

**NMR-basierte
Metabolomik
in der
Diabetes-Früherkennung
und
Hochdruck-
NMR-Spektroskopie
an Lipoproteinen**



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kristina Lobenhofer, geb. Frank
aus
Nürnberg

2014

Das Promotionsgesuch wurde am 11.02.2014 eingereicht.
Das Promotionskolloquium fand am 03.07.2014 statt.

Die Arbeit wurde von Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer angeleitet.

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Peter J. Flor

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

2. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Sterner

weiterer Prüfer: Prof. Dr. Christine Ziegler

Inhaltsverzeichnis

EINLEITUNG	1
1. GRUNDLAGEN.....	5
1.1 Metabolomik.....	5
1.2 Typ-2-Diabetes Mellitus	7
1.2.1 Definition, Klassifikation und Diagnostik des Typ-2-Diabetes.....	7
1.2.2 Risikofaktoren und gesundheitliche Folgen des Typ-2-Diabetes	10
1.2.3 Epidemiologie	10
1.3 Blut, Lipide und Lipoproteine.....	10
1.3.1 Blut.....	11
1.3.2 Struktur und Eigenschaften der Lipide	14
1.3.3 Lipoproteine	16
1.3.4 Forschungsergebnisse verschiedener Gruppen	20
1.4 NMR-Spektroskopie	22
1.4.1 1D- ¹ H-NMR-Spektroskopie an Blut und Lipoproteinen.....	23
1.4.2 Hochdruck-NMR-Spektroskopie.....	24
1.5 Statistische Methoden.....	27
1.5.1 Übersicht statistischer univariater Tests.....	27
1.5.2 Hauptkomponentenanalyse	29
1.5.3 Logistische Regression	31
1.6 BRK-Studienbeschreibung	32
2. MATERIAL UND METHODEN.....	37
2.1 Diabetesstudie	37
2.1.1 Probenherstellung.....	37
2.1.2 NMR-Messverfahren.....	38

2.1.3	Primärprozessierung der NMR-Spektren	42
2.1.4	Vorbereitung der NMR-Spektren auf die Hauptkomponentenanalyse	43
2.1.5	Zuordnung der NMR-Signale	45
2.1.6	Vorbereitung der Lipoproteinprofile auf die statistische Auswertung	47
2.1.7	Routine zur Berechnung der kleinen Metaboliten	50
2.2	Hochdruck-NMR-Spektroskopie an Serum und Lipoproteinen	52
2.2.1	Probenherstellung - Auftrennung des Serums in die Lipoproteinklassen.....	52
2.2.2	Hochdruck-NMR-Messaufbau.....	53
2.2.3	NMR-Messmethoden und Primärprozessierung	55
3.	ERGEBNISSE	61
3.1	Ergebnisse der Diabetesstudie.....	61
3.1.1	Kollektivbeschreibung.....	62
3.1.2	Metabolomische Auswertung der gesamten NMR-Spektren.....	68
3.1.3	Metabolomische Auswertung der Lipoproteinprofile mit Hilfe der logistischen Regressionsanalyse	95
3.2	Hochdruck-NMR-Messungen an Serum und Lipoproteinen	102
3.2.1	Qualitative Untersuchung der druckabhängigen 1D- ¹ H-NMR- Spektren des Serums und der Lipoproteine.....	103
3.2.2	Druckabhängigkeit eines großen Signal-integrals des Serums und der Lipoproteine.....	123
3.2.3	Druckabhängigkeit der CH ₂ -, CH ₃ - und Cholin-Kopfgruppen- Signalintegrale der Lipoproteine und des Serums.....	126
3.2.4	Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der CH ₂ -, CH ₃ -, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterol-Signale der Lipoproteine und des Serums	129
3.2.5	Thermodynamische Auswertung der Hochdruck-NMR-Daten....	132
3.2.6	Druck- und Temperatur-Reversibilität der Effekte an Serum und Lipoproteinen	150
4.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	157
4.1	Diskussion der Ergebnisse der Diabetesstudie	157
4.2	Diskussion der Hochdruck-Messergebnisse an Lipoproteinen und Serum	166

ZUSAMMENFASSUNG.....	171
A Tabellen.....	175
LITERATURVERZEICHNIS.....	181

Einleitung

Ein Bereich dieser Arbeit ist in der Metabolomik angesiedelt. Der Begriff Metabolomik beschreibt im Allgemeinen laut [1,2] das Gebiet der Analyse komplexer biologischer Proben und den sog. einzigartigen chemischen Fingerabdruck [3]. Dies geschieht im Rahmen einer Zuordnung und Quantifizierung aller Metaboliten in einer solchen Probe.

Seit Jahrhunderten sind Forscher daran interessiert, Krankheiten an Körperflüssigkeiten wie zum Beispiel Urin, Blut oder Gewebeproben zu diagnostizieren. Dabei wurde beispielsweise bereits im 16. Jahrhundert von U. Pinder Urin nach Merkmalen für Erkrankungen klassifiziert [1]. Im Jahr 1974 wurden die ersten Metaboliten in Gewebeproben mit Hilfe der NMR-Spektroskopie detektiert [4]. Die Forschungen an der Diagnose von Erkrankungen konnten in den letzten Jahrzehnten aufgrund fortschreitender Technologien zur Analyse von Körperflüssigkeiten intensiviert werden. Dabei spielen vor allem die NMR (engl. Nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz)-Spektroskopie und die Massenspektrometrie eine große Rolle. Mit Hilfe beider Methoden können Substanzen einer Probe identifiziert und quantifiziert werden. Die Stärke der Massenspektrometrie liegt in der Sensitivität und die Stärke der NMR-Spektroskopie in dem deutlich geringeren Fehler bei der Quantifizierung und der höheren Reproduzierbarkeit. Hierbei können teilweise an die tausende Signale den Substanzen zugeordnet werden und die Konzentrationen bestimmt werden. Sogenannte Hochdurchsatz-Verfahren ermöglichen das Messen einer großen Anzahl von Proben. Die Identifizierung von Biomarkern, d. h. Merkmalen in der untersuchten Körperflüssigkeit, die kennzeichnend für bestimmte Krankheiten sind, spielt eine immer größere Rolle. Dabei ist sowohl die Diagnose als auch die Früherkennung einer Krankheit Ziel vieler Forschungen. Neben Herzerkrankungen, wie beispielsweise Koronare Herzgefäßerkrankung (engl.: coronary artery disease, CAD) [5] und Nierenerkrankungen wie ADPKD (autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung) [6], ist auch die Volkskrankheit Diabetes immer häufiger Thema aktueller Studien [7,8,9], da die An-

zahl der Erkrankten immer weiter ansteigt [10]. Dabei werden sowohl Zusammenhänge zwischen den kleinen Metaboliten als auch den größeren Partikeln, wie den Lipoproteinen, und Diabetes untersucht. Lipoproteine sind nicht-kovalente Aggregate aus Lipiden und Proteinen, die Lipide und Cholesterol im Blut transportieren. Auffälligkeiten im Lipoproteinprofil weisen häufig auf Stoffwechselerkrankungen hin. Im Rahmen dieser Arbeit werden Blutplasmaproben eines aus 618 Studienteilnehmern bestehenden Kollektivs von gesunden Personen, Prädiabetikern und Diabetikern in Hinblick auf Biomarker für die Diabetesfrüherkennung mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht. Diese Proben stammen von Blutspendern des Blutspendedienstes. Ein zweiter Teil dieser Arbeit widmet sich den Hochdruck-NMR-Messungen an Serum und Lipoproteinen. Dabei wird an die Proben ein hoher Druck angelegt, um die Lipoproteine biophysikalisch zu charakterisieren und somit die lokale Viskosität und die Beweglichkeit der Fettsäuren zu analysieren. Die Untersuchung von Proteinen, Nukleoproteinen und Membranen mit Hilfe von Hochdruck-Messungen spielt bereits seit vielen Jahrzehnten eine entscheidende Rolle. Hierbei können wichtige Informationen über die Struktur, Dynamik und Faltung von Proteinen gewonnen werden. Daher lässt die Analyse der Hochdruck-NMR-Messungen an Lipoproteinen und Serum neue Informationen bezüglich deren Struktur und charakteristischen Eigenschaften erwarten.

In Abschnitt 1 werden die Grundlagen, die für die Analyse der Messergebnisse benötigt werden, erläutert. Hierbei wird sowohl der Begriff Metabolomik, die Krankheit Typ-2-Diabetes, Blut und dessen Bestandteile, wie Lipide und Lipoproteine, Grundlagen der NMR-Messungen an Blutproben und Hochdruck-NMR-Messungen als auch statistische Methoden dargestellt. Anschließend wird kurz das Design der untersuchten Studie zur Diabetesfrüherkennung gezeigt.

Abschnitt 2 fasst die wichtigsten Eigenschaften der Probenherstellung, des Messaufbaus und der Prozessierung der Daten zusammen. Dieser Abschnitt gliedert sich in einen die Diabetesstudie betreffenden Teil und einen, der die Probenvorbereitung der Serum- und Lipoprotein-Proben, den Aufbau der NMR-Hochdruckanlage und die Prozessierung der Hochdruckdaten darstellt.

Anschließend werden in Abschnitt 3 die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse sowohl bezüglich der Diabetesstudie als auch der Hochdruck-NMR-Messungen an Serum und Lipoproteinen gezeigt. Um mittels logistischer Regressionsanalyse Korrelationen zwischen Substanzen in der Probe und der Diabeteserkrankung zu finden, wurden mit Hilfe einer Fitroutine der Firma numares, ehemals LipoFIT analytic, Lipoproteinprofile der Proben berechnet. Zusätzlich konnten die Veränderungen der NMR-Spektren der Blutplasmaproben mit Hilfe sogenannter Rückstellproben, d. h. retrospektive Proben der Studienteilnehmer, qualitativ analysiert werden.

Ein zweiter Teil dieser Arbeit widmet sich den Ergebnissen der Hochdruck-NMR-Messungen an Serum und Lipoproteinen. Hochdruck-NMR-Spektroskopie kann, wie bereits erwähnt, wichtige Informationen über lokale mechanische und dynamische Eigenschaften von Proteinen liefern und ermöglicht die Stabilisierung von Faltungsin-termediaten [11]. Somit können die strukturellen Eigenschaften der Lipoproteine un-tersucht werden. Hierbei wird das Verhalten verschiedener Signale, wie beispielsweise die Signale der Methyl- und Methylengruppen und des Cholesterols, beobachtet. Hier-zu werden sowohl die Druckabhängigkeit der Signalintegrale als auch der chemischen Verschiebung dieser Signale analysiert. Das Verhalten wird anschließend erläutert und mit Hilfe von thermodynamischen Analysen interpretiert. Diese Daten wurden mit Hilfe aktueller Forschungsgrundlagen untersucht [12,13].

Diese Ergebnisse werden in Kapitel 4 mit den aktuellen Resultaten anderer Arbeits-gruppen verglichen und mit Hilfe dieser Forschungsgrundlagen analysiert und disku-tiert. Abschließend werden die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefasst und Mög-lichkeiten weiterer interessanter Untersuchungen gezeigt.

1. Grundlagen

Dieses Kapitel liefert die theoretischen Grundlagen, die für die Abschnitte 2, 3 und 4 benötigt werden. Im Besonderen wird hierbei in Abschnitt 1.1 auf das Gebiet der Metabolomik eingegangen. Anschließend werden die Formen des Diabetes Mellitus klassifiziert. Dabei wird vornehmlich der Diabetes Mellitus Typ 2 und seine Charakteristika behandelt. In Abschnitt 1.3 werden die chemischen Eigenschaften von Blut, Lipiden und Lipoproteinen dargestellt. Der Abschnitt 1.4 widmet sich den physikalischen Grundlagen der NMR-Spektroskopie von Blutplasma und –serum und den darin enthaltenen Lipoproteinen. Des Weiteren wird das physikalische Prinzip von Hochdruck-NMR-Spektroskopie erläutert. Die für die statistische Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Studie zur Früherkennung von Typ-2-Diabetes (kurz: Diabetesstudie) notwendigen Grundlagen liefert Abschnitt 1.5. Schließlich wird noch kurz das Design der Diabetesstudie beschrieben.

1.1 Metabolomik

Dieser Abschnitt basiert auf [1,2,14,15,16]. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist die Wissenschaft seit geraumer Zeit daran interessiert, Krankheiten mit Hilfe von Körperflüssigkeiten (z. B. Urin und Blut) zu diagnostizieren (vgl. Bild 1). Die Abbildung zeigt eine von U. Pinder 1506 veröffentlichte Zuordnung von Urinmerkmalen zu verschiedenen Krankheiten. Heute wird dieser Bereich als Metabolomik bezeichnet und fasst laut Nicholson im Allgemeinen das Messen einer Stoffwechselreaktion in Körperflüssigkeiten eines Lebewesens auf biologische Stimuli oder genetische Veränderungen zusammen [1,2]. Mit Hilfe der nahe verwandten Metabolomik werden analytische Untersuchungen komplexer biologischer Proben und dem einzigartigen chemischen Fingerprint des Stoffwechsels beschrieben [1,2,3]. Dies geschieht im Rahmen einer Zuordnung und Quantifizierung aller Metaboliten in einer solchen Probe.

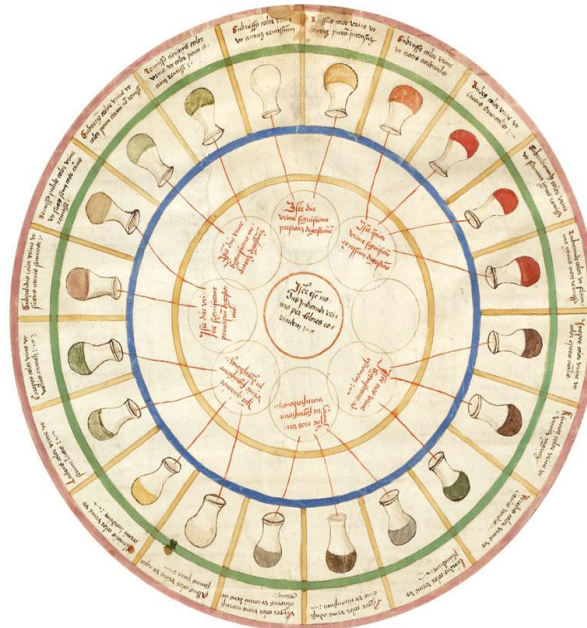


Bild 1: Diagnostik verschiedener Krankheiten mit Hilfe der Urineigenschaften von U. Pinder aus dem Jahr 1506 (aus [1]).

Metabolomik umfasst nicht nur die Messung der Probe mit Hilfe von analytischen Methoden wie NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie (kurz MS), sondern auch die Methoden der Mustererkennung, auch als Chemometrik bekannt. Metabolomik bezeichnet folglich im Allgemeinen die Untersuchung des Metabolismus und dient somit der Analyse der grundlegenden Prinzipien des Stoffwechsels, dem Verständnis von Stoffwechselstörungen, der Untersuchung von Krankheiten und der Identifizierung von Biomarkern.

Im Bereich der NMR-basierten Metabolomik können in einer Probe mit Körperflüssigkeit zur gleichen Zeit alle Wasserstoff-enthaltenden Moleküle mit Hilfe von ^1H -NMR-Spektroskopie und die Kohlenstoff-Isotope ^{13}C mit Hilfe der ^{13}C -NMR-Spektroskopie gemessen werden. Das bedeutet, dass bis zu mehreren tausend Metaboliten einer Probe gleichzeitig detektiert werden können. Ein weiterer Vorteil der NMR-Spektroskopie ist, dass im Vergleich zur Massenspektrometrie keine physikalische oder chemische Probenvorbehandlung notwendig ist und die Proben somit nicht zerstört werden. Ein NMR-Spektrum einer solchen Probe mit relativ kleiner Probenmenge (mindestens $50\ \mu\text{L}$) kann innerhalb weniger Minuten aufgenommen werden, was eine Untersuchung von Studien mit großer Probenzahl ermöglicht. Als weiteres Merkmal der NMR-Spektroskopie ist außerdem das hohe Maß an Reproduzierbarkeit einer Messung zu nennen.

Bei der Massenspektrometrie werden die zu analysierenden Metaboliten von der Probe mittels HPLC (engl.: High performance liquid chromatography) getrennt und anschließend detektiert. Hierbei ist jedoch die Identifikation einzelner Moleküle wegen des Übergangs in die Gasphase schwierig. Im Allgemeinen können bei beiden analytischen Methoden die Metaboliten identifiziert und quantifiziert werden. Mithilfe statistischer Auswertemethoden zur Mustererkennung ist es nach der Messung möglich, Zusammenhänge zwischen Metaboliten und Krankheiten zu analysieren, das heißt sogenannte Biomarker zu identifizieren.

1.2 Typ-2-Diabetes Mellitus

In folgendem Abschnitt werden die grundlegenden Informationen zu der Stoffwechselerkrankung Diabetes Mellitus insbesondere Typ-2-Diabetes Mellitus zusammengefasst, welche zur Diskussion der in Abschnitt 3.1 dargestellten Ergebnisse nötig sind. Hierbei wird auf die Definition, Klassifikation und Diagnostik dieses Diabetestyps eingegangen. Des Weiteren werden die Risikofaktoren und die Folgeerkrankungen erläutert, welche die Notwendigkeit einer Früherkennung des Typ-2-Diabetes darlegt. Die Abschnitte 1.2.1 bis 1.2.3 basieren auf [17,18,10,19].

1.2.1 Definition, Klassifikation und Diagnostik des Typ-2-Diabetes

Die Stoffwechselerkrankung Diabetes Mellitus umfasst alle Diabetestypen mit dem Leitbefund der Hyperglykämie, d. h. eine erhöhte Glucose-Konzentration im Blut. Diabetes Mellitus wird grundlegend in zwei Formen untergliedert: Zum einen der autoimmunen, „insulinabhängige“ Typ-1-Diabetes, der vorwiegend bei Kindern und Jugendlichen auftritt. Durch eine Autoimmunreaktion des Körpers werden die für die Insulinproduktion verantwortlichen Betazellen der Bauchspeicheldrüse zerstört. Dies führt zu einem Insulinmangel. Zum anderen der insulin-unabhängige Typ-2-Diabetes, welcher auch als Altersdiabetes bekannt ist. Diese Stoffwechselstörung ist die häufigste Form des Diabetes und umfasst nahezu 90 % aller Diabetiker.

Dieser Diabetestyp kennzeichnet sich meist durch eine Kombination aus relativem Insulinmangel und einer Insulinresistenz. Dies bedeutet, dass Insulin im Gegensatz zum Typ-1-Diabetes Mellitus produziert wird, aber an den Zellmembranen nicht richtig wirken kann.

Bild 2 zeigt die körpereigene Regulation des Blutzuckerspiegels mit Hilfe des Hormons Insulin und dessen Gegenspieler Glucagon [20]. Bei erhöhtem Glucosespiegel wird in

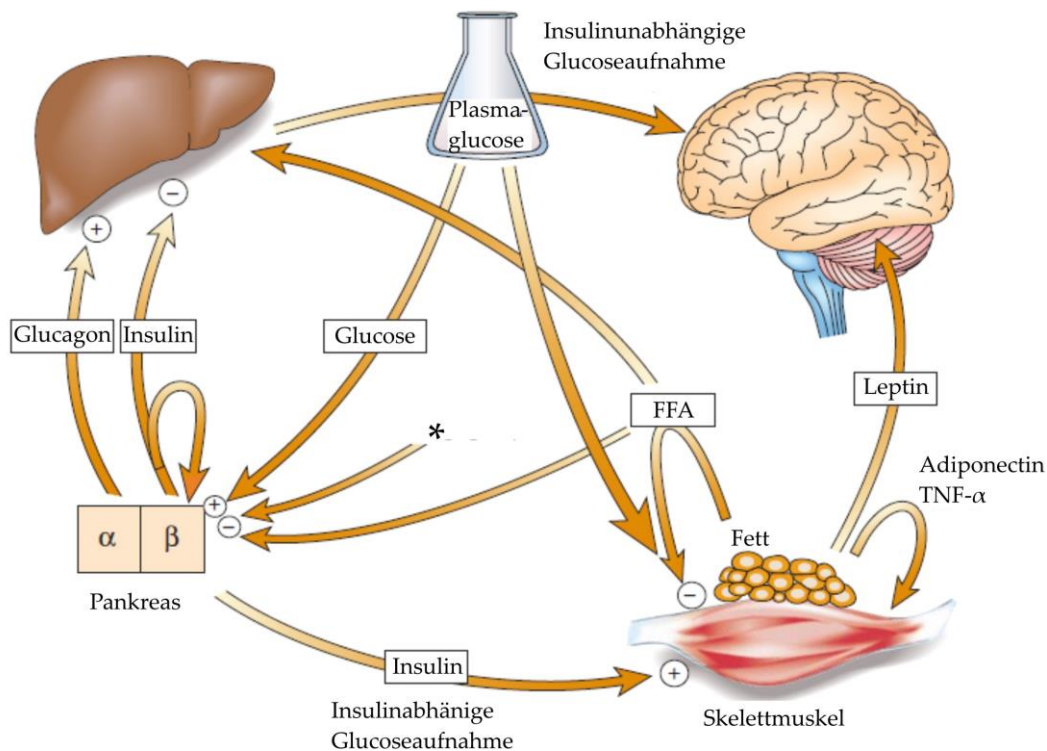


Bild 2: Regulation des Blutzuckerspiegels mit Hilfe der Hormone Insulin und Glucagon. Bei erhöhtem Glucosespiegel wird in den Betazellen der Bauchspeicheldrüse die Insulinsekretion veranlasst. Insulin bewirkt eine Aufnahme des Blutzuckers aus dem Blut in das Gewebe. In der Leber wird Glucose zu Glycogen umgewandelt, was den Blutzuckerspiegel weiter erniedrigt. Bei zu niedrigem Blutzuckerspiegel wird dieser mit Hilfe des Hormons Glucagon erhöht, welches von den Alphazellen der Bauchspeicheldrüse ausgeschüttet wird. Glucagon bewirkt eine Umwandlung von Glycogen zu Glucose, wodurch Glucose frei wird und somit der Blutzuckerspiegel erhöht und normalisiert wird. * ist ein nicht durch Glucose sekretionsanregendes Mittel und FFA steht für freie Fettsäuren (Abbildung nach [20]).

den Betazellen der Bauchspeicheldrüse die Insulinsekretion veranlasst. Insulin bewirkt eine Aufnahme des Blutzuckers aus dem Blut in das Gewebe (Muskeln, Gehirn etc.). Des Weiteren wird in der Leber Glucose zu Glycogen umgewandelt, was den Glucose-spiegel weiter erniedrigt. Bei zu niedrigem Blutzuckerspiegel wird dieser mit Hilfe des Hormons Glucagon erhöht, welches, wie Insulin, von den Betazellen der Bauchspeicheldrüse ausgeschüttet wird. Glucagon bewirkt eine Umwandlung von Glycogen zu Glucose, wodurch Glucose frei und somit der Blutzuckerspiegel erhöht und normalisiert wird.

Im Anfangsstadium dieser Erkrankung versucht der Körper mit dem sog. Hyperinsulinismus dem erhöhten Blutzuckerspiegel entgegenzuwirken. Wenn die Insulinmenge trotz dieser hohen Insulinproduktion nicht mehr ausreicht, spricht man von einer Ma-

nifestation des Diabetes. In schweren Formen kann es zu einer völligen Zerstörung der Betazellen durch eine Glucose- und Lipotoxizität kommen. Bereits viele Jahre vor der Manifestation des Typ-2-Diabetes treten prädiabetische Vorstufen auf, welche auf eine gestörte Glucoseregulation hinweisen.

Man unterscheidet eine gestörte Glucosetoleranz (engl.: Impaired Glucose Tolerance, IGT) und eine abnorme Nüchtern-glucose (engl.: Impaired Fasting Glucose, IFG). Des Weiteren gibt es als stärkste Form des Prädiabetes eine Kombination aus IGT und IFG. Die Diagnose des Typ-2-Diabetes erfolgt meist über einen oralen Glucosetoleranztest (oGTT), bei dem die Nüchternplasmagluco-se im Blut untersucht wird und anschließend 75 g Glucose, in Wasser gelöst, eingenommen werden. Nach zwei Stunden wird erneut die Plasmagluco-se bestimmt. Nach den in Tabelle 1 zu sehenden Kriterien werden die Patienten in die jeweiligen Klassen eingeteilt.

Tabelle 1

Klassifikation der (Prä-)Diabetes-Klassen mit Hilfe des oralen Glucosetoleranztests.^{a, b}

Venöse Blutplasma-glucose	mg/dL (mmol/L)	Kapillare Vollblut-glucose	mg/dL (mmol/L)
oGTT, t=0 min		oGTT, t=0 min	
Diabetes (Nüchtern)	> 126 (> 7,0)	Diabetes (Nüchtern)	> 110 (> 6,1)
abnorme Nüchtern-glucose ^a	> 110 (> 6,1)	abnorme Nüchtern-glucose ^a	> 100 (> 5,6)
oGTT, nach 2 h		oGTT, nach 2 h	
Diabetes	> 200 (> 11,1)	Diabetes	> 200 (> 11,1)
gestörte Glucosetoleranz ^b	> 140 (> 7,8)	gestörte Glucosetoleranz ^b	> 140 (> 7,8)

Quelle: [19].

^a Englisch: Impaired Fasting Glucose, IFG.

^b Englisch: Impaired Glucose Tolerance, IGT.

1.2.2 Risikofaktoren und gesundheitliche Folgen des Typ-2-Diabetes

Zu den bisher bekannten Risikofaktoren für Typ-2-Diabetes zählen laut Internationalem Diabetes Verband (engl.: International Diabetes Federation, kurz: IDF) unter anderem Übergewicht, ungesunde Ernährung, Bewegungsmangel, Insulinresistenz, Ethnizität, genetische Veranlagung und höheres Lebensalter [10]. Die Risikofaktoren untergliedern sich in zwei Gruppen, die modifizierbaren, welche in erster Linie durch den Lebensstil beeinflusst werden, und die nicht-modifizierbaren Risikofaktoren.

Da Typ-2-Diabetes einen schleichenden Verlauf nimmt und für den Erkrankten meist ohne Beschwerden auftritt, kann eine zu späte Diagnose zu schwerwiegenden gesundheitlichen Folgeerkrankungen führen. Wie bereits in Abschnitt 1.2.1 erläutert, kann es durch den dauerhaft erhöhten Blutzuckerspiegel zu einer Schädigung der Organe und des Gewebes kommen. Zu den häufigsten Folgeerkrankungen zählen unter anderem Herz-Kreislauf-Erkrankungen (engl.: cardiovascular disease, kurz: CV,), Nierenerkrankungen (Diabetische Nephropathie), Nervenerkrankungen (Diabetische Neuropathie) und Augenerkrankungen (diabetische Retinopathie).

1.2.3 Epidemiologie

Wie bereits in der Einleitung angedeutet, findet laut dem Internationalen Diabetes Verband weltweit eine rasante Ausbreitung des Typ-2-Diabetes statt [10]. Weltweit litten im Jahr 2011 etwa 371 Millionen Menschen an Diabetes, was in etwa 5,3 Prozent der Weltbevölkerung entspricht, wobei die Dunkelziffer mit etwa 187 Millionen Diabetesfällen relativ hoch ist. Man erwartet einen Anstieg auf 522 Millionen Diabetiker bis zum Jahr 2030. In Deutschland sind etwa 5,2 Millionen Diabetiker in Behandlung und etwa ein Drittel der Bevölkerung ist bereits an Prädiabetes erkrankt. Die Top 10 Liste aller Länder mit den höchsten Diabeteserkrankten führt China mit 92 Millionen Diabetikern an, gefolgt von Indien, USA, Brasilien, Russland, Mexiko, Indonesien, Ägypten, Japan und Pakistan. Deutschland steht an zweiter Stelle der Liste der europäischen Länder [10].

