte unter den beschriebenen Laborbedingungen lediglich nach der Inkubation mit 1 µmol/L des PPAR α -Agonisten GW7647 nachgewiesen werden. Diverse Nebeneffekte könnten eine Wirkung von PPAR γ -Liganden und PPAR α -Liganden auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen verhindert haben:

- LCFA's des FCS-Zusatzes im Kulturmedium könnten als natürliche PPAR-Liganden den Effekt der untersuchten synthetischen PPAR-Liganden kaschiert haben.
- Die eingesetzten PPAR α -Liganden üben keine Wirkung auf die FATP4-Expression aus.
- Der Inkubationszeitraum mit den Liganden war mit 48 h zu kurz.
- Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählten Ligandenkonzentrationen wurden Studien entnommen, die mit anderen Zelllinien durchgeführt wurden, und könnten deshalb für die Caco-2 Zellen zu hoch oder zu niedrig gewesen sein, um die erwarteten modulierenden Effekte auf die Genexpression zu bewirken.

Trotz der Suche nach möglichen Fehler- und Störungsquellen des Zellkultursystems und aus Mangel an Studien, die sich mit der vorliegenden Thematik beschäftigten, kann jedoch durchaus auch davon ausgegangen werden, dass die gewählten PPAR γ - und PPAR α -Liganden in einem geeigneten Testsystem und in den eingesetzten Konzentrationen keinen modulierenden Einfluss auf die Fettsäureaufnahme in Caco-2 Zellen ausgeübt haben.

Natürliche PPAR γ -Liganden wären daher keine aussichtsreichen Kandidaten für eine Verzögerung der Fettsäureaufnahme im Darm.

5 Zusammenfassung

Das Metabolische Syndrom beschreibt das Zusammentreffen verschiedener Risikofaktoren für koronare Herzerkrankungen wie abdominale Adipositas und Diabetes Typ 2 sowie deren Folgeerkrankungen Hypertonie, Dyslipoproteinämie und verfrühte Atherosklerose. In zahlreichen Studien wurde ein eindeutiger Zusammenhang zwischen postprandialer Hyperlipämie und Übergewicht [37], Insulinresistenz [6-8] sowie Atherosklerose [9,38,39,10,33,40] festgestellt. Aufgrund der eindeutigen Assoziation zwischen erhöhten postprandialen Triglyceridwerten und verschiedenen Symptomen des Metabolischen Syndroms muss das Ziel einer Prävention und Beeinflussung von kardiovaskulären Erkrankungen die Verzögerung des Einstroms von Nahrungsfetten in das Blutkompartiment und somit die Senkung von postprandialen Triglyceridwerten sein.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten durch *in vitro*-Versuche Stoffe identifiziert werden, die durch ihre Fähigkeit, die Pankreaslipase oder den intestinalen Fettsäuretransport zu hemmen, in der Lage sind, postprandiale Triglyceridwerte zu senken. Vielversprechende Kandidaten sollten nach Abschluss dieser Arbeit in *in vivo*-Studien auf ihre Wirksamkeit an Tier und Mensch untersucht werden, um damit die Voraussetzung für die Entwicklung von funktionellen Lebensmitteln zur Prävention und Beeinflussung des Metabolischen Syndroms zu schaffen.

560 Proben pflanzlicher und tierischer Herkunft wurden *in vitro* auf eine Lipase-hemmende Wirkung mit 1,2-O-Dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-Methylresorufin)-ester als Substrat (Methylresorufinmethode) untersucht.

Den Ergebnissen dieser Studie zufolge befindet sich das größte Potential Lipase-hemmender Verbindungen in pflanzlichen Auszügen mit einem hohen Anteil lipophiler Substanzen.

Bei lediglich acht der 24 wirksamsten Lipase-hemmenden Testsubstanzen, ermittelt bei der 1/100-Verdünnung mit der Methylresorufinmethode, konnte mit Triolein als Substrat (Trioleinmethode) eine > 50%-ige Lipasehemmung herbeigefügt werden. Mit dem Test auf Hemmung der alkalischen Phosphatase wurde bei 23 der 24 wirksamsten Proben ein unspezifischer Effekt ausgeschlossen. Unter diesen befand sich eine Extraktion mit 100% Ethanol aus *Tabebuia impetiginosa* (Lapachotee), ein Tee, der aus der inneren Rinde des amazonischen Taheebobaums gewonnen wird. Dieser Extrakt erzielte *in vitro* eine deutliche Lipasehemmung. In einem Tierversuch mit Wistarratten führte dieser Extrakt zu einer signifikanten Erniedrigung der postprandialen Triglyceridwerte [persönliche Mitteilung von Jürgen Schrezenmeir].

Auf der Suche nach Modulatoren der Fettsäureaufnahme in Enterozyten wurde der Effekt synthetischer PPAR γ - und PPAR α -Liganden untersucht, welchen eine bedeutende Rolle in der Regulierung des Fettstoffwechsels zugeschrieben wird [15-17]. Hierzu wurde die Palmitinsäureaufnahme in Caco-2 Zellen, einem etablierten Zellkulturmodell für Enterozyten [19,20,18] in Abhängigkeit von den PPAR-Liganden Troglitazone, GW1929, GW9662, GW7647 und MK886 bestimmt. Lediglich durch den Einsatz des PPAR α -Agonisten GW7647 bei der Konzentration von 1 μ mol/L konnte eine signifikante Hemmung der Palmitinsäureaufnahme ermittelt werden ($p = 0,027$). Alle anderen Liganden wiesen in den eingesetzten Konzentrationen keine signifikanten Effekte auf.

Es stellte sich die Frage, inwieweit freie Fettsäuren im FCS des Kulturmediums als natürliche PPAR-Liganden eine erwartete Modulation des Fettsäuretransportes durch die synthetischen PPAR-Liganden kaschiert haben könnten. Die Bestimmung der freien Fettsäuren im Medium ergab eine durchaus nennenswerte Konzentration, die eine PPAR-vermittelte Modulation der Fettsäureaufnahme denkbar erscheinen lassen. Diese Konzentration liegt jedoch weit unterhalb physiologisch vorkommender Konzentrationen an freien Fettsäuren.

Durch den Nachweis von FABP1, FABP6 sowie FATP4 mittels RT-PCR konnte die Vermutung widerlegt werden, dass diese an der Fettsäureaufnahme beteiligten Proteine in den für diese Studie eingesetzten Caco-2 Zellen nicht exprimiert wurden. Auch das FABP2 konnte in einem Teil der Proben nachgewiesen werden.

Mittels MTT-Test wurde ein zytotoxischer Effekt der Testsubstanzen ausgeschlossen.

Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die eingesetzten PPAR-Liganden in einem geeigneten Testsystem keinen oder einen nur sehr geringen Effekt auf die Fettsäureaufnahme ausüben.

Weitere Untersuchungen zur Inhibierung vermutlich beteiligter Fettsäure-Bindungs- und Transportproteine sowie des Energiestoffwechsels der Zellen könnte über die Art und das Ausmaß der Beteiligung von Proteinen bzw. Transportern an der Fettsäureaufnahme in Dünndarmzellen Aufschluss geben.

In Anbetracht der ermittelten Ergebnisse eignen sich natürliche PPAR γ - und PPAR α -Liganden nicht zur Verzögerung der Fettsäureaufnahme im Darm.

Mit Lapachotee konnte jedoch ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung eines funktionellen Lebensmittels und eines Nahrungsergänzungsmittels für das Metabolische Syndrom identifiziert werden.

6 **Abstract**

The Metabolic Syndrome describes the gathering of different risk factors for coronary heart diseases like abdominal adiposity and diabetes type 2 as well as their following symptoms hypertension, dyslipoproteinemia and precocious atherosclerosis. Several studies have provided evidence for a strong association between postprandial hyperlipemia and obesity [37], insulin resistance [6-8] as well as atherosclerosis [9,38,39,10,33,40]. Due to the strong association between elevated postprandial triglycerides and different symptoms of the metabolic syndrome, prevention and impact of cardiovascular diseases has to be achieved by delaying the influx of dietary fat in the blood compartment and consequently the reduction of postprandial triglycerides.

The aim of this study was to identify substances by *in vitro* trials which lower postprandial triglycerides by their ability to inhibit pancreatic lipase or the intestinal fatty acid uptake. Promising substances are candidates for *in vivo* trials in animals and humans following this study in order to identify requisites for the development of functional food and food additives for the prevention and impact of the metabolic syndrome.

560 samples of plant and animal origin were investigated *in vitro* on lipase inhibitory activity with 1,2-O-dilauryl-rac-glycero-3-glutarsäure-(6-methylresorufin)-ester as substrate (methylresorufin method).

As a result of this study the highest potential of lipase inhibitory compounds can be found in plant extracts with a high content of lipophilic substances.

The lipase inhibitory action of the 24 most effective test substances in the 1/100 dilution with the methylresorufin method was confirmed with > 50% lipase inhibition only in eight samples with triolein as substrate (triolein method). By testing on inhibition of alkaline phosphatase an unspecific effect was excluded in 23 of the 24 most effective test substances. One of these is *Tabebuia impetiginosa* (Lapacho tea), a tea manufacture of the inner bark of the amazonian taheebo tree. It inhibited the lipase strongly *in vitro*. In addition, this extract resulted in a significant reduction of postprandial triglycerides in subsequent animal trials with Wistar rats [personal information by Jürgen Schrezenmeir].

In search of modulators of fatty acid uptake into enterocytes the effect of synthetic PPAR γ - und PPAR α ligands, which are regarded as important for the regulation of the fat metabolism [15-17], was investigated. For this purpose, palmitic acid uptake in Caco-2 cells, an established cell culture model for enterocytes [19,20,18], was determined against the PPAR γ and PPAR α ligands Troglitazone, GW1929, GW9662, GW7647 and MK886 in a concentration dependent manner. Only the incubation of the PPAR α agonist GW7647 in the

concentration 1 $\mu\text{mol/L}$ resulted in a significant inhibition of palmitic acid uptake ($p = 0,027$). The other ligands did not show a significant impact in the applied concentrations.

The question rises how far free fatty acids in the FCS of the culture medium covered as natural PPAR ligands an expected modulation of fatty acid transport by the synthetic PPAR ligands. The determination of free fatty acids in the medium results in a noteworthy concentration which leads to the assumption that a PPAR mediated modulation could have taken place. This concentration, however, is far lower than physiological fatty acid concentrations.

By providing evidence for FABP1, FABP6 and FATP4 with RT-PCR the assumption was disapproved that these proteins participating in the fatty acid uptake are not expressed in Caco-2 cells used for this study. In addition, evidence for the expression of FABP2 was verified in some samples.

Via MTT-test a cytotoxic effect of the test substances was excluded.

There is the possibility that the applied PPAR ligands had none or just a weak effect on fatty acid uptake in Caco-2 cells.

Further experiments investigating the inhibition of proteins probably involved in fatty acid binding and transport as well as of the energy metabolism of the cells could give information about the way and amount proteins and transporters are involved in fatty acid uptake in enterocytes.

Considering the results, natural PPAR γ and PPAR α ligands are not applicable for the delay of fatty acid uptake in the intestine.

Lapacho tea was identified as a promising candidate for the development of functional food or food additives for the Metabolic Syndrome.

7 Literaturverzeichnis

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J (2001): *Global and societal implications of the diabetes epidemic*. Nature; **414**(6865): 782-7.
2. Holmboe-Ottesen G (2000): *Global trends in food consumption and nutrition*. Tidsskr Nor Laegeforen; **120**(1): 78-82.
3. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J (2006): *Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation*. Diabet Med; **23**(5): 469-80.
4. Reaven GM (1988): *Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease*. Diabetes; **37**(12): 1595-607.
5. Alberti KG, Zimmet PZ (1998): *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med; **15**(7): 539-53.
6. Schrezenmeir J, Fenselau S, Keppler I, et al. (1997): *Postprandial triglyceride high response and the metabolic syndrome*. Ann N Y Acad Sci; **827**: 353-68.
7. Weber P, Schrezenmeir J, Fenselau S, et al. (1993): *Prolonged postprandial increment in triglycerides and decreased postprandial response of very low density lipoproteins in type 2 diabetics following an oral lipid load*. Ann N Y Acad Sci; **683**: 315-21.
8. Jeppesen J, Hollenbeck CB, Zhou MY, et al. (1995): *Relation between insulin resistance, hyperinsulinemia, postheparin plasma lipoprotein lipase activity, and postprandial lipemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol; **15**(3): 320-4.
9. Groot PH, van Stiphout WA, Krauss XH, et al. (1991): *Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease*. Arterioscler Thromb; **11**(3): 653-62.
10. Simpson HS, Williamson CM, Olivecrona T, et al. (1990): *Postprandial lipemia, fenofibrate and coronary artery disease*. Atherosclerosis; **85**(2-3): 193-202.
11. Weibel EK, Hadvary P, Hochuli E, Kupfer E, Lengsfeld H (1987): *Lipstatin, an inhibitor of pancreatic lipase, produced by Streptomyces toxytricini. I. Producing organism, fermentation, isolation and biological activity*. J Antibiot (Tokyo); **40**(8): 1081-5.
12. Reitsma JB, Castro Cabezas M, de Bruin TW, Erkelens DW (1994): *Relationship between improved postprandial lipemia and low-density lipoprotein metabolism during treatment with tetrahydrolipstatin, a pancreatic lipase inhibitor*. Metabolism; **43**(3): 293-8.
13. Tan KC, Tso AW, Tam SC, Pang RW, Lam KS (2002): *Acute effect of orlistat on post-prandial lipaemia and free fatty acids in overweight patients with Type 2 diabetes mellitus*. Diabet Med; **19**(11): 944-8.
14. Pittler MH, Ernst E (2004): *Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review*. Am J Clin Nutr; **79**(4): 529-36.

15. Houseknecht KL, Cole BM, Steele PJ (2002): *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and its ligands: a review*. *Domest Anim Endocrinol*; **22**(1): 1-23.
16. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995): *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)*. *J Biol Chem*; **270**(22): 12953-6.
17. Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N (1998): *Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner*. *J Biol Chem*; **273**(27): 16710-4.
18. Tranchant T, Besson P, Hoinard C, et al. (1997): *Mechanisms and kinetics of alpha-linolenic acid uptake in Caco-2 clone TC7*. *Biochim Biophys Acta*; **1345**(2): 151-61.
19. Pinto M RLS, Appay M.-D, Kedinger M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, Fogh J, Zweibaum A (1983): *Enterocyte-Like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture*. *Biol Cell*; **47**: 323-330.
20. Fogh J, Fogh JM, Orfeo T (1977): *One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice*. *J Natl Cancer Inst*; **59**(1): 221-6.
21. Kerner W, Brückel J, Böhm BO (2004): *Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus*. In: *Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG* (Hrsg.: Scherbaum WA, Kiess W); Aktualisierung der 1. Auflage vom Juli 2001 der Deutschen Diabetes-Gesellschaft.
22. Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP (1992): *Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X)*. *Diabetes*; **41**(6): 715-22.
23. Kaplan NM (1996): *The deadly quartet and the insulin resistance syndrome: an historical overview*. *Hypertens Res*; **19 Suppl 1**: S9-11.
24. Liebl A, Neiss A, Spannheimer A, Reitberger U, Wagner T, Gortz A (2001): *[Costs of type 2 diabetes in Germany. Results of the CODE-2 study]*. *Dtsch Med Wochenschr*; **126**(20): 585-9.
25. Rolls BJ (2000): *The role of energy density in the overconsumption of fat*. *J Nutr*; **130**(2S Suppl): 268S-271S.
26. Perusse L, Bouchard C (2000): *Gene-diet interactions in obesity*. *Am J Clin Nutr*; **72**(5 Suppl): 1285S-1290S.
27. Parham ES (1990): *The interaction of eating restraint and stressful life events on women's weight and weight changes*. *Nutr. Res.*; **10**: 831-835.
28. Wells JC (1998): *Is obesity really due to high energy intake or low energy expenditure?* *Int J Obes Relat Metab Disord*; **22**(11): 1139-40.
29. Sharma AM, Chetty VT (2005): *Obesity, hypertension and insulin resistance*. *Acta Diabetol*; **42 Suppl 1**: S3-8.
30. Sharma AM (2006): *The obese patient with diabetes mellitus: from research targets to treatment options*. *Am J Med*; **119**(5 Suppl 1): S17-23.