1.3 Blut, Lipide und Lipoproteine

In diesem Abschnitt werden die grundlegenden Funktionen des Bluts und die chemischen Grundlagen von Lipiden veranschaulicht. Anschließend werden die im metabolischen Stoffwechsel eine wichtige Rolle spielenden Lipoproteine grundlegend charak-

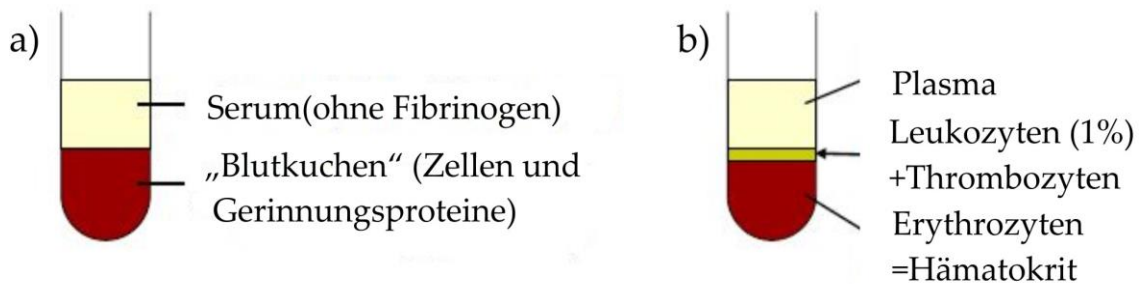


Bild 3: Zusammensetzung des Bluts. Blutserum erhält man durch Zentrifugieren nach der Gerinnung (a) und Blutplasma durch Zentrifugieren vor der Gerinnung (b) (nach [21]).

terisiert. Lipoproteine sind nicht-kovalente Aggregate aus Lipiden und Proteinen, die als Transportmittel für Lipide und Cholesterol im Blut fungieren.

1.3.1 Blut

Dieser Abschnitt fasst die grundlegenden Eigenschaften des Bluts aus [17,21,22,23,24,25,26,27] zusammen. Blut dient als Körperflüssigkeit, die den Transport von Atemgasen, Nähr- und Spurenstoffen, homöostatische Funktionen, wie beispielsweise die Regulation der Körpertemperatur, des pH-Werts und die Osmolarität, Gerinnungsfunktion und Abwehrfunktionen gewährleistet. Es wird häufig auch als „flüssiges Gewebe“ oder „flüssiges Organ“ bezeichnet. Arterien sind Blutgefäße, die vom Herz wegführen, und Venen solche, die zum Herz hinführen. Das Herz ist eine Art Pumpe, die den gesamten Körper mit Blut versorgt. Ein Mensch besitzt etwa 5 bis 6 Liter Blut, was circa 70 bis 80 ml pro Kilogramm entspricht. Aufgrund von Blutpuffern, die den pH-Wert konstant halten, hat das Blut einen stabilen pH-Wert von 7,4. Wie in Bild 3 und Bild 4 zu sehen, setzt sich Blut vor der Gerinnung aus einem zellulären Bestandteil (etwa 44 %) und dem Blutplasma (circa 56 %) zusammen, welches eine wässrige Lösung aus 90 % Wasser mit Proteinen, Salzen und niedermolekularen Substanzen enthält. Die zellulären Bestandteile werden in drei Gruppen untergliedert: die Erythrozyten, welche auch als die roten Blutkörperchen bezeichnet werden, die weißen Blutkörperchen (Leukozyten), die der Abwehr von Krankheiten, Blutgruppen etc. dienen, und die Blutplättchen (Thrombozyten), die für die Blutgerinnung verantwortlich sind.

Das Blutplasma enthält im Gegensatz zum Serum noch alle Gerinnungsfaktoren. Das Blutplasma besteht wie oben angeführt zu 90 % aus Wasser und zu 10 % aus gelösten Stoffen. Dazu zählen vor allem Blutproteine, wie beispielsweise Albumine, Lipoproteine, Immunglobuline und Fibrinogen, anorganische Elektrolyte (Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} ,

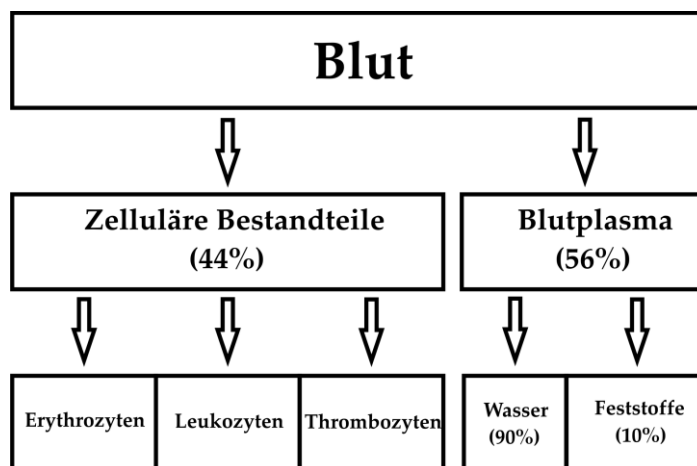


Bild 4: Zusammensetzung des Bluts: Blut besteht aus zellulären Bestandteilen (Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten) und vor der Gerinnung aus Blutplasma, welches sich zu 90 % aus Wasser und zu 10 % aus Feststoffen zusammensetzt (nach [25,26]).

Bikarbonat und Phosphate), Hormone, Nährstoffe und Abbauprodukte des Stoffwechsels (siehe Tabelle 2).

Die Plasmaproteine können mit Hilfe der Trägergelelektrophorese in fünf Gruppen eingeteilt werden: Albumin, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globuline (vgl. Bild 5, [28]). Albumin zählt als einziges Plasmaprotein nicht zu den Globulinen. Es dient dem Transport von Ca^{2+} und der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks. Globuline sind in Wasser unlösliche Eiweißstoffe, die in verdünnten Neutralsalzlösungen löslich sind. Die Aufgaben der Globuline liegen vorwiegend im Transport von Proteinen und schlecht wasserlöslichen Substanzen, wie beispielsweise Vitamine, Zucker und Lipiden, in der pH-Wert-Regulation, der Blutgerinnung und der Immunabwehr.

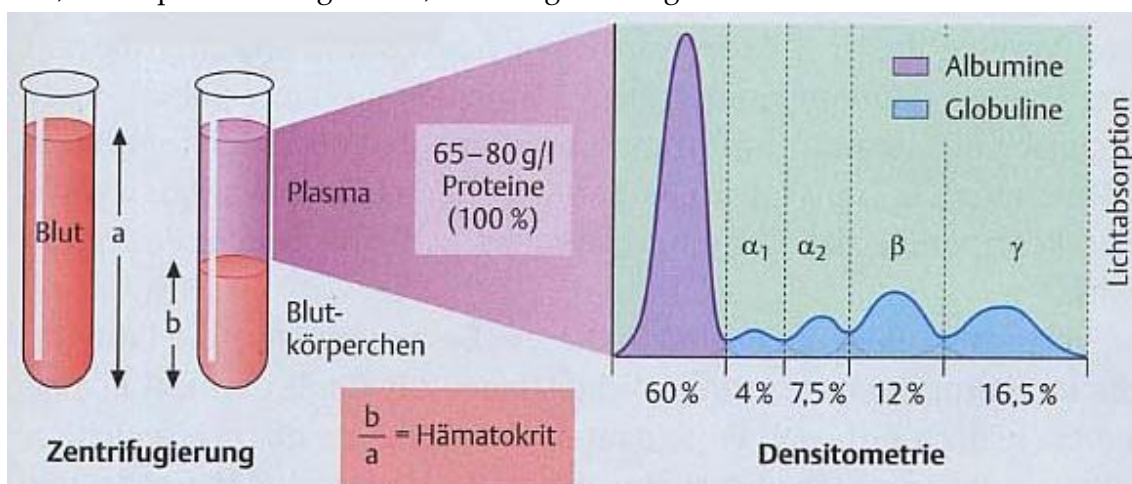


Bild 5: Kurve einer Eiweiß-Elektrophorese: Mit Hilfe dieser Methode können die Plasmaproteine in die Gruppen Albumin, α_1 -, α_2 -, β - und γ -Globuline untergliedert werden (aus [28]).

Wie bereits erwähnt, erfolgt der Transport der Lipide durch die Lipoprotein-Komplexe, den sog. Lipoproteinen. Dies sind Komplexe aus der Bindung von Lipiden an bestimmte Proteine, den Apolipoproteinen, welche diese Aggregate zusammenhalten. Die Lipoproteine können wegen ihrer physikalischen Eigenschaften mit Hilfe der Elektrophorese in verschiedene Klassen eingeteilt werden. VLDL und IDL wandern in der prä- β -Bande, LDL in der β -Bande und HDL in der α -Bande. Die Chylomikronen bleiben an dem Auftragungsort liegen. Eine Alternative zu dieser Methode ist die Ultrazentrifugation. Die Grundlagen und Eigenschaften der Lipoproteine werden in Abschnitt 1.3.3 genauer erläutert.

Die Untersuchung des Bluts gibt Aufschluss über den Metabolismus des Körpers und somit auch über den Gesundheitszustand bzw. Krankheiten.

Tabelle 2

Wichtige Bestandteile des Blutplasmas und deren Funktion.

Gruppe	Inhaltsstoffe	Funktion
Proteine	Albumine	Transport Kolloidosmotischer Druck
	Globuline	Immunfunktion
Elektrolyte	Na ⁺	Osmotisches Gleichgewicht
	K ⁺	Membranfunktion
	Mg ²⁺	Cofaktor von Enzymen
	Ca ²⁺	
Nährstoffe	Glucose	Substrate für den Stoffwechsel
	Freie Fettsäuren	
Metabolite	Laktat	
	Harnstoff	
Hormone	Insulin	Signalstoffe
	EPO	
Lipoproteine	Apolipoproteine	Transport
	Proteine	
	Cholesterol	
	Phospholipide	
	Triglyceride	

Quelle: [22].

1.3.2 Struktur und Eigenschaften der Lipide

Lipide spielen für alle Lebensformen eine wichtige Rolle. Sie dienen zum Beispiel der Energiespeicherung und bilden die Strukturkomponenten in den Membranen [29,30]. Lipide werden in den bereits erwähnten Lipoproteinen zu den Geweben oder Organen transportiert. Diese Partikel setzen sich zusammen aus einem polaren Mantel aus Phospholipiden, freiem Cholesterol und Apolipoproteinen. Der Kern der Lipoproteine besteht aus unpolaren, lipophilen Cholesterolestern und Triglyceriden. Die für den Aufbau und damit die Wirkungsweise der Lipoproteine in Abschnitt 1.3.3 notwendigen Grundlagen der Lipide werden in diesem Abschnitt, der auf [17,29,30,31,32] basiert, erläutert.

Als Lipide werden verschiedenste organische Moleküle bezeichnet, die sich zwar im Aufbau unterscheiden, aber alle gut in organischen und relativ schlecht in wässrigen Lösungsmitteln löslich sind. Dazu zählen Fettsäuren, Triglyceride, Cholesterol und Cholesterolster (Steroide) und Phospholipide.

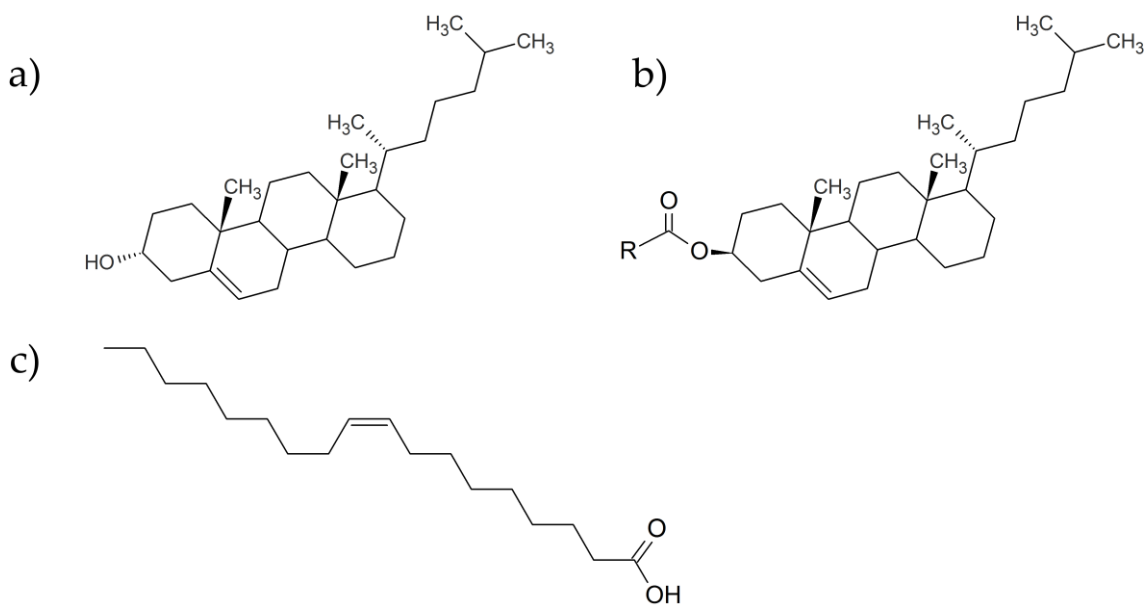


Bild 6: Strukturformel von Lipiden: (a) Cholesterol, (b) Cholesterolster und (c) Freie Fettsäure hier: Ölsäure (nach [17,30]).

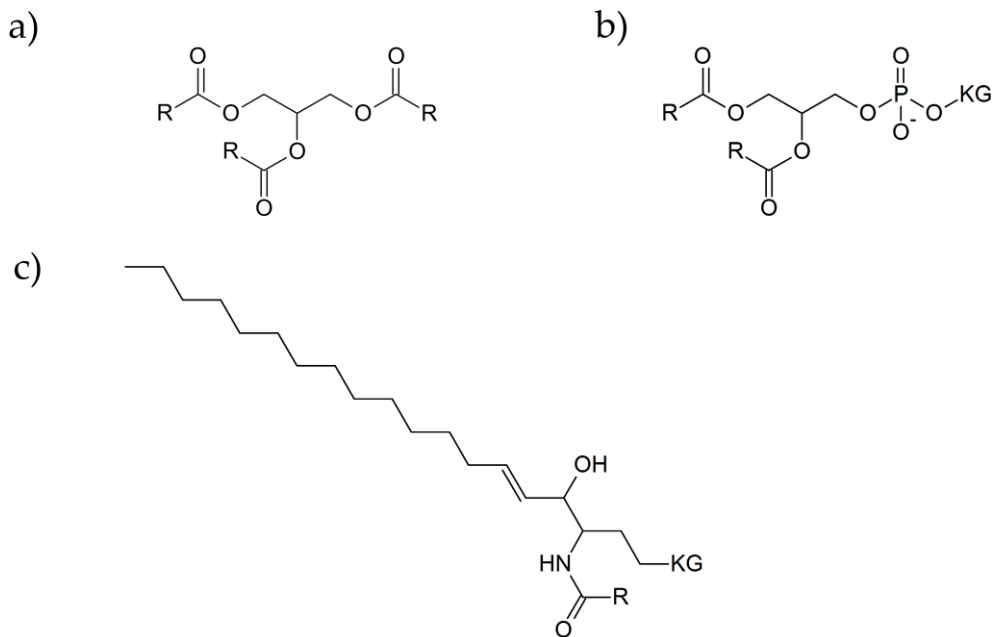


Bild 7: Strukturformel von Lipiden: (a) Triglyceride, (b) Phosphoglycerid und (c) Sphingolipid. KG steht in der Abbildung für Kopfgruppe und R für Kohlestoffe (nach [17,30]).

Fettsäuren kommen im menschlichen Organismus sowohl in freier Form, d. h. ohne Veresterung, als auch als Bestandteil von Acylglycerin, Phosphoglycerid, Sphingolipiden und Cholesterolestern vor. Fettsäuren enthalten eine Kohlenwasserstoffkette und eine Carboxyl(COOH)gruppe (vgl. Bild 6 (c)). Befindet sich keine Doppelbindung zwischen den C-Atomen, so spricht man von gesättigten Fettsäuren, andernfalls von ungesättigten Fettsäuren.

Triglyceride setzen sich zusammen aus Glycerol und Fettsäuren und dienen unter anderem der Energieversorgung des Körpers. Die Strukturformel eines Triglycerids ist in Bild 7 (a) zu sehen.

Einen ähnlichen Aufbau besitzen die Phospholipide, jedoch wird bei diesen Lipiden die dritte Fettsäure durch einen Phosphorsäureester ersetzt. An diese Phosphatgruppe binden wiederum unterschiedliche Alkohole, wie beispielsweise Cholin und Serin. Phosphoglyceride, bei denen an den Glycerolrest nur zwei Fettsäuren binden, zeichnen sich durch ihre Amphiphilität aus, d. h. sie besitzen einen hydrophilen Kopf (Alkohol) und zwei hydrophobe Kohlenwasserstoffketten (Fettsäureester) (vgl. Bild 7 (b)). Phospholipide dienen im Allgemeinen dem Aufbau von Biomembranen, indem sie Phospholipiddoppelschichten bilden.

Sphingolipide sind ebenso Bestandteil der Zellmembran. Im Gegensatz zu den Phospholipiden liefert nicht Glycerol den Alkohol, sondern Sphingosin (Bild 7 (c)). Je nach Modifikation dieses Alkohols kann man die Sphingolipide in verschiedene Klassen

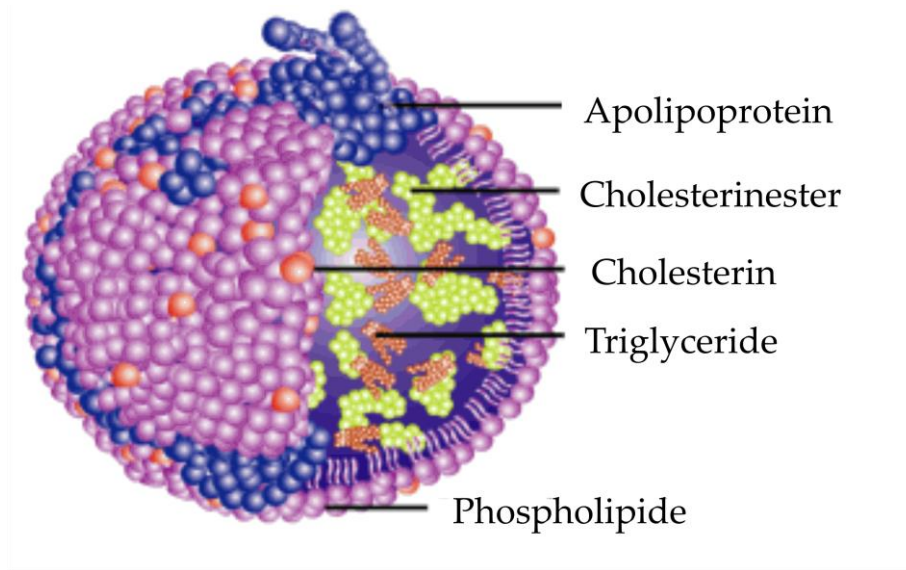


Bild 8: Schematischer Aufbau der Lipoproteine. Diese weisen einen polaren Mantel aus Phospholipiden, freiem Cholesterin und Apolipoproteinen auf. Der Kern der Partikel besteht aus unpolaren, lipophilen Cholesterolestern und Triglyceriden (nach [33]).

einteilen: die Ceramide, Sphingomyeline und Glycosphingolipide, welche in Cerebroside und Ganglioside klassifiziert werden.

Eine spezielle Lipidklasse bilden die Steroide, zu denen Cholesterin und Cholesterolester zählen. Eine Strukturformel von Cholesterin und Cholesterolester ist in Bild 7 (a) und (b) gezeigt. Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen und ist für die Synthese von Steroidhormonen und der Gallensäure verantwortlich. Da es hydrophobe Eigenschaften hat, wird es durch Bindung an Lipoproteine, vor allem an das LDL (siehe Abschnitt 1.3.3), im Blut transportiert.

1.3.3 Lipoproteine

Wie bereits in Abschnitt 1.3.2 erwähnt, erfolgt der Transport der Lipide zum Gewebe und den Organen in Form der sog. Lipoproteine. Mit Hilfe der Apolipoproteine wird deren Zusammensetzung und Zielsteuerung geregelt. Bild 8 zeigt den schematischen Aufbau der Lipoproteine. Dieser Abschnitt basiert auf [17,30,34].

1.3.3.1 Klassifikation und Struktur der Lipoproteine

Historisch bedingt erfolgt die Einteilung der Lipoproteine nach ihrer Dichte mit Hilfe der Ultrazentrifugation in fünf Hauptklassen. Somit ergibt sich folgende Klassifizierung:

- Chylomikronen mit der geringsten Dichte
- VLDL (engl.: very low density lipoprotein)
- IDL (engl.: intermediate density lipoprotein)
- LDL (engl.: low density lipoprotein)
- HDL (engl.: high density lipoprotein) mit der größten Dichte,

wobei HDL häufig in HDL2 und HDL3 untergliedert wird.

Eine Übersicht einiger Eigenschaften und der Zusammensetzung dieser fünf Hauptklassen ist in Tabelle 3 zu sehen. Chylomikronen besitzen einen Durchmesser von 100 – 1000 nm und eine geringe Dichte. Chylomikronen bestehen zu 85-90 % aus Triglyceriden, 3-6 % aus Cholesterol, 4-9 % aus Phospholipiden und zu 1 % aus Proteinen. Die Lipoproteinpartikel VLDL sind mit einer Größe von 30 – 100 nm deutlich kleiner. Die Hauptbestandteile des VLDL sind Triglyceride (etwa 60 %) und Phospholipide (15-20 %). Cholesterol und Proteine sind zu 15 % bzw. 10 % enthalten.

Tabelle 3

Eigenschaften der fünf Lipoproteinklassen.

	Chylomikronen	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dichte	<0,95	<1,006	1,006-1,019	1,019-1,063	1,063-1,21
Grösse [ø in nm]	100-1000	30-70	27	22	8
Elektrophorese	keine Wanderung	Prä-β	β	β	α
Haupt-Apoproteine	B-48, C, E, A-I, A-II, A-IV	B-100, C, E	B-100, wenig C und E	B-100	A-I, A-II, C, D, E
Anteil Protein	1 %	10 %	20 %	20 %	50 %
Cholesterol	3-6 %	15 %	35 %	45 %	20 %
Phospholipide	4-9 %	18 %	20 %	25 %	25 %
Triglyzeride	85-90 %	57 %	25 %	10 %	5 %
Halbwertszeit	<60 min	2-4 h	2-4 h	2 Tage	Tage
Synthese	Darm	Leber	VLDL-Katabolismus	VLDL-Katabolismus	Darm, Leber
Hauptfunktion	Transport der exogenen Triglyzeride	Transport der endogenen Triglyzeride von Leber zu den extrahepatischen Geweben		Cholesterol-Transport zu den extrahepatischen Geweben	reverser Transport des Cholesterols von extrahepatischen Geweben zur Leber

Quelle: [17,30,35].

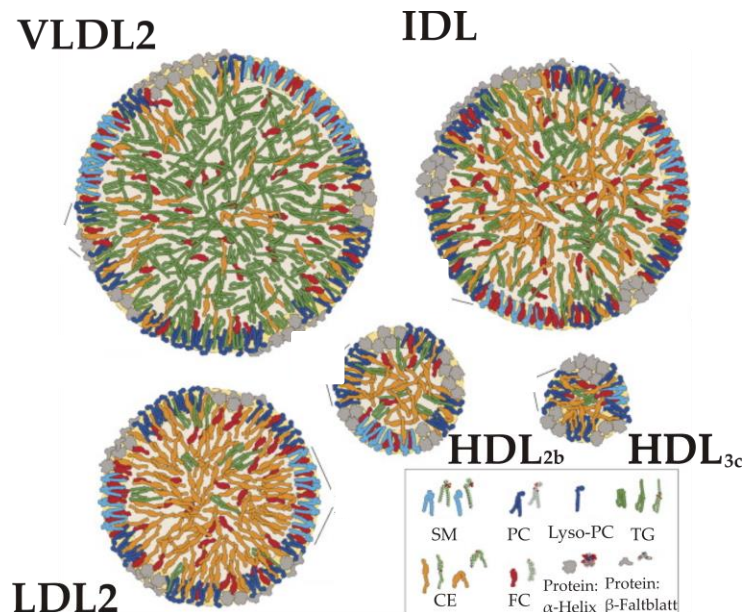


Bild 9: Skizze des Aufbaus der Lipoproteinklassen VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3 mit dem Sphingomyelin (SM, hellblau), Phosphatidylcholin (PC, dunkelblau), Triglycerid (TG, grün), Cholesterolester (CE, in orange) und freiem Cholesterol (FC, rot) (nach [36]).

Die Synthese der VLDL-Partikel erfolgt in der Leber und die Halbwertszeit im Blut liegt bei etwa vier Stunden. IDL ist ein Zwischenprodukt bei der Umwandlung von VLDL zu LDL. Man bezeichnet diese Lipoproteinklasse deshalb auch als VLDL-Remnants. Ihr Durchmesser beträgt etwa 30 – 50 nm und ihre Halbwertszeit bis zu sechs Stunden. LDL setzt sich zusammen aus 45 % Cholesterol, 25 % Phospholipiden, 20 % Proteinen und 10 % Triglyceriden. LDL spielt aufgrund des hohen Cholesterolanteils eine entscheidende Rolle beim Cholesteroltransport im Körper, da die Körperzellen zwar selbst Cholesterol synthetisieren können, aber ein sehr hoher Anteil des Cholesterols durch die Aufnahme von LDL zur Verfügung gestellt wird. Der kleinste Lipoproteinpartikel ist mit einem Durchmesser von 7 – 10 nm das HDL. Es besteht zur Hälfte aus Proteinen. Die andere Hälfte beinhaltet 30 % Phospholipide, 15 % Cholesterol und 5 % Triglyceride. HDL wird in der Leber gebildet und hat eine Halbwertszeit von bis zu vier Tagen.

Wie bereits in der Arbeit von Baumstark [17] erwähnt, hat Ala-Korpela et al. einen großen Beitrag zum Verständnis des Aufbaus der Lipoproteine geleistet. Bild 9 zeigt das Ergebnis aus [36]. Laut [36] und [37] besteht die äußere Membran aus zwei Bereichen. Zum einen der dichte Bereich, in dem sich gehäuft Cholesterol und Sphingomyelin befinden (Lipid Rafts). Diese bilden eine dichte Hülle nach außen. Im Gegensatz dazu besitzt der zweite, phosphoglycerid-reiche Bereich eine geringere Dichte und

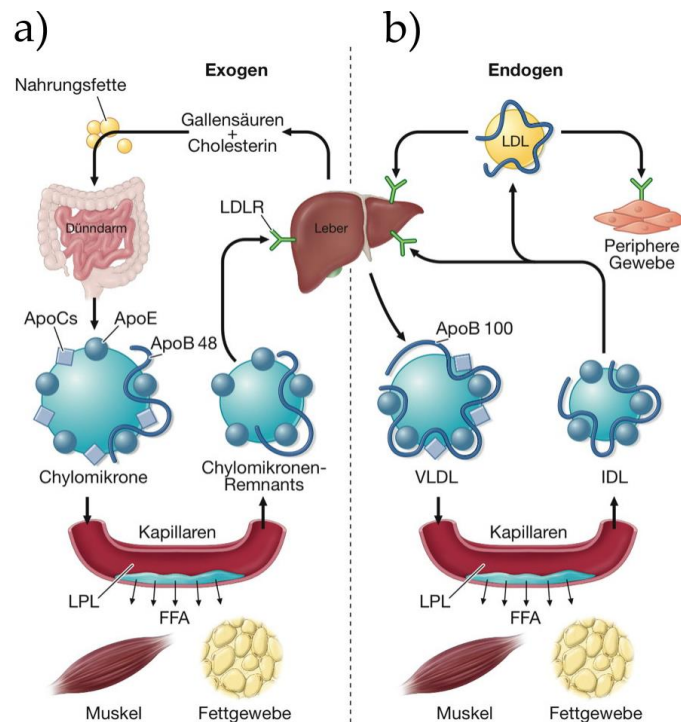


Bild 10: Lipoproteinstoffwechsel: (a) Exogener Lipidtransport charakterisiert den Transport von Lipiden, die durch Nahrungsmittel aufgenommen werden. Dies erfolgt in erster Linie durch Chylomikrone. Die Chylomikrone werden im Dünndarm aus den Nahrungsfetten synthetisiert. Anschließend können die Muskeln und das Fettgewebe über die Blutbahn mit Fettsäuren versorgt werden. Das Endprodukt der Chylomikrone nach der Lipoproteinlipase (kurz: LPL) sind die triglyceridärmeren Chylomikronen-Remnants. (b) zeigt den endogenen Lipidtransport, bei dem die Lipide mit Hilfe der VLDL-, LDL- und IDL-Partikel aus dem Darm in die peripheren Gewebe transportiert werden (aus [38]).

ermöglicht somit ein „Diffundieren“ der hydrophoben Lipide (Cholesterolester, Triglyceride,..) aus dem Kern in den Außenbereich des Lipoproteins.

1.3.3.2 Lipoproteinstoffwechsel

Den Lipoproteinstoffwechsel kann man grundlegend in drei Systeme einteilen: exogener und endogener Lipidtransport und der reverse Cholesteroltransport. Exogener Lipidtransport charakterisiert den Transport von Lipiden, die durch Nahrungsmittel aufgenommen werden (siehe Bild 10 (a)). Dies erfolgt in erster Linie durch Chylomikrone. Wie in Bild 10 (a) zu sehen, werden im Dünndarm die Chylomikrone aus den Nahrungsfetten synthetisiert. Anschließend können die Muskeln und das Fettgewebe über die Blutbahn mit Fettsäuren versorgt werden. Das Endprodukt der Chylomikrone nach der Einwirkung der Lipoproteinlipase (kurz: LPL) sind die triglyceridärmeren Chylomikronen-Remnants, welche in der Leber aufgenommen werden können.

Für den zweiten Lipidtransportpfad (vgl. Bild 10 (b)), den endogenen Lipidtransport aus der Leber in die Peripherie, werden VLDL, LDL und IDL benötigt. In der Leber wird VLDL synthetisiert, welches die Lipide in die Peripherie transportiert. VLDL wird in die cholesterolreichen VLDL-Remnants umgewandelt. Diese können entweder durch Rezeptoren in der Leber aufgenommen werden oder zu IDL und anschließend nach Abgabe von Triglyceride und dem Apolipoprotein ApoE zu LDL umgewandelt werden.

Der Rücktransport des Cholesterols aus dem Gewebe bei dem sog. reversen Cholesteroltransport erfolgt durch das HDL. Dabei spielt die Leber eine wichtige Rolle, da sie das einzige menschliche Organ ist, das Cholesterol mit Hilfe der Galle ausscheiden kann. HDL wird, wie bereits erwähnt, in die Subfraktionen HDL2 und HDL3 untergliedert. Diese Subfraktionen haben beide das Apolipoprotein ApoA, welches für die Form des Lipoproteins verantwortlich ist. HDL2 und HDL3 unterscheiden sich geringfügig in ihrer Zusammensetzung. HDL3 ist cholesterolärmer als HDL2 und kann somit Cholesterol mit Hilfe des Enzyms LCAT (Lecithin-Cholesterol-Acetyltransferase) aus der Peripherie aufnehmen. Cholesterol wird durch das Enzym LCAT in Form von Cholesterolestern im HDL verpackt und nun als HDL2 zurück zur Leber transportiert, wo es dann mit Hilfe des ApoA-Rezeptors aufgenommen werden kann.

1.3.4 Forschungsergebnisse verschiedener Gruppen

Die Charakterisierung der Lipoproteine und deren Konzentration in Blutproben mit Hilfe von NMR-Spektroskopie werden von verschiedenen Gruppen untersucht. Zum Einen veröffentlichte Otvos et al. im Jahre 1994 ein Patent zum Thema „Methoden und technische Vorrichtungen zur Messung der Lipoproteinklassen und –subklassen (engl.: Method and apparatus for measuring classes and subclasses of lipoproteins) [39]. Hierbei wurde die Quantifizierung der Lipoproteinsubklassen mit Hilfe eines NMR-basierten Modells, das die Linienform der Lipoproteine mittels Referenzspektren der Lipoproteinsubklassen annähert und anschließend die Konzentration der einzelnen Subklassen bestimmt, durchgeführt. In den folgenden Jahren entwickelte Otvos et al. Methoden zur Früherkennung verschiedener Erkrankungen, wie beispielsweise der Koronaren Herzgefäßerkrankung [40,41]. 2013 wurde ein Patent zur Früherkennung von Typ-2-Diabetes mit Hilfe eines Index, der sich aus mindestens vier der folgenden Lipoprotein-Parametern zusammensetzt, veröffentlicht: Konzentrationen des großen VLDL, kleinen LDL und großen HDL und die Partikelgrößen des VLDL, LDL und HDL [42]. Zur Berechnung des Lipoproteinprofils dient das CH₃-Signal im ¹H-NMR-Spektrum.

Ala Korpela et al. publizierte im Jahr 1994 eine Methode zur Quantifizierung von Lipoproteinen und deren Lipidbestandteile aus dem Blutplasma mittels ^1H -NMR-Spektroskopie [43]. Hierbei wurden die Lipoproteinprofile mit Hilfe von experimentell ermittelten Signalen der 11 Lipoproteinsubklassen modelliert. Dabei wurde analog zu Otvos et al. der CH_3 -Bereich zur Quantifizierung der Lipoproteinsubklassen verwendet [43]. Wang und Ala Korpela veröffentlichten 2012 Ergebnisse einer Studie zur Identifikation von Korrelationen zwischen dem Lipoproteinsubklassenprofil und dem Schweregrad der Glucosetoleranz [7]. Dabei wurden über neuntausend Serumproben mit Hilfe von NMR-Spektroskopie untersucht. Die 14 Lipoproteinsubklassen wurden mit Hilfe der HPLC vermessen. Zusätzlich wurde ein Matsuda Index bestimmt, der sich aus der Glucose- und Insulin-Konzentration während des oralen Glucosetoleranztests zusammensetzt und somit die Insulin-Sensitivität abschätzt. Als statistische Methode wurde von Wang et al. die ANOVA verwendet. Damit wurden Unterschiede in den Serumlipiden und in den Partikeln der Lipoproteinsubklassen und deren Hauptlipidbestandteile bezüglich ihres Glucosetoleranz-Schweregrades analysiert. Diese Untersuchungen ergaben, dass abnorme Glucosetoleranz signifikant mit einer erhöhten Konzentration von VLDL-Subklassenpartikeln und deren Bestandteilen korreliert [7]. Des Weiteren wurde ein Anstieg des kleinen HDL und eine Abnahme des großen HDL bei Patienten mit Hyperglykämie beobachtet [7]. Dies zeigt, dass es je nach Schweregrad der Glucosetoleranz sowohl zu einer veränderten Konzentration der Lipoproteinsubklassen und deren Bestandteile als auch zu einer veränderten Zusammensetzung dieser Bestandteile führt. Wang et al. zeigte 2011, dass die Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Valin, Tyrosin und Phenylalanin signifikant mit der Entwicklung von Typ-2-Diabetes korrelieren [9]. Eine Früherkennung von Typ-2-Diabetes gelang mit einer Kombination der drei Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin. Mit steigender Konzentration dieser Aminosäuren steigt das Risiko an Diabetes zu erkranken. Dazu wurden etwa zweitausend gesunde Personen über zwölf Jahre beobachtet, von denen 201 Personen Diabetes entwickelten. Die Aminosäuren, Amine und andere polaren Metaboliten wurden mit Hilfe von LC-MS, d. h. Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung, bestimmt. Als statistische Methode wurde ein logistisches Regressionsmodell gewählt. Die Ergebnisse wurden an einer weiteren Studie validiert.

numares, ehemals LipoFIT analytic, patentierte das NMR-basierte Verfahren zur Quantifizierung der Lipoproteinsubklassen mit Hilfe von Körperflüssigkeiten im Jahr 2005 [44]. Dazu werden diffusionsgewichtete NMR-Spektren der Probe aufgenommen. Der CH_3 -Bereich der Spektren wird mit Hilfe von 15 Kurven der Lipoproteinsubklassen modelliert. Diese Subfraktionen werden, wie in Tabelle 4 zusammengefasst, klassifi-

ziert. Somit kann für jede Probe ein Lipoproteinprofil erstellt werden, welches für jede Person charakteristisch wie ein Fingerabdruck ist.

Tabelle 4

Lipoproteinsubfraktionen L1 bis L15 und ihre Partikeldurchmesser und Dichte.

NMR Lipoprotein-subfraktionen	Zugehörige Lipoprotein-subfraktion	Teilchendurchmesser [nm]	Durchschnittliche Dichte [g/ml]
L1	Kleines HDL	7-8,5	1,200
L2	Mittleres HDL	8,5-10	1,120
L3	Großes HDL	10-13	1,090
L4	Sehr großes HDL	13-16	1,063
L5	Sehr kleines LDL	16-19	1,060
L6	Kleines LDL	19-21	1,045
L7	Mittleres LDL	21-22	1,035
L8	Großes LDL	22-25	1,027
L9	Sehr großes LDL	25-30	1,019
L10	IDL	30-40	1,015
L11	Kleines VLDL	40-60	1,010
L12	Großes VLDL	60-80	1,006
L13	Remnants	80-100	1,000
L14	Kleine Chylomikronen	100-150	0,980
L15	Große Chylomikronen	>150	0,960

Quelle: [45,46].

Eine Übersicht aktueller Publikationen zum Thema Charakterisierung von Lipoproteinen mit Hilfe von ^1H -NMR-Spektroskopie ist in R. Mallol et al. gezeigt [47].

1.4 NMR-Spektroskopie

Im folgenden Abschnitt werden die NMR-spektroskopischen Grundlagen für die in Kapitel 2 und 3 benötigten Methoden gezeigt. Hierzu wird zunächst auf die 1D- ^1H -NMR-Spektroskopie an Blut und Lipoproteinen, basierend auf [14,17], eingegangen. Die NMR-Spektroskopie spielt aufgrund ihrer hohen Informationsdichte, der reproduzierbaren und schnellen Messung für die NMR-basierte Metabolomik eine wichtige Rolle. Die für die Auswertung der Hochdruck-NMR-Daten in Abschnitt 3.2 notwendigen theoretischen Grundlagen werden im Anschluss in Abschnitt 1.4.2 veranschaulicht.

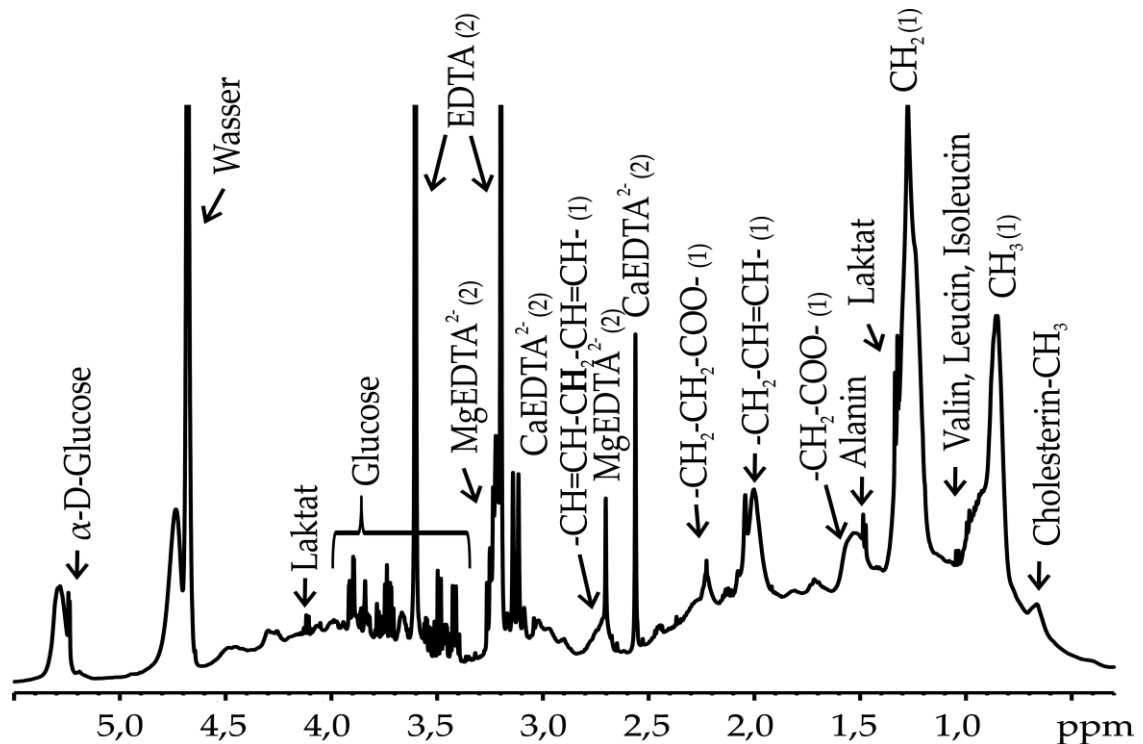


Bild 11: $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von humanem Blutplasma. Gezeigt ist der Bereich von 5,5 bis 0,5 ppm aufgenommen bei $T=310\text{ K}$ an einem 600 MHz-Spektrometer der Firma BRUKER mit der Pulssequenz noesygppr1d. Einige Signale stammen von den Fettsäureresten (1) und dem Antikoagulant EDTA (2) (nach [17,48,47]).

1.4.1 $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie an Blut und Lipoproteinen

Blutplasma und -serum beinhaltet sowohl nieder- als auch hochmolekulare Substanzen, was in einem $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum zu breiten Signalen, die von den Proteinen und Lipoproteinen stammen, und überlagerten scharfen Peaks von den kleinen Metaboliten führt (vgl. Bild 11). Im Gegensatz dazu hat ein NMR-Spektrum von Urin keine breiten Signale, sondern bis zu tausend scharfe Peaks von niedermolekularen Substanzen. Bild 11 zeigt ein $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von EDTA-Blutplasma. Die bereits erwähnten verbreiterten Signale der Proteine und Lipoproteine sind deutlich zu erkennen. Der breite Untergrund zwischen 3,5 und 0,5 ppm ist unter anderem auf das Protein Albumin zurückzuführen. Das unterdrückte Wassersignal liegt zwischen 4,5 und 5,0 ppm. Die dem Antikoagulant EDTA, welcher zur Hemmung der Blutgerinnung dient, zuzuordnenden Signale führen zu zusätzlichen Peaks [48].

Als Referenzsignal werden meist TSP (3-Trimethylsilylpropionat) oder DSS (2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-sulfonsäure) verwendet. Die relative Konzentration einer Substanz kann direkt über das Integral eines Signals, welches direkt proportional zur Protonenanzahl dieser Substanz ist, bestimmt werden. Die absolute Konzentration bestimmt man durch Zugabe eines internen Standards mit bekannter Konzentration.

Die Zuordnung der Peaks zu den Substanzen erfolgt mittels chemischer Verschiebung, Multiplizität, Spike-In-Experimenten [49], Vergleichsspektren der jeweiligen Substanzen und Datenbanken. Nach der Zuordnung können dann beispielsweise im Rahmen metabolomischer Auswerteverfahren Biomarker für bestimmte Krankheiten identifiziert werden.

Es ist, wie bereits in der Arbeit von Baumstark [17] gezeigt, mit Hilfe der NMR-Spektroskopie möglich, die Lipoproteine und ihre Lipoproteinsubklassen zu analysieren und quantifizieren. Mit Hilfe der in Abschnitt 2.2.1 beschriebenen Probenherstellung zur Fraktionierung der Lipoproteine in ihre Lipoproteinklassen mit Hilfe von sequentieller Ultrazentrifugation können dann die einzelnen Lipoproteinfraktionen charakterisiert werden. Des Weiteren ist eine Quantifizierung der Lipoproteinsubklassen mittels Fitroutinen im Bereich der Methylgruppen-Signale im NMR-Spektrum nach numares [44,50,51] und anderen Fitroutinen nach [43,52] möglich.

Statistische Auswerteverfahren können im Anschluss angewendet werden, um Korrelationen der Lipoproteinsubfraktionen mit Krankheiten zu analysieren. Auf diese Weise wurde beispielsweise ein Zusammenhang zwischen den Lipoproteinsubklassen und Gefäßerkrankungen erkannt [5,53,54].

1.4.2 Hochdruck-NMR-Spektroskopie

Die folgende Zusammenfassung über die Grundlagen der Hochdruck-NMR-Spektroskopie basiert auf [11,12,55,56,57].

Seit den 60er und 70er Jahren des letzten Jahrhunderts spielen Hochdruck-Messungen eine entscheidende Rolle bei der Untersuchung von Proteinen, Nukleoproteinen und Membranen. Hierbei können wichtige Informationen über die Struktur, Dynamik und Faltung von Proteinen gewonnen werden.

Bei Anlegen von Druck auf ein Protein unterscheidet man folgende Druckeffekte, die schematisch in Bild 12 dargestellt sind. Zum einen ergibt sich eine Volumenveränderung bei Betrachtung eines Subensembles, wie in Bild 12 (a) gezeigt. Dieser Effekt kann durch die isothermale Kompressibilität β_T beschrieben werden, welche durch folgende Gleichung definiert ist [12]

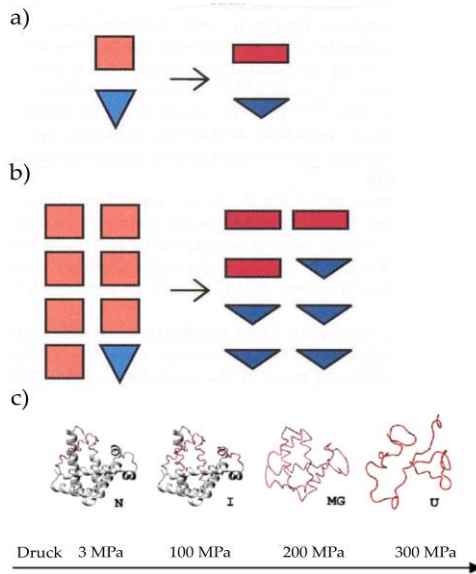


Bild 12: Druckeffekte bei Anlegen eines hydrostatischen Drucks und $\Delta V \neq 0$. Zum einen wird bei Anlegen eines Drucks auf einen Konformer dieser anisotrop komprimiert (a) und zum anderen wird das konformationelle Gleichgewicht zwischen verschiedenen Subensembles verschoben (b). Als weiterer Druckeffekt ist die Proteindenaturierung (c) zu nennen (aus [55]).

$$\beta_T = -\frac{1}{V_i} \left(\frac{\partial V_i}{\partial p} \right)_T \quad (1.1)$$

wobei V_i dem molaren Teilvolumen des Proteins in wässriger Lösung entspricht.

Zum anderen resultiert aus einer Druckerhöhung eine Verschiebung des konformationellen Gleichgewichts von mehreren Subensembles (vgl. Bild 12 (b)). Proteine in wässrigen Lösungen existieren in verschiedenen Konformationen von Subensembles, dem nativen Subensemble N und dem intermediär gefaltetem Subensemble I, welche sich in ihrer räumlichen Struktur der Faltung, der thermodynamischen Stabilität $\Delta G = G_I - G_N$ und ihrem molaren Teilvolumen $\Delta V = V_I - V_N$ unterscheiden.

Durch Anlegen eines hydrostatischen Drucks verschiebt sich das Gleichgewicht, das sich zwischen den Konformationen eines Proteins eingestellt hat, in Richtung eines kleineren Partialvolumens. Dafür gelten nach [12] folgende Gleichungen

$$K = \frac{[I]}{[N]} = e^{-\Delta G/RT} \quad (1.2)$$

$$\Delta G = G_I - G_N = \Delta G(p_0) + \Delta V^0(p - p_0) - \frac{1}{2} \Delta \beta' (p - p_0)^2 \quad (1.3)$$

mit den Gibbs Energieänderungen von N nach I ΔG und $\Delta G(p_0)$ bei den Drücken p und $p_0(0,1 \text{ MPa})$, der Änderung des molaren Teilvolumens ΔV_0 bei $p = 0,1 \text{ MPa}$, der Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta \beta'$, der Gaskonstanten R und der absoluten Temperatur T .

Als weitere Druckeffekte sind, wie in Bild 12 (c) zu sehen, die Proteindenaturierung zu nennen. Dieser Effekt ist beispielsweise bei dem Peptid Amyloid- β zu finden [58].

Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie in Verbindung mit einer Hochdruckanlage ist die Beobachtung von Auswirkungen bei Anlegen eines hohen Drucks in atomarer Auflösung möglich. Diesbezüglich wurde viele Jahre an einer Verbesserung der Spektrenqualität geforscht. Das Problem resultiert aus dem geringen Probenvolumen (ca. 50 μL) und der „dickwandigen Kapillare“ (Zitat aus [11]), welches zu Feldinhomogenitäten innerhalb der Probe und somit zu einer schlechten Sensitivität führt. Neuere Methoden, wie beispielsweise die Verwendung von Keramik-Zellen, ergaben eine Verbesserung der Spektrenqualität [59,60], indem ein Probenvolumen von bis zu 350 μL möglich ist. Genaueres zu den Hochdruck-Messmethoden findet sich in Abschnitt 2.2.2.

Bild 13 zeigt ein Phasendiagramm eines Proteins. Auf den Achsen sind die freie Stabilisierungsenthalpie ΔG gegen die Temperatur und den Druck aufgetragen. Das Phasendiagramm ist in zwei Bereiche unterteilt, welche die Eigenschaften der Proteine charakterisieren. Zum einen der reversible Bereich, bei dem bei Atmosphärendruck und -temperatur die Sekundärstruktur der Proteine erhalten bleibt.

Da Wasser bei einem Druck von 200 MPa bis zu einer Temperatur von $T = -18^\circ\text{C}$ flüssig bleibt, können mit Hilfe von Hochdruck-Messungen Kältedenaturierung von Proteinen beobachtet werden. Mittels Hochdruck-NMR-Spektroskopie können somit Konformationsgleichgewichte von Proteinen, wie bereits genannt die Dynamik, Struktur von Faltungsintermediaten, und die Faltung, beobachtet werden.

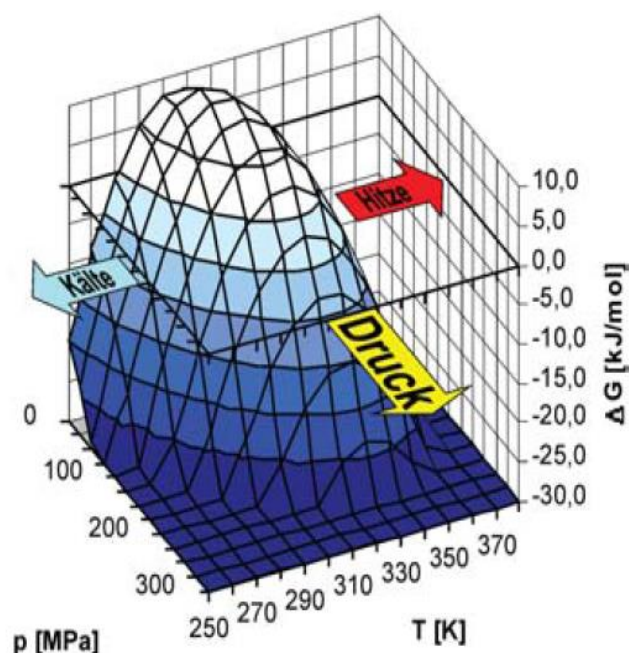


Bild 13: Phasendiagramm eines Proteins. Die Änderung der Gibbs Energie ΔG ist gegen die Temperatur T und den Druck p aufgetragen. Somit sind die Konformationen des Proteins abhängig von der Temperatur und dem hydrostatischen Druck bestimmt (aus [11]).

1.5 Statistische Methoden

Für die Kollektivbeschreibung und Analyse der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Studie sind verschiedene statistische Auswertemethoden vonnöten, die in diesem Abschnitt grundlegend erläutert werden. Die Abschnitte 1.5.1 bis 1.5.3 basieren auf [61,62,63,64,65,66,67,68,69].

1.5.1 Übersicht statistischer univariater Tests

Bei der Suche nach Unterschieden oder Korrelationen innerhalb einer statistischen Datenanalyse ist die Wahl des geeigneten Signifikanztests von großer Bedeutung. Dieser Abschnitt soll einen allgemeinen Überblick über die statistischen univariaten Tests geben und die Wahl der Tests in dem Abschnitt 3.1.3 verdeutlichen. Univariat bedeutet, dass eine Funktion nur von einer Variablen abhängt. Im Gegensatz dazu hängt bei multivariaten Daten die Funktion von mehreren Variablen ab (vgl. Abschnitt 1.5.2 und 1.5.3).

Tabelle 5 zeigt eine Zusammenfassung der häufigsten Signifikanztests. Je nach Stichprobenanzahl, Abhängigkeitsstatus der Stichproben, Signifikanzniveau und (Populations-)Verteilung kann mit Hilfe dieser Tabelle der passende Test zur statistischen Analyse gewählt werden. Bei Signifikanztests ist zu beachten, dass die Hypothese und das Signifikanzniveau vor der Datenanalyse aufgestellt werden. Man bestimmt hierbei eine Hypothese und nimmt an, dass dies nicht zutrifft, was als Nullhypothese bezeichnet wird. Diese Vorgehensweise wird als deduktive Schlussweise bezeichnet. Untersucht man beispielsweise den Unterschied einer Messgröße innerhalb zweier Gruppen, so nimmt man als Nullhypothese an, dass sich die Messgrößen beider Gruppen nicht unterscheiden.

Das Messniveau wird laut [61], wie in Tabelle 5 zu sehen, in die Kategorien binär, nominal, ordinal und zensiert eingeteilt. Binäre Daten, sind Daten die die Studienteilnehmer mit ja oder nein beschreiben. Nominale Daten sind beispielsweise Patienteneigenschaften wie die Haarfarbe oder das Geschlecht. Die Reihenfolge, die Abstände und die Verhältnisse spielen innerhalb der Kategorie keine Rolle. Teilt man die Studienteilnehmer zum Beispiel nach ihrem Gesundheitszustand (Ergebnis des Glucosetoleranztests von 1 bis 5 je nach Grad der Diabeteserkrankung, vgl. Abschnitt 1.6) ein, so nennt man dies ordinale Daten. Hierbei ist die Reihenfolge der Kategorien entscheidend für die Datenbeschreibung. Eine weitere Form der Daten bezeichnet man als metrische Daten ohne oder mit natürlichem Nullpunkt [62]. Hierzu zählen beispielsweise Geburtsdatum oder Gewicht.

Bei der Stichprobenanzahl unterscheidet man eine, zwei oder mehr als zwei Stichproben. Der t-Test (auch Student's t-Test) findet beispielsweise in vielen medizinischen Studien Anwendung [61]. Bedingung für die Verwendung dieses Tests ist, dass die Daten stetig und normalverteilt sind. Des Weiteren dürfen nicht mehr als ein Stichprobenpaar verglichen werden. Diese genannten statistischen Methoden bezeichnet man wie oben angeführt als univariate Analysemethoden, da die Messgröße eindimensional ist [70]. Das bedeutet nicht, dass die Messgrößen aber nicht voneinander abhängen dürfen. Wie bereits erwähnt, ist die Analyse mehrdimensionale Messgrößen als multivariates statistisches Verfahren definiert [71]. In den folgenden Abschnitten 1.5.2 und 1.5.3 werden zwei Vertreter dieser multivariater Analysemethoden beschrieben, welche in Abschnitt 3.1 bei der statistischen Auswertung der im Rahmen der Arbeit untersuchten Studie Verwendung finden.

Tabelle 5

Übersicht statistischer univariater Tests zur Wahl des geeigneten Signifikanztests je nach Stichprobenanzahl und Verteilung.

Stichproben		Messniveau der Zielvariable		t-Test		
Anzahl	Status	Binär	Nominal	Ordinal oder stetig (nicht normalverteilt)	Stetig und normalverteilt	zentriert
1	-	Binomialtest χ^2 -Test	χ^2 -Test	(Vor-)Zeichentest Wilcoxon Vorzeichenrangtest	t-Test	-
2	unabhängig	χ^2 -Test Fisher's exakter Test	χ^2 -Test Fisher's exakter Test	Wilcoxon Rangsummentest=Mann-Whitney U-Test	Ungepaarter t-Test	Log-Rang-Test
>2	unabhängig	χ^2 -Test Fisher's exakter Test	χ^2 -Test Fisher's exakter Test	Kruskal-Wallis-Test	F-Test (ANOVA)	Log-Rang-Test
2	abhängig	McNemar Test		Friedman Test	Gepaarter t-Test	
>2	abhängig	Cochran's Q			ANOVA für Messwertwiederholungen	

Quelle: [61].

1.5.2 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (engl.: Principal Component Analysis, kurz: PCA) ist ein Methode der multivariaten Statistik. Sie wird bei großen Datenmengen verwendet, um Muster zu erkennen und die Dimension des Datensatzes zu reduzieren. Man kann kurz zusammenfassen, dass die Hauptkomponentenanalyse eine Rotation des Koordinatensystems in Richtung maximaler Varianz durchführt, ohne dass dabei Informationen verloren gehen.

Nach Pearson (1901) und Hotelling (1933) wird aus einem Datensatz mit n Messwerten und p Zufallsvariablen X_j mit $j = 1, \dots, p$ eine neue Basis mit maximaler Varianz berechnet [65].