31. Riccardi G, Rivellese AA (2000): *Dietary treatment of the metabolic syndrome--the optimal diet*. Br J Nutr; **83 Suppl 1**: S143-8.
32. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ (2005): *The metabolic syndrome*. Lancet; **365**(9468): 1415-28.
33. Weintraub MS, Grosskopf I, Rassin T, et al. (1996): *Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary artery disease: case control study over three years*. Bmj; **312**(7036): 936-9.
34. Cohn JS, McNamara JR, Cohn SD, Ordovas JM, Schaefer EJ (1988): *Postprandial plasma lipoprotein changes in human subjects of different ages*. J Lipid Res; **29**(4): 469-79.
35. Schrezenmeir J, Weber P, Probst R, et al. (1992): *Postprandial pattern of triglyceride-rich lipoprotein in normal-weight humans after an oral lipid load: exaggerated triglycerides and altered insulin response in some subjects*. Ann Nutr Metab; **36**(4): 186-96.
36. Schlierf G, Oster P, Seidel D, et al. (1977): *Tagesprofile von Plasmalipiden und Lipoproteinen bei Patienten mit endogener Hypertriglyceridämie (Typ IV Hyperlipoproteinämie)*. Klin. Wochenschau; **55**: 161-167.
37. Lewis GF, O'Meara NM, Soltys PA, et al. (1990): *Postprandial lipoprotein metabolism in normal and obese subjects: comparison after the vitamin A fat-loading test*. J Clin Endocrinol Metab; **71**(4): 1041-50.
38. Boquist S, Ruotolo G, Tang R, et al. (1999): *Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men*. Circulation; **100**(7): 723-8.
39. Patsch JR, Miesenbock G, Hopferwieser T, et al. (1992): *Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state*. Arterioscler Thromb; **12**(11): 1336-45.
40. Simons LA, Dwyer T, Simons J, et al. (1987): *Chylomicrons and chylomicron remnants in coronary artery disease: a case-control study*. Atherosclerosis; **65**(1-2): 181-9.
41. Zilversmit DB (1979): *Atherogenesis: a postprandial phenomenon*. Circulation; **60**(3): 473-85.
42. Schrezenmeir J (1996): *Hyperinsulinemia, hyperproinsulinemia and insulin resistance in the metabolic syndrome*. Experientia; **52**(5): 426-32.
43. Friedman HI, Nylund B (1980): *Intestinal fat digestion, absorption, and transport. A review*. Am J Clin Nutr; **33**(5): 1108-39.
44. Abumrad N, Coburn C, Ibrahimi A (1999): *Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm*. Biochim Biophys Acta; **1441**(1): 4-13.
45. Abumrad N, Harmon C, Ibrahimi A (1998): *Membrane transport of long-chain fatty acids: evidence for a facilitated process*. J Lipid Res; **39**(12): 2309-18.
46. Chen M, Yang Y, Braunstein E, Georgeson KE, Harmon CM (2001): *Gut expression and regulation of FAT/CD36: possible role in fatty acid transport in rat enterocytes*. Am J Physiol Endocrinol Metab; **281**(5): E916-23.

47. Levin MS, Talkad VD, Gordon JI, Stenson WF (1992): *Trafficking of exogenous fatty acids within Caco-2 cells*. J Lipid Res; **33**(1): 9-19.
48. Stump DD, Fan X, Berk PD (2001): *Oleic Acid Uptake and Binding by Rat Adipocytes Define Dual Pathways for Cellular Fatty Acid Uptake* J. Lipid Res; **42**: 509-520.
49. Lowe ME (2002): *The triglyceride lipases of the pancreas*. J Lipid Res; **43**(12): 2007-16.
50. Brockerhoff H (1971): *On the function of bile salts and proteins as cofactors of lipase*. J Biol Chem; **246**(18): 5828-31.
51. Löffler G, Perides PE (2003): *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer, 6.Auflage.
52. Embleton JK, Pouton CW (1997): *Structure and function of gastro-intestinal lipases*. Advanced Drug Delivery Reviews; **25**: 15-32.
53. Rehner G, Daniel H (1999): *Biochemie der Ernährung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
54. van Tilbeurgh H, Bezzine S, Cambillau C, Verger R, Carriere F (1999): *Colipase: structure and interaction with pancreatic lipase*. Biochim Biophys Acta; **1441**(2-3): 173-84.
55. Ollis DL, Cheah E, Cygler M, et al. (1992): *The alpha/beta hydrolase fold*. Protein Eng; **5**(3): 197-211.
56. Traub PC.(2000): Gensynthese, Expression und Refolding der Lipasen. Dissertation: Stuttgart.
57. Aoubala M, de la Fourniere L, Douchet I, et al. (1995): *Human pancreatic lipase. Importance of the hinge region between the two domains, as revealed by monoclonal antibodies*. J Biol Chem; **270**(8): 3932-7.
58. Beer HD, Wohlfahrt G, McCarthy JE, Schomburg D, Schmid RD (1996): *Analysis of the catalytic mechanism of a fungal lipase using computer-aided design and structural mutants*. Protein Eng; **9**(6): 507-17.
59. Chiesi M, Huppertz C, Hofbauer KG (2001): *Pharmacotherapy of obesity: targets and perspectives*. Trends Pharmacol Sci; **22**(5): 247-54.
60. Ballinger A, Peikin SR (2002): *Orlistat: its current status as an anti-obesity drug*. Eur J Pharmacol; **440**(2-3): 109-17.
61. Williams G (1997): *Lipase inhibition from theory to clinical practice*. Abstract books, 8th European Congress on Obesity, Roche Pharmaceuticals.
62. Hutton B, Fergusson D (2004): *Changes in body weight and serum lipid profile in obese patients treated with orlistat in addition to a hypocaloric diet: a systematic review of randomized clinical trials*. Am J Clin Nutr; **80**(6): 1461-8.
63. Hadvary P, Lengsfeld H, Wolfer H (1988): *Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin*. Biochem J; **256**(2): 357-61.

64. Guerciolini R (1997): *Mode of action of orlistat*. Int J Obes Relat Metab Disord; **21 Suppl 3**: S12-23.
65. Slanc P, Doljak B, Mlinaric A, Strukelj B (2004): *Screening of wood damaging fungi and macrofungi for inhibitors of pancreatic lipase*. Phytother Res; **18**(9): 758-62.
66. Nonaka Y, Ohtaki H, Ohtsuka E, et al. (1996): *Effects of ebelactone B, a lipase inhibitor, on intestinal fat absorption in the rat*. J Enzyme Inhib; **10**(1): 57-63.
67. Shimura S, Tsuzuki W, Kobayashi S, Suzuki S (1992): *Inhibitory effect on lipase activity of extracts from medical herbs*. Biosci. Biotech. Biochem.; **56**(9): 1478-1479.
68. Juhel C, Armand M, Pafumi Y, Rosier C, Vandermander J, Lairon D (2000): *Green tea extract (AR25) inhibits lipolysis of triglycerides in gastric and duodenal medium in vitro*. J Nutr Biochem; **11**(1): 45-51.
69. Han LK, Takaku T, Li J, Kimura Y, Okuda H (1999): *Anti-obesity action of oolong tea*. Int J Obes Relat Metab Disord; **23**(1): 98-105.
70. Han LK, Kimura Y, Kawashima M, et al. (2001): *Anti-obesity effects in rodents of dietary teasaponin, a lipase inhibitor*. Int J Obes Relat Metab Disord; **25**(10): 1459-64.
71. Ikeda I, Tsuda K, Suzuki Y, et al. (2005): *Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats*. J Nutr; **135**(2): 155-9.
72. Shimura S, Tsuzuki W, Itoh Y, Kobayashi S, Suzuki T (1993): *Lipase inhibitors in Cassia mimosoides L. var. nomame Makino*. Nippon Nogeikagaku Kaishi; **67**(11): 1583-1589.
73. Hatano T, Yamashita A, Hashimoto T, et al. (1997): *Flavan dimers with lipase inhibitory activity from Cassia nomame*. Phytochemistry; **46**(5): 893-900.
74. Yamamoto M, Shimura S, Itoh Y, Ohsaka T, Egawa M, Inoue S (2000): *Anti-obesity effects of lipase inhibitor CT-II, an extract from edible herbs, Nomame Herba, on rats fed a high-fat diet*. Int J Obes Relat Metab Disord; **24**(6): 758-64.
75. Han LK, Xu BJ, Kimura Y, Zheng Y, Okuda H (2000): *Platycodi radix affects lipid metabolism in mice with high fat diet-induced obesity*. J Nutr; **130**(11): 2760-4.
76. Han LK, Zheng YN, Xu BJ, Okuda H, Kimura Y (2002): *Saponins from platycodi radix ameliorate high fat diet-induced obesity in mice*. J Nutr; **132**(8): 2241-5.
77. Moreno DA, Ilic N, Poulev A, Brasaemle DL, Fried SK, Raskin I (2003): *Inhibitory effects of grape seed extract on lipases*. Nutrition; **19**(10): 876-9.
78. Shin JE, Han MJ, Song MC, Baek NI, Kim DH (2004): *5-Hydroxy-7-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-1-phenyl-3-heptanone: a pancreatic lipase inhibitor isolated from Alpinia officinarum*. Biol Pharm Bull; **27**(1): 138-40.
79. Kwon CS, Sohn HY, Kim SH, et al. (2003): *Anti-obesity effect of Dioscorea nipponica Makino with lipase-inhibitory activity in rodents*. Biosci Biotechnol Biochem; **67**(7): 1451-6.

7 Literaturverzeichnis

80. Bitou N, Ninomiya M, Tsujita T, Okuda H (1999): *Screening of lipase inhibitors from marine algae*. *Lipids*; **34**(5): 441-5.
81. Kurihara H, Asami S, Shibata H, Fukami H, Tanaka T (2003): *Hypolipemic effect of Cyclocarya paliurus (Batal) Iljinskaja in lipid-loaded mice*. *Biol Pharm Bull*; **26**(3): 383-5.
82. Ninomiya K, Matsuda H, Shimoda H, et al. (2004): *Carnosic acid, a new class of lipid absorption inhibitor from sage*. *Bioorg Med Chem Lett*; **14**(8): 1943-6.
83. Yoshikawa M, Shimoda H, Nishida N, Takada M, Matsuda H (2002): *Salacia reticulata and its polyphenolic constituents with lipase inhibitory and lipolytic activities have mild antiobesity effects in rats*. *J Nutr*; **132**(7): 1819-24.
84. Tsujita T, Sumiyoshi M, Han LK, Fujiwara T, Tsujita J, Okuda H (2003): *Inhibition of lipase activities by citrus pectin*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*; **49**(5): 340-5.
85. Kawaguchi K, Mizuno T, Aida K, Uchino K (1997): *Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and Pseudomonas*. *Biosci Biotechnol Biochem*; **61**(1): 102-4.
86. Knuckles BE (1988): *Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on lipase activity*. *J. Food Science*; **53**(1): 250-252.
87. Tani H, Ohno H, Watanabe K (1994): *Purification and characterization of proteinous inhibitor of lipase from wheat flour*. *J. Agric. Food Chem.*; **42**: 2382-2385.
88. Tani H, Ohishi H, Watanabe K (1995): *When flour lipase inhibitor decreases serum lipid levels in male rats*. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*; **41**(6): 699-706.
89. Borel P, Lairon D, Termine E, Grataroli R, Lafont H (1989): *Isolation and properties of lipolysis inhibitory proteins from wheat germ and wheat bran*. *Plant Foods Hum Nutr*; **39**(4): 339-48.
90. Satouchi K, Mori T, Matsushita S (1974): *Characterization of inhibitor protein for lipase in Soybean seeds*. *Agr Biol Chem*; **38**: 97-101.
91. Takahashi H (1996): *Lipase inhibitor of defatted rice germ*. European Patent EP0631727.
92. Tsutsumi K, Kawauchi Y, Kondo Y, Inoue Y, Koshitani O, Kohri H (2000): *Water extract of defatted rice bran suppresses visceral fat accumulation in rats*. *J Agric Food Chem*; **48**(5): 1653-6.
93. Tsujita T, Matsuura Y, Okuda H (1996): *Studies on the inhibition of pancreatic and carboxylester lipases by protamine*. *J Lipid Res*; **37**(7): 1481-7.
94. Carriere F, Renou C, Ransac S, et al. (2001): *Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; **281**(1): G16-28.
95. Kagawa K, Matsutaka H, Fukuhama C, Watanabe Y, Fujino H (1996): *Globin digest, acidic protease hydrolysate, inhibits dietary hypertriglyceridemia and Val-Val-Tyr-Pro, one of its constituents, possesses most superior effect*. *Life Sci*; **58**(20): 1745-55.

96. Kagawa K, Matsutaka H, Fukuhama C, Fujino H, Okuda H (1998): *Suppressive effect of globin digest on postprandial hyperlipidemia in male volunteers*. J Nutr; **128**(1): 56-60.
97. Kagawa K MH, Fukuhama C, Fujino H, Numata M, Honda K, Nakamura T (1999): *Peptide and formulations thereof inhibiting elevation of triglycerid levels in blood*. US Patent, Patent number 5 958 885.
98. Comai K, Sullivan AC (1980): *Antiobesity activity of pluronic L-101*. Int J Obes; **4**(1): 33-42.
99. Comai K, Sullivan AC (1980): *In vivo meal model for the evaluation of agents which affect the absorption of triglyceride and cholesterol*. Biochem Pharmacol; **29**(11): 1475-82.
100. Magrioti V, Verger R, Constantinou-Kokotou V (2004): *Triacylglycerols based on 2-(N-tert-butoxycarbonylamino)oleic acid are potent inhibitors of pancreatic lipase*. J Med Chem; **47**(2): 288-91.
101. Mattson FH, Volpenhein RA, Benjamin L (1970): *Inhibition of lipolysis by normal alcohols*. J Biol Chem; **245**(20): 5335-40.
102. Subramanian R, Wasan KM (2003): *Effect of lipid excipients on in vitro pancreatic lipase activity*. Drug Dev Ind Pharm; **29**(8): 885-90.
103. Yukihiisa Y, Fumihiro H, Kenji S (2000): *Lipase inhibitor from extracts of Gambir, a leaf of a guava (Psidium guajava L.) and a leaf of a meadowsweet (Filipendula ulmaria)*. Patentnr.: JP2000103741.
104. Keiichi M, Yoshimasa H, Ikuo S, et al. (2001): *Lipase inhibitor containing a crude drug derived from the terrestrial part of yacon or its extract*. Patentnr.: JP2001299272.
105. Takahiro Y, Shinichiro S, Toshinobu M (2001): *Lipase inhibitor from a plant body of Myrcia sphaerocarpa, Myrcia multiflora or an extract thereof*. Patentnr.: JP2001231500.
106. Keiichi M, Yoshimasa H, Ikuo S, et al. (2001): *Lipase inhibitor from leaf of Psidium guajava L., Psidium guajava L., leaf of Apocynum venetum L., leaf of Gymnema sylvestre and Gardenia jasminoides var. grandiflor or their extracts*. Patentnr.: JP2001226274.
107. Naohito I, Kenichi I (2001): *Lipase inhibitor from lemon grass, allspice, cinnamon or clove, or extract thereof*. Patentnr.: JP2001120237.
108. Masanori K (2001): *Lipase inhibitor from hop*. Patentnr.: JP2001321166.
109. Masahito S TS (2002): *Lipase inhibitor from the group consisting of yucca, Ginseng Radix, jasmine tea, Crataegi Fructus, Astragali Radix tea, rooibos tea, soybean embryo, Zingiber officinale Roscoe and Tochu tea (a tea made from a leaf of Eucommia ulmoides Oliver) as an active ingredient*. Patentnr.: JP2002275077.
110. Kazuma Y (2002): *Lipase inhibitor from Rhodiola sacra*. Patentnr.: JP2002179586.
111. Yoshie O, Yoshishige Y, Katsuyuki O, Shinsuke M (2002): *Lignin as a lipase inhibitor*. Patentnr.: JP2002308796.

7 Literaturverzeichnis

112. Kokichi T, Tomonori S, Masazumi M (2003): *Lipase inhibitor obtained from Medicago sativa, Ilex latifolia, Lonicera japonica, from Mentha piperita, Syzygium aromaticum, Hedera helix, Olea europaea and Apocynum venetum*. Patentnr.: JP2003026585.
113. Kokichi T, Tomonori S, Masazumi M (2003): *Lipase inhibitor Ampelopsis cantoniensis extract and/or an Engelhardtia chrysolepis H. extract containing dihydroflavonol compounds as an active ingredient*. Patentnr.: JP2003012536.
114. Akihiro Y, Takashi T, Takeo I (2003): *Inhibitor of lipase activity from Astilbe thunbergii*. Patentnr.: JP2003342185.
115. Tetsunari T (2003): *Lipase inhibitor from eukalyptus plants*. Patentnr.: JP2003119150.
116. Hiroshi S, Chie Y, Naoki K (2003): *Lipase inhibitor from sage and/or rosemary*. Patentnr.: WO03086436.
117. Takahiro Y, Naoaki M, Yusuke M, Toshinobu M (2004): *Lipase inhibitor from Erythroxylum catuaba plant and/or its extract*. Patentnr.: JP2004292368.
118. Shuichi K, Atsunori O, Naoko O (2004): *Lipase inhibitor from Ilex paraguariensis extract*. Patentnr.: JP2004161644.
119. Hideki K, Hiroshi R, Junko T, Yuuji H (2004): *Pipsissewa extract having the [alpha]-1, 4-glucosidase-inhibiting action and the lipase-inhibiting action*. Patentnr.: JP2004168770.
120. Katsura F, Takashi K, Minoru T, Mariko I, Katsumi I, Junko Y (2005): *Lipase inhibitor from extract of Ascophyllum nodsum*. Patentnr.: WO2005056034.
121. Osamu C, Rie T, Masayuki K, Kazunori O, Hideyuki S (2005): *Lipase inhibitor comprising, as the active ingredient, at least one plant selected from the group consisting of avocado, Flacourtia inermis, Pouteria campechiana, Eugenia jambolana, Syzygium jambos and Syzygium samarangense, or an extract thereof*. Patentnr.: WO2005056031.
122. Kazuyo T, Tetsuya H (2005): *Lipase inhibitor comprising crushed Eucommia ulmoides leaves or their water extract*. Patentnr.: JP2005289951.
123. Rikiya K (1991): *(-)-epicatechin gallate and (-)-epigallocatechin gallate as lipase inhibitors*. Patentnr.: JP3228664.
124. Fusako S, Yoshio A, Minoru F, Yasuharu K, Keiichi U, Masato H (1989): *Lipase inhibitor from SHAKUYAKU (root of Paeonia albiflora), OOREN (rhizome of Captis japonica), OOBAKU (bark of Phellodendron amurense), BOTANPI (root of Paeonia moutan), GENNOSHOKO (leaf of Geranium thunbergii), tea leaves, KUJIN (root of Sophora angustifolia), SIBOTANTSURU, arch angle, salvia, SEIYO NEZU, hamamelis and birch or solvent extract of above herbs*. Patentnr.: JP1090131.
125. Kazunori S, Nobuyuki M (2003): *Lipase inhibitor containing dihydrochalcone compound*. Patentnr.: JP2003321351.
126. Kazunori S, Nobuyuki M (2004): *Lipase inhibitor comprising curcumin*. Patentnr.: JP2004137190.