Dabei erfolgt zuerst eine Zentrierung der Spalten mit Hilfe einer Subtraktion der arithmetischen Mittelwerte μ der Spalten

$$Z = \begin{pmatrix} x_{11} - \mu_1 & \dots & x_{1p} - \mu_p \\ \dots & \ddots & \dots \\ x_{n1} - \mu_1 & \dots & x_{np} - \mu_p \end{pmatrix} \in \mathfrak{R}^{n \times p} \quad (1.4)$$

mit

$$\mu_j = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_{i,j} \quad (1.5)$$

und $j = 1, \dots, p$. Anschließend wird die Kovarianzmatrix K_{jk}

$$K_{jk} = \text{Cov}(x_j, x_k) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \mu_j)(x_{ik} - \mu_k) \quad (1.6)$$

mit $j, k \in \{1, \dots, p\}$, dem arithmetischen Mittel μ und

$$K = \frac{1}{n-1} Z^T Z \in \mathfrak{R}^{p \times p} \quad (1.7)$$

mit Z aus (1.4) bestimmt.

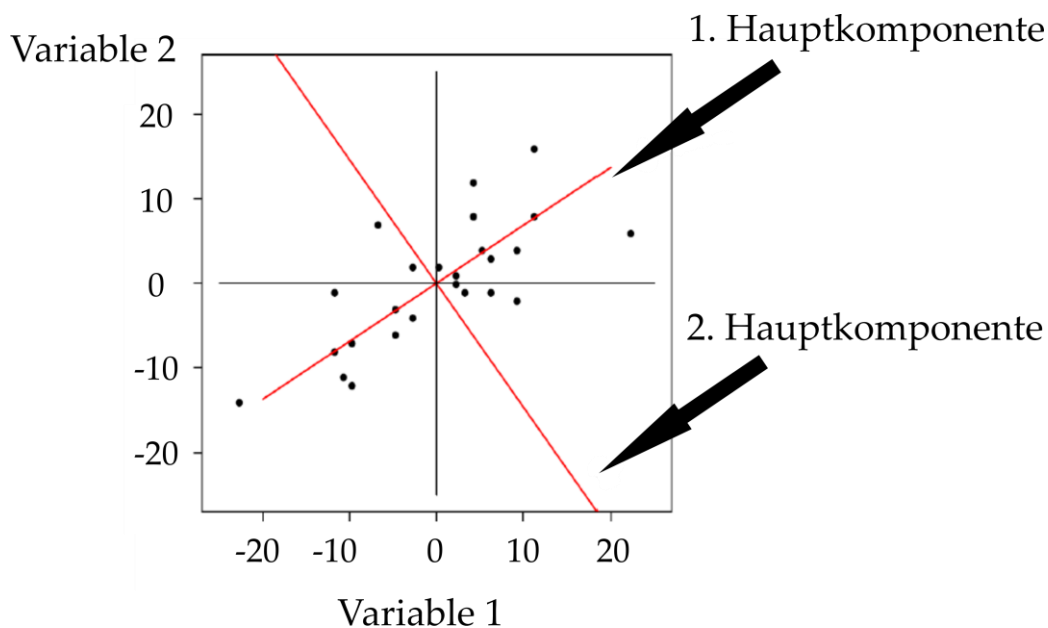


Bild 14: Hauptkomponentenanalyse mit den zwei orthogonalen Hauptkomponenten (rote Linien). Die erste Hauptkomponente gibt die Richtung der maximalen Varianz an (nach [64]).

Die Kovarianzmatrix ist symmetrisch und auf der Diagonalen stehen die Varianzen mit

$$\text{Var}(x, x) = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_{ij} - \mu_j)^2 \quad (1.8)$$

Die Varianz kann als ein „Maß für die Abweichung der Komponenten des Vektors zu ihrem arithmetischen Mittel“ (Zitat aus [63]) gesehen werden. Somit entspricht die Kovarianzmatrix einem Vergleich der Varianzen zweier Vektoren. Um nun den Eigenvektor mit der maximalen Varianz zu finden, muss das sog. Eigenwertproblem gelöst werden. Dazu werden die Eigenwerte λ und Eigenvektoren x für

$$C \cdot x = \lambda \cdot x \quad (1.9)$$

gesucht.

Hat man die Eigenwerte und Eigenvektoren, so werden diese vom höchsten Wert abwärts mit Hilfe eines Scree-Plots sortiert (vgl. Bild 14). Der Eigenvektor mit dem größten Eigenwert wird als Hauptkomponente bezeichnet und gibt die Richtung der maximalen Varianz an. Als Bedingung gilt außerdem, dass diese Hauptkomponenten orthogonal sind. Anwendung findet die PCA beispielsweise in der Bildverarbeitung, in der Statistik zur Mustererkennung und Dimensionsreduktion.

1.5.3 Logistische Regression

Dieser Abschnitt beschreibt die wichtigsten theoretischen Grundlagen der logistischen Regression. Das Prinzip der logistischen Regression oder Logit Modell basiert auf dem Modell der linearen Regression [68]. Hierbei wird der „Einfluss einer oder mehrerer erklärender Variablen X_1, \dots, X_m , wie beispielsweise das Geschlecht oder das Gewicht, auf eine stetige Zielvariable Y (z. B. systolischer Blutdruck) analysiert“ (Zitat aus [68]). Untersucht man nur eine erklärende Variable X , so wird dieses Modell als einfache lineare Regression bezeichnet. Dann gilt nach [72] folgende Gleichung

$$Y = \alpha + \beta X \quad (1.10)$$

mit dem Regressionsparameter β , der Konstanten α , der erklärenden Variablen X und der Zielvariable Y .

Betrachtet man nun mehrere erklärende Variablen X_1, \dots, X_m , so wird die Gleichung (1.10) durch die jeweiligen Regressionsparameter und die erklärenden Variablen ergänzt:

$$Y = \alpha + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_m X_m \quad (1.11)$$

Bei medizinischen Studien, bei denen die statistische Bedeutung mehrerer Variablen auf eine Zielvariable analysiert werden soll, spielt dieses Modell eine wichtige Rolle. Möchte man dagegen den Einfluss erklärender Variablen auf eine binäre Zielvariable Y (z. B. $Y = 1$ Diabetiker, $Y = 0$ gesund) charakterisieren, so kann das lineare Regressionsmodell meist nicht verwendet werden und man wählt stattdessen die sog. logistische Regression. Außerdem berechnet man bei diesem Modell keine Vorhersage sondern die Eintrittswahrscheinlichkeit für Y , d. h. die Wahrscheinlichkeit $p(Y = 1)$. Die Zielvariable Y kann die beiden Werte 0 und 1 annehmen und folglich die Wahrscheinlichkeit $p(Y)$ beliebige Werte zwischen 0 und 1.

Als Odds bezeichnet man die Chance im Vergleich zu $Y = 1$, das Ereignis $Y = 0$ zu erhalten

$$\frac{p}{1-p} \quad (1.12)$$

mit beliebig positiven Werten. Der sog. Logit, d. h. der Logarithmus des Odds, ergibt sich aus:

$$\text{logit}(p) = \log\left(\frac{p}{1-p}\right) = \alpha + \beta X \quad (1.13)$$

was durch Auflösen nach p

$$p = \frac{e^{\alpha + \beta X}}{1 + e^{\alpha + \beta X}} \quad (1.14)$$

ergibt, wobei die rechte Seite in Gleichung (1.14) als logistische Funktion definiert wird. Erweitert man nun den Term $\alpha + \beta X$ durch

$$\alpha + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_m X_m \quad (1.15)$$

so kann man für die Wahrscheinlichkeit von $Y = 1$ mehrere erklärende Variablen berechnen. Als weiterer Begriff im Rahmen von klinischen Studien ist das Odds-Ratio OR definiert. Dieser Wert gibt das Verhältnis der Chancen (Odds) von exponierten und nichtexponierten Personen an und wird mit

$$OR = e^{\beta} \quad (1.16)$$

bestimmt.

Untersucht man den Einfluss mehrerer erklärender Variablen auf eine Zielvariable, so wird das sog. adjustierte Odds-Ratio wie folgt berechnet:

$$OR_j = e^{\beta_j} \quad (1.17)$$

mit dem zugehörigen Regressionskoeffizient β_j . Dieses adjustierte Odds-Ratio gibt an, wie stark die erklärenden Variablen bzw. Risikofaktoren und die Zielvariable (z. B. Diabetiker ja/nein) zusammenhängen.

1.6 BRK-Studienbeschreibung

Im Rahmen eines Forschungsprojekts „Testmethoden für die Diabetes-Früherkennung“ wurden 11.655 Humanplasma-Proben von 618 Studienteilnehmern, welche fünf Gruppen zugeordnet wurden (Normalbereich, IFG, IGT, IFG und IGT und Diabetes, siehe Tabelle 6), in Kooperation mit der Firma numares organisiert, gepflegt, bereinigt und anschließend nach der Probenpräparation gemessen.

Tabelle 6Einteilung der oralen Glucosetoleranztestergebnisse in die (Prä-)Diabetesklassen.^{a, b}

oGTT-Ergebnis ^a	Gesundheitszustand
1	Normbereich
2	IFG
3	IGT
4	IFG + IGT
5	Diabetiker

^a oGTT: oraler Glucosetoleranztest.^b IFG steht für abnorme Nüchtern-glucose und IGT für gestörte Glucosetoleranz.

Aufgrund der im Jahr 2006 vom Blutspendedienst des BRK gegründeten „Biobank der Blutspender“ standen innerhalb dieses Projekts retrospektive Plasmaproben von Blutspendern, d. h. sog. Rückstellproben, die bis zum Jahr 2001 zurückreichen, zur Verfügung. Diese Proben werden für Forschungszwecke aufbewahrt und können somit zur Untersuchung von Krankheitsverläufen herangezogen werden und diesbezüglich der Biomarkerforschung dienen. Die Studienteilnehmer dieser Diabetes-Studie wurden mit Hilfe eines sog. Findrisk-Fragebogen ausgewählt [8,18]. Dazu füllten 60000 Blutspender diesen Fragebogen aus.

Der Findrisk-Fragebogen soll das Risiko, in den nächsten 10 Jahren an Typ-2-Diabetes zu erkranken, vorhersagen (vgl. Bild 15). Personen, mit einem Findrisk-Wert von größer oder gleich 12 und eine zusätzliche Personengruppe, ließen ihren HbA1c-Wert untersuchen. Der HbA1c-Test gibt an, wie viel Glucose an das Hämoglobin gebunden ist. Man misst somit den mittleren Blutzuckerspiegel der letzten zwei bis drei Monate. Anschließend wurden die Personen mit erhöhtem HbA1c-Wert zum oralen Glucosetoleranztest eingeladen. Hierbei wird der Nüchtern-Plasmaglukosewert zum Zeitpunkt

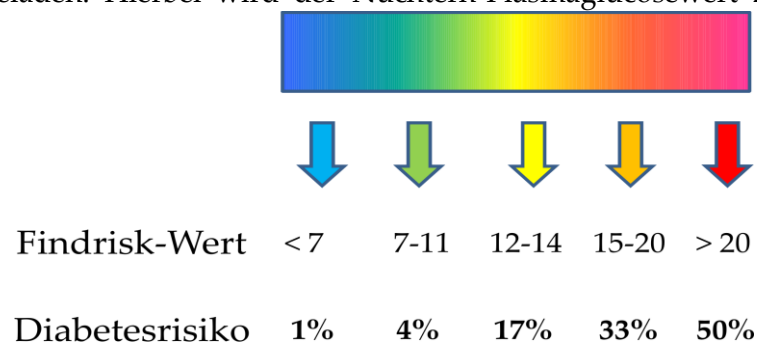


Bild 15: Schematische Skizze des Findrisk-Wertes und dessen Abschätzung für das Diabetesrisiko. Bei einem Findrisk-Wert zwischen 15 und 20 erkrankt etwa jeder dritte innerhalb von 10 Jahren an Typ-2-Diabetes. Ab einem Wert von über 20 liegt die Wahrscheinlichkeit bereits bei 50 % (nach [18]).

$t = 0 \text{ min}$ und der Wert zwei Stunden nach der Einnahme von 75 g Glucose in Wasser gemessen. Somit standen 618 Studienteilnehmer mit zugehörigen retrospektiven Proben und 172 oGTT-Proben von einer zusätzlichen Gruppe (mit oGTT-Ergebnissen von normal bis Diabetes) zur Verfügung. Tabelle 7 zeigt die zugehörigen patientenspezifischen Daten, die zur Patientenstatistik und Auswertung der gemessenen Daten vom BRK-Blutspendedienst dienen. Dazu zählen beispielsweise patientenspezifische Daten wie Alter, Geschlecht, Gewicht, Größe, BMI und viele mehr. Der BMI (engl.: Body Mass Index) wird nach folgender Formel bestimmt:

$$BMI = \frac{\text{Gewicht}[kg]}{(\text{Größe}[m])^2} \quad (1.18)$$

Dabei gilt laut WHO [19] ein BMI bis 25 als normal und ab 25 als übergewichtig. Mit einem BMI über 30 leidet man an Adipositas. Somit kann der BMI als Kenngröße für das Körpergewicht in Bezug auf die Körpergröße in der statistischen Auswertung dienen. Des Weiteren stehen sog. Erhebungsfragebögen zur Verfügung. Diese Fragebögen beinhalten eine Gesundheitsuntersuchung vor Beginn der Blutspende. Dabei wird außerdem kontrolliert, welche Medikamente eingenommen werden und welche Krankheiten vorliegen. Diese Fragebögen können bei der anschließenden Auswertung zusätzliche Informationen zu den jeweiligen Patienten liefern.

Tabelle 7

Patientenspezifische Daten und zugehörige Kategorie der Variablen.^{a, b, c, d}

Daten	Kategorie nach Abschnitt 1.5.1
Label (DS-Nummer) ^a	nominal
KNR (7-stellige Ziffer) ^b	nominal
Geburtsdatum	metrisch
Geschlecht	nominal
Größe	metrisch
Gewicht	metrisch
BMI ^c	metrisch
Alter	metrisch
Blutspende-Institut	nominal
Glucose-Wert zu $t=0 \text{ min}$ [mg/dL]	metrisch
Glucose-Wert zu $t=120 \text{ min}$ in [mg/dL]	metrisch
Findrisk-Wert	metrisch

Taillenumfang	metrisch
oGTT-Ergebnis^d	ordinal
HbA1c	metrisch

^a DS-Nummer: Nummer des Diabetesstudienteilnehmers.

^b KNR: Kundennummer.

^c BMI: Body-Mass-Index.

^d siehe Tabelle 6.

2. Material und Methoden

In diesem Abschnitt werden die Herstellung der Plasmaproben der Diabetesstudie und die NMR-Messmethoden dargelegt. Anschließend wird die Primärprozessierung der mit Hilfe der NMR-Spektroskopie gewonnenen Daten erläutert. Des Weiteren wird die Auftrennung des Serums in die Lipoproteinklassen mit Hilfe der sequentiellen Ultrazentrifugation dargestellt. Der Aufbau der NMR-Hochdruckanlage sowie die Messverfahren und Prozessierung der NMR-Spektren werden im Anschluss gezeigt.

2.1 Diabetesstudie

Die in Abschnitt 1.6 beschriebene Diabetesstudie wurde in Kooperation mit der Firma numares durchgeführt. Das Labor und das NMR-Spektrometer der Firma standen für die Probenherstellung und der NMR-Datengewinnung der Studie zur Verfügung.

2.1.1 Probenherstellung

Das für die NMR-Messung notwendige Probenmaterial wurde vom Blutspendedienst des BRK bereitgestellt. Dazu haben sowohl die Proben, die während des oGTT entnommen wurden, als auch die Rückstellproben folgendes Verfahren durchlaufen. 500 ml Blut wird dem Blutspender nach Ausfüllen des bereits erwähnten Erhebungsfragebogens, der der Dokumentation des Gesundheitszustands und der Medikamenteneinnahme dient, und nach einer ärztlichen Untersuchung entnommen. 10 ml davon werden in EDTA-Röhrchen pipettiert. EDTA hemmt, wie bereits in Abschnitt 1.3.1 erwähnt, die Blutgerinnung. Anschließend wird das EDTA-Röhrchen 15 Minuten bei 500 g zentrifugiert, um das Plasma vom zellulären Anteil zu trennen. Für die Rückstellproben wurde das EDTA-Plasma im auf -42 °C gekühlten Probenlager der Biobank der Blutspender des BSD aufbewahrt. Anschließend wurden die Proben in gefrorenem Zustand in Probenröhrchen, wie in Bild 16 (a) gezeigt, zu einem -80 °C Gefrier-

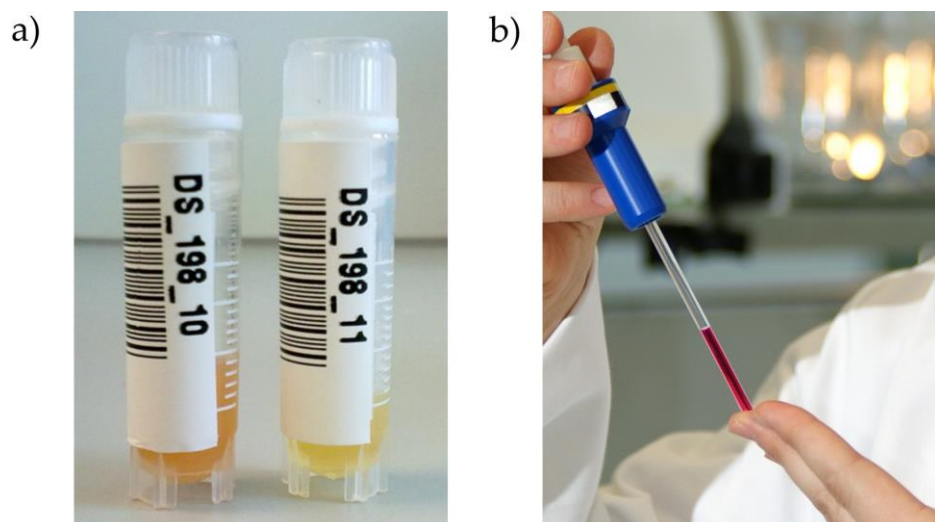


Bild 16: (a) Beispiel für die vom Blutspendedienst erhaltenen Humanplasmaproben mit Etikettierung zur Zuordnung der Probe zu den patientenspezifischen Daten über die DS-Kennung. DS_198_10 ist beispielsweise die zehnt-älteste Probe des Studienteilnehmers 198. (b) 5 mm NMR-Röhrchen wie es im Rahmen der NMR-Messungen verwendet wurde [45].

schrank transportiert, wo sie bis zur Probenherstellung gelagert wurden. Für die Messungen der Proben mit NMR-spektroskopischen Methoden ist keine weitere Probenpräparation bis auf das Auftauen der Probe und Pipettieren von $400\ \mu\text{l}$ Probenvolumen in ein 5 mm NMR-Röhrchen wie in Bild 16 (b) zu sehen vonnöten. Dem Probenmaterial wurden keine internen Standards hinzugefügt. Dies bietet die Möglichkeit einer anschließenden Messung des Plasmas mit Hilfe anderer Verfahren. Zudem werden vor und nach jeder Messung Referenzspektren vermessen, um die Qualität während der Messserie zu gewährleisten. Außerdem dient diese Probe der Einstellung der idealen Messparameter (vgl. Abschnitt 2.1.2). Dabei handelt es sich um $400\ \mu\text{L}$ Citrat-Plasma mit DSS in einem 5 mm-NMR-Röhrchen.

2.1.2 NMR-Messverfahren

Im Rahmen des Diabetes-Projekts wurde eine verbesserte NMR-Messmethode an einem 600 MHz AVANCE II+ BRUKER NMR-Spektrometer mit TXI-Probenkopf, der mit einem automatischen Probenwechsler namens Sample Jet der Firma BRUKER ausgestattet ist, etabliert. Die Verwendung des Sample Jet Probenwechslers ermöglicht eine schonende Messung der Proben, da die Proben permanent gekühlt werden. Zur Qualitätssicherung wurde zu Beginn und zum Ende jeder Messreihe eine Referenzprobe gemessen. Die gesamten NMR-Messungen der Diabetesstudie wurden an dem bereits erwähnten 600 MHz NMR-Spektrometer durchgeführt.

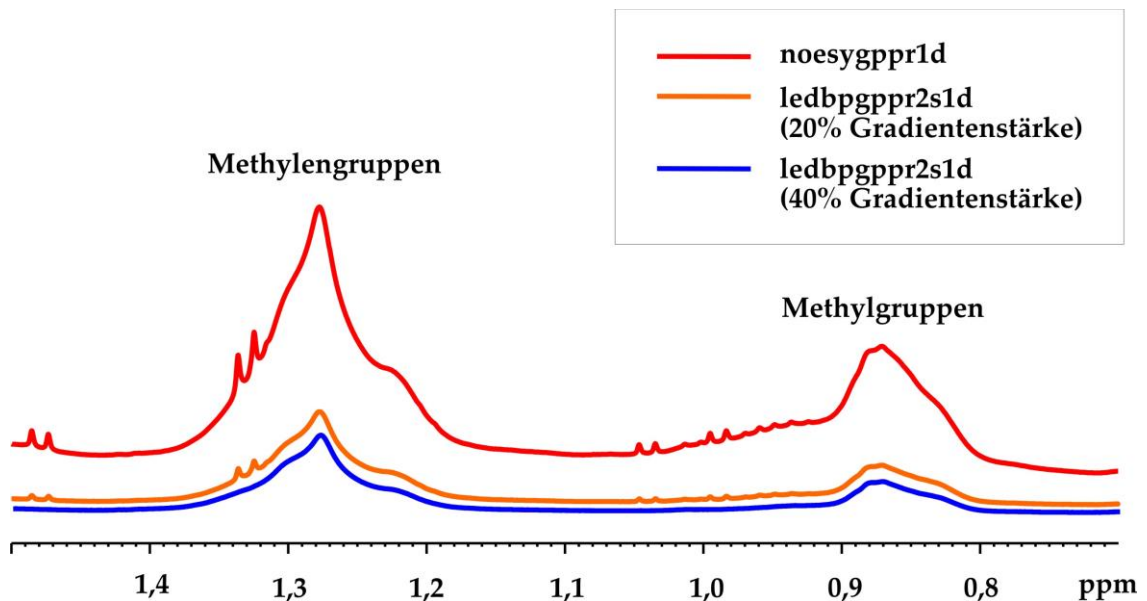


Bild 17: Methylen (1,3 ppm) - und Methylbereich (0,85 ppm) von 1D-¹H-NMR-Spektren einer Humanplasma-EDTA-Probe. Die Spektren wurden bei einer Temperatur von $T=310$ K an einem 600 MHz-Spektrometers mit den Pulssequenzen noesygppr1d (rote Linie) und den beiden diffusionsgewichteten Pulssequenzen ledbpgppr2s1d mit einer Gradientenstärke von 20 % (orange Linie) bzw. 40 % (blaue Linie), einer Diffusionszeit von 100 ms und einer Gradientenpulslänge von 2 ms bzw. 4 ms aufgenommen. Die Spektren besitzen die gleiche Skalierung.

Im Rahmen des Diabetes-Projekts wurden somit 11655 Plasmaproben mit je drei NMR-Spektren vermessen. Bild 17 zeigt drei 1D-¹H-NMR-Spektren einer Humanplasma-EDTA-Probe, welche bei einer Temperatur von $T = 310$ K an einem 600 MHz-Spektrometers mit den Pulssequenzen noesygppr1d (rote Linie) und den beiden diffusionsgewichteten Pulssequenzen ledbpgppr2s1d mit einer Gradientenstärke von 20 % (orange Linie) bzw. 40 % (blaue Linie), einer Diffusionszeit von 100 ms und einer Gradientenpulslänge von 2 ms bzw. 4 ms aufgenommen wurden. Bild 18 zeigt ein Beispiel für eine solche Pulssequenz ledbpgppr2s aus [17].

Tabelle 8 zeigt die Parameter der durchgeführten 1D-¹H-NMR-Pulssequenzen noesygppr1d und ledbpgppr2s1d.

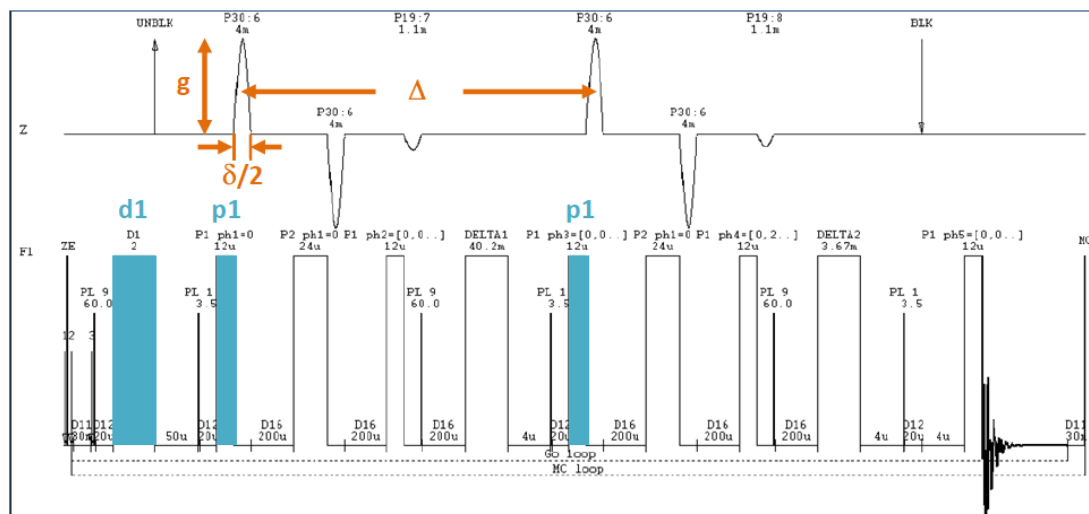


Bild 18: Skizze einer Pulssequenz *ledbgppr2s1d* mit den wichtigsten Messparametern: die Wartezeit *d1* (blau), dem Anregungspuls *p1* (blau), der Gradientenstärke *g*, der Gradientenpulslänge δ und der Diffusionszeit Δ (aus [17]).

Tabelle 8

NMR-Messparameter der Diabetesstudien-Experimente.

	Noesygppr1d	Ledbgppr2s1d	Ledbgppr2s1d
Spektrometer	600 MHz	600 MHz	600 MHz
Temperatur	310	310	310
Pulsprogramm	noesygppr1d	ledbgppr2s1d	ledbgppr2s1d
Wartezeit	4 s	0.7 s	0.7 s
Mixing-Zeit	0,01 s	-	-
FID	32768	32768	32768
Spektrale Breite [ppm]	20,022	20,022	20,022
Anregungspuls <i>p1</i>	90°		
Gradientenstärke	-	20 %	40 %
Gradientenpulslänge	-	2 ms	4 ms
Diffusionszeit	-	100 ms	100 ms
Dämpfung [dB]	0	0	0

Das Einstellen der Messparameter erfolgte, wie bereits erwähnt, mit Hilfe einer Plasma-Referenzprobe mit dem internen Standard DSS. Es wurde eine Bestimmung der Dauer des 90°-Pulses durchgeführt und die optimale Transmitterfrequenz O1 zur Wasserunterdrückung mit Vorsättigung bestimmt. Im Folgenden werden kurz die Methoden der Wasserunterdrückung, welche grundlegend in zwei Verfahren unterteilt wer-

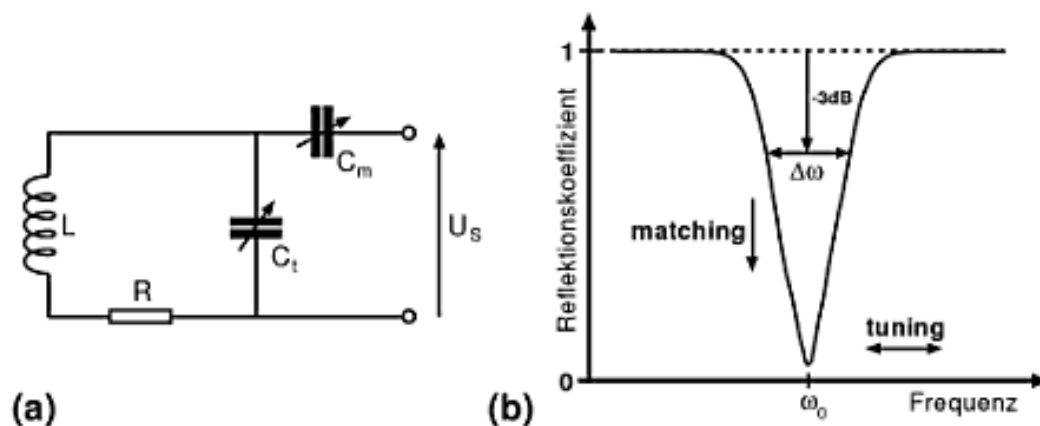


Bild 19: (a) Schaltkreisskizze zur Veranschaulichung des Tunings und Matchings. Beim Matching wird die Impedanz der Spule an die Impedanz des Kondensators mit der variablen Kapazität C_m angepasst. Als Tuning bezeichnet man das Abstimmen der Spule mit Hilfe des Kondensators mit variabler Kapazität C_t , so dass die Resonanzbedingung erfüllt ist. In (b) ist eine sog. Wobble-Kurve abgebildet, welche zur Justierung der Tuning- und Matching-Schrauben dient (aus [74]).

den können, dargestellt, zum einen die Wasserunterdrückung mit Hilfe von beispielsweise Vorsättigung während der Akquisition und zum anderen durch geeignete Prozessierung des gemessenen NMR-Spektrums. Dies kann beispielsweise mit Hilfe von SSA-basierter Präprozessierungsmethoden durchgeführt werden [73]. Des Weiteren wurden mit Hilfe des Tunings, Matchings und Shimmens die optimalen Einstellungen für die Akquisition festgelegt. Beim sog. Tuning wird der Stromkreis des Probenkopfs so abgestimmt, dass die Frequenz, bei der er die höchste Empfindlichkeit besitzt, mit der Sender- bzw. Empfängerfrequenz übereinstimmt (Resonanz). Beim Matching findet eine Impedanzanpassung statt, was bedeutet, dass der Widerstand des Probenkopfs so eingestellt wird, dass die maximale Leistung, die am Probenkopf ankommt, auch durch die Spule übertragen wird [74].