127. Hitochi M, Yoshiyuki I, Hiroaki S, et al. (2005): *Polyphenol fraction collected from Oolong tea as lipase inhibitor*. Patentnr.: WO2005077384.
128. Dietschy JM, Sallee VL, Wilson FA (1971): *Unstirred water layers and absorption across the intestinal mucosa*. *Gastroenterology*; **61**(6): 932-4.
129. Ho SY, Storch J (2001): *Common mechanisms of monoacylglycerol and fatty acid uptake by human intestinal Caco-2 cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*; **281**(4): C1106-17.
130. Hofmann AF, Borgström B (1964): *The Intraluminal Phase of Fat Digestion in Man: the Lipid Content of the Micellar and Oil Phases of Intestinal Content Obtained during Fat Digestion and Absorption*. *J Clin Invest*; **43**: 247-257.
131. Guthmann F, Haupt R, Looman AC, Spener F, Rustow B (1999): *Fatty acid translocase/CD36 mediates the uptake of palmitate by type II pneumocytes*. *Am J Physiol*; **277**(1 Pt 1): L191-6.
132. Berk PD, Wada H, Horio Y, et al. (1990): *Plasma membrane fatty acid-binding protein and mitochondrial glutamic-oxaloacetic transaminase of rat liver are related*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **87**(9): 3484-8.
133. Poirier H, Niot I, Monnot MC, et al. (2001): *Differential involvement of peroxisome-proliferator-activated receptors alpha and delta in fibrate and fatty-acid-mediated inductions of the gene encoding liver fatty-acid-binding protein in the liver and the small intestine*. *Biochem J*; **355**(Pt 2): 481-8.
134. Schaffer JE, Lodish HF (1994): *Expression cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein*. *Cell*; **79**(3): 427-36.
135. Abumrad NA, el-Maghrabi MR, Amri EZ, Lopez E, Grimaldi PA (1993): *Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36*. *J Biol Chem*; **268**(24): 17665-8.
136. Harmon CM, Abumrad NA (1993): *Binding of sulfosuccinimidyl fatty acids to adipocyte membrane proteins: isolation and amino-terminal sequence of an 88-kD protein implicated in transport of long-chain fatty acids*. *J Membr Biol*; **133**(1): 43-9.
137. Hamilton JA (1998): *Fatty acid transport: difficult or easy?* *J Lipid Res*; **39**(3): 467-81.
138. Kamp F, Zakim D, Zhang F, Noy N, Hamilton JA (1995): *Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast*. *Biochemistry*; **34**(37): 11928-37.
139. Kamp F, Guo W, Souto R, Pilch PF, Corkey BE, Hamilton JA (2003): *Rapid flip-flop of oleic acid across the plasma membrane of adipocytes*. *J Biol Chem*; **278**(10): 7988-95.
140. Kleinfeld AM, Storms S, Watts M (1998): *Transport of long-chain native fatty acids across human erythrocyte ghost membranes*. *Biochemistry*; **37**(22): 8011-9.
141. Kleinfeld AM, Chu P, Romero C (1997): *Transport of long-chain native fatty acids across lipid bilayer membranes indicates that transbilayer flip-flop is rate limiting*. *Biochemistry*; **36**(46): 14146-58.

142. Kleinfeld AM, Storch J (1993): *Transfer of long-chain fluorescent fatty acids between small and large unilamellar vesicles*. *Biochemistry*; **32**(8): 2053-61.
143. Ockner RK, Manning JA (1974): *Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport*. *J Clin Invest*; **54**(2): 326-38.
144. Abumrad NA, Perkins RC, Park JH, Park CR (1981): *Mechanism of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte*. *J Biol Chem*; **256**(17): 9183-91.
145. Trotter PJ, Ho SY, Storch J (1996): *Fatty acid uptake by Caco-2 human intestinal cells*. *J Lipid Res*; **37**(2): 336-46.
146. Abumrad NA, Park JH, Park CR (1984): *Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein*. *J Biol Chem*; **259**(14): 8945-53.
147. Luiken JJ, van Nieuwenhoven FA, America G, van der Vusse GJ, Glatz JF (1997): *Uptake and metabolism of palmitate by isolated cardiac myocytes from adult rats: involvement of sarcolemmal proteins*. *J Lipid Res*; **38**(4): 745-58.
148. Chow SL, Hollander D (1979): *A dual, concentration-dependent absorption mechanism of linoleic acid by rat jejunum in vitro*. *J Lipid Res*; **20**(3): 349-56.
149. Stremmel W (1988): *Uptake of fatty acids by jejunal mucosal cells is mediated by a fatty acid binding membrane protein*. *J Clin Invest*; **82**(6): 2001-10.
150. Murota K, Storch J (2005): *Uptake of micellar long-chain fatty acid and sn-2-monoacylglycerol into human intestinal Caco-2 cells exhibits characteristics of protein-mediated transport*. *J Nutr*; **135**(7): 1626-30.
151. Storch J, Thumser AE (2000): *The fatty acid transport function of fatty acid-binding proteins*. *Biochim Biophys Acta*; **1486**(1): 28-44.
152. Binas B, Danneberg H, McWhir J, Mullins L, Clark AJ (1999): *Requirement for the heart-type fatty acid binding protein in cardiac fatty acid utilization*. *Faseb J*; **13**(8): 805-12.
153. Shields HM, Bates ML, Bass NM, Best CJ, Alpers DH, Ockner RK (1986): *Light microscopic immunocytochemical localization of hepatic and intestinal types of fatty acid-binding proteins in rat small intestine*. *J Lipid Res*; **27**(5): 549-57.
154. Hirsch D, Stahl A, Lodish HF (1998): *A family of fatty acid transporters conserved from mycobacterium to man*. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **95**(15): 8625-9.
155. Stahl A, Hirsch DJ, Gimeno RE, et al. (1999): *Identification of the major intestinal fatty acid transport protein*. *Mol Cell*; **4**(3): 299-308.
156. Stahl A (2004): *A current review of fatty acid transport proteins (SLC27)*. *Pflugers Arch*; **447**(5): 722-7.
157. Martin G, Poirier H, Hennuyer N, et al. (2000): *Induction of the fatty acid transport protein 1 and acyl-CoA synthase genes by dimer-selective rexinoids suggests that the peroxisome*

- proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimer is their molecular target.* J Biol Chem; **275**(17): 12612-8.
158. Coe NR, Smith AJ, Frohnert BI, Watkins PA, Bernlohr DA (1999): *The fatty acid transport protein (FATP1) is a very long chain acyl-CoA synthetase.* J Biol Chem; **274**(51): 36300-4.
159. Pohl J, Ring A, Eehalt R, Herrmann T, Stremmel W (2004): *New concepts of cellular fatty acid uptake: role of fatty acid transport proteins and of caveolae.* Proc Nutr Soc; **63**(2): 259-62.
160. Poirier H, Degrace P, Niot I, Bernard A, Besnard P (1996): *Localization and regulation of the putative membrane fatty-acid transporter (FAT) in the small intestine. Comparison with fatty acid-binding proteins (FABP).* Eur J Biochem; **238**(2): 368-73.
161. Goudriaan JR, Dahlmans VE, Febbraio M, et al. (2002): *Intestinal lipid absorption is not affected in CD36 deficient mice.* Mol Cell Biochem; **239**(1-2): 199-202.
162. Wetterau JR, Lin MC, Jamil H (1997): *Microsomal triglyceride transfer protein.* Biochim Biophys Acta; **1345**(2): 136-50.
163. Levy E, Stan S, Delvin E, et al. (2002): *Localization of microsomal triglyceride transfer protein in the Golgi: possible role in the assembly of chylomicrons.* J Biol Chem; **277**(19): 16470-7.
164. Chang G, Ruggeri RB, Harwood HJ, Jr. (2002): *Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) inhibitors: discovery of clinically active inhibitors using high-throughput screening and parallel synthesis paradigms.* Curr Opin Drug Discov Devel; **5**(4): 562-70.
165. Wetterau JR, Aggerbeck LP, Bouma ME, et al. (1992): *Absence of microsomal triglyceride transfer protein in individuals with abetalipoproteinemia.* Science; **258**(5084): 999-1001.
166. Berriot-Varoqueaux N, Aggerbeck LP, Samson-Bouma M, Wetterau JR (2000): *The role of the microsomal triglyceride transfer protein in abetalipoproteinemia.* Annu Rev Nutr; **20**: 663-97.
167. Berger J, Moller DE (2002): *The mechanisms of action of PPARs.* Annu Rev Med; **53**: 409-35.
168. Ferre P (2004): *The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity.* Diabetes; **53 Suppl 1**: S43-50.
169. Desvergne B, Wahli W (1999): *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism.* Endocr Rev; **20**(5): 649-88.
170. Duplus E, Forest C (2002): *Is There a Single Mechanism for Fatty Acid Regulation of Gene Transcription?* Biochemical Pharmacology; **64**: 893-901.
171. Oberfield JL, Collins JL, Holmes CP, et al. (1999): *A peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits adipocyte differentiation.* Proc Natl Acad Sci U S A; **96**(11): 6102-6.
172. Sewter C, Vidal-Puig A (2002): *PPARgamma and the thiazolidinediones: molecular basis for a treatment of 'Syndrome X'?* Diabetes Obes Metab; **4**(4): 239-48.
173. Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG (1999): *Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function.* Curr Opin Genet Dev; **9**(2): 140-7.

174. Fenske D HM (2003): *PPAR-Rezeptoren vermitteln vielfältige Effekte*. Pharmazeutische Zeitung Deutschland (PZ) Ausgabe 23/2003
<http://www.pharmazeutische-zeitung.de/>, Zugriff am 26.03.2006.
175. Duval C, Fruchart JC, Staels B (2004): *PPAR alpha, fibrates, lipid metabolism and inflammation*. Arch Mal Coeur Vaiss; **97**(6): 665-72.
176. Spiegelman BM, Flier JS (1996): *Adipogenesis and obesity: rounding out the big picture*. Cell; **87**(3): 377-89.
177. Mital A, Vats RK, Ramachandran U (2002): *PPARs: Nuclear Receptors for Antidiabetics*. CRIPS; **3**: 5-8.
178. Parker JC (2002): *Troglitazone: the discovery and development of a novel therapy for the treatment of Type 2 diabetes mellitus*. Adv Drug Deliv Rev; **54**(9): 1173-97.
179. Kimmel B, Inzucchi SE (2005): *Oral Agents for Typ 2 Diabetes: An Update*. Clinical Diabetes; **23**: 64-76.
180. Berger J, Leibowitz MD, Doebber TW, et al. (1999): *Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects*. J Biol Chem; **274**(10): 6718-25.
181. Tamori Y, Masugi J, Nishino N, Kasuga M (2002): *Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in maintenance of the characteristics of mature 3T3-L1 adipocytes*. Diabetes; **51**(7): 2045-55.
182. Leesnitzer LM, Parks DJ, Bledsoe RK, et al. (2002): *Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662*. Biochemistry; **41**(21): 6640-50.
183. Seimandi M, Lemaire G, Pillon A, et al. (2005): *Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands*. Anal Biochem; **344**(1): 8-15.
184. Muoio DM, Way JM, Tanner CJ, et al. (2002): *Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha regulates fatty acid utilization in primary human skeletal muscle cells*. Diabetes; **51**(4): 901-9.
185. Brown PJ, Stuart LW, Hurley KP, et al. (2001): *Identification of a subtype selective human PPARalpha agonist through parallel-array synthesis*. Bioorg Med Chem Lett; **11**(9): 1225-7.
186. Huang TH, Peng G, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y (2006): *Salacia oblonga root improves postprandial hyperlipidemia and hepatic steatosis in Zucker diabetic fatty rats: activation of PPARalpha*. Toxicol Appl Pharmacol; **210**(3): 225-35.
187. Rouzer CA, Ford-Hutchinson AW, Morton HE, Gillard JW (1990): *MK886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes*. J Biol Chem; **265**(3): 1436-42.
188. Chantret I, Barbat A, Dussaux E, Brattain MG, Zweibaum A (1988): *Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines*. Cancer Res; **48**(7): 1936-42.

189. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT (1989): *Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability.* Gastroenterology; **96**(3): 736-49.
190. Anderson JM, Van Itallie CM (1995): *Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability.* Am J Physiol; **269**(4 Pt 1): G467-75.
191. Delie F, Rubas W (1997): *A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model.* Crit Rev Ther Drug Carrier Syst; **14**(3): 221-86.
192. Diamond J.M. (1977): *The Epithelial Junction: Bridge, Gate, and Fence.* Physiologist; **20**: 10-18.
193. Lever JE (1979): *Regulation of dome formation in differentiated epithelial cell cultures.* J Supramol Struct; **12**(2): 259-72.
194. Gangl A, Ockner RK (1975): *Intestinal metabolism of plasma free fatty acids. Intracellular compartmentation and mechanisms of control.* J Clin Invest; **55**(4): 803-13.
195. Trotter PJ, Storch J (1991): *Fatty acid uptake and metabolism in a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of apical and basolateral incubation.* J Lipid Res; **32**(2): 293-304.
196. van Greevenbroek MM, Voorhout WF, Erkelens DW, van Meer G, de Bruin TW (1995): *Palmitic acid and linoleic acid metabolism in Caco-2 cells: different triglyceride synthesis and lipoprotein secretion.* J Lipid Res; **36**(1): 13-24.
197. Dashti N, Smith EA, Alaupovic P (1990): *Increased production of apolipoprotein B and its lipoproteins by oleic acid in Caco-2 cells.* J Lipid Res; **31**(1): 113-23.
198. Field FJ, Albright E, Mathur SN (1988): *Regulation of triglyceride-rich lipoprotein secretion by fatty acids in CaCo-2 cells.* J Lipid Res; **29**(11): 1427-37.
199. Hughes TE, Sasak WV, Ordovas JM, Forte TM, Lamon-Fava S, Schaefer EJ (1987): *A novel cell line (Caco-2) for the study of intestinal lipoprotein synthesis.* J Biol Chem; **262**(8): 3762-7.
200. Traber MG, Kayden HJ, Rindler MJ (1987): *Polarized secretion of newly synthesized lipoproteins by the Caco-2 human intestinal cell line.* J Lipid Res; **28**(11): 1350-63.
201. Field FJ, Albright E, Mathur SN (1987): *Regulation of cholesterol esterification by micellar cholesterol in CaCo-2 cells.* J Lipid Res; **28**(9): 1057-66.
202. Darimont C, Gradoux N, Cumin F, Baum HP, De Pover A (1998): *Differential regulation of intestinal and liver fatty acid-binding proteins in human intestinal cell line (Caco-2): role of collagen.* Exp Cell Res; **244**(2): 441-7.
203. Sweetser DA, Birkenmeier EH, Klisak IJ, et al. (1987): *The human and rodent intestinal fatty acid binding protein genes. A comparative analysis of their structure, expression, and linkage relationships.* J Biol Chem; **262**(33): 16060-71.
204. Anderle P, Rakhmanova V, Woodford K, Zerangue N, Sadee W (2003): *Messenger RNA expression of transporter and ion channel genes in undifferentiated and differentiated Caco-2 cells compared to human intestines.* Pharm Res; **20**(1): 3-15.

205. Voigt R Pharmazeutische Technologie, Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2000, 9. Auflage.
206. Technologie Pflanzlicher Arzneizubereitungen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1994.
207. Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, de Gruyter, Berlin New York, 2004, 9. Auflage.
208. Beisson F, Tiss A, Riviere C, Verger R (2000): *Methods for lipase detection and assay: a critical review*. European Journal of Lipid Science and Technology; **102**(2): 133-153.
209. Zambon D, Sabate J, Munoz S, et al. (2000): *Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. A randomized crossover trial*. Ann Intern Med; **132**(7): 538-46.
210. Abbey M, Noakes M, Belling GB, Nestel PJ (1994): *Partial replacement of saturated fatty acids with almonds or walnuts lowers total plasma cholesterol and low-density-lipoprotein cholesterol*. Am J Clin Nutr; **59**(5): 995-9.
211. Almario RU, Vonghavaravat V, Wong R, Kasim-Karakas SE (2001): *Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoproteins in combined hyperlipidemia*. Am J Clin Nutr; **74**(1): 72-9.
212. Sano M, Takenaka Y, Kojima R, et al. (1986): *Effects of pu-erh tea on lipid metabolism in rats*. Chem Pharm Bull (Tokyo); **34**(1): 221-8.
213. Andersen T, Fogh J (2001): *Weight loss and delayed gastric emptying following a South American herbal preparation in overweight patients*. J Hum Nutr Diet; **14**(3): 243-50.
214. Kerckhoffs DA, Brouns F, Hornstra G, Mensink RP (2002): *Effects on the human serum lipoprotein profile of beta-glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols*. J Nutr; **132**(9): 2494-505.
215. Belitz H-D, Grosch W (1992): *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer Verlag, 4.Auflage.
216. Watzl B (2001): *Saponine - Charakteristik, Vorkommen, Aufnahme, Stoffwechsel, Wirkungen*. Ernährungsumschau; **48**(Heft 6): 251-253.
217. Dubin M, Fernandez Villamil SH, Stoppani AO (2001): *[Cytotoxicity of beta-lapachone, an naphthoquinone with possible therapeutic use]*. Medicina (B Aires); **61**(3): 343-50.
218. Choi BT, Cheong J, Choi YH (2003): *beta-Lapachone-induced apoptosis is associated with activation of caspase-3 and inactivation of NF-kappaB in human colon cancer HCT-116 cells*. Anticancer Drugs; **14**(10): 845-50.
219. Lee JI, Choi DY, Chung HS, et al. (2006): *beta-lapachone induces growth inhibition and apoptosis in bladder cancer cells by modulation of Bcl-2 family and activation of caspases*. Exp Oncol; **28**(1): 30-5.
220. Muller K, Sellmer A, Wiegrebe W (1999): *Potential antipsoriatic agents: lapacho compounds as potent inhibitors of HaCaT cell growth*. J Nat Prod; **62**(8): 1134-6.

221. Woo HJ, Choi YH (2005): *Growth inhibition of A549 human lung carcinoma cells by beta-lapachone through induction of apoptosis and inhibition of telomerase activity*. Int J Oncol; **26**(4): 1017-23.
222. Lindl T (2000): *Zell- und Gewebekultur*,. 5.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin.
223. Kunert A (2005): *Etablierung einer Methode zur Bestimmung des Fettsäuretransports in Caco-2 Zellen*, Master Thesis, Kiel.
224. Müller N (2005): *Einfluss von chemischen und natürlichen PPAR?-Liganden auf die Glucoseaufnahme in 3T3-L1 Adipocyten*, Diplomarbeit, Hamburg.
225. Samoszuk M, Tan J, Chorn G (2005): *The chalcone butein from Rhus verniciflua Stokes inhibits clonogenic growth of human breast cancer cells co-cultured with fibroblasts*. BMC Complement Altern Med; **5**(1): 5.
226. Cunard R, Eto Y, Muljadi JT, Glass CK, Kelly CJ, Ricote M (2004): *Repression of IFN-gamma expression by peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. J Immunol; **172**(12): 7530-6.
227. Kehrer JP, Biswal SS, La E, et al. (2001): *Inhibition of peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)alpha by MK886*. Biochem J; **356**(Pt 3): 899-906.
228. Spector AA (1975): *Fatty acid binding to plasma albumin*. J Lipid Res; **16**(3): 165-79.
229. Mosmann T (1983): *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods; **65**(1-2): 55-63.
230. Trotter PJ, Storch J (1993): *Fatty acid esterification during differentiation of the human intestinal cell line Caco-2*. J Biol Chem; **268**(14): 10017-23.
231. Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ (1979): *Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria*. J Cell Biol; **80**(2): 248-65.
232. Kunert A (2005): *Etablierung einer Methode zur Bestimmung des Fettsäuretransports in Caco-2 Zellen*, Master Thesis, Kiel.
233. Hamilton JA, Kamp F (1999): *How are free fatty acids transported in membranes? Is it by proteins or by free diffusion through the lipids?* Diabetes; **48**(12): 2255-69.
234. Zakim D (1996): *Fatty acids enter cells by simple diffusion*. Proc Soc Exp Biol Med; **212**(1): 5-14.
235. Stremmel W (1988): *Fatty acid uptake by isolated rat heart myocytes represents a carrier-mediated transport process*. J Clin Invest; **81**(3): 844-52.
236. Stremmel W, Lotz G, Strohmeyer G, Berk PD (1985): *Identification, isolation, and partial characterization of a fatty acid binding protein from rat jejunal microvillous membranes*. J Clin Invest; **75**(3): 1068-76.

237. Frohnert BI, Hui TY, Bernlohr DA (1999): *Identification of a functional peroxisome proliferator-responsive element in the murine fatty acid transport protein gene*. J Biol Chem; **274**(7): 3970-7.
238. Mochizuki K, Suruga K, Kitagawa M, Takase S, Goda T (2001): *Modulation of the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-dependent genes through disproportional expression of two subtypes in the small intestine*. Arch Biochem Biophys; **389**(1): 41-8.
239. Mochizuki K, Suruga K, Yagi E, Takase S, Goda T (2001): *The expression of PPAR-associated genes is modulated through postnatal development of PPAR subtypes in the small intestine*. Biochim Biophys Acta; **1531**(1-2): 68-76.
240. Brouillette C, Bosse Y, Perusse L, Gaudet D, Vohl MC (2004): *Effect of liver fatty acid binding protein (FABP) T94A missense mutation on plasma lipoprotein responsiveness to treatment with fenofibrate*. J Hum Genet; **49**(8): 424-32.
241. Schachtrup C, Emmler T, Bleck B, Sandqvist A, Spener F (2004): *Functional analysis of peroxisome-proliferator-responsive element motifs in genes of fatty acid-binding proteins*. Biochem J; **382**(Pt 1): 239-45.
242. Allred CD, Kilgore MW (2005): *Selective activation of PPARgamma in breast, colon, and lung cancer cell lines*. Mol Cell Endocrinol; **235**(1-2): 21-9.
243. Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C (2002): *Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes*. J Biol Chem; **277**(40): 37254-9.
244. Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J (1997): *Coordinate regulation of the expression of the fatty acid transport protein and acyl-CoA synthetase genes by PPARalpha and PPARgamma activators*. J Biol Chem; **272**(45): 28210-7.

8 Anhang

8.1 Ergebnisse der Enzymatik

8.1.1 Ergebnisse ermittelt mit der Methylresorufinmethode

Tab. 25: Lipaseaktivität in Gegenwart von alkoholischen Testsubstanzen, Methylresorufinmethode

Bezeichnung	n	unverdünnt	1/2	1/10	1/100
Propolis, unbekanntes Extraktionsmittel	5	100 ± 0	98 ± 3	90 ± 1	49 ± 11
Propolis, 86% eth. Extrakt	5	93 ± 9	81 ± 9	46 ± 37	-25 ± 11
Pyrethrum, Mischung aus verschiedenen Chrysanthemum-Arten	2	-12	-	-98	-98
Boonekamp	1	40	33	-33	25
Jägermeister	1	-33	-23	-37	-31
Kümmerling	1	-22	-7	-20	-44
Underberg	1	-39	-10	-50	-76
Wolfsberry	2	18	0	-14	-10
Yaona	2	-7	-	19	-2
<i>Aconitum napellus L.</i>	2	-51	-29	-114	-79
<i>Aesculus hippocastanum</i> (A Natura)	2	4	8	5	7
<i>Aesculus hippocastanum</i> (Cognis)	2	8	-20	6	-38
<i>Agni casti fructus</i>	2	22	11	2	-17
<i>Allium sativum L.</i>	2	-7	-9	18	-72
<i>Aloe barbardensis</i>	2	6	-13	-18	-6
<i>Althaeae radix</i>	2	25	11	-26	4
<i>Anethum graveolens</i>	2	18	26	12	3
<i>Angelica officinalis</i>	2	87	84	64	-2
<i>Anisum</i>	2	53	46	48	38
<i>Armoracia</i>	2	53	52	47	6
<i>Arnica montana</i>	2	60	52	35	-5
<i>Artemisia vulgaris L.</i>	2	-55	-63	-82	-64
<i>Asparagi radix</i>	2	-7	4	-1	-7
<i>Avena sativa</i>	2	-4	2	5	-7
<i>Bellis perennis</i>	2	2	-16	-45	-21
<i>Betula Pedula</i>	2	43	40	14	-27
<i>Bryonia dioica</i>	2	-17	-52	-24	-1
<i>Calendula officinalis</i>	2	8	-9	-10	-33

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverdünnt	1/2	1/10	1/100
<i>Camellia sinensis</i> (Cognis)	2	81	71	36	7
<i>Camellia sinensis</i> (Frutarom, charge 1)	2	61	-15	35	16
<i>Camellia sinensis</i> (Frutarom, charge 2)	2	-42	-15	31	-43
<i>Capsella Bursa-Pastois</i>	2	23	24	0	9
<i>Capsicum frutescens</i>	2	48	35	38	-5
<i>Cardamomum</i>	2	14	17	13	-4
<i>Caryophylli flos</i>	2	30	-40	-102	-87
<i>Castanea vesca</i>	2	24	23	27	19
<i>Centaurea cyanus</i> (Herbamed)	2	-82	-127	-167	-96
<i>Centaurea cyanus</i> (A Natura)	2	8	6	-2	-8
<i>Chamomilla recutita</i> L.	2	46	49	46	34
<i>Chelidonii herba</i>	2	6	5	11	-50
<i>Cichorium intybus</i>	2	32	28	13	11
<i>Cimicifuga racemosa</i>	2	-10	-21	-11	-6
<i>Cimicifugae radix</i>	2	23	20	17	-31
<i>Cinnamomum</i>	2	89	88	-46	-8
<i>Citrus aurantium dulcis</i>	2	16	8	-17	-3
<i>Cotinus coggygria scop</i>	2	58	54	57	13
<i>Crataegus laevigata</i> (Finzelberg)	2	86	79	52	-60
<i>Crataegus laevigata</i> (Cognis)	2	47	34	15	-81
<i>Crataegus laevigata</i> (Flachsmann)	2	58	55	36	5
<i>Cucumis sativus</i>	2	8	3	-23	-35
<i>Dioscorea villosa</i> L.	2	-76	-249	-358	-392
<i>Dulcamara</i>	2	-14	-8	-10	-6
<i>Echinaceae purpureae</i>	2	-4	6	-16	3
<i>Eleutherococcus</i> (Frutarom)	2	9	-2	8	-39
<i>Eleutherococcus</i> (Extraktchemie)	2	28	42	7	-43
<i>Equisetum arvense</i>	2	17	7	9	3
<i>Eucalyptus globulus</i>	2	80	46	-7	0
<i>Euphorbia cyparissias</i> L.	2	-289	-382	-398	-213
<i>Flor de piedra</i>	5	76 ± 9	59 ± 12	10 ± 35	-46 ± 37
<i>Fumaria officinalis</i> L.	2	-53	-43	2	-23
<i>Galega officinalis</i>	2	-14	-15	6	-51
<i>Ginkgo biloba</i> (Phytoline)	2	52	54	69	6

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverdünnt	1/2	1/10	1/100
<i>Ginkgo biloba</i> (A Natura)	2	-11	-3	-3	8
<i>Ginseng radix</i> (Finzelberg)	2	26	26	44	-37
<i>Ginseng radix</i> (Frutarom, 50% m/m)	2	-45	-	-43	-145
<i>Ginseng radix</i> (Frutarom, 80% m/m)	2	-183	-	-63	-9
<i>Guajacum</i>	2	100	89	48	8
<i>Hamamelis virginiana</i>	2	36	26	15	8
<i>Harpagophyti procumbens radix</i>	2	19	12	-6	14
<i>Hedera helix</i> L. (A Natura)	2	12	17	8	-9
<i>Hedera helix</i> L. (Frutarom)	2	55	47	53	7
<i>Humulus lupulus</i>	2	-3	-8	-5	17
<i>Hyperici herba</i> (Finzelberg)	2	91	90	67	4
<i>Hyperici herba</i> (Cognis)	2	54	56	1	0
<i>Ilex paraguariensis</i> (Frutarom, Charge 1)	2	30	-	73	15
<i>Ilex paraguariensis</i> (Frutarom, Charge 2)	2	31	21	70	43
<i>Juglans</i>	2	42	37	37	-40
<i>Piper methysticum</i>	2	97	92	77	50
<i>Lavendula</i>	2	64	63	44	-23
<i>Lawsonia inermis</i>	2	-2	2	4	2
<i>Leonuri herba</i>	2	28	15	31	1
<i>Leonurus cardiaca</i>	2	8	17	39	-17
<i>Magnolia officinalis</i>	5	97 ± 2	96 ± 1	81 ± 6	-8 ± 12
<i>Majorana</i>	2	37	37	-3	-40
<i>Malve silvestris</i>	2	14	12	-11	0
<i>Matricaria chamomilla</i>	2	-11	-10	-7	0
<i>Melissa officinalis</i>	2	-5	20	-31	-54
<i>Mentha piperita</i> (Dr. Hetterich)	2	-49	-58	-41	-74
<i>Mentha piperita</i> (Cognis)	2	18	-4	19	14
<i>Momordica balsamica</i>	2	-186	-378	-323	-578
<i>Nasturtium officinale</i>	2	1	8	6	-29
<i>Olea europaea</i> (20% standardisierter Trockenextrakt)	2	-33	-20	-51	-73
<i>Olea europaea</i> (12% standardisierter Trockenextrakt)	2	-14	-41	-98	-47

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverdünnt	1/2	1/10	1/100
<i>Olea europaea</i> (Frutarom, Charge 1)	2	54	37	16	-42
<i>Olea europaea</i> (Frutarom, Charge 2)	2	59	45	-22	-34
<i>Olea europaea</i> (Frutarom, Charge 3)	2	86	73	51	32
<i>Orthosiphonis folium</i>	2	30	25	31	23
<i>Panax ginseng</i>	2	29	18	-3	-36
<i>Papaver rhoeas</i>	2	45	47	19	10
<i>Passiflora incarnata</i> (Cognis)	2	0	-31	2	3
<i>Passiflora incarnata</i> (Frutarom)	2	-13	-9	3	-24
<i>Paullinia cupana</i>	2	9	32	-34	-21
<i>Phaseolus vulgaris</i>	2	45	36	43	29
<i>Pinus silvestris</i>	5	63 ± 7	59 ± 8	24 ± 27	-38 ± 23
<i>Potentilla anserina</i>	2	23	23	5	-55
<i>Primula veris</i> (Frutarom)	5	81 ± 13	-	68 ± 1	-7 ± 39
<i>Primula veris</i> (Herbamed)	2	-	-	9	2
<i>Prunus africanus</i>	5	69 ± 4	67 ± 5	38 ± 14	9 ± 27
<i>Rhododendron ferrugineum</i>	2	90	87	72	34
<i>Ruscus aculeatus</i>	2	7	22	0	2
<i>Ruta</i>	2	24	20	-1	-20
<i>Sabalisa serrulatae</i>	2	66	67	41	-14
<i>Sanguinaria</i>	2	16	-11	-19	0
<i>Sarothamnus scoparius</i>	2	-	-	-64	19
<i>Schisandrae fructus</i>	2	90	83	-7	-18
<i>Sennae fructus</i>	2	13	10	-12	-33
<i>Sepia gruneris</i>	2	-19	-12	-48	-42
<i>Serpyllum</i>	2	36	40	-3	-18
Silybinrest (Rückstand nach Silibinherstellung)	2	46	42	35	-29
<i>Silymarin-Konzentrat</i> (50,6-56,0% Silymarin)	5	58 ± 4	46 ± 16	34 ± 35	-16 ± 31
<i>Smilax officinalis</i>	2	-50	-	-57	1
<i>Solanum melangenium</i>	2	28	33	-17	-33
<i>Solidaginis herba</i> (Extraktchmie)	2	11	5	15	5
<i>Solidaginis herba</i> (Finzelberg)	2	51	43	18	-17
<i>Symphytum</i>	2	-3	2	10	-12
<i>Syzygium cumini</i> Skeels	2	71	21	-46	-9

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverdünnt	1/2	1/10	1/100
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	2	99	99	73	-15
<i>Tabernanthe iboga</i>	2	-	-	-33	-46
<i>Tanacetum vulgare</i>	2	30	36	-33	-7
<i>Taraxacum officinale</i> (übererdiger Teil)	2	15	7	-3	12
<i>Taraxacum officinale</i> (Wurzel)	2	16	12	-46	-15
<i>Teucrium chamaedrys L.</i>	2	-185	-379	-323	-578
<i>Thymus vulgaris</i>	2	40	46	-40	-38
<i>Tormentillae rhiz.</i>	2	1	-	-6	-5
<i>Trifolium pratense</i>	2	-8	-	-16	-48
<i>Urticae radix</i>	2	50	56	70	-56
<i>Uvae ursi</i>	4	78 ± 4	79 ± 4	46 ± 28	-51 ± 82
<i>Valerianae radix</i>	2	33	44	48	38
<i>Viola tricolor</i>	2	26	22	4	5
<i>Vitis vinifera</i> , Kerne	2	72	67	67	6
<i>Voacanga africana</i>	2	-	-	-7	-59