Bild 19 zeigt eine Schaltskizze eines solchen Stromkreises, bei der mit Hilfe zweier Kondensatoren mit variabler Kapazität C die Spule abgestimmt werden kann. Dies führt zu einem verbesserten Signal/Rausch-Verhältnis, was die Qualität des aufgenommenen NMR-Spektrums steigert. Die Feldhomogenität innerhalb der Probe wird mit Hilfe des sog. Shimmens eingestellt, was zu einer weiteren Verbesserung der spektralen Auflösung führt. Die NMR-Röhrchen wurden in 96er Mikrotiterplatten überführt und können unter Verwendung des Programms ICON-NMR (Bruker Bio-Spin, Rheinstetten, Deutschland) automatisiert gemessen werden.

2.1.3 Primärprozessierung der NMR-Spektren

Eine primäre Prozessierung findet automatisch unter Verwendung des Programms Topspin (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Deutschland) statt. Dabei werden die Prozessierungsparameter aus Tabelle 9 für alle Proben und somit Messungen mit den Pulssequenzen noesygppr1d, ledbgppr2s1d und ledbgppr2s1d übernommen.

Tabelle 9

Primärprozessierungsparameter der Pulssequenzen noesygppr1d, ledbgppr2s1d und ledbgppr2s1d im Rahmen der Diabetesstudie.^a

Kategorie	Parameter	
Fensterfunktion^a	Fensterfunktion	EM (exponentiell multipliziert)
	Linienverbreiterung (LB)	0,30
Phasenkorrektur	Phasenkorrektur Nullter Ordnung	Je nach Spektrum
	Phasenkorrektur 1. Ordnung	0
	Verfahren zur Phasenkorrektur	pk
Grundlinienkorrektur	Degree of polynormal for abs	5
	Grenzen [ppm]	0-10
	CORROFFS [Hz]	0
	FID Baseline-Mode	Quadratur

^a *englisch: window function.*

Die Grundlinie und Phase wurde geprüft und gegebenenfalls manuell korrigiert. Diese Korrektur wurde für alle studienbetreffenden Proben identisch ausgeführt, damit eine fehlerfreie, quantitative Auswertung der NMR-Spektren erfolgen kann. Daher wurde nur eine Phasenkorrektur nullter Ordnung durchgeführt. Eine Referenzierung der NMR-Spektren erfolgte unter Verwendung einer Excel-Routine mit Hilfe des Laktatpeaks, der als $\delta = 1,330 \text{ ppm}$ gesetzt wurde, da wie bereits erwähnt kein interner Standard als Referenz hinzugefügt wurde.

Die Firma numares hat in den letzten Jahren ein Analyseverfahren zur exakten Bestimmung von Lipoproteinprofilen aus NMR-Spektren entwickelt (Patente: AU2005250571, DE102004026903B4, US 7927878) [50,44,51].

Die diffusionsgewichteten Spektren ledbgppr2s1d führen hierbei zu charakteristischen Signalen der Lipoproteine verschiedener Größenbereiche [45]. Tabelle 4 zeigt die Zuordnung und Kennzeichnung der Lipoproteinsubklassen L1 bis L15 bezüglich ihres Partikeldurchmessers und Dichte.

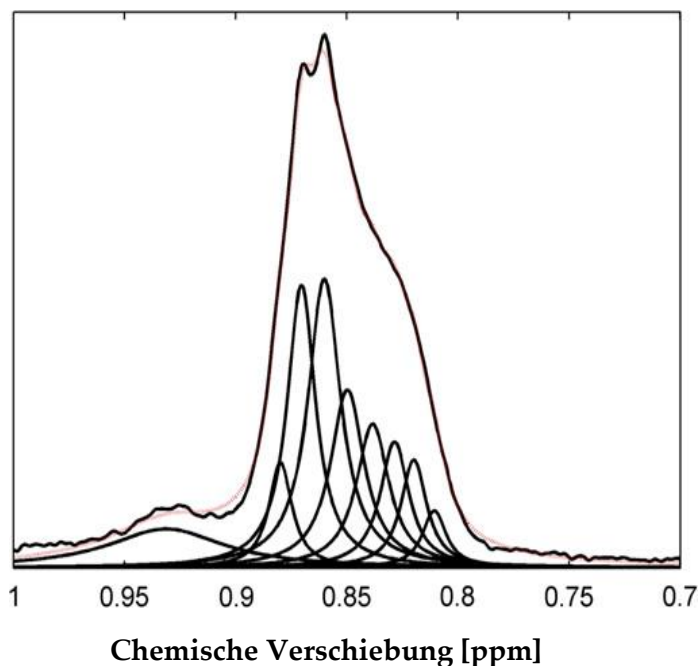


Bild 20: Methylbereich zur Veranschaulichung eines 1D-¹H-NMR-Spektrums und neun modellierten Lorentz-Linien aus [47].

Der Methylbereich konnte somit in insgesamt 15 Lipoproteinsubklassen L1 bis L15 modelliert werden mit Hilfe von Gauß- und Lorentz-Funktionen [44]. In Bild 20 ist ein Beispiel für eine vergleichbare Modellierung des Methylbereichs mit Hilfe von neun Lorentz-Kurven aus [47] gezeigt.

Die für die Statistik verwendeten Werte entsprechen den Normierungswerten der Referenz-Kurven. Diese sind proportional zur Konzentration der jeweiligen Lipoproteinsubklasse. Unter Verwendung dieser Fitroutine konnten für alle Proben die zugehörigen Lipoproteinprofile ermittelt werden. Diese werden in Form von Microsoft Excel-Datenblättern abgespeichert und stehen somit der weiteren Datenvorbereitung und der anschließenden metabolomischen Analyse zur Verfügung.

2.1.4 Vorbereitung der NMR-Spektren auf die Hauptkomponentenanalyse

Für die statistische Auswertung der gesamten NMR-Spektren mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse (vgl. Abschnitt 1.5.2) ist eine Präprozessierung dieser notwendig. Hierfür wurde das Programm AMIX 3.8.1 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Deutschland) verwendet. Zu Beginn der Präprozessierungsschritte werden die 1D-¹H-NMR-Spektren mit der Pulssequenz Noesygppr1d in das Programm eingelesen. Anschließend findet

das sog. Bucketing bzw. Binning der Spektren statt. Dabei wird das Spektrum in kleine rechteckige Bereiche sog. Buckets/ Bins aufgespalten. Es gibt verschiedene Methoden wie das Bucketing durchgeführt wird. Dazu zählen beispielsweise das rechteckige Bucketing mit konstanter Breite und das dynamische Bucketing mit Bins variabler Größe. Die Bucketbreite wird meist so gewählt, dass sie der Hälfte der durchschnittlichen Peakbreite entspricht, typischerweise zwischen 0,02 und 0,04 *ppm*. Des Weiteren wählt man die Grenzen für das Bucketing und schließt Bereiche aus, die das Ergebnis verfälschen könnten, wie beispielsweise das unterdrückte Wassersignal zwischen 4,5 und 5,0 *ppm* und die EDTA-Signale im EDTA-Plasma. Anschließend wird das Signal innerhalb jedes Buckets integriert. Dafür stehen mit Hilfe des Programms AMIX verschiedene Integrationsmethoden zur Verfügung mit Hilfe derer die Spektren normalisiert werden können. Beispielsweise summiert man über alle Intensitäten, über die absoluten Intensitäten oder über positive oder negative Intensitäten. Dabei ist die Normalisierung auf die Summe aller Buckets eines Spektrums die gebräuchlichste Methode in der Metabolomik [2]. Abschließend entscheidet man sich für eine Skalierungsmethode. In dem Programm AMIX kann man zwischen folgenden Methoden wählen: Skalierung auf das größte Bucket, Skalierung auf einen Referenzbereich, Skalierung auf die Gesamtintensität oder keine Skalierung. Bei Skalierung auf die Gesamtintensität werden die Integrale der Buckets durch die Gesamtintensität des Spektrums dividiert. Die Skalierung auf einen Referenzbereich ist beispielsweise eine verbreitete Methode bei der metabolomischen Analyse von Urinproben [6]. Hierbei wird meist auf ein Creatinin-Signal normiert. Man dividiert alle Bucket-Integrale durch das Integral eines Buckets, der einen Creatinin-Peak enthält. Für die in Abschnitt 3.1.2 durchgeführte Auswertung der NMR-Spektren mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse wurden die in Tabelle 10 dargestellten oben beschriebenen Methoden verwendet.

Tabelle 10

Methoden und Parameter der Präprozessierung für die Hauptkomponentenanalyse der 1D-¹H-NMR-Spektren der Diabetesstudie mit Hilfe des Programms AMIX von Bruker.

Methode	Verwendete Methode
Bucketing	Rechteckiges Bucketing, Bucketing mit variabler Größe
Bucketing-Bereich	0 bis 10 <i>ppm</i>
Bucketbreite	0,03 <i>ppm</i>
Ausgeschlossener Bereich	4,5 bis 5 <i>ppm</i> (unterdrücktes Wassersignal) und EDTA-Signale
Integrationsmethode	Summe über alle Intensitäten
Normierung	Normierung auf Gesamtintensität

Ein Nachteil dieser Bucketing-Methode ist, dass Informationen über die spektrale Struktur wie die Linienform, aber auch die hohe Auflösung der NMR-Daten verloren gehen. Da aber für statistische Methoden wie beispielsweise der Hauptkomponentenanalyse die komplexen NMR-Datensätze zu komplizierten Ergebnissen führen können, ist diese Methode in der Metabolomik meist unverzichtbar.

2.1.5 Zuordnung der NMR-Signale

Mit Hilfe von Datenbanken, wie beispielsweise der MMCD-Datenbank (engl.: Madison Metabolomics Consortium Database), Literatur ([48], [75]) und Standardspektren der einzelnen Substanzen, aber auch mittels weiterer Messungen zur vollständigen Zuordnung (Spike-In-Experimente [76]), konnten die Peaks den jeweiligen Substanzen zugeordnet werden. Als Referenzspektren der einzelnen Substanzen dienten außerdem die in AMIX verfügbaren Standardspektren der Datenbank Bbioefcode 2-0-3 (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Deutschland). Diese Spektren sind unter verschiedenen Bedingungen (pH-Wert und Lösungsmittel) gemessen worden. Somit ist der größte Teil der Substanzen, die innerhalb eines 1D- ^1H -NMR-Spektrums enthalten sind, mit Hilfe dieser Referenzspektren zuzuordnen.

Beispielhaft sind in Bild 21 der Methyl- und Methylenbereich mit den jeweiligen Referenzspektren zu sehen. Eine Liste der Zuordnungen ist in Tabelle 11 zu finden.

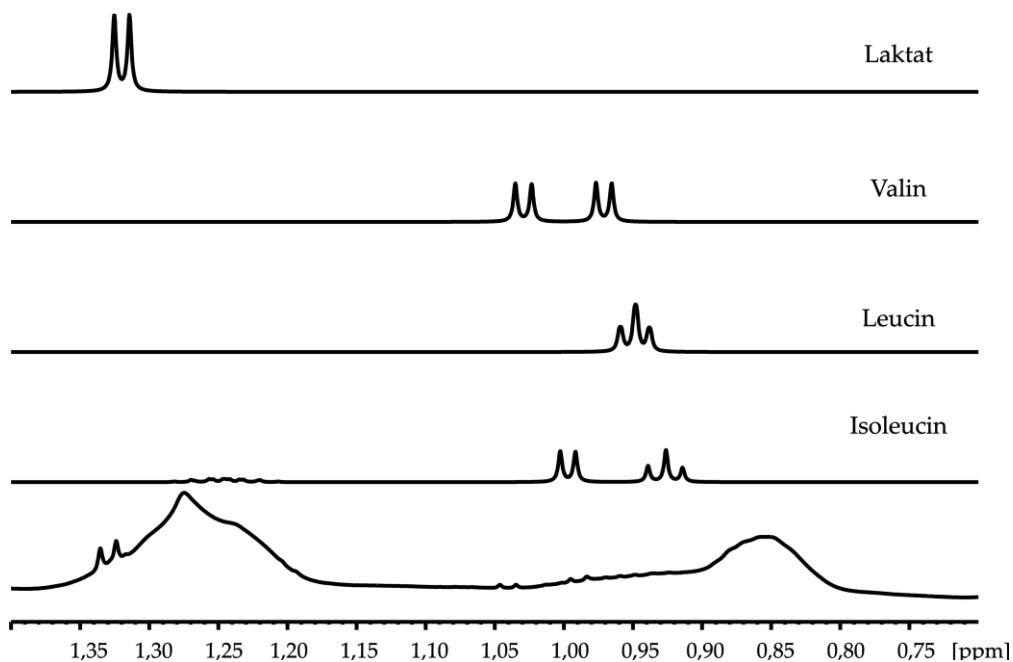


Bild 21: Zuordnung der Signale des humanen Blutplasma-1D- ^1H -Spektrums (unten) mit Hilfe von Standardspektren der Substanzen Laktat, Valin, Leucin und Isoleucin von [76].

Tabelle 11

Zuordnung der Signale des 1D-¹H-NMR-Spektrums von Humanplasma zu den jeweiligen Substanzen.^{a, b}

¹ H chemische Verschiebung [ppm]	Multiplizität	Substanz/Molekül
0,670	m	Cholesterol [CH ₃]
0,80- 0,90	m	Methyl- Gruppen
0,936	t	Isoleucin [CH ₃]
0,950	d	Leucine [CH ₃]
0,970	d	Leucine [CH ₃]
0,990	d	Valin [CH ₃]
1,008	d	Isoleucin [CH ₃]
1,041	d	Valin [CH ₃]
1,144	d	Unbek.
1,180	t	Ethanol*
1,199	d	3-Hydroxybutyrate [γ-CH ₃] ^b
1,16 - 1,37	m	Methylen-Gruppen
1,330	d	D-Lactat [CH ₃]
1,480	d	Alanin [CH ₃]
1,45-1,61	m	Lipide (hauptsächlich VLDL)
1,720	m	Lysine [δ -CH ₂]
1,920	s	Acetat [CH ₃]
2,000	m	Lipide [CH ₂ -C=C]
2,044	s	N-acetyl-Glucosamine (NAG)
2,078	s	N-Acetylneuramin-Säure (NANA)
2,130	m	Glutamat
2,226	s	Acetoacetat [CH ₃] ^b
2,700	s	Mg-EDTA
3,040	s	Creatinin
3,130	q	Ca-EDTA
3,200	s	H-EDTA
3,240	s	Acetate Mg-EDTA
3,251	dd	beta-D-Glucose [H2]
3,364	s	Methylguanidin
3,410	m	beta-D-Glucose
3,580	d	Threonine [alpha-CH]
3,600		EDTA
3,660	q	Ethanol

3,840	m	alpha-D-Glucose
3,905	dd	beta-D-Glucose
3,920	d	Tyrosin
4,110	q	Lactat [CH]
4,050	s	Creatinin
4,650	d	beta-D-Glucose
4,700	s	Wasser
5,240	d	α -D-Glucose
5,25-5,38	m	Ungesättigte Lipide

Quelle: Substanzen [77], [48], [75] und [76].

^a Abkürzungen: s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, q: Quartett, m: Komplexes Multiplett; dd: Dublett eines Dubletts. Die chemischen Verschiebungen sind referenziert auf das Laktat-Signal, das auf $\delta=1,330$ ppm gesetzt wurde.

^b kennzeichnet die Ketonkörper.

2.1.6 Vorbereitung der Lipoproteinprofile auf die statistische Auswertung

Wie bereits in Abschnitt 1.5.1 erläutert, ist es für viele Tests zwingend notwendig, dass die zu untersuchenden Daten annähernd normalverteilt sind. Da die Verteilung biologischer und medizinischer Daten meist nicht der Normalverteilung entspricht, müssen im Rahmen der Diabetesstudie die Verteilungen der Lipoproteinsubklassen diesbezüglich untersucht werden.

Bild 22 zeigt exemplarisch wie die Lipoproteinsubklassen L1 bis L15 auf ihre Verteilung überprüft wurden. Hierzu kann die Verteilung mit Hilfe eines Histogramms dargestellt werden (vgl. Bild 22 (a)). Bild 22 (b) zeigt eine weitere Möglichkeit der Visualisierung der Verteilung mittels eines sog. Quantile-Quantile-Plots (kurz: QQ-Plot). Hierbei werden die Quantile der Variable (y-Achse) gegen die theoretischen Quantile der Standardnormalverteilung (x-Achse) aufgetragen. Stimmen die Verteilungen überein, so liegt die Funktion auf der Diagonalen. In Bild 22 (b) ist zu erkennen, dass die Variable L8 in ihrer ursprünglichen Form nicht normalverteilt ist.

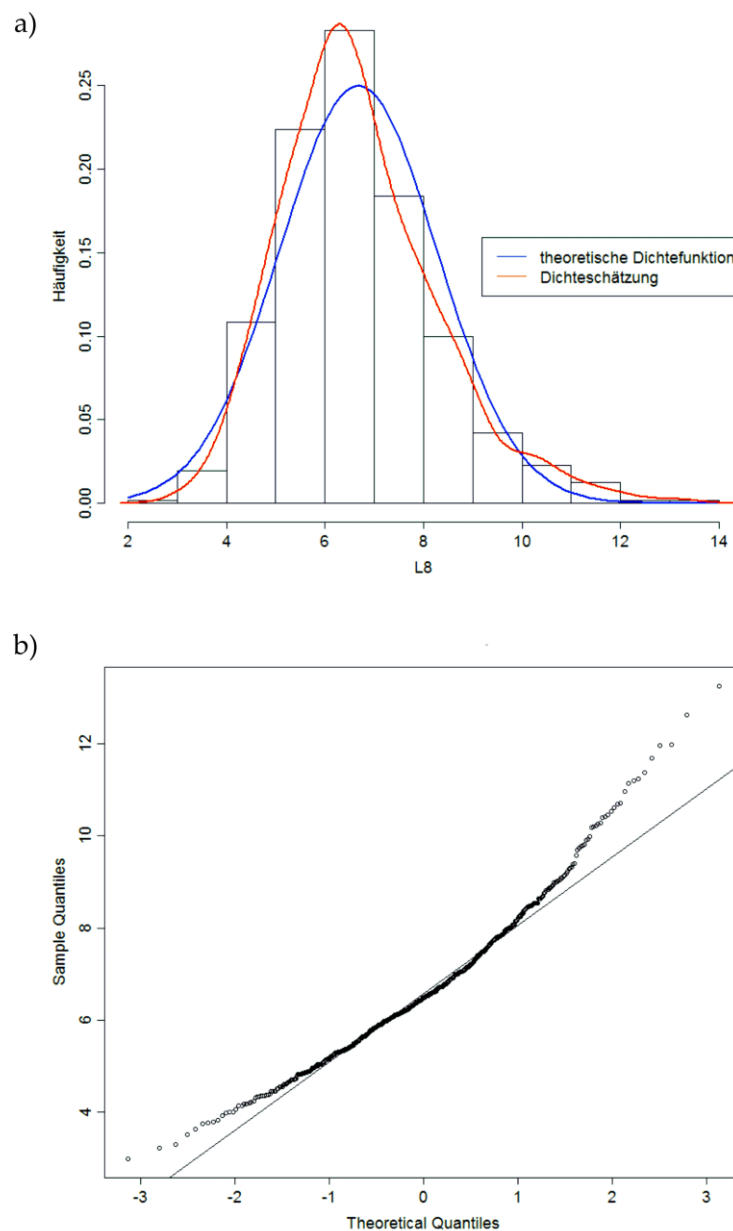


Bild 22: Exemplarischer, graphischer Normalverteilungstest des gewichteten Integrals der modellierten Signalkurve der Lipoproteinsubklasse L8. Die Darstellung der Daten von L8 in Form eines Histogramms ist eine Möglichkeit, die Verteilung von L8 zu überprüfen (a). Hierbei wird die Häufigkeit gegen die Werte von L8 aufgetragen. Die rote Kurve ist eine Dichteschätzung der Daten und die blaue Linie zeigt eine theoretische Normalverteilung. Die Kurven stimmen nicht überein, was bedeutet, dass keine Normalverteilung der Daten vorliegt. (b) zeigt ein QQ-Diagramm. Die Funktion weicht von der Geraden ab, was bedeutet, dass die Daten nicht normalverteilt sind.

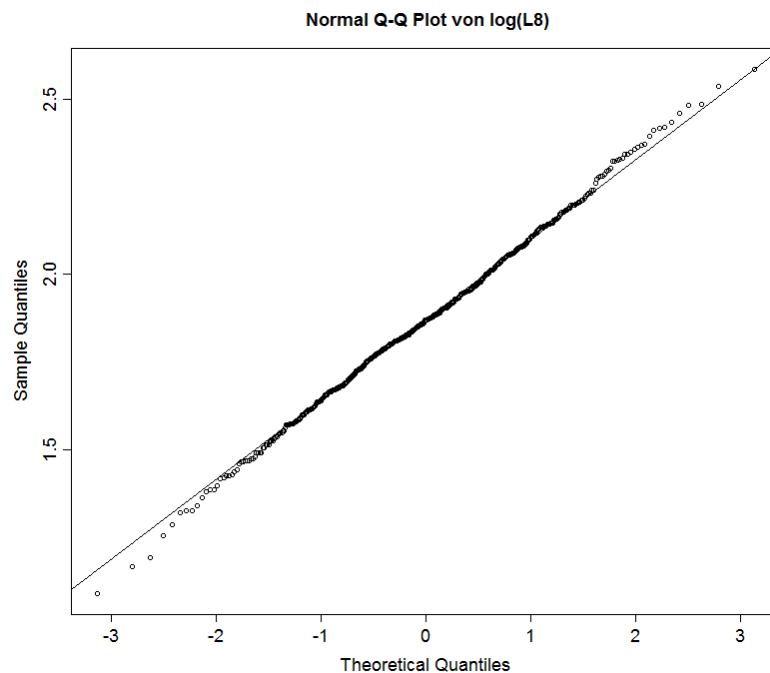


Bild 23: QQ-Plot von $L8$ nach einer Log-Transformation. Die Kurve liegt nahezu auf der Diagonalen, was die Normalverteilung von der logarithmierten Variable $L8$ bedeutet.

Um der Bedingung vieler Tests auf Normalverteilung der Daten zu genügen, müssen die Messdaten in der biologischen und medizinischen Statistik häufig mit Hilfe des natürlichen Logarithmus transformiert werden (kurz: Log-Transformation).

Bild 23 zeigt ein QQ-Diagramm der Werte von $L8$ nach der Log-Transformation. Die Kurve nähert sich der Diagonalen an, was eine angenäherte Normalverteilung der Daten bedeutet.

Des Weiteren kann man die Daten mit Hilfe eines Signifikanztests auf Normalverteilung prüfen. Hierzu stehen beispielsweise folgende Tests zur Verfügung: Kolmogorov–Smirnov Test, Anderson–Darling Test und Shapiro–Wilk Test. Mit Hilfe dieser Tests werden zwei kontinuierliche Verteilungen mit der Nullhypothese, dass sie übereinstimmen, verglichen. Das heißt, die Daten werden gegen normalverteilte Daten getestet. Die Normalverteilung der Daten wurde im Rahmen dieser Arbeit wegen seiner Teststärke mit Hilfe des Shapiro-Wilk Tests überprüft [78]. Hierfür wird das Signifikanzniveau auf $\alpha = 0,05$ oder $0,01$ gesetzt, was einer Art "maximalen Irrtumswahrscheinlichkeit, die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie richtig ist" entspricht (Zitat aus [79]). Ist $p < 0,05$, so besteht eine statistische Signifikanz zum Signifikanzniveau.

Der Shapiro–Wilk Test ergab beispielsweise für die Daten von $L8$ folgenden p-Wert: $p = 8,638 \cdot 10^{-10}$, welcher deutlich unter $p < 0,05$ liegt. Dies bedeutet, dass die Nullhypothese verworfen wird, und die Daten folglich nicht normalverteilt sind. Nach der

Logarithmierung der Daten, ergibt der Test folgenden p-Wert: $p = 0,8761 \gg 0,05$, d. h. die Nullhypothese wurde bestätigt. Die Log-Transformation von L8 bewirkte folglich eine Normalverteilung der Daten. Eine Übersicht aller Lipoproteinsubklassen und ihrer Ergebnisse des Shapiro-Wilk Tests ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12

Ergebnisse des Shapiro-Wilk Tests auf Normalitätsverteilung der Lipoproteinsubklassen L1 bis L15 aller Proben, die 120 min nach der Glucoseeinnahme entnommen wurden.^{a,b}

NMR-Lipoproteinsubklassen	p-Wert(L1-L15)	p-Wert(log(L1-L15))
L1	0,31	0,019
L2	b	0,002
L3	b	0,105
L4	0,000	0,028
L5	0,000	0,365
L6	0,000	0,600
L7	0,000	0,139
L8	0,000	0,872
L9	b	0,007
L10	0,000	0,011
L11	b	0,015
L12	b	0,000
L13	b	0,025
L14	b	0,0047
L15	b	0,233

^a Gilt $p < 0,05$, so wird die Nullhypothese verworfen, d. h. die Daten sind nicht normalverteilt.

^b $p < 2,2 \cdot 10^{-16}$.

2.1.7 Routine zur Berechnung der kleinen Metaboliten

Die lehrstuhleigene Routine zur Quantifizierung der kleinen Metaboliten mit Hilfe von MATLAB von [76] wurde an die Blutplasmaproben angepasst. Da bislang das Problem des breiten Untergrundsignals nicht gelöst werden konnte, wurde eine neue Routine mit Hilfe des Programms MATLAB (MathWorks) geschrieben.

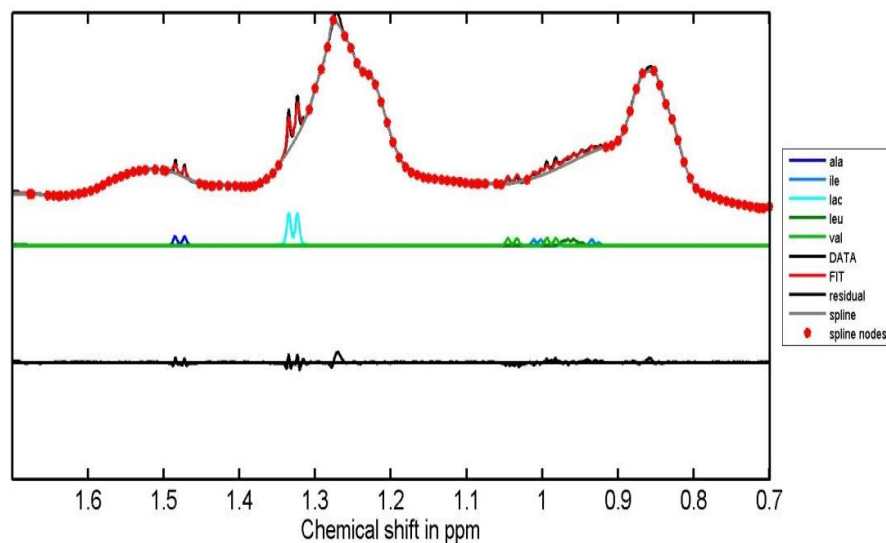


Bild 24: Quantifizierungsmethode der kleinen Metaboliten mit Hilfe des Programms MATLAB. Die Routine liest die Daten aus Tabelle 11 mit den Zuordnungen aus Abschnitt 2.1.5 ein und simuliert Gauß/Lorentz-Spektren, die anhand der Linearkombination der Modellspektren angenähert werden.