Tab. 26: Lipaseaktivitäten in Gegenwart von CO₂-Extrakten, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	1/10	1/50	1/100	1/200
Galbanum	2	59	7	1	-9
<i>Acorus calamus</i>	2	90	58	7	-41
<i>Actinidia chinensis</i>	2	100	60	18	-8
<i>Allium sativum</i>	5	97 ± 2	85 ± 11	67 ± 12	32 ± 22
<i>Anethum graveolens</i>	2	67	-32	-24	-15
<i>Anethum sowa</i>	2	53	19	11	8
<i>Azadirachta indica</i>	2	68	58	35	15
<i>Borago officinalis</i>	2	96	67	48	32
<i>Boswellia serrata</i>	2	58	20	13	10
<i>Calendula officinalis</i>	5	87 ± 6	67 ± 14	56 ± 19	26 ± 29
<i>Capsicum annuum</i>	2	32	40	14	16
<i>Capsicum frutescens</i> (5% Capsaicinoide)	2	84	60	46	30
<i>Capsicum frutescens</i> (10% Capsaicinoide)	2	90	56	31	25
<i>Carum carvi</i>	2	77	30	32	33
<i>Chamomilla recutita</i> , -se	2	98	63	43	27
<i>Chamomilla recutita</i> , -to	5	90 ± 6	66 ± 24	54 ± 26	39 ± 23

8 Anhang

Bezeichnung	n	1/10	1/50	1/100	1/200
<i>Chamomilla recutita</i> , -to (ökol.)	5	90 ± 5	65 ± 25	53 ± 27	32 ± 25
<i>Cinnamomum ceylanicum</i>	2	87	52	38	27
<i>Commiphora abyssinica</i>	2	100	8	10	-17
<i>Coriandrum sativum</i>	2	75	37	12	-22
<i>Cryptocaria massoia</i>	2	38	11	2	-16
<i>Daucus carota</i>	2	100	20	27	33
<i>Elettaria cardamomum</i> , -to	5	99 ± 1	86 ± 5	70 ± 14	-
<i>Elettaria cardamomum</i> , -se	5	79 ± 13	44 ± 15	39 ± 20	35 ± 24
<i>Elettaria cardamomum</i> , -se (ökol.)	5	79 ± 4	41 ± 11	38 ± 16	28 ± 16
<i>Hibiscus abelmoschus</i>	2	100	36	16	6
<i>Hippophae rhamnoides</i> (Fruchtfleisch)	2	95	67	36	14
<i>Hippophae rhamnoides</i> (Samen)	5	91 ± 7	73 ± 3	61 ± 11	29 ± 5
<i>Humulus lupulus</i> (Flavex)	2	24	17	13	13
<i>Humulus lupulus</i> (Nateco ₂)	2	73	34	27	15
<i>Illicium verum</i>	2	64	7	-6	-5
<i>Iris pallida</i> (1% Irone)	5	97 ± 5	50 ± 14	26 ± 15	9 ± 7
<i>Iris pallida</i> (3% Irone)	5	100 ± 0	59 ± 12	33 ± 18	17 ± 8
<i>Juniperes communis</i>	2	96	31	16	25
<i>Melissa officinalis</i>	2	46	37	26	24
<i>Mentha piperita</i>	2	86	53	36	28
<i>Myristica fragrans</i> (Blüte)	2	74	32	16	-13
<i>Myristica fragrans</i> (Nuss)	5	40 ± 35	23 ± 14	9 ± 10	16 ± 20
<i>Oenothera biennis</i>	5	72 ± 11	36 ± 12	15 ± 31	-2 ± 25
<i>Origanum majoranum</i>	5	83 ± 12	15 ± 37	-2 ± 34	-6 ± 24
<i>Origanum vulgare</i> (Phenol Typ)	2	46	7	10	8
<i>Origanum vulgare</i> (Terpinol Typ)	5	85 ± 4	36 ± 21	23 ± 18	10 ± 7
<i>Petroselinum crispum</i>	2	61	15	-3	-15
<i>Piper methysticum</i>	5	58 ± 8	47 ± 7	23 ± 13	6 ± 12
<i>Piper nigrum</i>	2	30	13	9	3
<i>Rosa canina</i> (Fruchtfleisch)	5	97 ± 1	60 ± 18	38 ± 14	23 ± 22
<i>Rosa canina</i> (Samen)	5	96 ± 7	60 ± 15	43 ± 20	20 ± 14
<i>Salvia officinalis</i>	2	94	56	41	34
<i>Salvia triloba</i>	2	92	44	28	15
<i>Tanacetum parthenium</i>	5	81 ± 10	53 ± 5	50 ± 12	25 ± 12

8 Anhang

Bezeichnung	n	1/10	1/50	1/100	1/200
<i>Thymus vulgaris</i> , -se	5	97 ± 1	69 ± 6	55 ± 7	29 ± 11
<i>Thymus vulgaris</i> , -to	2	58	19	15	9
<i>Usnea barbata</i>	2	5	-15	-7	2
<i>Vanilla planifolia</i>	2	26	23	-31	17

Zahl: > 50%-ige Lipasehemmung bei der Verdünnung 1/100

Tab. 27: Lipaseaktivität in Gegenwart von wässrigen Fertigextrakten, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	unverdünnt	1/2	1/10	1/100
Tee Extr. Getr., 285133	2	62	53	30	2
Tee Extr. Getr., 290177	2	70	70	21	-13
<i>Agnus castus</i>	2	-51	-52	-13	-6
<i>Apium graveolens</i>	2	7	-20	-5	2
<i>Avenae sativa</i>	2	25	23	-32	-19
<i>Camellia sinensis</i>	2	90	86	49	23
<i>Carum carvi</i>	4	51 ± 9	21 ± 18	12 ± 25	-11 ± 34
<i>Cinnamomum</i>	2	65	53	14	-8
<i>Citrus aurantium</i>	2	-61	-73	-16	3
<i>Cynarae folium</i>	2	-63	-41	7	19
<i>Cynara scolymus</i>	2	-16	-8	-15	-26
<i>Domianae folium</i>	2	-9	-14	4	-21
<i>Echinaceae purpureae herba</i>	2	-86	-61	-94	-105
<i>Garcinia cambogia</i>	2	87 ⁸	-	-2	0
<i>Gentianae luteae radix</i>	2	-24	-49	17	16
<i>Hapagophyti radix</i>	2	-39	-24	2	-20
<i>Hydrocotylis asiat. herba</i>	2	35	15	-45	-11
<i>Ilex paraguariensis</i> , geröstet	2	-15	-10	29	2
<i>Ilex paraguariensis</i> , grün	2	-14	-3	44	-2
<i>Medicaginis herba</i>	2	17	11	-18	-31
<i>Melissae folium</i>	2	11	8	20	2
<i>Paullinia cupana</i>	2	30	-5	-2	-14
<i>Rosa damascena</i>	2	-117	-48	4	-1
<i>Rubi idaei folium</i>	2	33	16	43	11
<i>Salicis cort</i>	2	-4	-10	-4	-6
<i>Taraxaci herba</i>	2	9	-58	-24	-40
<i>Thymus vulgaris</i>	2	-3	-60	2	-66

⁸ ermittelt bei pH 2 anstelle des für die Lipase optimalen pH-Wertes von 8

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverdünnt	1/2	1/10	1/100
<i>Uvae ursi folium</i> (Extraktchemie)	4	78 ± 4	79 ± 4	46 ± 28	-51 ± 82
<i>Uvae ursi folium</i> (Finzelberg)	5	60 ± 22	66 ± 14	17 ± 24	-43 ± 78
<i>Vitis vinifera</i> , Kerne	5	49 ± 12	49 ± 5	52 ± 18	48 ± 21
<i>Vitis vinifera folium</i>	2	11	-	-10	-52

Tab. 28: Lipaseaktivität in Gegenwart von Reinsubstanzen, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)

Bezeichnung	Lsg.m.	n	unv.	1/2	1/10	1/50	1/100	1/200
Allantoin	Bicin-Puffer	2	-40	-45	-12	-	6	-
	100% eth.	2	-65	-37	-28	-	-42	-
Apigenin		1	0	0	5	-	6	-
Apigenin-7-o-Glucosid		1	-16	-17	-3	-	-8	-
Apiin*		2	11	5	-18	-	-15	-
p-Arbutin	100% eth.	1	-6	-4	-14	-	11	-
	Bicin-Puffer	1	-2	-13	-14	-	-14	-
α-Bisabolol		2	43	57	46	-	31	-
Borneol		1	-	-	33	18	11	8
β-Caryophyllen		2	-	-	-	-14	4	-3
Dihydromethysticin		1	0	2	-5	-	0	-
Eugenol		2	14	10	5	-	-6	-
Gallensäure Monohydrat		1	67	-8	-2	-	-5	-
Dinatrium Glyzyrrhetinsäure		2	15	-1	-30	-	-19	-
Monoammonium Glycyrrhetinsäure		2	5	5	-	-	-70	-
18-β-Glyzyrrhetinsäure		2	85	70	82	-	-79	-
18-β-Glyzyrrhetinsäure Kaliumsalz		2	51	38	-	-	5	-
18-β-Glyzyrrhetinsäure Zinksalz		2	98	95	69	-	-100	-
Lapachol		1	0	10	17	-	-17	-
Ligustilid		4	46 ± 13	35 ± 11	8 ± 11	-	-5 ± 12	-
R-(+)-Limonen (306)		1	-	-	33	10	-2	-16
Meristim (1%-ig)	100% eth.	2	-35	2	-66	-	-2	-
	Puffer	2	-57	-7	-7	-	-6	-
Myristicin		2	-	-	15	-3	47	-5
Phloretin		1	95	90	58	-	43	-
Quercetin Dihydrat		2	44	-2	7	-	7	-
Rutoside		2	-3	1	-1	-	-4	-

8 Anhang

Bezeichnung	Lsg.m.	n	unv.	1/2	1/10	1/50	1/100	1/200
Sabinenhydrat		1	-	-	-11	-23	-8	-
Silibinin		2	-19	12	-16	-	2	-
Silibinin, wasserlöslich		1	44	34	-50	-	13	-
Silichristin		1	11	-2	5	-	7	-
Silidianin		1	6	-3	1	-	1	-
Terpineol		1	-	-	41	20	0	-16

Zahl: > 50%-ige Lipasehemmung bei der Verdünnung 1/10

Tab. 29: Lipaseaktivität in Gegenwart von Proteinen, Proteinisolaten und -hydrolysaten, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
Beefextrakt	2	9	10	3	5
Ca-Caseinat	2	-21	-1	-9	-36
Lab Caseinat 30/60	2	-15	-19	-6	-19
Lab Caseinat 90/110	2	0	-47	-5	-7
Na-Caseinat	2	-6	-15	-3	-39
Casein CE90STL, enzymatisch hydrolysiert	2	-15	-2	-62	-26
Fleischpepton	2	-43	-13	4	0
Molkeproteinkonzentrat WE80BG, enzymatisch hydrolysiert	2	-20	-30	-4	-11
Säure-Caseinat 90/110	2	-5	-21	-22	-107
Säure-Caseinat 30/60	2	-15	-4	-21	-32
Seidenprotein	2	-30	-29	-7	-16
<i>Glycine max</i> (Sojamehl SE50BT, enzymatisch hydrolysiert)	2	-25	-5	3	-16
<i>Glycine max</i> (Sojapepton)	2	6	-5	-11	9
<i>Glycine max</i> (Sojaprotein SE70M, enzymatisch hydrolysiert)	2	-28	-38	-10	-20
<i>Lupinus luteus</i> (Lupinenproteinisolat)	2	-17	-25	-18	0
Maisgluten CGE60M, enzymatisch hydrolysiert	2	-8	-22	-3	-8
<i>Oryza sativa</i> (Reisprotein)	4	16 ± 27	2 ± 15	1 ± 7	2 ± 7
Weizengluten WGE80M, enzymatisch hydrolysiert	2	-43	-54	-26	-16
Weizengluten WGE80GP, enzymatisch hydrolysiert	2	-52	-22	-30	-27
<i>Zea mays</i>	2	-8	-22	-3	-8

8 Anhang

Tab. 30: Lipaseaktivitäten in Gegenwart von Oleoresinen/Ölen, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	1/10	1/50	1/100	1/200
<i>Algea</i>	2	65	17	29	16
<i>Aloe barbardensis</i>	5	82 ± 14	38 ± 27	29 ± 27	13 ± 30
<i>Apium graveolens</i>	5	85 ± 9	67 ± 12	41 ± 19	20 ± 28
<i>Arctium lappa officinalis</i>	2	99	39	11	-2
<i>Arnica montana</i>	2	94	49	23	12
<i>Capsicum annum</i>	2	69	55	42	31
<i>Capsicum frutescens</i>	5	88 ± 7	80 ± 7	71 ± 3	51 ± 7
<i>Carum carvi</i>	5	100 ± 0	90 ± 2	77 ± 4	61 ± 6
<i>Corylus avellana</i>	2	95	60	32	24
<i>Persea americana</i>	2	93	59	23	16
<i>Petroselinum crispum</i>	2	86	7	-6	8
<i>Pimenta officinalis</i>	5	94 ± 9	81 ± 4	63 ± 12	45 ± 5
<i>Sabalae serulatae fructus</i>	5	91 ± 6	71 ± 10	51 ± 12	39 ± 22
<i>Salvia officinalis</i>	2	98	44	18	20
<i>Zea mays</i>	5	67 ± 30	-	33 ± 23	-

Zahl: > 50%-ige Lipasehemmung bei der Verdünnung 1/100

Tab. 31: Lipaseaktivität in Gegenwart von Ätherischen Ölen, Methylresorufinmethode

	n	1/10	1/50	1/100	1/200
<i>Cananga odorata</i>	2	92	17	19	14
<i>Cupressus sempervirens</i>	2	3	-	-5	-
<i>Veviteria zizanioides</i>	2	49	13	8	7

Tab. 32: Lipaseaktivität in Gegenwart verschiedener Eigenextraktvarianten, Methylresorufinmethode (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
Strauchtagetes					
wässrig, 37°C	2	-8	-13	-5	-1
<i>Arachis hypogaea</i>					
wässrig, 37°C	1	10	10	10	-20
wässrig, 95°C	1	-2	3	-5	-72
60% ethanolisch, 37°C	1	16	16	21	-29
100% ethanolisch, 37°C	1	47	75	33	16

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
<i>Arctium lappa</i>					
wässrig, 37°C	5	78 ± 6	67 ± 10	35 ± 23	-10 ± 22
wässrig, 95°C	4	36 ± 9	14 ± 33	-19 ± 32	-6 ± 16
60% ethanolisch, 37°C	1	16	11	7	-32
100% ethanolisch, 37°C	5	94 ± 8	94 ± 5	88 ± 8	59 ± 18
<i>Brassica napus L. spp. oleifera Metzg., Sorte A</i>					
wässrig, 37°C	1	-10	-17	-29	-8
wässrig, 95°C	1	21	27	52	14
60% ethanolisch, 37°C	1	-42	-41	-25	-11
100% ethanolisch, 37°C	1	72	64	-38	-26
<i>Brassica napus L. spp. oleifera Metzg., Sorte C</i>					
wässrig, 37°C	1	-11	-5	-31	-170
wässrig, 95°C	1	39	44	33	11
60% ethanolisch, 37°C	1	9	11	9	4
100% ethanolisch, 37°C	5	48 ± 28	10 ± 37	0 ± 20	-7 ± 15
<i>Brassica napus L. spp. oleifera Metzg., Sorte P</i>					
wässrig, 37°C	1	5	2	-10	-32
wässrig, 95°C	1	35	40	37	-58
60% ethanolisch, 37°C	1	37	34	34	4
100% ethanolisch, 37°C	5	74 ± 13	78 ± 3	57 ± 9	34 ± 11
<i>Brassica nigra</i>					
wässrig, 37°C	1	27	16	-23	-32
wässrig, 95°C	-	-	-	-	-
60% ethanolisch, 37°C	1	54	45	44	42
100% ethanolisch, 37°C	1	62	78	58	31
<i>Calendula officinalis</i>					
wässrig, 37°C	5	71 ± 19	58 ± 22	50 ± 23	-9 ± 48
wässrig, 95°C	1	88	87	73	46
60% ethanolisch, 37°C	1	44	36	19	4
100% ethanolisch, 37°C	5	91 ± 1	90 ± 4	88 ± 6	66 ± 12
<i>Camellia sinensis</i>					
wässrig, 37°C	2	91	82	33	10
wässrig, 95°C	2	92	87	50	15
60% ethanolisch, 37°C	1	72	68	-1	-9
100% ethanolisch, 37°C	3	60	61	39	37