Hierbei dienen die Daten der Zuordnung aus Abschnitt 2.1.5 als Modellspektren, anhand derer Gauß/Lorentz-Spektren simuliert werden. Die Peaks werden mittels Least-Squares-Verfahren (Methode der kleinsten Quadrate) und Simulated Annealing anhand der Linearkombination der Modellspektren angefitet. Dabei ist Simulated Annealing ein Optimierungsverfahren, das einem Abkühlungsprozess nachempfunden ist. Mit dieser Methode können die Minima innerhalb der Kurve gesucht werden. Mit Hilfe des Least-Squares-Verfahren können Kurven angefitet werden, so dass die Kurve bestmöglich mit den Datenpunkten übereinstimmt [80].

Die Routine beinhaltet außerdem eine engmaschige Baselinekorrektur mit Hilfe einer sog. Spline-Interpolation (engl.: "Piecewise Cubic Hermite Interpolating Polynomial (PCHIP)") mit einem Abstand von 5 Hz zwischen den Knotenpunkten (vgl. Bild 24). Die entsprechend skalierten Modellspektren werden integriert und somit quantifiziert. Anschließend können diese Daten statistisch analysiert werden.

2.2 Hochdruck-NMR-Spektroskopie an Serum und Lipoproteinen

Die Fraktionierung des Serums in dessen Lipoproteinklassen erfolgte nach der Probenherstellungsanleitung aus [17]. Die Lipoproteine wurden mittels sequentieller Ultrazentrifugation nach ihrer Dichte in ihre Lipoproteinklassen aufgetrennt und anschließend mit einem extrazellulären Puffer und dem internen Standard DSS versehen. Die Hochdruck-NMR-Messungen erfolgten an einem 800 MHz-Spektrometer, das mit einem Hochdruck-Autoklav und einer Keramikzelle ausgestattet ist. Die Probenherstellung, der NMR-Messaufbau, die NMR-Messmethode sowie die Prozessierung werden in folgenden Abschnitten dargestellt.

2.2.1 Probenherstellung - Auftrennung des Serums in die Lipoproteinklassen

Das Verfahren zur Probenherstellung der Lipoproteinklassen aus dem Serum basiert auf [17,81,82]. Das für die Probenpräparation verwendete Humanserum wurde von einem gesunden, nüchternen Spender in einer Arztpraxis entnommen und anschließend bei -20 °C bis zur weiteren Probenvorbereitung verwahrt.

Durch das Verfahren der Ultrazentrifugation ist es möglich, eine Serumprobe in ihre Lipoproteinklassen aufzutrennen. Dies geschieht durch Einstellen der Serumprobe auf eine definierte Dichte durch Zugabe einer bestimmten Menge an Kaliumbromid (KBr). Dieser Zusammenhang ist laut [81,82] gegeben durch

$$m_{KBr} = \frac{V' \cdot (\rho' - \rho)}{1 - 0,321 \cdot \rho'} \quad (2.1)$$

mit der Masse von KBr m_{KBr} , dem Volumen V' und der Dichte ρ und ρ' .

Die Dichte wird auf die maximale Dichte der jeweiligen Lipoproteinklasse eingestellt. Tabelle 13 zeigt eine Auflistung der Lipoproteinklassen mit den zugehörigen Dichten und die Dichte, auf die eingestellt wird.

Tabelle 13

Dichteeinstellung der Lipoproteinklassen bei der sequentiellen Ultrazentrifugation.

Lipoproteinklasse	Dichte [g/ml]	Eingestellte Dichte [g/ml]
VLDL	0,940-1,006	1,006
IDL	1,006-1,019	1,019
LDL	1,019-1,063	1,063
HDL2	1,063-1,125	1,125
HDL3	1,125-1,210	1,210

Quelle: [17].

Zur Fraktionierung des Serums durch sequentielle Ultrazentrifugation wie in [17] wurden je drei 500 μl Serumproben aufgetaut. Es wurden zwei Polycarbonatbehälter mit je 5 – 10 ml des Probenmaterials mit mittels KBr eingestellter Dichte befüllt und anschließend für 24 Stunden bei einer Temperatur von $T = 4\text{ }^\circ\text{C}$ und 60000 Umdrehungen pro Minute in einem Festwinkelrotor Typ 75Ti ultrazentrifugiert. Aufgrund der Zentrifugalkraft und der Massenträgheit bewegen sich die Partikel mit höherer Dichte wegen der größeren Trägheit nach außen und die Partikel mit geringerer Dichte bleiben im oberen Bereich des Behälters zurück. Somit kann das obere Drittel mit der geringeren Dichte abgetragen werden. Die restliche Probe mit der höheren Dichte wird auf die Dichte der nächsten Lipoproteinklasse eingestellt und unter denselben Bedingungen hergestellt. Die Proben werden anschließend in Vivaspin-Gefäße (MW 10000) pipettiert und zentrifugiert bis sie die nötige Konzentration erreicht haben. Anschließend werden die aufkonzentrierten Proben der einzelnen Lipoproteinklassen mit extrazellulärem Puffer nach [83] in Eppendorf-Behälter pipettiert. Die Proben wurden im Anschluss bei $T = -20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Messung gelagert.

Kurz vor Beginn der Messung wurde die jeweilige Probe aufgetaut und der interne Standard DSS mit jeweiliger Konzentration hinzugefügt.

2.2.2 Hochdruck-NMR-Messaufbau

Der folgende Abschnitt basiert auf [59], der die am Lehrstuhl verwendete Hochdruckanlage beschreibt. Die Hochdruck-NMR-Messungen wurden an einer am Lehrstuhl angefertigten Hochdruckanlage ähnlich der Methode von Yamada [84] durchgeführt. Der Druck wird mit Hilfe eines Kolbenkompressors aufgebaut und über eine mit Wasser gefüllten Hochdruckleitung auf eine Keramikzelle der Firma Daedalus und somit auf die Probe übertragen. Eine Skizze eines Hochdruck-Autoklavens mit einer solchen Keramikzelle ist in Bild 25 zu sehen.

Keramik wird, wie bereits in Abschnitt 1.4.2 erwähnt, wegen seiner hervorragenden physikalischen Eigenschaften für die Hochdruck-NMR-Messungen verwendet.

Eine Übersicht der wichtigsten physikalischen Parameter der am Lehrstuhl geprüften Keramikzellen ist in Tabelle 14 zu sehen.

Tabelle 14

Physikalische Eigenschaften der Keramikzellen für Hochdruck-NMR-Messungen.

	Keramik		
Hersteller	HiPer		Daedalus
Bruchwiderstand σ [N/mm²]	1000		
Expansionskoeffizient [10⁻⁶K⁻¹]	11,4		
Magnetische Suszeptibilität χ_{magn} [10⁻⁹m³kg⁻¹]	-1,4 (ZrO ₂)		
Durchmesser d_{innen} [mm]	1,1	2	3
Durchmesser $d_{\text{außen}}$ [mm]	4	4	5
$d_{\text{außen}}/d_{\text{innen}}$	3,64	2	1,67
Maximaler theoretischer Druck $p_{\text{max,theor}}$ [MPa]	1290	693	513
Maximaler durchschnittlicher theoretischer Druck $p^*_{\text{max,theor}}$ [MPa]	745	400	296
Maximaler durchschnittlicher realer Druck $p^*_{\text{max,real}}$ [MPa]	200	200	250

Quelle: [60].

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Hochdruck-NMR-Messungen an den Lipoproteinklassen wurden ausschließlich der aus Titan gefertigte Hochdruck-Autoklav mit der Keramikzelle der Firma Daedalus mit dem Sicherheitsventil, der PET (polyethylene terephthalate)-Membran und einem zylindrischen PEEK (polyetherether-ketone)-Verdränger wie in Bild 25 zu sehen mit den Eigenschaften aus Tabelle 14 verwendet. Der PEEK-Verdränger dient dazu das Probenvolumen zu verringern. Es kann mit Hilfe dieses Hochdruckaufbaus ein Druck von bis 250 MPa an die Probe angelegt werden.

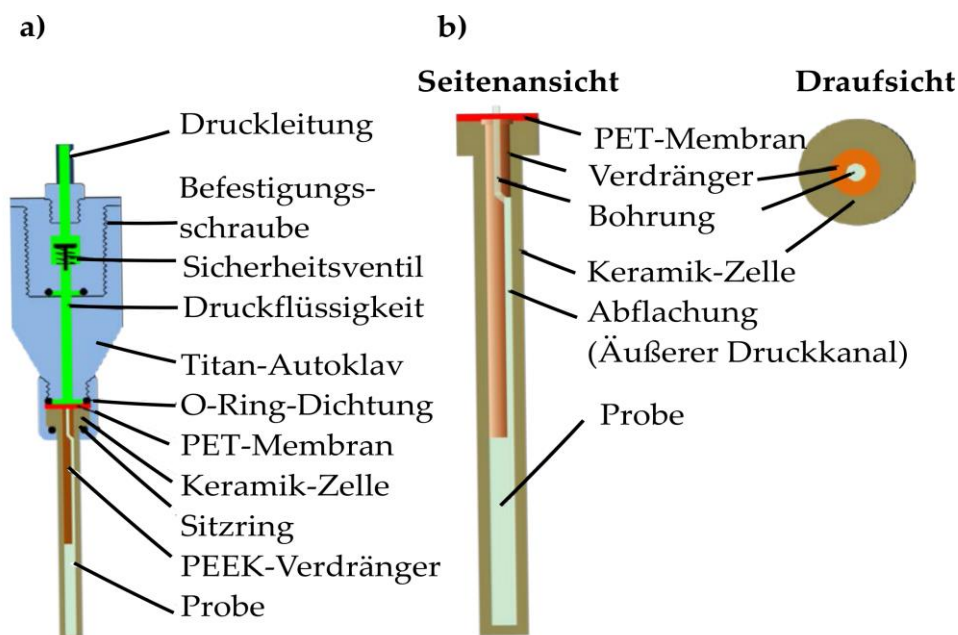


Bild 25: Hochdruck-Autoklav mit der Keramikzelle: (a) Keramikzelle der Firma Daedalus mit zusätzlichem Sicherheitsventil. (b) zeigt die Keramikzelle mit der PET-Membran und dem Verdränger (nach [59]).

2.2.3 NMR-Messmethoden und Primärprozessierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vom Serum und allen Lipoproteinklassen 1D- ^1H -NMR-Spektren der Pulssequenz noesygppr1d, wie in Abschnitt 2.1.2 beschrieben, bei zwei Temperaturen $T = 283\text{ K}$ und $T = 313\text{ K}$ aufgenommen. Der Druck wurde bei $T = 283\text{ K}$ innerhalb einer Druckreihe im Intervall von 20 MPa von Normaldruck bis zu einem Maximaldruck von $p = 200\text{ MPa}$ erhöht, anschließend wieder auf Normaldruck gesenkt und ein Spektrum unter Anfangsbedingungen aufgenommen. Dies dient der Überprüfung der Reversibilität der Druckeffekte. Anschließend wird die Temperatur auf $T = 313\text{ K}$ erhöht, um eine weitere Druckreihe zu beginnen. Nach Erreichen des Maximaldrucks wird der Druck auf Normaldruck verringert und ein weiteres NMR-Spektrum mit der Pulssequenz Noesygppr1d aufgenommen. Anschließend erniedrigt man die Temperatur auf $T = 283\text{ K}$ und nimmt ein weiteres Spektrum zur Kontrolle der Druck- und Temperatur-Reversibilität auf. Eine Übersicht der Akquisitionseigenschaften ist in Tabelle 15 zu finden.

Die Grundlinie und Phase der NMR-Spektren werden manuell korrigiert, sodass die Spektren quantifizierbar sind. Anschließend erfolgt eine Referenzierung des Acetat-Signals auf $\delta = 1,875 \text{ ppm}$.

Tabelle 15

Aufnahmeparameter der Hochdruck-NMR-Messungen am Serum und den Lipoproteinklassen.

	Noesygprr1d	Noesygprr1d
NMR-Spektrometer	800 MHz	800 MHz
Temperatur [K]	283	313
Druck	Messung bei konstantem Druck	Messung bei konstantem Druck
Druck p_0	Normaldruck	Normaldruck
Maximaldruck p_{\max} [MPa]	200	200
Druckintervalle [MPa]	20	20
Wartezeit	5 s	5 s
Mixing-Zeit	0,01 s	0,01 s
FID-Größe	32768	32768
Anregungspuls	90°	90°

Die Signalfläche eines größeren Spektrenbereichs der Lipoprotein- und Serum-Proben werden für die jeweiligen Proben mit Hilfe einer Integration mit den Grenzen aus Tabelle 16 berechnet.

Tabelle 16

Integrationsgrenzen für die Berechnung des Integrals eines großen Spektrenbereichs der Proben.

Probe	Integration von [ppm]	bis [ppm]
Serum	-2,00	3,45
VLDL. IDL, LDL und HDL2	-2,00	3,50
HDL3	-2,00	3,44

Darüber hinaus werden die Signalintegrale mit Hilfe einer Fit-Routine des Programms TOPSPIN (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Deutschland) berechnet. Um das CH_3 -Signal quantifizieren zu können, wird, wie in [85] beschrieben, von dem Spektrum der Lipoproteinsubklassen ein Cholesterol-Spektrum mit geeigneter Linienbreite abgezogen, so

dass das Cholesterol-Signal bei 0,693 ppm des Lipoprotein-Spektrums mit dem des Cholesterol-Spektrums übereinstimmt. Anschließend wird ein Werkzeug namens „dcon“ in Topspin verwendet. Dabei wird eine Entfaltung eines Signals durchgeführt. Dies ist hilfreich, wenn die Peaks nicht schmal und definiert sind. Dazu wird das jeweilige Signal mit Hilfe von Lorentz-, Gauß-Linienformen oder eine Mischung aus beiden angenähert. Überlappende Signale werden als Summe dieser Linienformen berechnet. Dazu wird eine Liste mit den chemischen Verschiebungen der Signale, den Linienbreiten und den Integralen in einer Datei namens dconpeaks.txt abgespeichert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierbei Lorentzlinien und die Parameter aus Tabelle 17 verwendet.

Tabelle 17

Prozessierungsparameter aus „dcon“ TOPSPIN.

	Parameter
Detektionssensitivität PC	1
Signalüberlappungsfaktor AZFW [ppm]	0,1
Linienform	Lorentz

Anschließend werden die gepickten Signale für das Tool „mdcon“ verwendet. Dabei wird der Peak mit einer Mischung aus Gauß- und Lorentz-Funktionen gefittet. Das gewonnene Fit-Signal kann mit Hilfe des Integral-Werkzeugs in Topspin aufsummiert werden [86]. In Abschnitten 3.2.2 bis 3.2.4 wird zur Analyse der Daten eine Näherung der chemischen Verschiebungen und Signalintegrale mit Hilfe der Gleichung

$$y = a + b_1 \cdot (p - p_0) + b_2 \cdot (p - p_0)^2 \quad (2.2)$$

durchgeführt.

Die thermodynamische Auswertung der Daten erfolgt in dem Abschnitt 3.2.5. Hierbei wird für die Analyse der chemische Verschiebung δ nach [13] die Gleichung

$$\delta = \frac{\delta_1 + \delta_2 e^{-\frac{\Delta G}{RT}}}{1 + e^{-\frac{\Delta G}{RT}}} \quad (2.3)$$

herangezogen, wenn ein Gleichgewicht zwischen zwei Zuständen der Substanz besteht, welches sich in einem schnellen Austausch auf einer Zeitskala des NMR-Experiments befindet [13].

Bei der thermodynamischen Auswertung der Hochdruck-Daten wird das nach [85] berechnete ΔG_0^* mit dem aus den thermodynamischen Fits erhaltenen Werten des ΔG_0 verglichen. Dazu wird ΔG_0^* nach [85] wie folgt berechnet:

$$\Delta G = \Delta H(T_m) \cdot (1 - T/T_m) + \Delta C_p [(T - T_m) - T \cdot \ln(T/T_m)] \quad (2.4)$$

mit T_m und $\Delta H(T_m)$ aus [85] und der Messtemperatur T . ΔC_p wurde nach [85] vernachlässigt.

Die Analyse der Temperatur der Lipoproteine [85] hat gezeigt, dass die Signalintegrale V durch ein Drei-Kompartimentmodell wiedergegeben werden können. Kompartiment A enthält Lipidsignale, die zu breit sind, um detektiert zu werden, die Konzentration c_A dieser Lipide bzw. funktionelle Gruppen dieser Lipide ist temperaturunabhängig.

Ein zweites Kompartiment B enthält Lipide, die unabhängig von der Temperatur immer sichtbar sind. Ein drittes Kompartiment C enthält Lipide, die in einem Phasenübergang involviert sind, nach dem Phasenübergang sind die Lipide zu breit, um detektiert zu werden (langsamer Austausch).

Das beobachtete Signalintegral $V(p)$ ist dann

$$V(p) = a(c_B + c_C^v) \quad (2.5)$$

mit der Konstanten a , die apparative Parameter enthält, c_A und c_B die Protonenkonzentrationen der beobachteten Gruppen von A und B und c_C^v und c_C^i der Konzentrationen der NMR-sichtbaren und unsichtbaren Protonen von C mit

$$c_C = c_C^v + c_C^i \quad (2.6)$$

Da die Lipoprotein-Konzentration wegen der Kompression der ganzen Probe, mit dem Druck zunimmt, muss diese Konzentrationsänderung berücksichtigt werden. In erster Näherung kann man diesen Effekt durch die Kompressibilität des Wassers nähern, was den Hauptteil der Probe ausmacht und in die Konstante a einbezogen wird.

$$a = a(p_0) \cdot f(p) \quad (2.7)$$

mit

$$\frac{c^i}{c^v} = K = e^{-\Delta G/RT} \quad (2.8)$$

Nach Auflösen der Gleichung (2.6) erhält man

$$c_C^i = c_C - c_C^v \quad (2.9)$$

Setzt man c_C^i aus Gleichung (2.9) in (2.8), so ergibt sich:

$$\frac{c_c - c_c^v}{c_c^v} = K \quad (2.10)$$

und nach Auflösung dieser Gleichung nach c_c^v :

$$c_c^v = c_c \cdot \frac{1}{1 + K} \quad (2.11)$$

Anschließend wird c_c^v aus Gleichung (2.11) in Gleichung (2.5) eingesetzt

$$V(p) = a(p_0) \cdot f(p) \cdot \left(c_B + \frac{1}{1 + K} \cdot c_c \right) \quad (2.12)$$

Dividiert man $V(p)$ durch $V(p_0)$, so erhält man

$$\frac{V(p)}{V(p_0)} = \frac{f(p)}{f(p_0)} \cdot \left(\frac{c_B + \frac{1}{1 + K(p)} \cdot c_c}{c_B + \frac{1}{1 + K(p_0)} \cdot c_c} \right) \quad (2.13)$$

Mit der Annahme, dass die isotherme Kompressibilität des Lösungsmittels als druckunabhängig betrachtet werden kann, ergibt sich

$$\beta_T = -\frac{1}{V} \cdot \frac{dV}{dp} \quad (2.14)$$

$$f(p) = e^{\beta_T(p-p_0)}$$

$$\frac{V(p)'}{V(p_0)'} = A \cdot \left(\frac{1 + \frac{1}{1 + K(p)} \cdot \frac{c_c}{c_B}}{1 + \frac{1}{1 + K(p_0)} \cdot \frac{c_c}{c_B}} \right) \quad (2.15)$$

$$\frac{V(p)'}{V(p_0)'} = \frac{1 + \left[\frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta G(p_0) + \Delta V^0(p-p_0) - \frac{1}{2}\Delta\beta'(p-p_0)^2}{RT}\right)} \cdot c \right]}{1 + \left[\frac{1}{1 + \exp\left(-\frac{\Delta G(p_0)}{RT}\right)} \cdot c \right]} \quad (2.16)$$

mit der Gleichung (1.3) für ΔG , $c = c^c/c_B$, K aus Gleichung (2.8), dem druckkorrigierten Volumen und $A = 1,00$.

Der Wert von β_T wurde aus einem Fit der Kompressibilitäts-Daten nach [87] erhalten:
Die zugrunde liegende Formel für das spezifische Volumen V ist darin:

$$V = V_0 - (V_0 \cdot p) / ((K_0 + A \cdot p + B \cdot p^2)) \quad (2.17)$$

Mit dem spezifischen Volumen V_0 unter Standardbedingungen und dem Kompressionsmodul bei Atmosphärendruck K_0 . A und B sind temperaturabhängige Koeffizienten. V_0 ist nach [87,88] der Kehrwert der Dichte d_0 . K_0 kann nun mit Hilfe der folgenden Gleichung aus [87] berechnet werden:

$$K_0 = 19652,17 + 148,183t - 2,29995t^2 + 0,012810t^3 - 4,91564 \cdot 10^{-5} t^4 + 1,03553 \cdot 10^{-7} t^5 \quad (2.18)$$

Nun kann man Formel (2.17) lösen und erhält das spezifische Volumen mit der Temperatur t und Druck p .

3. Ergebnisse

In folgendem Kapitel werden die Ergebnisse der NMR-Messungen dieser Arbeit dargestellt. Hierbei wird zu Beginn die Auswertung der Diabetesstudie gezeigt und anschließend die Hochdruck-NMR-Messungen an Serum und Lipoproteinen untersucht.

3.1 Ergebnisse der Diabetesstudie

Dieser Abschnitt beginnt mit einer Kollektivbeschreibung der Diabetesstudie. Dafür wird das Kollektiv in Hinblick auf für Typ-2-Diabetes relevante patientenspezifische Daten, wie beispielsweise Alter, BMI, Geschlecht, analysiert. Anschließend werden die NMR-Spektren qualitativ analysiert. Hierbei wird besonderen Wert auf die Unterschiede der Personen je nach Krankheitsgrad des Diabetes gelegt. Dabei wird ein Subset des Datensatzes gebildet. Danach werden mit Hilfe einer Pilotstudie die ausgewerteten Lipoproteinprofile der Nüchternplasma-Proben und der Proben, die zwei Stunden nach Glucoseeinnahme entnommen wurden, verglichen, um Biomarker für Prädiabetes und Typ-2-Diabetes zu identifizieren. Die Auswertung der Entwicklung von Diabetes und Prädiabetes anhand der retrospektiven Rückstellproben konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits qualitativ analysiert werden. Diese Proben sind bis zu 10 Jahre alte Blutspendeproben der Studienteilnehmer. Die Ergebnisse dieser Arbeit können als Pilot-Studie angesehen werden. Wie bereits in dem Abschnitt 2.1 dargestellt, wurde den Humanplasma-Proben kein interner Standard hinzugefügt, um diese nicht zu verunreinigen, damit sie mit Hilfe alternativer Messmethoden anschließend untersucht werden können.

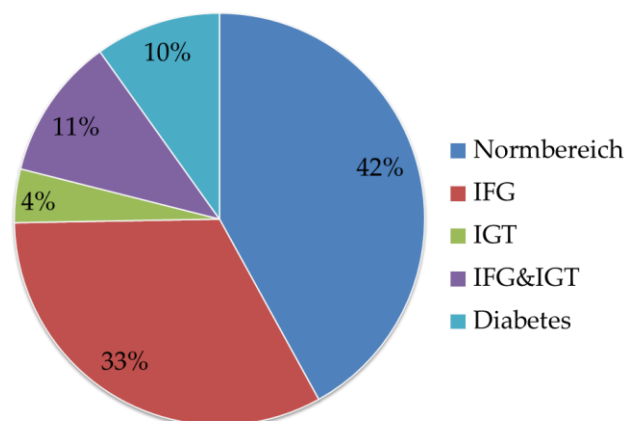


Bild 26: Verteilung der Studienteilnehmer auf die fünf oGTT-Gruppen. Die Hälfte der Studienteilnehmer befindet sich in einem prädiabetischen Stadium und die andere Hälfte gliedert sich in 10 % Diabetiker und 42 % gesunde Personen. Insgesamt nahmen an der Diabetesstudie 618 Personen teil. IFG steht für abnorme Nüchternblutglucose und IGT für gestörte Glucosetoleranz.

3.1.1 Kollektivbeschreibung

Die bereits in Abschnitt 1.6 dargestellte Studie zur Identifikation von Biomarkern für die Diabetesfrüherkennung wird in folgendem Abschnitt hinsichtlich ihrer für die Statistik relevanten Eigenschaften beschrieben.

Es fand eine Charakterisierung des gesamten Studienkollektivs statt. In Bild 26 ist eine Verteilung des Studienkollektivs auf die oGTT-Ergebnisse zu sehen. Die gesunden Teilnehmer machen mit 42 % den größten Anteil des Kollektivs aus. 10 % der Studienteilnehmer erhielten beim oralen Glucosetoleranztest das Ergebnis, dass sie Typ-2-Diabetiker sind. Die übrigen 48 % wurden in die prädiabetischen Gruppen eingeteilt, d. h. wie in Abschnitt 1.6 erwähnt, dass entweder IFG, IGT oder beides diagnostiziert wurde. In Bild 27 (a) ist eine Altersverteilung des Studienkollektivs zu sehen. Eine Blutspende ist ab einem Alter von 18 bis 68 Jahren möglich. 473 Studienteilnehmer gehören zu der Altersgruppe der 45 bis 64-jährigen und befinden sich daher innerhalb des für Typ-2-Diabetes risikoe erhöhten Bereichs [19].

In Bild 27 (b) ist die Verteilung des BMI innerhalb des Kollektivs dargestellt. Wie in Abschnitt 1.6 erwähnt, leidet man laut Weltgesundheitsorganisation WHO ab einem BMI von 25 an Übergewicht [19]. Aus dem Balkendiagramm ist zu erkennen, dass der größte Teil der Studienteilnehmer übergewichtig ist. Laut der Weltgesundheitsorganisation gilt eine Person ab einem BMI von 30 als adipös. Dieser Gruppe gehört etwa die

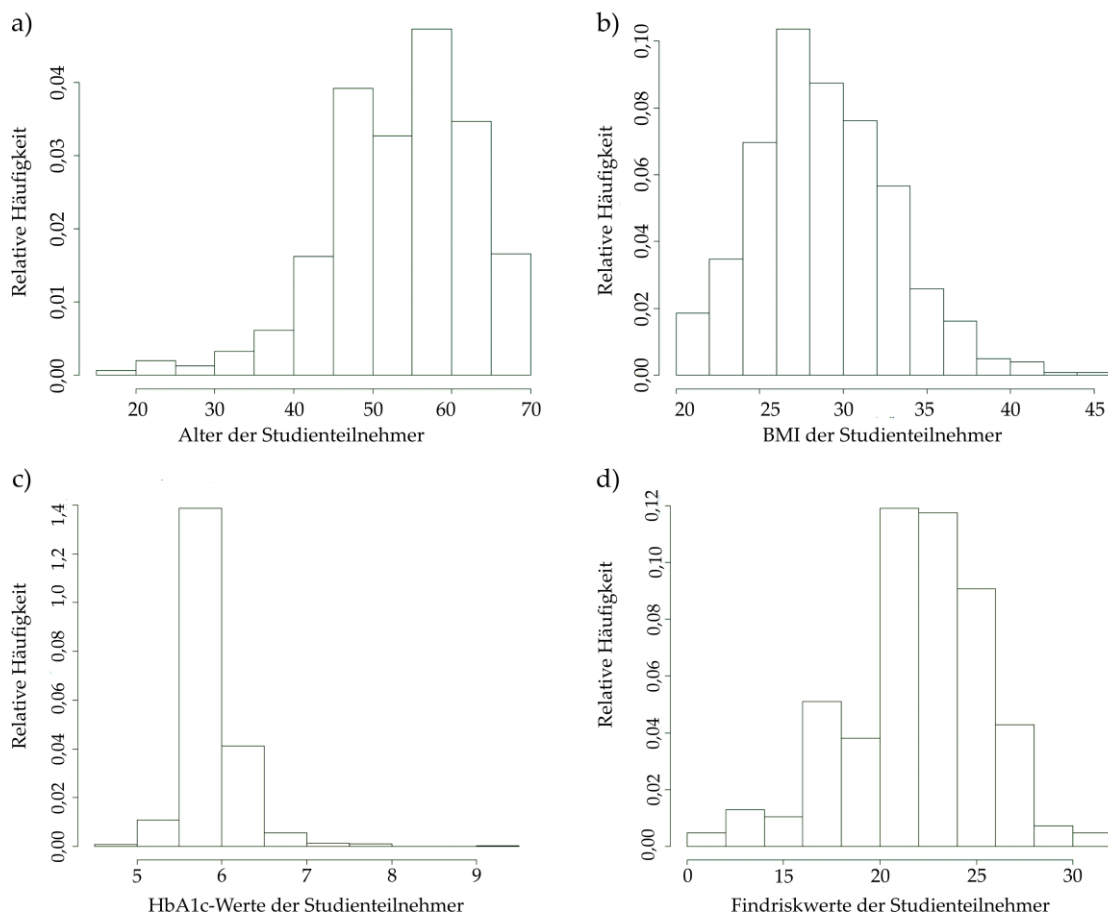


Bild 27: (a) Altersverteilung des Studienkollektivs: Das Blutspenden ist von 18 bis 68 Jahren erlaubt. (b) BMI-Verteilung der Studienteilnehmer. (c) Verteilung der HbA1c-Werte der Studienteilnehmer. Der HbA1c-Wert gibt den mittleren Blutzuckerspiegel der letzten zwei bis drei Monate an. Die Verteilung der FINDRISK-Werte der Studienteilnehmer ist in (d) zu sehen.