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
<i>Camellia sinensis var. assamica</i>					
wässrig, 37°C	2	6	-27	-47	-5
wässrig, 95°C	-	-	-	-	-
60% ethanolisch, 37°C	2	56	48	31	18
100% ethanolisch, 37°C	2	78	71	54	55
<i>Cannabis sativa</i> , Sorte A					
wässrig, 37°C	1	40	28	27	5
wässrig, 95°C	1	67	59	58	1
60% ethanolisch, 37°C	1	51	60	28	19
100% ethanolisch, 37°C	1	96	95	75	47
<i>Cannabis sativa</i> , Sorte B					
wässrig, 37°C	1	75	50	18	-9
wässrig, 95°C	1	-15	-10	-25	-100
60% ethanolisch, 37°C	1	18	19	26	36
100% ethanolisch, 37°C	1	91	87	36	23
<i>Carum carvi</i>					
wässrig, 37°C	1	-4	-13	-38	-18
wässrig, 95°C	1	54	50	47	10
60% ethanolisch, 37°C	1	66	50	27	-46
100% ethanolisch, 37°C	1	34	46	33	-5
<i>Cocos nucifera L.</i>					
wässrig, 37°C	1	21	4	-31	-2
wässrig, 95°C	1	19	24	-37	-13
60% ethanolisch, 37°C	1	9	20	31	-71
100% ethanolisch, 37°C	1	43	59	46	28
<i>Corylus avellana</i>					
wässrig, 37°C	1	53	34	18	-14
wässrig, 95°C	1	38	43	11	-8
60% ethanolisch, 37°C	1	25	24	29	23
100% ethanolisch, 37°C	5	98 ± 2	94 ± 7	74 ± 13	45 ± 36
<i>Cucurbita pepo</i> , Sorte A					
wässrig, 37°C	1	-14	-19	-18	-4
wässrig, 95°C	1	15	15	-6	-24
60% ethanolisch, 37°C	1	44	23	10	-5
100% ethanolisch, 37°C	5	97 ± 5	97 ± 3	79 ± 9	31 ± 22

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
<i>Cucurbita pepo</i> , Sorte B					
wässrig, 37°C	1	18	18	23	-86
wässrig, 95°C	1	-16	-44	-46	-54
60% ethanolisch, 37°C	1	-27	-21	-14	1
100% ethanolisch, 37°C	1	54	70	6	-7
<i>Cuphea wrightii</i>					
wässrig, 37°C	1	25	20	-10	-9
wässrig, 95°C	1	20	-3	-35	-6
60% ethanolisch, 37°C	1	31	17	15	-102
100% ethanolisch, 37°C	5	83 ± 19	88 ± 10	73 ± 7	28 ± 40
<i>Cynoglossum officinale</i>					
wässrig, 37°C	1	56	45	44	41
wässrig, 95°C	1	53	47	52	18
60% ethanolisch, 37°C	1	-7	-6	1	-16
100% ethanolisch, 37°C	5	42 ± 25	42 ± 20	38 ± 10	3 ± 6
<i>Echinops ritro</i> , Sorte A					
wässrig, 37°C	1	-17	-29	18	-21
wässrig, 95°C	1	8	22	9	-75
60% ethanolisch, 37°C	1	33	24	30	12
100% ethanolisch, 37°C	5	70 ± 23	75 ± 15	70 ± 15	37 ± 5
<i>Echinops ritro</i> , Sorte B					
wässrig, 37°C	1	10	17	-103	-34
wässrig, 95°C	1	31	19	25	4
60% ethanolisch, 37°C	1	28	31	30	40
100% ethanolisch, 37°C	1	86	51	47	4
<i>Echinops ritro</i> , Sorte C					
wässrig, 37°C	1	-9	-17	4	40
wässrig, 95°C	1	6	10	13	-92
60% ethanolisch, 37°C	1	27	27	34	15
100% ethanolisch, 37°C	5	55 ± 13	52 ± 22	40 ± 19	20 ± 17
<i>Echinops ritro</i> , Sorte D					
wässrig, 37°C	5	-	-	-	-7 ± 9
wässrig, 95°C	1	-20	-18	-38	-8
60% ethanolisch, 37°C	1	43	14	45	37
100% ethanolisch, 37°C	3	57 ± 19	72 ± 12	81 ± 7	63 ± 13

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
<i>Glycine max</i> , 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-37	-41	-25	-9
wässrig, 95°C	2	-12	-18	-36	-75
60% ethanolisch, 37°C	2	-28	-34	-12	12
100% ethanolisch, 37°C	6	-2	11	-12	-17
<i>Glycine max</i> , 1 Tag Keimung					
wässrig, 37°C	2	-33	-38	-36	-70
wässrig, 95°C	2	-26	-40	-41	-30
60% ethanolisch, 37°C	2	-18	-12	-7	19
100% ethanolisch, 37°C	6	-11	5	-25	-21
<i>Glycine max</i> , 3 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-23	-26	-28	-54
wässrig, 95°C	2	3	-4	-50	-31
60% ethanolisch, 37°C	2	-10	-19	-12	-4
100% ethanolisch, 37°C	6	23	27	-8	-23
<i>Helianthus annuus</i> , Sorte A					
wässrig, 37°C	1	-35	-53	-29	-41
wässrig, 95°C	1	30	27	25	0
60% ethanolisch, 37°C	1	-25	-5	17	12
100% ethanolisch, 37°C	1	75	71	5	-2
<i>Helianthus annuus</i> , Sorte B					
wässrig, 37°C	5	-	-	-	-10 ± 24
wässrig, 95°C	1	28	14	7	-50
60% ethanolisch, 37°C	1	63	36	43	2
100% ethanolisch, 37°C	5	85 ± 7	92 ± 5	87 ± 5	64 ± 7
<i>Hordeum vulgare</i> , 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-14	-19	-4	-1
wässrig, 95°C	2	-3	-53	-33	-20
60% ethanolisch, 37°C	2	22	22	30	22
100% ethanolisch, 37°C	6	4	-5	-15	-31
<i>Hordeum vulgare</i> , 1 Tag Keimung					
wässrig, 37°C	2	-9	-7	-9	-3
wässrig, 95°C	2	1	3	-4	-18
60% ethanolisch, 37°C	2	-12	-14	-6	21
100% ethanolisch, 37°C	6	41	29	-6	-115

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
<i>Hordeum vulgare</i> , 3 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-7	-1	3	6
wässrig, 95°C	2	2	-2	-2	11
60% ethanolisch, 37°C	2	-25	-20	-7	24
100% ethanolisch, 37°C	6	32	20	-22	-29
<i>Ilex paraguariensis</i>					
wässrig, 37°C	2	23	29	67	65
wässrig, 95°C	2	29	42	69	12
60% ethanolisch, 37°C	1	27	36	61	-8
100% ethanolisch, 37°C	2	47	41	50	41
<i>Juglans nigra</i> , Sorte S					
wässrig, 37°C	1	12	-6	23	-58
wässrig, 95°C	1	10	-1	-23	-171
60% ethanolisch, 37°C	1	27	32	39	20
100% ethanolisch, 37°C	5	67 ± 45	73 ± 34	58 ± 44	11 ± 16
<i>Juglans nigra</i> , Sorte H					
wässrig, 37°C	5	-	-	-	19 ± 6
wässrig, 95°C	1	20	10	13	-106
60% ethanolisch, 37°C	1	71	78	74	-48
100% ethanolisch, 37°C	5	77 ± 18	86 ± 10	95 ± 4	72 ± 29
<i>Linum usitatissimum</i>					
wässrig, 37°C	1	-74	-87	-103	-11
wässrig, 95°C ¹		-	-	-	-
60% ethanolisch, 37°C	1	15	12	12	23
100% ethanolisch, 37°C	5	86 ± 10	85 ± 10	62 ± 24	44 ± 22
<i>Linum usitatissimum</i> , Sorte A					
wässrig, 37°C	5	-	-	-	-7 ± 9
wässrig, 95°C	1	1	-92	7	-25
60% ethanolisch, 37°C	1	-25	-35	-90	7
100% ethanolisch, 37°C	5	85 ± 3	91 ± 5	87 ± 3	61 ± 10
<i>Linum usitatissimum</i> , Sorte B					
wässrig, 37°C ¹		-	-	-	-
wässrig, 95°C ¹		-	-	-	-
60% ethanolisch, 37°C	1	-2	7	-8	-13
100% ethanolisch, 37°C	5	86 ± 13	96 ± 3	69 ± 12	-2 ± 19

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
<i>Linum usitatissimum</i> , Sorte C					
wässrig, 37°C	1	-44	-76	-54	28
wässrig, 95°C		Extrakt	nicht	res.bar	
60% ethanolisch, 37°C	1	0	8	25	17
100% ethanolisch, 37°C	1	53	65	-20	-25
<i>Mallotus philippinensis</i>					
wässrig, 37°C	1	74	59	28	-39
wässrig, 95°C	1	68	57	31	-66
60% ethanolisch, 37°C	1	73	66	45	30
100% ethanolisch, 37°C	5	61 ± 21	56 ± 19	67 ± 10	46 ± 15
<i>Malus domestica</i>					
wässrig, 37°C	5	-	-	-	2 ± 5
wässrig, 95°C	1	19	-10	-73	-23
60% ethanolisch, 37°C	1	44	39	27	-15
100% ethanolisch, 37°C	5	84 ± 3	88 ± 3	92 ± 2	76 ± 6
<i>Nicotiana tabacum</i>					
100% ethanolisch, 37°C	1	23	-	-2	2
<i>Nigella sativa</i>					
wässrig, 37°C	1	-11	-8	-31	-44
wässrig, 95°C	1	22	14	-71	-10
60% ethanolisch, 37°C	1	82	63	59	22
100% ethanolisch, 37°C	5	41 ± 19	60 ± 12	71 ± 6	29 ± 13
<i>Oenothera biennis</i> , Sorte A					
wässrig, 37°C	1	51	53	1	-14
wässrig, 95°C	1	76	76	58	34
60% ethanolisch, 37°C	1	67	71	77	-7
100% ethanolisch, 37°C	5	97 ± 3	97 ± 4	74 ± 51	14 ± 50
<i>Oenothera biennis</i> , Sorte B					
wässrig, 37°C	1	62	49	38	-165
wässrig, 95°C	1	64	55	40	-10
60% ethanolisch, 37°C	1	65	65	88	22
100% ethanolisch, 37°C	4	71 ± 5	90 ± 5	88 ± 7	36 ± 11
<i>Panicum 25% Gummi Arabicum</i>					
wässrig, 37°C	2	-35	-46	-32	8
wässrig, 95°C	-	-	-	-	-
60% ethanolisch, 37°C	-	-	-	-	-
100% ethanolisch, 37°C	2	-30	-36	12	-27

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
<i>Panicum</i>					
wässrig, 37°C	2	-22	-32	-18	16
wässrig, 95°C	-	-	-	-	-
60% ethanolisch, 37°C	2	-20	-25	-30	20
100% ethanolisch, 37°C	2	-85	-96	-71	-43
<i>Phaseolus</i> , weiß, 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-7	-9	-10	-10
wässrig, 95°C	2	-	-21	-90	-62
60% ethanolisch, 37°C	2	-2	-5	-6	1
100% ethanolisch, 37°C	2	43	28	-19	-27
<i>Phaseolus</i> , weiß, ohne Angabe					
wässrig, 37°C	2	-1	-6	-38	-57
wässrig, 95°C	2	-	2	-68	-60
60% ethanolisch, 37°C	2	4	3	-6	-8
100% ethanolisch, 37°C	2	36	13	-17	-29
<i>Phaseolus</i> , weiß, 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	6	-12	-12	-8	-14
wässrig, 95°C	2	-6	5	-77	-51
60% ethanolisch, 37°C	2	3	0	7	8
100% ethanolisch, 37°C	6	25	9	-24	-29
<i>Phaseolus</i> , weiß, 1 Tag Keimung					
wässrig, 37°C	2	-16	-9	-17	-16
wässrig, 95°C	2	-	-44	-43	-127
60% ethanolisch, 37°C	2	35	17	15	17
100% ethanolisch, 37°C	6	14	2	-5	-7
<i>Phaseolus</i> , weiß, 3 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-1	-1	-5	-10
wässrig, 95°C	2	-	-34	-16	-71
60% ethanolisch, 37°C	2	14	9	11	29
100% ethanolisch, 37°C	6	42	30	6	-4
<i>Pisum sativum</i> , grün, 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-14	-13	-1	6
wässrig, 95°C	2	-25	-45	-163	-127
60% ethanolisch, 37°C	2	-11	-17	-13	-26
100% ethanolisch, 37°C	2	30	7	-5	-15

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
<i>Pisum sativum</i> , grün, 1 Tag Keimung					
wässrig, 37°C	2	-10	1	1	-2
wässrig, 95°C	2	-16	-25	-50	-60
60% ethanolisch, 37°C	2	1	2	6	-8
100% ethanolisch, 37°C	2	-8	-7	-16	-12
<i>Pisum sativum</i> , grün, 3 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	7	5	10	13
wässrig, 95°C	2	-7	-4	-43	-25
60% ethanolisch, 37°C	2	2	3	5	5
100% ethanolisch, 37°C	2	-3	0	1	-21
<i>Prunus dulcis</i>					
wässrig, 37°C	1	63	39	13	-66
wässrig, 95°C	1	14	-60	-77	-13
60% ethanolisch, 37°C	1	38	39	44	35
100% ethanolisch, 37°C	5	73 ± 14	86 ± 9	46 ± 33	10 ± 21
<i>Rosa canina</i>					
wässrig, 37°C	1	17	-20	10	-61
wässrig, 95°C	1	49	47	61	32
60% ethanolisch, 37°C	1	16	21	47	-9
100% ethanolisch, 37°C	5	91 ± 2	92 ± 3	1 ± 42	-12 ± 26
<i>Secale cereale</i> , 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-17	-12	-12	-5
wässrig, 95°C	2	-	-67	-117	-75
60% ethanolisch, 37°C	2	6	-5	-13	-7
100% ethanolisch, 37°C	6	30	24	1	-20
<i>Secale cereale</i> , 1 Tag Keimung					
wässrig, 37°C	2	-21	-13	-21	-6
wässrig, 95°C	2	-9	-15	-4	-4
60% ethanolisch, 37°C	2	-17	-18	-7	-27
100% ethanolisch, 37°C	6	47	37	5	-13
<i>Secale cereale</i> , 3 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-20	-18	-22	10
wässrig, 95°C	2	9	6	11	13
60% ethanolisch, 37°C	2	-27	-24	-13	-38
100% ethanolisch, 37°C	6	48	38	11	0

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
<i>Sesamum indicum</i> , Sorte A					
wässrig, 37°C	1	-4	-13	-38	-18
wässrig, 95°C	1	-8	-30	-55	-43
60% ethanolisch, 37°C	1	35	38	42	35
100% ethanolisch, 37°C	5	46 ± 16	40 ± 20	44 ± 25	2 ± 28
<i>Sesamum indicum</i> , Sorte B					
wässrig, 37°C	1	2	7	-8	-9
wässrig, 95°C	1	3	-2	-28	-82
60% ethanolisch, 37°C	1	26	14	22	24
100% ethanolisch, 37°C	5	50 ± 22	49 ± 25	23 ± 11	15 ± 21
<i>Tabebuia impetiginosa</i>					
wässrig, 37°C	2	92	78	33	17
wässrig, 95°C	2	65	38	10	4
60% ethanolisch, 37°C	5	98 ± 1	97 ± 1	53 ± 24	21 ± 28
100% ethanolisch, 37°C	5	98 ± 0	98 ± 1	93 ± 5	47 ± 27
<i>Triticum aestivum</i> , 0 Tag Keimung					
wässrig, 37°C	2	-17	-20	-25	-24
wässrig, 95°C	-	-	-	-	-
60% ethanolisch, 37°C	2	-5	-3	-9	-5
100% ethanolisch, 37°C	2	17	-3	-27	-32
<i>Triticum aestivum</i> , 1 Tag Keimung					
wässrig, 37°C	2	-13	-14	-12	-2
wässrig, 95°C	2	-	-	2	-2
60% ethanolisch, 37°C	2	1	1	3	7
100% ethanolisch, 37°C	6	51	22	-17	-20
<i>Triticum aestivum</i> , 3 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-13	-19	-36	-26
wässrig, 95°C	2	-	-	-6	-7
60% ethanolisch, 37°C	2	-11	-13	0	24
100% ethanolisch, 37°C	6	37	12	-20	-24
<i>Triticum aestivum</i> , Keime					
wässrig, 37°C	5	43 ± 20	40 ± 10	-8 ± 36	-71 ± 70
wässrig, 95°C	1	-21	-89	-70	2
60% ethanolisch, 37°C	1	-3	-4	-1	29
100% ethanolisch, 37°C	1	1	4	18	-15