Hälfte der Studienteilnehmer an. Bild 27 (c) zeigt die Häufigkeit der jeweiligen HbA1c-Werte der Studienteilnehmer. Der HbA1c-Wert gibt den mittleren Blutzuckerspiegel der letzten zwei bis drei Monate an. Liegt der HbA1c-Wert bei mehr als 6,5 %, so leidet man laut [89] an Diabetes. Eine relativ große Zahl an Studienteilnehmern hat einen HbA1c-Wert von weniger als 6,5 %. Ab einem HbA1c-Wert von 5,6 % ist das Risiko, an Diabetes zu erkranken, deutlich erhöht. Die Anzahl der Risikopersonen innerhalb des Studienkollektivs ist, wie in Bild 27 (c) zu erkennen, relativ hoch.

In Bild 27 (d) ist ein Diagramm der Verteilung des Findrisk-Werts innerhalb des Kollektivs abgebildet. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei mehr als der Hälfte der Studienteilnehmer ein erhöhtes Diabetesrisiko besteht. Bei etwa 30 % der Teilnehmer wird

in etwa jeder dritte in den nächsten 10 Jahren laut Findrisk-Fragebogen an Diabetes erkranken.

Tabelle 18 zeigt eine Zusammenfassung aller wichtigen patientenspezifischen Daten der Studienteilnehmer, wie das durchschnittliche Alter und den BMI, aber auch den Nüchternplasmaglucose (kurz: NPG) - und Plasmaglucose (PG)-Wert nach dem oralen Glucosetoleranztest.

Tabelle 18

Übersicht der wichtigsten patientenspezifischen Daten der Studienteilnehmer.^{a, b, c}

oGTT- Ergebnis	Alle (n=618)	1^c (n=259)	2^c (n=202)	3^c (n=26)	4^c (n=69)	5^c (n=61)
Männer	390	142	135	18	46	49
Frauen	228	117	67	8	23	12
Alter [Jahre]	54,1 ± 9,0	52,5 ± 10,3	54,6 ± 7,9	57,2 ± 7,6	55,9 ± 8,0	56,0 ± 6,9
BMI [kg/m²]	28,8 ± 4,1	27,9 ± 4,0	29,1 ± 3,7	29,4 ± 3,4	30,4 ± 4,3	30,2 ± 4,2
NPG^a [mmol/l]	103,4 ± 13,5	93,5 ± 4,2	106,7 ± 5,6	95,2 ± 3,9	110,1 ± 6,8	130,6 ± 18,2
PG^b [mmol/l]	120,5 ± 44,8	100,6 ± 19,5	105,6 ± 21,4	155,3 ± 14,3	163,7 ± 16,9	207,4 ± 62,8

^a Nüchternplasmaglucose.

^b Plasmaglucose-Wert zwei Stunden nach der Glucoseeinnahme.

^c 1: Gesunde Person, 2: abnorme Nüchternglucose, 3: gestörte Glucosetoleranz, 4: gestörte Nüchternglucose und gestörte Glucosetoleranz und 5: Diabetes.

Der Auswertung liegt das in Tabelle 19 zusammengefasste Kollektiv vor. Der Grund für die Abnahme der Probenanzahl ist, dass manche Proben aufgrund des zu geringen Probenvolumens nicht messbar sind oder die Spektrenqualität wegen der Probeneigenschaften den Qualitätsanforderungen nicht genügen.

Tabelle 19

Patientenspezifische Daten der Studienteilnehmer, von denen die Spektren auswertbar sind.^{a, b, c}

oGTT- Ergebnis	Alle (n=580)	1^c (n=239)	2^c (n=194)	3^c (n=24)	4^c (n=68)	5^c (n=55)
Männer	364	131	128	16	45	44
Frauen	216	108	66	8	23	11
Alter [Jahren]	54,1 ± 9,0	52,5 ± 10,4	54,5 ± 7,8	57,2 ± 7,6	55,7 ± 7,9	56,1 ± 6,9
BMI [kg/m²]	28,9 ± 4,1	27,9 ± 4,1	29,1 ± 3,8	29,3 ± 3,6	30,6 ± 4,5	30,4 ± 4,1
NPG^a [mmol/l]	103,3 ± 13,2	93,5 ± 4,2	106,6 ± 5,6	95,2 ± 4,0	110,2 ± 6,9	129,8 ± 18,1
PG^b	120,7 ± 44,4	100,9 ± 19,7	105,3 ± 21,7	154,0 ± 13,6	164,0 ± 16,9	192,9 ± 80,5

^a Nüchternplasmaglucoese.

^b Plasmaglucoese-Wert zwei Stunden nach der Glucoseeinnahme.

^c 1: Gesunde Person, 2: abnorme Nüchternglucose, 3: gestörte Glucosetoleranz, 4: gestörte Nüchternglucose und gestörte Glucosetoleranz und 5: Diabetes.

Wie bereits in Abschnitt 1.6 erwähnt, sind zusätzliche Proben, welche ebenfalls zwei Stunden nach der Glucoseeinnahme entnommen wurden, wie bei den übrigen Studienteilnehmern patientenspezifische Daten vorhanden, jedoch liegen nur diese Proben und keine Rückstellproben vor. Diese Gruppe besteht aus 101 männlichen und 71

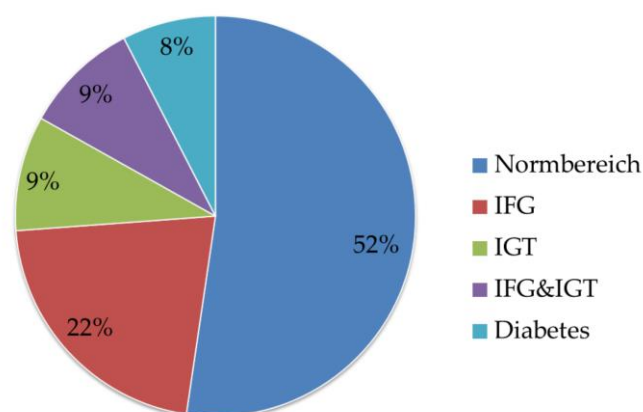


Bild 28: Verteilung der zusätzlichen oGTT-Proben auf die oGTT-Gruppen. Etwa die Hälfte der Personen dieser Gruppe liegt im Normbereich. 40 % leiden an Prädiabetes und 8 % an Diabetes. IFG steht für abnorme Nüchternglucose und IGT für gestörte Glucosetoleranz.

weiblichen Personen. Die Verteilung der oGTT-Ergebnisse innerhalb dieser Gruppe ist in Bild 28 zu sehen. Etwa die Hälfte der Personen dieser Gruppe besitzt ein Ergebnis des oralen Glucosetoleranztests, das im Normbereich liegt. 40 % der Personen leiden an Prädiabetes (Gestörte Nüchternglucose, Gestörte Glucosetoleranz oder an beidem) und 8 % an Diabetes. Eine Zusammenfassung der patientenspezifischen Daten dieser zusätzlichen Proben ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20

Übersicht der wichtigsten patientenspezifischen Daten der oGTT-Proben, von denen keine Rückstellproben vorhanden sind.^{a, b, c}

oGTT-Ergebnis	Alle (n=172)	1 ^c (n=90)	2 ^c (n=37)	3 ^c (n=16)	4 ^c (n=16)	5 ^c (n=13)
Männer	101	54	22	3	12	10
Frauen	71	36	15	13	4	3
Alter [Jahre]	52,7 ± 9,9	57,3 ± 7,2	55,7 ± 8,0	49,6 ± 9,0	51,7 ± 8,8	47,6 ± 8,1
BMI [kg/m²]	29,9 ± 6,6	29,4 ± 4,1	29,2 ± 4,2	33,7 ± 12,8	32,9 ± 4,8	31,0 ± 2,4
NPG^a [mmol/l]	98,4 ± 13,7	106,0 ± 4,8	106,4 ± 5,0	93,2 ± 4,0	112,5 ± 6,1	120,3 ± 26,0
PG^b [mmol/l]	122,0 ± 42,5	111,5 ± 19,2	110,0 ± 20,1	159,2 ± 12,3	164,0 ± 17,3	196,9 ± 78,9

^a Nüchternplasmaglucoese.

^b Plasmaglucoese-Wert zwei Stunden nach der Glucoseeinnahme.

^c 1: Gesunde Person, 2: abnorme Nüchternglucose, 3: gestörte Glucosetoleranz, 4: gestörte Nüchternglucose und gestörte Glucosetoleranz und 5: Diabetes.

Zehn Patientenproben der zusätzlichen Proben sind wegen des zu geringen Probenvolumens bzw. der Spektrenqualität nicht auswertbar, so dass zur Datenanalyse 162 Plasmaproben dieser Gruppe vorliegen (vgl. Tabelle 21). Eine Aufstellung der gesamten auswertbaren Proben des oralen Glucosetoleranztests, d. h. Proben sowohl der Studienteilnehmer als auch der Personen, von denen keine Rückstellproben vorhanden sind, ist in Tabelle 22 zu finden.

Tabelle 21

Patientenspezifische Daten des Kollektivs der zusätzlichen oGTT-Proben, von denen die Spektren auswertbar sind.^{a, b, c}

oGTT- Ergebnis	Alle (n=162)	1^c (n=84)	2^c (n=36)	3^c (n=16)	4^c (n=15)	5^c (n=11)
Männer	95	49	22	3	12	9
Frauen	67	35	14	13	3	2
Alter [Jahre]	53 ± 9,4	53 ± 10,3	57 ± 7,2	50 ± 9,0	52 ± 8,6	50 ± 5,1
BMI [kg/m²]	30 ± 6,6	29 ± 5,9	29 ± 4,1	34 ± 12,8	33 ± 5,0	31 ± 2,5
NPG^a [mmol/l]	98 ± 13,7	90 ± 6,3	106 ± 4,8	93 ± 4,0	113 ± 6,1	121 ± 27,6
PG^b [mmol/l]	122 ± 42,5	101 ± 20,2	112 ± 19,2	159 ± 12,3	165 ± 17,1	204 ± 81,7

^a Nüchternplasmaglucose.

^b Plasmaglucose-Wert zwei Stunden nach der Glucoseeinnahme.

^c 1: Gesunde Person, 2: abnorme Nüchternglucose, 3: gestörte Glucosetoleranz, 4: gestörte Nüchternglucose und gestörte Glucosetoleranz und 5: Diabetes.

Tabelle 22

Patientenspezifische Daten aller oGTT-Daten, von denen die Spektren auswertbar sind.^{a, b, c}

oGTT-Ergebnis	Alle (n=742)	1^c (n=323)	2^c (n=230)	3^c (n=40)	4^c (n=83)	5^c (n=66)
Männer	459	180	151	19	57	53
Frauen	283	143	80	21	26	13
Alter [Jahre]	54 ± 9,1	52 ± 10,4	55 ± 7,8	54 ± 9,0	55 ± 8,2	55 ± 7,0
BMI [kg/m²]	29 ± 4,8	28 ± 4,6	29 ± 3,4	31 ± 8,8	31 ± 4,5	30 ± 3,9
NPG^a [mmol/l]	102 ± 13,4	93 ± 5,0	107 ± 5,5	94 ± 4,1	111 ± 6,8	128 ± 20,3
PG^b [mmol/l]	121 ± 44,0	101 ± 19,9	106 ± 21,5	156 ± 13,3	164 ± 17,0	195 ± 80,8

^a Nüchternplasmaglucose.

^b Plasmaglucose-Wert zwei Stunden nach der Glucoseeinnahme.

^c 1: Gesunde Person, 2: abnorme Nüchternglucose, 3: gestörte Glucosetoleranz, 4: gestörte Nüchternglucose und gestörte Glucosetoleranz und 5: Diabetes.

3.1.2 Metabolomische Auswertung der gesamten NMR-Spektren

3.1.2.1 Hauptkomponentenanalyse der gesamten NMR-Spektren

Wie im Bereich der Metabolomik weit verbreitet [2], wurden zu Beginn der statistischen Auswertung der Diabetesstudie die NMR-Spektren mit Hilfe der in Abschnitt 1.5.2 beschriebenen Hauptkomponentenanalyse untersucht.

Dazu wurde das Programm AMIX (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Deutschland) und die in Abschnitt 2.1.4 beschriebenen Methoden mit den Parametern aus Tabelle 10 verwendet. Wie bereits erläutert, werden mit Hilfe des Programms AMIX Buckets gebildet, die mit Hilfe einer Routine integriert und normiert werden. Hierfür werden die Bereiche der EDTA-Signale und des unterdrückten Wassersignals entfernt. Für eine schnelle Analyse wurde ein Trainingsdatensatz gebildet. Dieses Subkollektiv besteht aus 75 Personen, wovon 52 männlich und 23 weiblich sind. Das Durchschnittsalter des

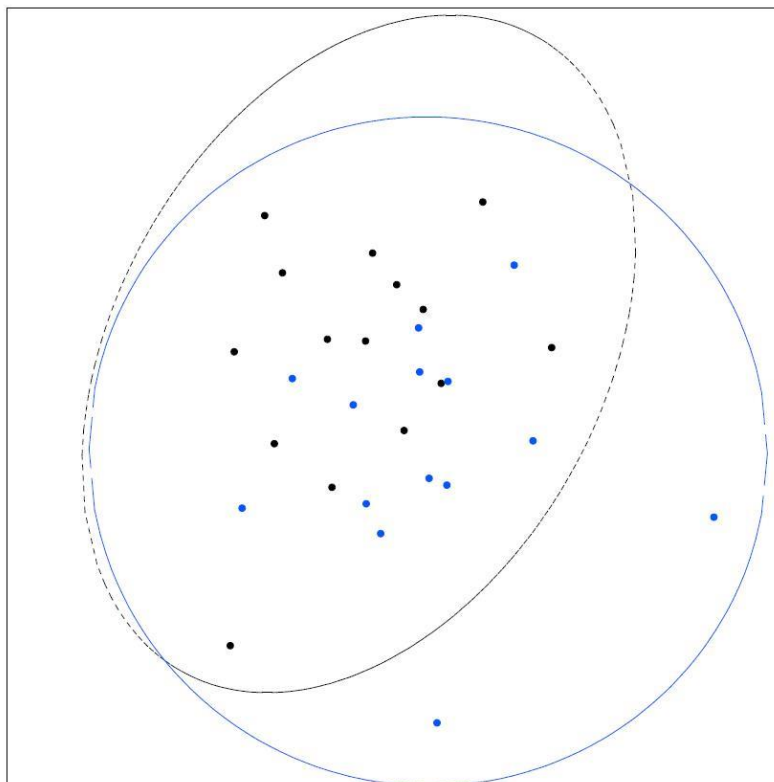


Bild 29: Ergebnis der PCA: PC1 gegen PC2 der Trainingsgruppe. Blaue Punkte: Diabetiker; Schwarze Punkte: Gesunde Studienteilnehmer. Die Bereiche der EDTA-Signale und des unterdrückten Wassersignals werden entfernt.

Kollektivs beträgt $55,09 \pm 7,7$ Jahre und durchschnittlich sind $16,6 \pm 5,2$ Rückstellproben pro Person vorhanden. Je oGTT-Gruppe liegen 15 Proben vor. Eine kurze Übersicht der wichtigsten Eigenschaften ist in Tabelle 23 zu sehen.

Tabelle 23

Subset zur Auswertung der Daten mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse.^a

Oraler Glucosetoleranztest-Ergebnis	Männer	Frauen	Alter	BMI
Normbereich	8	7	$52,8 \pm 8,1$	$27,39 \pm 3,84$
IFG ^a	11	4	$53,5 \pm 6,4$	$28,27 \pm 3,26$
IGT ^a	12	3	$56,8 \pm 7,2$	$29,55 \pm 2,53$
IFG + IGT	9	6	$56,8 \pm 9,4$	$28,81 \pm 3,82$
Diabetiker	12	3	$55,6 \pm 5,8$	$30,31 \pm 4,13$

^aIFG: *abnorme Nüchtern-glucose* und IGT: *gestörte Glucosetoleranz*.

In Bild 29 ist das Ergebnis der durchgeführten Hauptkomponentenanalyse gezeigt. Es wurden die beiden Gruppen gewählt, bei denen der Unterschied des Gesundheitszustands am größten ist, d. h. Diabetiker und gesunde Studienteilnehmer. Die blauen Punkte innerhalb der Abbildung repräsentieren die Diabetiker und die schwarzen Punkte die gesunden Personen.

Diese Methode brachte keine signifikanten Ergebnisse. Die Erläuterung der möglichen Ursachen wird in 4.1 diskutiert.

3.1.2.2 Routine zur Berechnung der kleinen Metaboliten

Die lehrstuhleigene Routine zur Quantifizierung der kleinen Metaboliten mit Hilfe von MATLAB von [76] wurde, wie bereits in Abschnitt 2.1.7 beschrieben, an die Spektreneigenschaften von Plasmaproben angepasst. Die Methode basiert demnach auf ein Programm implementiert in MATLAB.

Dabei können die Intensitäten der Signale bestimmt werden und dadurch quantifiziert werden. Darüber hinaus erhält man für jedes NMR-Spektrum eine Verteilung der Metaboliten (vgl. Bild 30). Anschließend können diese Daten statistisch analysiert werden (siehe Abschnitt 3.1.3).

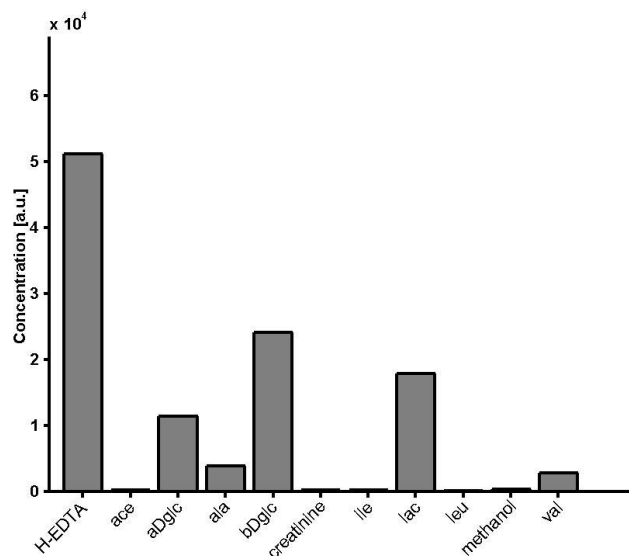


Bild 30: Beispiel einer relativen Verteilung einzelner Substanzen zueinander, welche mit Hilfe der MATLAB-Routine berechnet wurde. Abkürzungen: Ace: Aceton, aDglc: Alpha-D-Glucose, ala: Alanin, bDglc: beta-D-Glucose, ile: Isoleucin, lac: Laktat, Leu: Leucin, val: Valin. Die relativen Konzentrationen sind auf die Anzahl der Protonen korrigiert.

3.1.2.3 Qualitativer Vergleich der NMR-Spektren

Meist sind Unterschiede zwischen gesunden und kranken Personen bereits mit bloßem Auge im NMR-Spektrum sichtbar. Hierzu werden die Blutplasmaproben, welche vor und nach dem oralen Glucosetoleranztest entnommen wurden, qualitativ untersucht und bestimmte Merkmale analysiert. Des Weiteren wird analysiert, ob ein Krankheitsverlauf innerhalb der Rückstellproben zu finden ist.

3.1.2.3.1 Vergleich von NMR-Spektren von Nüchternblutplasma-Proben der Diabetiker und gesunden Studienteilnehmern

Bild 31 zeigt exemplarische NMR-Spektren von Nüchternblutplasma-Proben, d. h. Proben, die vor dem oralen Glucosetoleranztest entnommen wurden. Hierbei ist der Methyl- und Methylenbereich des NMR-Spektrums einer gesunden Person (schwarze Linie) und eines Diabetikers (rote Linie) dargestellt.

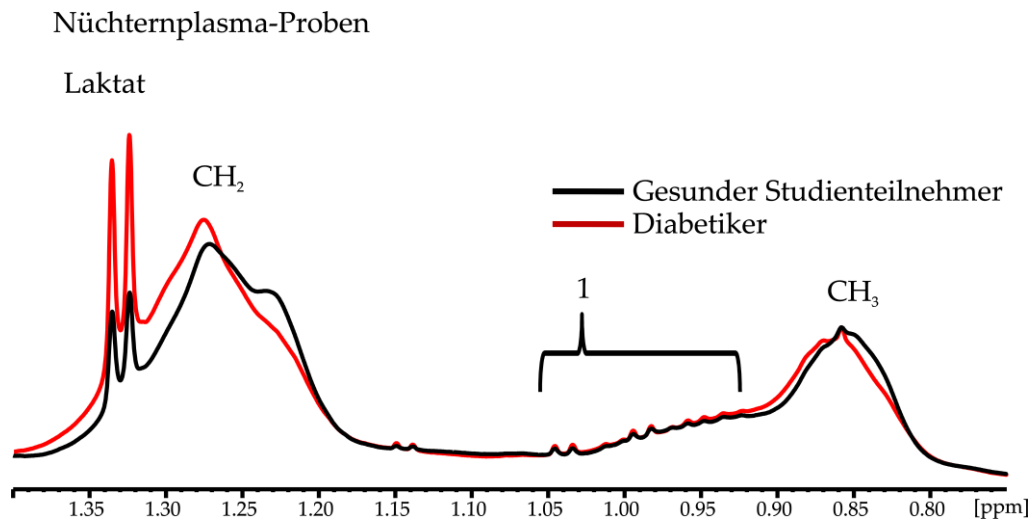


Bild 31: Vergleich von Nüchternplasma-Spektren eines gesunden Studienteilnehmers (schwarze Linie) und eines Diabetikers (rote Linie). Die Spektren wurden bei $T=310$ K mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 600 MHz-NMR-Spektrometer aufgenommen. 1 sind die Signale der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin.

Die Form des Signals der Methylengruppe des Diabetikers weicht stark von der des gesunden Studienteilnehmers ab. Wie im Balkendiagramm in Bild 32 zu sehen, ist die Konzentration der Subfraktion des kleinen VLDL (L11), großen VLDL (L12), der Rem-

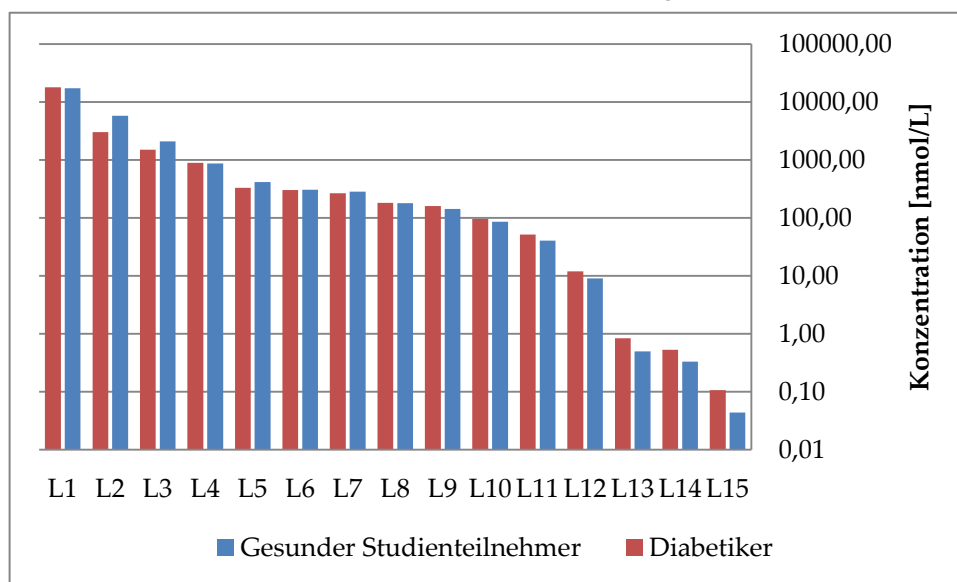


Bild 32: Vergleich der Lipoproteinprofile des gesunden Studienteilnehmers und des Diabetikers aus Bild 31. L1: Kleines HDL, L2: Mittleres HDL, L3: Großes HDL, L4: sehr großes HDL, L5: sehr kleines LDL, L6: kleines LDL, L7: Mittleres LDL, L8: Großes LDL, L9: sehr großes LDL, L10: IDL, L11: Kleines VLDL, L12: Großes VLDL, L13: Remnants, L14: Kleine Chylomikronen, L15: Große Chylomikronen.

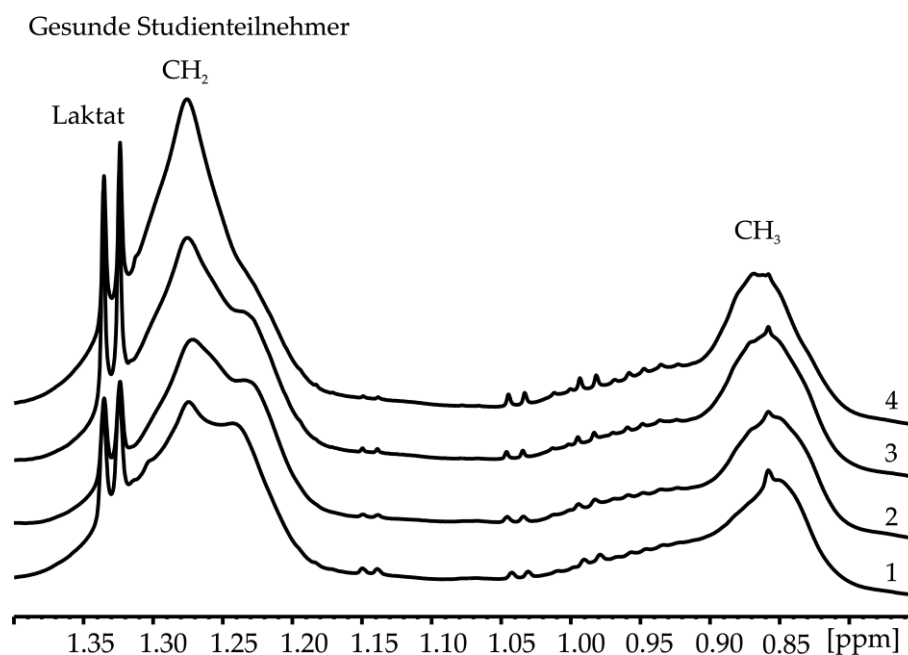


Bild 33: Vergleich von Nüchternplasma-Spektren gesunder Studienteilnehmer (1-4). Die Spektren wurden bei $T=310$ K mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 600 MHz-NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Abbildung zeigt den Methyl- und Methylenbereich der Nüchternplasma-Spektren. In Bild 34 sind Nüchternplasma-Spektren mehrerer Diabetiker dargestellt. Die Lipoproteinprofile der Spektren 1 bis 8 sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Skalierung der Spektren 1 bis 4 ist identisch.

nants (L13), der kleinen (L14) und der großen Chylomikronen (L15) bei dem Diabetiker höher. Die Konzentration des mittleren (L2) und großen (L3) HDL ist dagegen bei der gesunden Person deutlich erhöht. Dies entspricht dem rechten Bereich des CH₂-Gruppen-Signals. Der größte Unterschied im Lipoproteinprofil ist bei den Subfraktionen L2, L13, L14 und L15 zu beobachten. Die Konzentration der Aminosäuren Isoleucin, Valin und Leucin im Bereich zwischen 1,05 und 0,90 ppm ist in etwa gleich groß. Das Laktat-Signal der beiden Personen unterscheidet sich jedoch sehr. Der Diabetiker besitzt eine größere Menge an Laktat im Nüchternblutplasma als die gesunde Person. In Bild 33 ist ein Ausschnitt mehrerer NMR-Spektren von Nüchternplasma von gesunden Studienteilnehmern und in Bild 34 von Diabetikern dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Form der Signale des Methylen- und Methylgruppen je nach Person stark variiert. Das Maximum der Signale der CH₂-Gruppe unterscheidet sich stark, wohingegen das Maximum des CH₃-Peaks weniger stark variiert. Große Unterschiede sind auch in der Höhe des Laktat-Signals zu erkennen. Die Konzentrationen der Aminosäuren stimmen bei den Spektren der gesunden Personen weitestgehend überein.