8 Anhang

Bezeichnung	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
<i>Vitis vinifera</i> , Kerne, Sorte A					
wässrig, 37°C	1	72	69	36	-66
wässrig, 95°C	1	49	49	24	-37
60% ethanolisch, 37°C	1	58	60	72	2
100% ethanolisch, 37°C	1	67	69	80	47
<i>Vitis vinifera</i> , Kerne, Sorte B					
wässrig, 37°C	1	67	71	74	13
wässrig, 95°C	1	52	40	26	-67
60% ethanolisch, 37°C	1	28	31	30	40
100% ethanolisch, 37°C	1	65	66	81	48
<i>Vitis vinifera</i> , Kerne, Sorte C					
wässrig, 37°C	1	40	42	-19	-39
wässrig, 95°C	1	37	-41	-51	9
60% ethanolisch, 37°C	1	50	49	25	-12
100% ethanolisch, 37°C	1	78	-	-	-
<i>Zea may</i> , Keime					
wässrig, 37°C	1	38	42	22	-50
wässrig, 95°C	1	19	-44	-62	-120
60% ethanolisch, 37°C	1	15	4	14	2
100% ethanolisch, 37°C	4	46 ± 38	54 ± 39	9 ± 28	-4 ± 10

Zahl: > 50%-ige Lipasehemmung bei der Verdünnung 1/100
¹ Extrakt nicht resuspendierbar

8.1.2 Ergebnisse ermittelt mit der Trioleinmethode

Tab. 33: Lipaseaktivitäten in Gegenwart von alkoholischen Testsubstanzen, Trioleinmethode (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	unv.	1/2	1/10	1/100
Propolis	2	-	99	78	9

8 Anhang

Tab. 34: Lipaseaktivitäten in Gegenwart von wässrigen Fertigextrakten, Trioleinmethode (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	unv.	1/2	1/10	1/100
<i>Vitis vinifera</i> (Kerne)	2	-	-	-	9

Tab. 35: Lipaseaktivität in Gegenwart von CO₂-Extrakten, Trioleinmethode (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	1/10	1/50	1/100	1/200
<i>Allium sativum</i>	2	87	54	50	20
<i>Calendula officinalis</i>	2	71	72	49	34
<i>Capsicum frutescens</i> , 10% Capsaicinoide	2	94	73	48	37
<i>Chamomilla recutita</i> , -to	2	100	73	38	35
<i>Chamomilla recutita</i> , -to, öko	2	100	51	42	26
<i>Elettaria cardamomum</i> , -to	2	100	96	78	27
<i>Hippophae rhamnoides</i> (Samen)	2	-19	-44	-56	-34
<i>Myristica fragrans</i> (Nuss)	2	98	81	62	40
<i>Oenothera biennis</i>	2	-39	-24	-17	-16
<i>Origanum majoranum</i>	2	76	45	35	-7
<i>Origanum vulgare</i> , Terpinol Typ	2	92	75	48	31
<i>Tanacetum parthenium</i>	2	99	78	59	67
<i>Thymus vulgaris</i> , -se	2	-	81	92	49

: Bestätigung der > 50%-igen Lipasehemmung aus der Methylresorufinmethode (1/100)

Tab. 36: Lipaseaktivität in Gegenwart von Oleoresinen und Ölen, Trioleinmethode (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	1/10	1/50	1/100	1/200
<i>Apium graveolens</i>	2	67	43	25	21
<i>Capsicum frutescens</i> , 20% Capsaicinoide	2	-	86	83	53
<i>Carum carvi</i>	2	37	18	51	56
<i>Persea americana</i>	2	-95	-	-44	-
<i>Pimenta officinalis</i>	2	79	52	28	9
<i>Sabalae serulatae fructus</i>	2	87	-	70	-
<i>Zea mays</i>	2	-102	-	-38	-

: Bestätigung der > 50%-igen Lipasehemmung aus der Methylresorufinmethode (1/100)

Tab. 37: Lipaseaktivität in Gegenwart von Eigenextrakten, Trioleinmethode (in % Inhibition)

100% ethanolische Eigen- extrakte, 37°C	n	unverd.	1/2	1/10	1/100
<i>Arctium lappa</i>	2	-	-	-	12
<i>Brassica napus</i> L. spp. <i>oleifera</i> Metzg., Sorte C	2	-	-	-	16
<i>Calendula officinalis</i>	2	-	-	6	-62
<i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i>	1	-	-	-	16
<i>Corylus avellana</i>	2	-	-	-3	12
<i>Cucurbita pepo</i> , Sorte A	2	-	-	-	7
<i>Cuphea wrightii</i>	2	-	-	-	38
<i>Cynoglossum officinale</i>	2	-	-	-	17
<i>Echinops ritro</i> , Sorte A	2	-	-	35	12
<i>Echinops ritro</i> , Sorte B	2	-	-	-	26
<i>Echinops ritro</i> , Sorte C	2	-	-	84	19
<i>Helianthus annuus</i> , Sorte B	2	-	-	-	43
<i>Ilex paraguariensis</i>	2	-	-	-	55
<i>Juglans nigra</i> , Sorte H	2	7	28	1	18
<i>Juglans nigra</i> , Sorte S	2	-	-	-10	-31
<i>Linum usitatissimum</i>	2	-	17	-76	-31
<i>Linum usitatissimum</i> , Sorte A	2	-	-	-	-6
<i>Linum usitatissimum</i> , Sorte B	4	-	-	-	-16 ± 36
<i>Mallotus philippinensis</i>	2	-	-	51	7
<i>Malus domestica</i>	2	-	-	66	62
<i>Nigella sativa</i>	2	-	-	51	20
<i>Oenothera biennis</i> , Sorte A	2	33	50	25	39
<i>Oenothera biennis</i> , Sorte B	2	-	-	36	30
<i>Prunus dulcis</i>	3	-	12 ± 38	-18 ± 16	-5 ± 8
<i>Sesamum indicum</i> , Sorte B	2	-	-	-	-8
<i>Tabebuia impetiginosa</i>	2	92 ± 3	-	91	68
<i>Zea mays</i>	2	-	-	-	-17

: Bestätigung der > 50%-igen Lipasehemmung aus der Methylresorufinmethode (1/100)

8.1.3 Ergebnisse der Bestimmungen der alkalischen Phosphatase

Tab. 38: Aktivität der alkalischen Phosphatase in Gegenwart alkoholischer Fertigextrakte (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	1/200	1/400	1/2000	1/20000
<i>Ilex paraguariensis</i> (Frutarom, Charge 1)	5	7 ± 4	3 ± 1	7 ± 9	18 ± 13
<i>Primula veris</i>	5	-2 ± 21	6 ± 21	-1 ± 25	-1 ± 23
Propolis (A Natura)	5	-1 ± 5	-3 ± 3	-1 ± 5	0 ± 4

Tab. 39: Aktivität der alkalischen Phosphatase in Gegenwart von CO₂-Extrakten (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	1/2000	1/10000	1/20000	1/40000
<i>Allium sativum</i>	5	-13 ± 20	-30 ± 13	-16 ± 16	-8 ± 24
<i>Calendula officinalis</i>	5	-3 ± 2	5 ± 1	3 ± 4	3 ± 3
<i>Capsicum frutescens</i> , 10% Capsaicinoide	5	-19 ± 15	-31 ± 43	-10 ± 7	-18 ± 14
<i>Chamomilla recutita</i> , -se	5	-6 ± 14	-22 ± 24	-4 ± 23	-61 ± 33
<i>Chamomilla recutita</i> , -to, öko	5	-62 ± 21	-62 ± 40	-81 ± 44	-86 ± 51
<i>Elettaria cardamomum</i> , -to	5	-	-2 ± 11	-4 ± 8	-11 ± 19
<i>Hippophae rhamnoides</i> (Samen)	5	-5 ± 8	-5 ± 13	-11 ± 11	-
<i>Myristica fragrans</i> (Nuss)	5	-10 ± 27	-	4 ± 22	-
<i>Oenothera biennis</i>	5	-5 ± 41	-2 ± 35	-38 ± 41	-6 ± 15
<i>Origanum majoranum</i>	5	2 ± 6	-	-10 ± 15	-
<i>Origanum vulgare</i> , Terpinol Typ	5	85 ± 4	36 ± 21	23 ± 18	10 ± 7
<i>Tanacetum parthenium</i>	5	-2 ± 6	-1 ± 6	-1 ± 6	-2 ± 6
<i>Thymus vulgaris</i>	5	-1 ± 30	-8 ± 43	-20 ± 17	-17 ± 28

Tab. 40: Aktivität der alkalischen Phosphatase in Gegenwart wässriger Fertigextrakten (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	unverdünnt	1/2	1/10	1/100
<i>Uvae ursi</i> (Finzelberg)	4	-7 ± 7	-3 ± 4	-9 ± 11	-1 ± 1
<i>Vitis vinifera</i> (Kerne)	5	-4 ± 7	-4 ± 9	-4 ± 7	-4 ± 6

8 Anhang

Tab. 41: Aktivität der alkalischen Phosphatase in Gegenwart von Oleoresinen und Ölen (in % Inhibition)

Bezeichnung	n	1/200	1/400	1/2000	1/10000	1/20000	1/40000
<i>Apium graveolens</i>	5	-	-	-8 ± 23	-3 ± 12	-1 ± 13	-2 ± 21
<i>Carum Carvi</i>	5	-	-	9 ± 12	7 ± 12	9 ± 8	3 ± 7
<i>Capsicum frutescens</i> , 20% Capsaicinoide	5	-	-	-52 ± 32	-49 ± 14	-53 ± 11	-42 ± 4
<i>Persea americana</i>	2	-	-	-14	-14	-10	-11
<i>Pimenta officinalis</i>	5	-	-	-32 ± 16	-33 ± 16	-49 ± 30	-30 ± 14
<i>Sabalae serulatae fructus</i>	5	-	-	-3 ± 14	-23 ± 9	-11 ± 11	-8 ± 20

Tab. 42: Aktivität der alkalischen Phosphatase in Gegenwart von Eigenextrakten (in % Inhibition)

	n	1/200	1/400	1/2000	1/20000
<i>Arctium lappa</i> *	5	-11 ± 17	-6 ± 13	-4 ± 6	-4 ± 7
<i>Brassica napus L. spp. oleifera</i> Metzg., Sorte C*	5	-20 ± 26	-15 ± 13	-10 ± 18	-22 ± 29
<i>Camellia sinensis var. assamica</i> *	5	-3 ± 11	-1 ± 9	1 ± 8	6 ± 9
<i>Calendula officinalis</i> *	5	5 ± 6	-2 ± 7	-3 ± 8	-1 ± 11
<i>Corylus avellana</i> *	5	-2 ± 5	-3 ± 6	-2 ± 3	-7 ± 7
<i>Cucurbita pepo</i> , Sorte A*	5	0 ± 8	-2 ± 7	0 ± 5	0 ± 6
<i>Cuphea wrightii</i> *	5	-12 ± 18	-13 ± 9	-14 ± 10	-16 ± 14
<i>Cynoglossum officinale</i> *	5	0 ± 10	11 ± 30	9 ± 19	9 ± 16
<i>Echinops ritro</i> , Sorte A*	5	-18 ± 27	-14 ± 24	14 ± 7	6 ± 35
<i>Echinops ritro</i> , Sorte C*	5	-4 ± 3	-4 ± 2	-3 ± 2	-3 ± 3
<i>Echinops ritro</i> , Sorte D*	5	-4 ± 3	-1 ± 2	-1 ± 2	9 ± 20
<i>Glycine max</i> , 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-5	-4	-3	-3
wässrig, 95°C	2	-8	-14	-6	-3
60% ethanolisch, 37°C	2	-3	-1	3	6
100% ethanolisch, 37°C	2	0	-1	1	1

8 Anhang

	n	1/200	1/400	1/2000	1/20000
<i>Glycine max</i> , 1 Tag					
Keimung					
wässrig, 37°C	2	-5	-3	-3	-2
wässrig, 95°C	2	-2	-10	-3	-2
60% ethanolisch, 37°C	2	-2	-2	-2	-1
100% ethanolisch, 37°C	2	0	-1	0	0
<i>Glycine max</i> , 3 Tage					
Keimung					
wässrig, 37°C	2	-2	-1	-2	0
wässrig, 95°C	2	-17	-7	-4	-2
60% ethanolisch, 37°C	2	-1	-3	-2	-3
100% ethanolisch, 37°C	2	-2	-1	-1	0
<i>Helianthus annuus</i> , Sorte B*	5	1 ± 10	0 ± 9	-3 ± 6	-1 ± 7
<i>Hordeum vulgare</i> , 0 Tage					
Keimung					
wässrig, 37°C	2	-7	-7	-5	-4
wässrig, 95°C	2	-7	-8	-3	-1
60% ethanolisch, 37°C	2	-3	-1	-1	0
100% ethanolisch, 37°C	2	-1	0	-1	1
<i>Hordeum vulgare</i> , 1 Tag					
Keimung					
wässrig, 37°C	2	1	3	3	4
wässrig, 95°C	2	-1	-2	-2	1
60% ethanolisch, 37°C	2	-3	-2	-2	-2
100% ethanolisch, 37°C	2	0	-6	-6	-8
<i>Hordeum vulgare</i> , 3 Tage					
Keimung					
wässrig, 37°C	2	1	2	3	5
wässrig, 95°C	2	-2	-1	-2	-3
60% ethanolisch, 37°C	2	1	-2	-1	1
100% ethanolisch, 37°C	2	0	-4	-5	-2
<i>Juglans nigra</i> , Sorte H*	5	2 ± 4	1 ± 7	2 ± 4	1 ± 6
<i>Juglans nigra</i> , Sorte S*	5	0 ± 11	3 ± 15	1 ± 15	1 ± 12
<i>Linum usitatissimum</i> , Sorte A*	5	-1 ± 4	1 ± 8	0 ± 7	1 ± 2
<i>Linum usitatissimum</i> , Sorte B*	5	-6 ± 3	-4 ± 3	-3 ± 2	-2 ± 3
<i>Mallotus philippinensis</i> *	5	-3 ± 3	-9 ± 11	-12 ± 12	-9 ± 10
<i>Malus domestica</i> *	5	8 ± 9	-4 ± 10	-4 ± 7	-5 ± 10
<i>Nigella sativa</i> *	5	-8 ± 4	-6 ± 1	0 ± 1	-2 ± 1

8 Anhang

	n	1/200	1/400	1/2000	1/20000
<i>Oenothera biennis</i> , Sorte A*	4	-4 ± 5	-5 ± 3	-3 ± 4	-5 ± 4
<i>Oenothera biennis</i> , Sorte B*	4	-4 ± 3	-1 ± 6	-4 ± 5	-2 ± 5
<i>Phaseolus</i> , weiß, 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-18	-16	-9	0
wässrig, 95°C	2	3	-7	-8	-3
60% ethanolisch, 37°C	2	2	1	1	0
100% ethanolisch, 37°C	2	1	1	-2	4
<i>Phaseolus</i> , weiß, ohne Angabe					
wässrig, 37°C	2	-13	-11	-7	-1
wässrig, 95°C	2	-5	-3	-3	-2
60% ethanolisch, 37°C	2	-3	-5	-2	-1
100% ethanolisch, 37°C	2	-3	-1	-1	-1
<i>Phaseolus</i> , weiß, 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	6	6	8	7
wässrig, 95°C	2	-3	-2	5	5
60% ethanolisch, 37°C	2	6	3	5	6
100% ethanolisch, 37°C	2	-2	-1	-3	0
<i>Phaseolus</i> , weiß, 1 Tag Keimung					
wässrig, 37°C	2	0	-2	1	0
wässrig, 95°C	2	-9	-8	-5	4
60% ethanolisch, 37°C	2	-1	-2	-3	2
100% ethanolisch, 37°C	2	-3	-3	-6	-2
<i>Phaseolus</i> , weiß, 3 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-1	0	1	3
wässrig, 95°C	2	-8	-6	-5	2
60% ethanolisch, 37°C	2	7	13	14	12
100% ethanolisch, 37°C	2	-3	-6	-4	-3
<i>Pisum sativum</i> , grün, 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-3	-3	-2	-2
wässrig, 95°C	2	-11	-9	-2	-3
60% ethanolisch, 37°C	2	2	0	0	0
100% ethanolisch, 37°C	2	1	0	3	3

8 Anhang

	n	1/200	1/400	1/2000	1/20000
<i>Pisum sativum</i> , grün, 1 Tag Keimung					
wässrig, 37°C	2	-2	-1	-2	2
wässrig, 95°C	2	-9	-3	-6	2
60% ethanolisch, 37°C	2	-1	-2	-3	0
100% ethanolisch, 37°C	2	-5	0	-1	0
<i>Pisum sativum</i> , grün, 3 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	12	11	11	12
wässrig, 95°C	2	-4	-4	-2	-1
60% ethanolisch, 37°C	2	-2	-2	-2	-3
100% ethanolisch, 37°C	2	0	-3	1	-1
<i>Prunus dulcis</i> *	4	+9 ± 19	+16 ± 9	+11 ± 7	1 ± 14
<i>Secale cereale</i> , 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	2	-1	2	1
wässrig, 95°C	2	-8	-3	-9	-8
60% ethanolisch, 37°C	2	-7	-11	2	-16
100% ethanolisch, 37°C	2	-2	0	1	0
<i>Secale cereale</i> , 1 Tag Keimung					
wässrig, 37°C	2	-26	-9	2	1
wässrig, 95°C	2	2	1	-1	-1
60% ethanolisch, 37°C	2	-4	-2	-6	-2
100% ethanolisch, 37°C	2	-1	-3	-3	-2
<i>Secale cereale</i> , 3 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-2	-3	0	0
wässrig, 95°C	2	1	4	2	1
60% ethanolisch, 37°C	2	1	0	1	6
100% ethanolisch, 37°C	2	-1	-3	-2	-2
<i>Sesamum indicum</i> , Sorte B	5	-5 ± 1	1 ± 7	1 ± 6	6 ± 4
<i>Triticum aestivum</i> , 0 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-6	-3	-4	-2
wässrig, 95°C	-	-	-	-	-
60% ethanolisch, 37°C	2	-3	-1	-1	-1
100% ethanolisch, 37°C	2	0	5	1	4

8 Anhang

	n	1/200	1/400	1/2000	1/20000
<i>Tabebuia impetiginosa</i> *					
100% ethanolisch, 37°C	5	-6 ± 12	-1 ± 7	-4 ± 10	-7 ± 11
<i>Triticum aestivum</i> , 1 Tag Keimung					
wässrig, 37°C	2	-7	-4	-1	0
wässrig, 95°C	2	-14	-12	-5	0
60% ethanolisch, 37°C	2	-1	-2	-3	-3
100% ethanolisch, 37°C	2	0	1	-2	0
<i>Triticum aestivum</i> , 3 Tage Keimung					
wässrig, 37°C	2	-3	-2	-2	0
wässrig, 95°C	2	-14	-10	-11	-8
60% ethanolisch, 37°C	2	2	2	2	4
100% ethanolisch, 37°C	2	-6	-6	-8	-5
<i>Zea mays</i> *	5	0 ± 8	0 ± 8	-3 ± 9	0 ± 8

* 100% ethanolisch Extrakte, 37°C



Abb. 31: Lapachobaum (Taheebobaum, *Tabebuia impetiginosa*)



Abb. 32: Lapachotee aus der inneren Rinde des Lapachobaums (*Tabebuia impetiginosa*)

8.2 Chemikalien

8.2.1 Chemikalien für die Enzymatik

3- <i>tert</i> -butyl-4-Hydroxyanisol	Sigma, Taufkirchen
2-Amino-2-methyl-1-Propanol	Merck, Darmstadt
Alkalische Phosphatase	Roche, Darmstadt, 108162
Alkalische Phosphatase Bestimmungstest	Thermo Clinical Labsystems, Frankfurt
Bathocuproin	Aldrich, Taufkirchen
BICIN	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt, absolut pro analysi 1.00983.2500
Gallensäuren	Sigma, Taufkirchen, T4009
Gummi Arabicum	Aldrich, Taufkirchen
HEDTA	Fluka, Taufkirchen
Kupferniträt	Merck, Darmstadt
Lipase	Sigma, Taufkirchen, Type II crude, aus porcinem Pankreas, 34% Protein
Lipase colorimetric assay	Roche, Darmstadt
Fluitest Lip	Analyticon, Lichtenfels
Methylcellulose	Sigma, Taufkirchen, M0262
Ölsäure	Sigma, Taufkirchen
Orlistat	Roche, Mannheim
Phosphatidylcholin	Sigma, Taufkirchen, P7443
Triethanolamin	Merck, Darmstadt
Triolein	Fluka, Taufkirchen
Tris	Merck, Darmstadt
Tween 80	Fluka, Taufkirchen

8.2.2 Chemikalien für die Zellkultur

Amphotericin B	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (3,7 g/L NaHCO ₃ , 4,5g/L Glucose, stabiles Glutamin, ohne Na-Pyruvat)	Biochrom, Berlin
Fötales Kälberserum (FCS), hitzeinaktiviert	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Trypsin/ EDTA-Lösung 0,05% Trypsin	Biochrom, Berlin

 0,02% EDTA in PBS

8.2.3 Chemikalien für die Fettsäureaufnahme

Folin Ciocalteus Phenolreagenz	Merck, Darmstadt
MTT-Cell Proliferations Kit I	Roche, Mannheim
Natronlauge 1 N (NaOH)	Merck, Darmstadt
[9,10 (n)- ³ H] Palmitinsäure	Hartmann, Braunschweig
Palmitinsäure	Sigma, Taufkirchen
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
Protease-Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Szintillationsflüssigkeit (Aquasafe 300 Plus)	Zinsser Analytik, Frankfurt
Taurocholsäure	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Biochrom, Berlin

8.2.4 Chemikalien für die qualitative Genexpression

RNeasy Mini Kit 74106 QIAGEN	Quiagen (Hilden)
RLT-Puffer	
RPE-Puffer Quiagen,	
RW1-Puffer	
RNAse-free Aqua bidest	
Quiashredder-Säule	
Quiaspin-Säulen	
Auffanggefäße 2 mL	
2-β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNA-Verdau:	
DNase Verdau Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
DNase Enzym	
RDD-Puffer	
Reverse Transkription:	
TaqMan® Reverse Transcription Reagents Kit	ABI Applied Biosystems, Forest City, USA
dNTP-Mix	
MgCl ₂	
Random Hexamere	
Reverse Transkriptase	
RNAse Inhibitor	
RNAse-freies Wasser	
TaqMan RT-Puffer	

Qualitative RT-PCR:

10xPCR Puffer ohne Mg	Invitrogen, Karlsruhe
10 mmol/L dNTPs	Invitrogen, Karlsruhe
50 mmol/L MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
0,125 µL Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
DEPC (Diethyl Pyrocarbonate)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Agarose-Gel:

TAE-Puffer:	
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris-Puffer Roth	Roth, Karlsruhe
MOPS-Puffer:	
MOPS	Severa Electrophoris, Heidelberg
Agarose	Eurogentec, Köln
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Leiter 1000bp DNA	Invitrogen, Karlsruhe
Leiter 1000bp RNA	Invitrogen, Karlsruhe

8.3 Einwegmaterialien

8.3.1 Einwegmaterialien für die Enzymatik und die Zellkultur

12-Well Nunclon Multischalen	Nunc, Wiesbaden
6-Well Platten	Sarstedt, Nümbrecht
75 cm ² -Kulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
Cell Scraper (25 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße RNase frei 1,5 mL und 200 µL	Sarsted, Nümbrecht
Pipettenspitzen 5 mL 10 mL 30 mL	Sarsted, Nümbrecht
Pipettenspitzen RNase frei 10 µL 100 µL 1000 µL	Sarsted, Nümbrecht
Einfriergefäß 'Mr. Frosty'	Nalgene Labware, Nunc, Wiesbaden
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 mL	Sarsted, Nümbrecht
Szintillationsgefäße, Mini 2000	Zinsser Analytik, Frankfurt

8.3.2 Einwegmaterialien für die qualitative Genexpression

96-Microtiterplatte	ABI, Forest City, USA
Kanülen 1,5 mm*100 mm	Kendall Monoject
optische Deckel (Optical Adhesive Covers)	ABI, Forest City, USA
Petrischalen 100 mm	Corning Costar, Bodenheim, Deutschland
Spritzen 20 mL	Basik Codan Medical AP/S Rödby, DK

8.4 Laborgeräte

8.4.1 Laborgeräte für die Enzymatik

Analyseautomat für die klinische Chemie	Konelab 20i, Kone, Helsinki
SPR-Bindungsermittler	BIAcore [®] 3000
Kaffeemühle M8500	Petra Electric
Magnetrührer	Eydam, IKA-Combimag Reo
Mühle	Futtermischer Lödige M20
pH-Indikatorpapier	Merck, Darmstadt
Reagenzglasschüttler	Janke & Kunkel, VF2
Sieb	Prüfsieb, Ø Porengrösse 2,0 mm
Speed Vac Concentrator	Bachofer, SVC100H
Standardphotometer	Uvikon 860, Kontron
Thermomixer	Eppendorf, 5437
Ultraschall	Labsonic 1510, B.Braun
Zentrifugen	Biofuge B, Heraeus Christ, Eydam Megafuge 1.0 R, Heraeus Sepatech

8.4.2 Laborgeräte für die Zellkultur

Begasungsbrutschrank	Heraeus Instruments, Hamburg
Microplate Spectrophotometer (ELISA-Reader)	Spectra Max 340, Molecular Devices, USA
Mikroskope	Olympus, Japan
Neubauer- Zählkammer (Hämocytometer)	Neubauer- Zählkammer, Brand, Wertheim
Photometer	Uvikon 860, Tegimenta AG, Schweiz
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments, Hamburg
Szintillationszähler	Beckman LS- 1801 Counter, Beckman Coulter GmbH, Krefeld.
Ultraschall	Labsonic 1510, B.Braun Melsungen AG, Melsungen

Wasserbad	GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Zentrifuge	Labofuge M, Heraeus Sepatech

8.4.3 Laborgeräte für die qualitative Genexpression

ABI PRISM™ 7000	ABI, Forest City, USA
Elektrophoresekammer mit Kamm (DNA)	Serva, Heidelberg
Elektrophoresekammer mit Kamm (RNA)	Biozym Oldendorf
Erlenmeyerkolben 200 mL	Roth, Karlsruhe
Kolbenhubpipetten 0,5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL,	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5810R mit Ausschwingrotor	Eppendorf, Hamburg
Spannungsquelle	Electrophoresis Power Supply GIBCO BRL, Gaithersburg, USA
Thermocycler	Whatman Biometra Göttingen

8.5 Verwendete Abkürzungen

µL	Mikroliter
µmol/L	Mikromol / Liter
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-triphosphat
BICIN	<i>N,N</i> -Bis(2-hydroxyethyl)glycine
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
Caco	Karzinom Kolon
CBP	CAMP response element-binding protein
cDNA	Copy Desoxyribonukleinsäure
cpm	Counts per minute
DGAT	Diacylglycerol-Acyltransferase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FABP2	Fatty Acid Binding Protein 2
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung, 9,81 m /s ²
g	Gramm
HDL	High density lipoprotein

IC ₅₀	Konzentration der Testsubstanz, bei der die halbmaximale Enzymhemmung auftritt
ID ₅₀	Verdünnungsstufe der Testlösung, bei der die halbmaximale Enzymhemmung auftritt
IDF	International Diabetes Federation
<i>in vitro</i>	Untersuchung im Labormaßstab
<i>in vivo</i>	Untersuchung am lebenden Organismus
KDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
Kj	Kilojoule
LCFA	Long Chain Fatty Acid (Langkettige Fettsäuren)
LD ₅₀	Letale Dosis
mg/dl	Milligramm / Deziliter
Min	Minute
mmol/L	Millimol / Liter
MPa	Megapascal
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
MTP	Microsomal Triglyceride Transfer Protein
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid
NEAA	Non essential amino acids
ng/mL	Nanogramm pro Milliliter
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
pp	postprandial(e)
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PUFA	Poly Unsaturated Fatty Acids (Mehrfach Ungesättigte Fettsäure)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real Time-Polymerase Chain Reaction
RU	Response Unit
RXR	Retinoid-X-Receptor
SD	Standardabweichung
SEM	Standard Error of Means
SPR	Surface Plasmon Resonance
TG	Triglycerid(e)
THL	Tetrahydrolipstatin
TZDs	Thiazolidinedione
VLDL	Very low density lipoprotein
WHR	Waist to hip ratio

Danksagung

Der grösste Dank geht an Professor Dr. med. J. Schrezenmeir, der mich über den gesamten Zeitraum der Promotion in vielerlei Hinsicht unterstützt hat und mir in zahlreichen Diskussionen wissenschaftliche Hilfestellungen und Anregungen gegeben hat.

Für die produktive Zusammenarbeit, die durch unzähligen Besprechungen zustande kam, bedanke ich mich bei Dr. N. Roos.

Bei der Erarbeitung der Fülle an Daten haben mir über den gesamten Zeitraum der Doktorarbeit eine grosse Anzahl an Personen assistiert, an die alle ein grosser Dank geht: Katharina Lichtenfeld, Anke Kunert, Julia Kiosz, Frauke Repenning, Neele Dellschaft, Kathrin Pfafferodt, Swiowati Schumann, Silvia Mayr, Chris Opitz, Svenja Mertins, Sebastian Schröbler, Adrian Boldt, Mathias Stender, Radya Secilmis, Katharina Schwartzler, Antje Damms, Fabian Galenschevsky, Maja Stache, Panteha Roshan, Carolin Keller, Inga Naue, Inga Rix und Saskia Johannsen.

Sehr dankbar bin ich für die Betreuung durch Prof. Dr. med. vet. S. Wolffram als 2. Berichterstatter dieser Dissertation.

Für die stets netten Hilfestellungen und kompetenten Auskünfte bei jeglicher Art Problemen danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie und Biochemie der Ernährung, v.a. Angelika Thoss, Martina Gerrul, Maren Hartelt und Michaela Steinke. Jederzeit ansprechbar und immer hilfsbereit waren Dr. M. Pfeuffer, Dr. med Ulf Helwig, Dr. med. Diana Rubin, Dr. K. Scholz-Ahrens, Professor Dr. Sieck und Dr. M. de Vrese. Bei Frau Dr. K. Scholz-Ahrens möchte ich mich zusätzlich bedanken für die Kooperation bei der Erstellung des Manuskripts „Bioactive Peptides from foods - Evidence for health effects“.

Für die ausserordentlich gute Zusammenarbeit geht ein Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Molekulare Ernährung der CAU zu Kiel. Hierbei besonders zu erwähnen sind Christina Vock, Berit Marten, Daniela Stengel, Yvonne Dignal, Inka Lindner, Mike Böhme, Maja Klapper, Constance Schmelzer und Professor Dr. Frank Döring.

Bedanken möchte ich mich bei allen Firmen, die durch die kostenlose Zusendung von Probenmaterial die Voraussetzung für das umfangreiche Screening von Testsubstanzen auf Lipasehemmung ermöglicht haben.

Für die nette moralische Unterstützung danke ich insbesondere Julia Kiosz, Constance Schmelzer und Dr. Imke van Venrooy. Letztere hat darüber hinaus wertvolle Hinweise bei der Suche nach geeigneten Emulgatoren gegeben. Julia und Constance wünsche ich viel Erfolg bei der Anfertigung ihrer Dissertationen.

Sehr dankbar bin ich für die Einweisung in die Zellkultur und die Hilfestellungen von Dr. Christiane Laue und Daniela Ploen in den ersten Wochen und Monaten meiner Doktorarbeit.

Celina Gebauer, Sandra Bettsteller und Ursula Fahr haben mich hervorragend bei der Literaturrecherche unterstützt.

Für die stets freundliche Unterstützung in bürokratischen Angelegenheiten jeglicher Art bedanke ich mich bei Frau T. Jessen und Frau B. Ingwardsen.

Ohne die Hilfe von Herrn A. Gauder und Frau D. Scharfenberg hätte ich viele Probleme mit der PC-Technik nicht lösen können.

Herr J. Kunze war mir behilflich bei der Verarbeitung der Rückstände der Ölpressung.

Die Firma BiaCore hat dem Institut für Physiologie und Biochemie freundlicherweise die Technik der Surface Plasmon Resonance Spektroskopie zur Verfügung gestellt.

Lebenslauf

Niels Peter Möller

geboren am 11. Dezember 1970 in Flensburg, Deutschland

Schulischer Werdegang:

1977 - 1981: Grundschule, Waldschule Flensburg
1981 - 1990: Gymnasium, Auguste-Viktoria-Schule, Flensburg; Abschluß
Abitur

Bundeswehr:

10 / 1990 – 09 / 1991: Grundwehrdienst, Bremerhaven und Meierwik

Universitäre Ausbildung

10 / 1991 – 09 / 1993: Grundstudium der Gartenbauwissenschaften, Universität
Hannover
10 / 1994 – 09 / 1996: Grundstudium Oecotrophologie, Universität Giessen
09 / 1996 – 08 / 1997: Auslandsstudium der Ernährungswissenschaften, Universität
Wien
10 / 1997 – 09 / 2001: Hauptstudium Oecotrophologie in Giessen,

Praktika:

1.8.1995 - 28.8.1995: Institut für Medizinische Mikrobiologie / Universität Giessen
4.9.1995 - 27.10.1995: Molkerei Schwälbchen / Zweigstelle Marburg
20.5.1997 - 13.6.1997: Bäckerei Nissen / Glücksburg
2.8.1999 - 15.2.2000: Institut für Lebensmitteltechnologie / Universität Hohenheim
4.3. 2002 – 31.5. 2002: Institut für Physiologie und Biochemie der Ernährung /
Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel
08 / 2002 – 09 / 2002: Ph.D.-Student, Department of Nutritional Science & Dietetics,
University of Nebraska, Lincoln

Erwerbstätigkeiten:

07 / 1990 - 08 / 1990: Restaurant Kliffkieker, Wenningstedt / Sylt
07 / 1996 – 08 / 1996: Fördereederei Flensburg

Berufstätigkeit:

10 / 2002 – 02 / 2007: Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Physiologie und
Biochemie der Ernährung, Bundesforschungsanstalt für
Ernährung und Lebensmittel, Standort Kiel, und Anfertigung der
Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. med. Jürgen
Schrezenmeir.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel

“In vitro - Identifizierung fettassimilationsinhibierender Bioaktivität“

selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und dass ich die Arbeit noch keinem anderen Fachbereich bzw. noch keiner anderen Fakultät vorgelegt habe.

Peter Möller