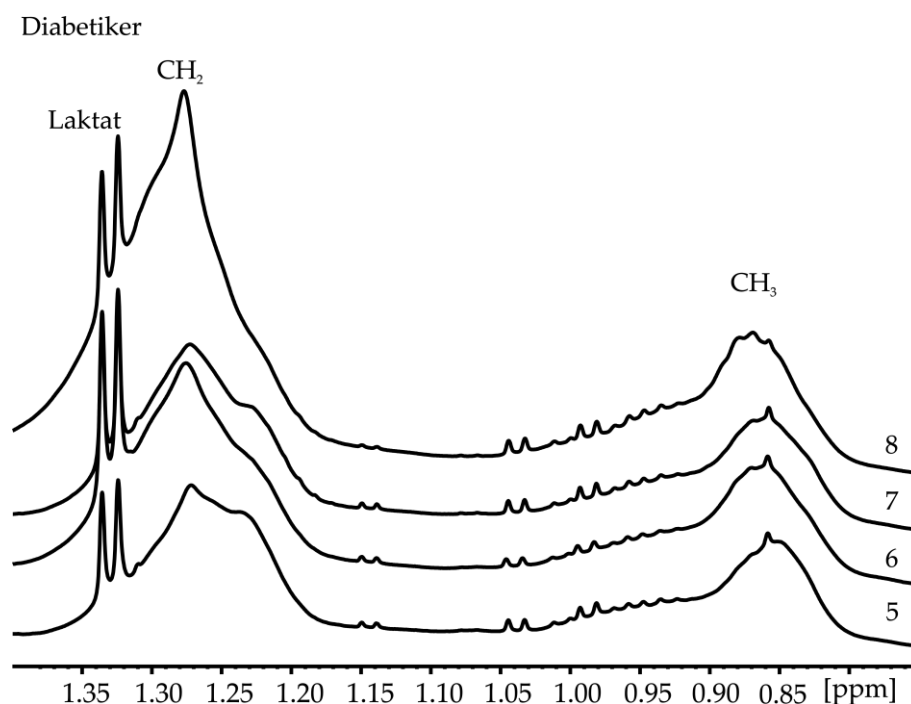


Bild 34 Vergleich von Nüchternplasma-Spektren mehrerer Diabetiker (5-8). Die Spektren wurden bei $T=310$ K mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 600 MHz-NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Abbildung zeigt den Methyl- und Methylenbereich der Nüchternplasma-Spektren. Lipoproteinprofile der Spektren 1 bis 8 sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Skalierung der Spektren 5 bis 8 ist identisch.

Für das Dublett-Signal bei $\delta = 1,14$ ppm gilt: $J = 6,47$ Hz. Als mögliche Substanz konnte Isopropanol mit Hilfe eines Spike-In-Experiments ausgeschlossen werden. Die J-Kopplung für den CH_3 -Peak des Isopropanols beträgt $J = 6,21$ Hz und für das CH -Signal $J(\text{CH}) = 6,22$ Hz.

Die zugehörigen Lipoproteinprofile sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Die Nüchternplasmaspektren der Spektren 4 und 8 weisen eine von den übrigen Spektren deutlich abweichende Form auf. Wie in den Lipoproteinprofilen zu erkennen, ist die Konzentration von L11 bis L15 stark erhöht im Vergleich zu den übrigen. Somit zeigen sich sowohl qualitativ in den NMR-Spektren als auch im Lipoproteinprofil starke Unterschiede zwischen den Personen aber auch innerhalb der einzelnen Gruppen.

Tabelle 24

Vergleich der Lipoproteinprofile der Nüchternplasmaproben von gesunden Personen (1-4) und Diabetikern (5-8) aus Bild 33 und Bild 34.^{a, b, c}

Lipo- protein- sub- klassen	Lipo- proteinsubklas- sen	1	2	3	4	5	6	7	8
L1	Kleines HDL	14772	17329	17883	17397	15478	17945	17563	14567
L2	Mittleres HDL	4626	5772	5804	3933	4843	3014	3849	2572
L3	Großes HDL	2888	2097	2285	1882	2025	1502	1437	1374
L4	Sehr großes HDL	960	869	988	1171	922	893	819	993
L5	Sehr kleines LDL	438	415	460	484	375	329	308	310
L6	Kleines LDL	314	306	363	422	282	301	285	327
L7	Mittleres LDL	255	283	332	392	260	267	251	254
L8	Großes LDL	175	178	223	288	146	182	173	234
L9	Sehr großes LDL	111	142	184	242	125	159	141	189
L10	IDL	73	86	114	145	69	96	86	114
L11	Kleines VLDL	34,92	40,50	56,70	78,71	33,62	51,50	42,38	73,45
L12	Großes VLDL	8,18	9,02	13,29	17,56	7,08	11,84	9,43	14,29
L13	Remnants	0,55	0,49	0,74	1,19	0,43	0,83	0,63	1,44
L14	Kleine Chylomik- ronen	0,34	0,33	0,52	0,75	0,24	0,52	0,37	0,72
L15	Große Chylomik- ronen	0,07	0,04	0,08	0,12	0,04	0,11	0,08	0,15

^a Gesunde Personen 1 bis 4 siehe Bild 33.

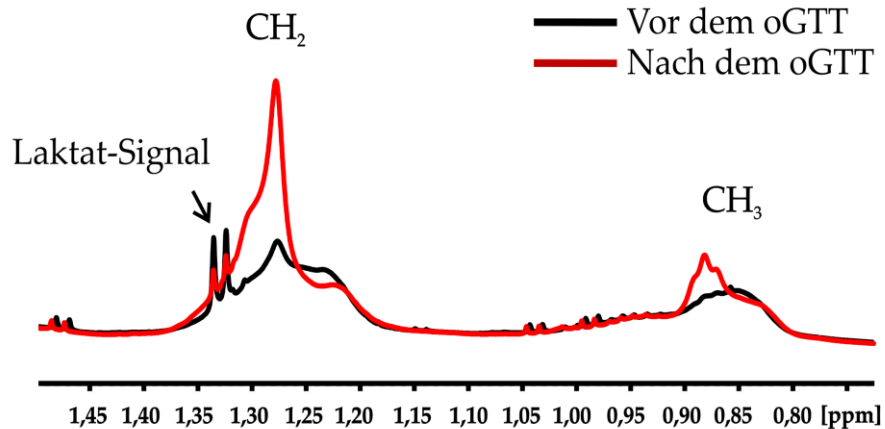
^b Diabetiker: 5 bis 8 siehe Bild 34.

^c Konzentration der Lipoproteinsubklassen L1 bis L15 in [nmol/L].

3.1.2.3.2 Vergleich der Spektren von Diabetiker und gesunder Person vor und nach dem oralen Glucosetoleranztest

Ein Beispiel für das Verhalten des Metabolismus nach Glucoseeinnahme im Rahmen des oralen Glucosetoleranztest zeigt das Bild 35. In Bild 35 (a) sind der Methyl- und Methylenbereich eines NMR-Spektrums eines gesunden Studienteilnehmers und (b) eines Diabetikers vor (schwarze Linie) und nach dem oralen Glucosetoleranztest (rote Linie) dargestellt.

a) Gesunder Studienteilnehmer



b) Diabetiker

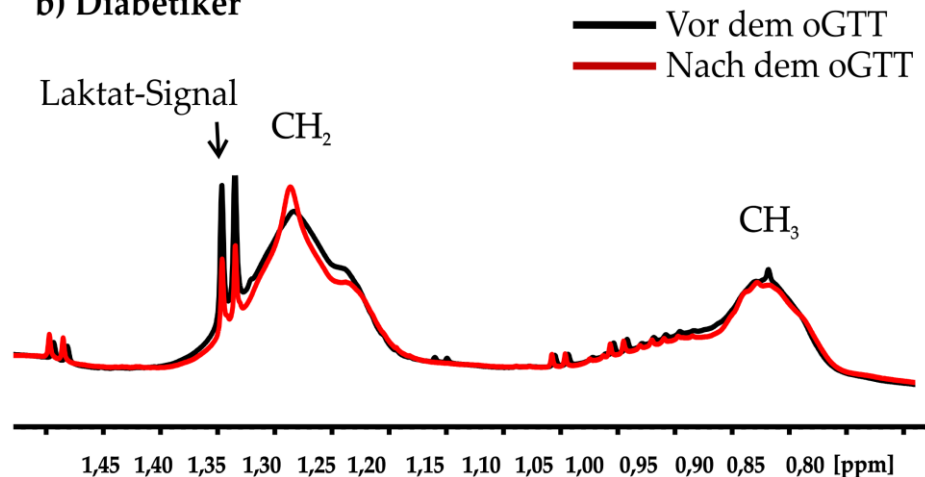


Bild 35: Vergleich des Methyl- und Methylenbereichs eines $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrums eines gesunden Studienteilnehmers (a) und eines Diabetikers (b) vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) dem oralen Glucosetoleranztest. Die $1D\text{-}^1\text{H}$ -Spektren wurden bei $T=310\text{ K}$ an einem 600 MHz -Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* aufgenommen. Die zugehörigen Lipoproteinprofile sind in Bild 36 als Balkendiagramme zusammengefasst.

Hierbei ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Spektren der Nüchternplasma- und oGTT-Probe (120 min nach Glucoseeinnahme) der gesunden Person zu erkennen. Vor allem die Form der CH₂- und CH₃-Signale ändert sich nach der Glucoseeinnahme sichtbar. Der linke Bereich der Signale wird dabei deutlich erhöht und der rechte Teil etwas erniedrigt. Dies zeigt sich auch bei der Analyse des zugehörigen Lipoproteinprofils der gesunden Person aus Bild 35 (a) im Balkendiagramm in Bild 36. Hierbei ist eine sehr starke Erhöhung der Konzentration der Lipoproteinsubklassen L8 (Großes

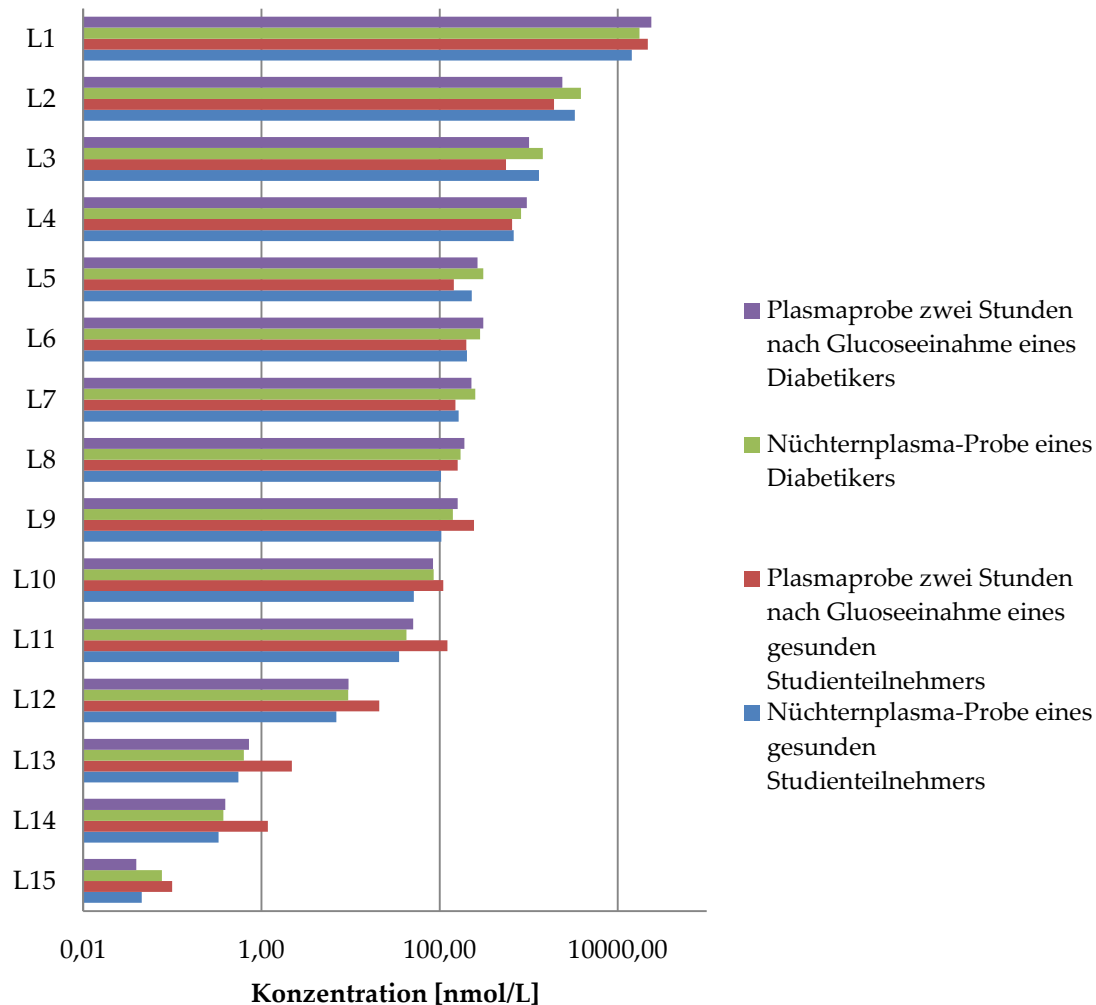


Bild 36: Vergleich der Lipoproteinprofile des gesunden Studienteilnehmers und des Diabetikers aus Bild 35 (a) und (b) während des Glucosetoleranztests. Abkürzungen: L1: Kleines HDL, L2: Mittleres HDL, L3: Großes HDL, L4: sehr großes HDL, L5: sehr kleines LDL, L6: kleines LDL, L7: Mittleres LDL, L8: Großes LDL, L9: sehr großes LDL, L10: IDL, L11: Kleines VLDL, L12: Großes VLDL, L13: Remnants, L14: Kleine Chylomikronen, L15: Große Chylomikronen.

LDL) bis zu L15 (große Chylomikronen) der Proben zwei Stunden nach Glucoseeinnahme im Vergleich zu den Nüchternplasmaproben zu erkennen. Die Subklassen der kleinen Lipoproteine L2 bis L5 fallen nach Glucoseeinnahme stark ab.

Bild 35 (b) zeigt NMR-Spektren der Nüchternplasmaprobe und der Probe des Diabetikers, die zwei Stunden nach der Glucoseeinnahme entnommen wurde. Die Laktatkonzentration sinkt nach der Glucoseeinnahme deutlich ab. Im Lipoproteinprofil in Bild 36 ist zu erkennen, dass die L2-Konzentration nach Glucoseeinnahme stark sinkt.

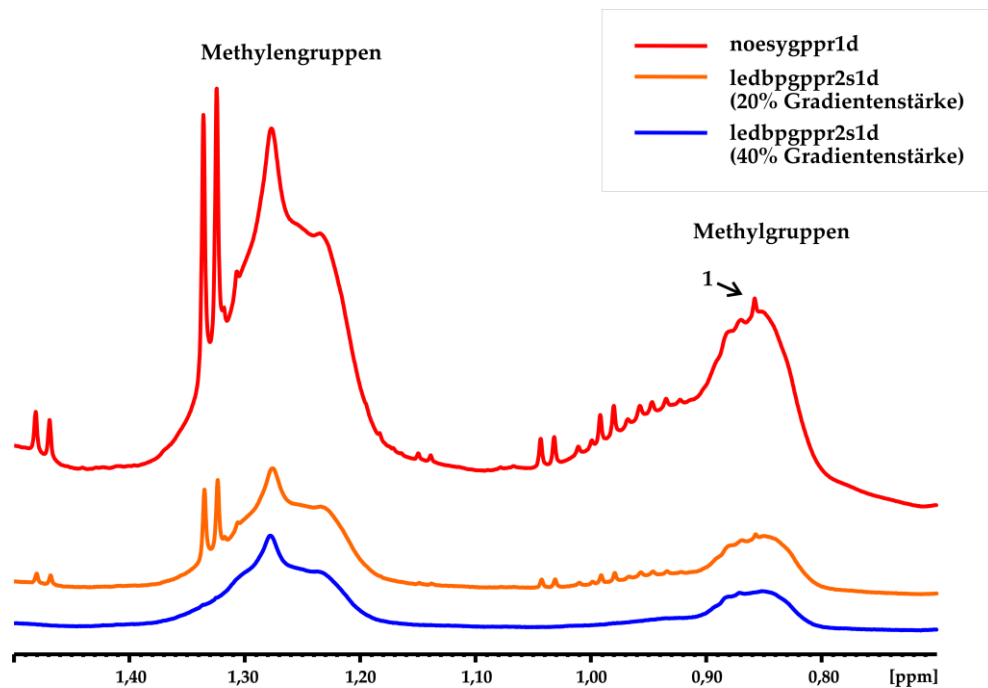


Bild 37: Methylen- und Methylbereich von $1D$ - 1H -NMR-Spektren einer Humanplasma-EDTA-Probe. Die Spektren wurden bei einer Temperatur von $T=310$ K an einem 600 MHz-Spektrometer mit den Pulssequenzen *noesygppr1d* (rote Linie) und den beiden diffusionsgewichteten Pulssequenzen *ledbpgppr2s1d* mit einer Gradientenstärke von 20 % (orange Linie) bzw. 40 % (blaue Linie), einer Diffusionszeit von 100 ms und einer Gradientenpulslänge von 2 ms bzw. 4 ms aufgenommen. (1) kennzeichnet den unbekanntes Peak. Die Skalierung der Spektren ist identisch.

Die Konzentration von L9 steigt nach der Glucoseeinnahme an. Dies erklärt das Verhalten der in Bild 35 (b) gezeigten Spektren.

Des Weiteren sind die zu dem in Bild 35 (b) gezeigten Spektrum der Nüchternplasmaprobe gehörenden Spektren mit den diffusionsgewichteten Pulssequenzen *ledbpgppr2s1d* mit einer Gradientenstärke von 20 % (orange Linie) bzw. 40 % (blaue Linie), einer Diffusionszeit von 100 ms und einer Gradientenpulslänge von 2 ms bzw. 4 ms aufgenommen in Bild 37 dargestellt. Dadurch kann man eine Aussage über die Größe der Substanz, die zu dem Signal bei 0,858 ppm gehört, treffen. Da das Signal bei der höheren Gradientenstärke, wie die niedermolekularen Substanzen Laktat und die Aminosäuren, vollständig verschwunden ist, handelt es sich hierbei um eine niedermolekulare Substanz.

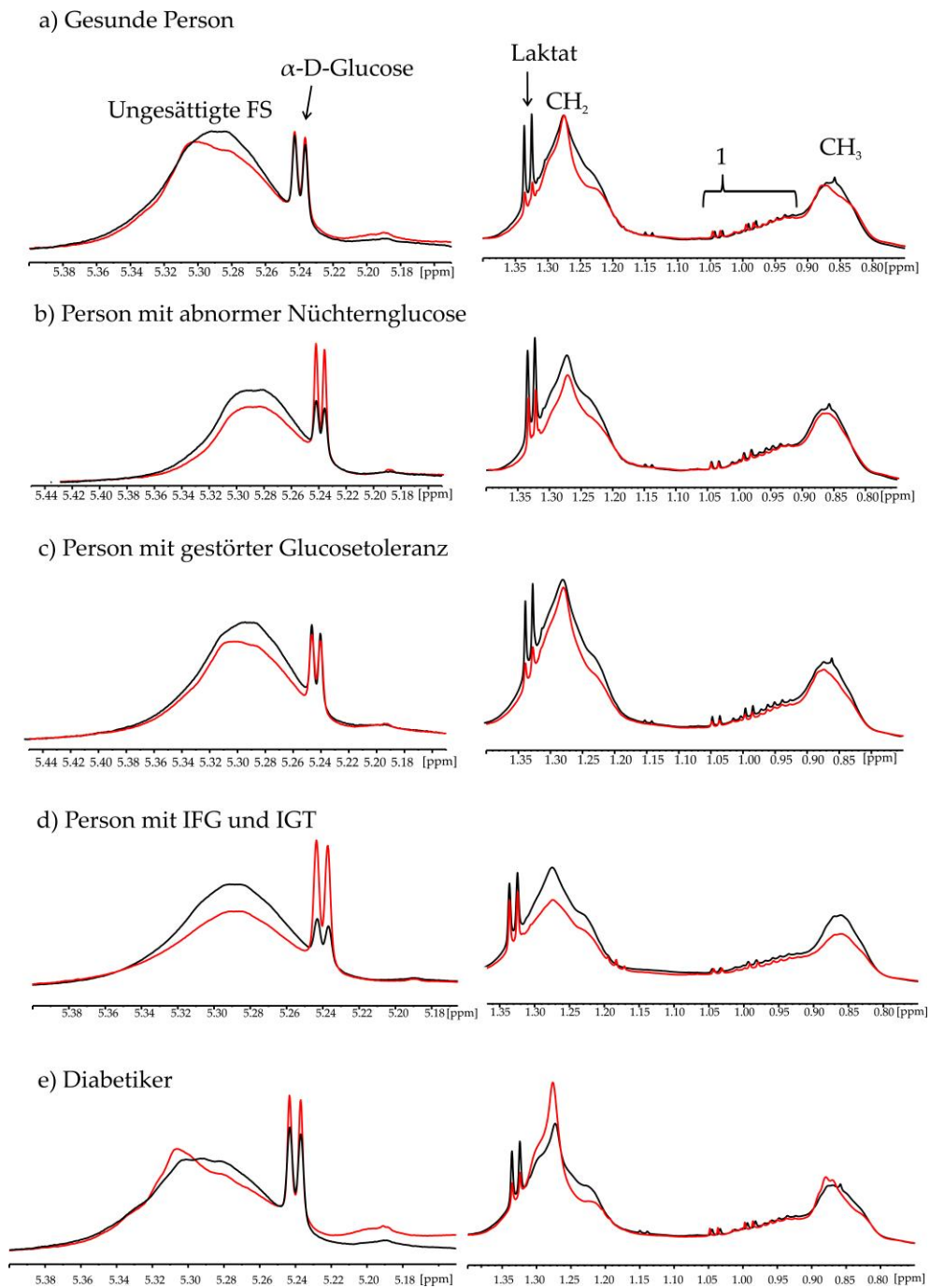


Bild 38: Vergleich des Bereichs mit dem Glucosesignal und den ungesättigten Fettsäuren und des Methyl- und Methylenbereichs eines 1D ^1H -NMR-Spektrums eines gesunden Studienteilnehmers (a), von Prädiabetikern (b-d) und eines Diabetikers (e) vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) dem Glucosetoleranztest. Die Signale „1“ sind die Signale der Aminosäuren Valin, Isoleucin und Leucin.

In Bild 38 werden Blutplasmaproben aller oGTT-Gruppen vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) dem oralen Glucosetoleranztest verglichen. Auf der linken Seite sind

$^1\text{D-}^1\text{H-}$ NMR-Spektren des Glucosesignals bei etwa $5,24 \text{ ppm}$ und des Bereichs der ungesättigten Fettsäuren der jeweiligen oGTT-Gruppen dargestellt. Auf der rechten Seite sind der Methyl- und Methylenbereich der oGTT-Gruppen zu sehen. Bild 38 (a) zeigt zwei Spektren im Bereich zwischen $5,15$ und $5,40 \text{ ppm}$ einer gesunden Person. Die Glucose-Konzentration ist zwei Stunden nach Glucoseeinnahme nur minimal höher und das Signal der ungesättigten Fettsäuren wird kleiner. Der rechte Graph zeigt den zugehörigen Spektrenbereich der CH_2 - und CH_3 -Gruppen. Hierbei ist eine Abnahme der rechten Schulter des CH_2 - und CH_3 -Signals beobachtbar. Dies entspricht einer Erhöhung der L2- und L3-Konzentration nach dem oralen Glucosetoleranztests (vergleiche Bild 40). Die Laktat-Konzentration sinkt nach der Glucoseeinnahme deutlich. Spektren eines IFG-Erkrankten sind in Bild 38 (b) dargestellt. Bild 38 (c) sind Spektren eines Studienteilnehmers mit gestörter Glucoseintoleranz. Die Spektren in Bild 38 (d) gehören zu einem Studienteilnehmer mit der Prädiabetesform abnorme Nüchtern-glucose (IFG) und gestörter Glucosetoleranz (IGT). Bild 38 (e) enthält die Spektren eines Diabetikers. Das Signal der ungesättigten Fettsäuren nimmt bei der gesunden Person und bei den Prädiabetikern nach der Glucoseeinnahme ab. Lediglich bei dem Diabetiker in Bild 38 (e) ist eine Verschiebung des Signalmaximums zu erkennen (siehe Bild 40 und Bild 41). Im Allgemeinen ist beim Vergleich der Personen mit unterschiedlichem Diabetes-Krankheitsgrad in Bild 40 und Bild 41 der größte Unterschied bei den Lipoproteinsubklassen des VLDL (L11 und L12), der Remnants L13 und des mittleren LDL (L2) zu beobachten. Das Glucose-Signal zeigt je nach Grad der Diabeteserkrankung ein unterschiedliches Verhalten zwei Stunden nach der Glucoseeinnahme. Für den gesunden Studienteilnehmer ist die Konzentration wie bereits erwähnt nur minimal erhöht (siehe Bild 38 (a)). Bei sowohl den Personen mit abnormaler Nüchtern-glucose und den Personen mit IFG und IGT als auch bei den Diabetikern steigt die Glucose-Konzentration stark an. In Tabelle 25 ist das Ergebnis des Glucosetoleranztests für den an IFG und IGT Erkrankten gezeigt.

Tabelle 25

Ergebnis des oralen Glucosetoleranztests des an Prädiabetes mit abnormer Nüchtern-glucose und gestörter Glucosetoleranz Erkrankten aus Bild 38 (d).

Nüchternplasmaglucose [mg/dL]	Glucose (Zwei Stunden nach Glucoseeinnahme) [mg/dL]
121,6	147,7

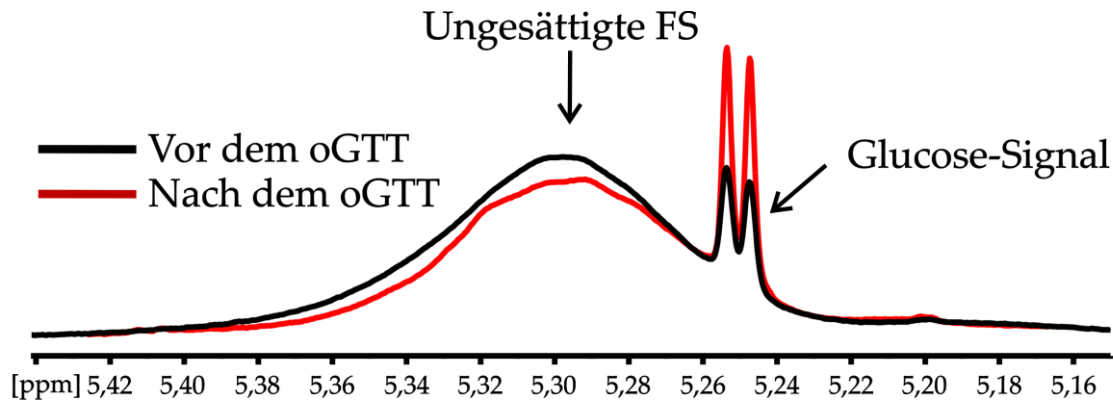


Bild 39: Glucose-Signal eines Diabetikers vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) dem oralen Glucosetoleranztest in einem 1D ^1H -Spektrum aufgenommen bei 310 K am 600 MHz-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d*.

Lediglich bei der Person mit der gestörten Glucosetoleranz sinkt das Glucosesignal minimal (siehe Bild 38 (c)). Dies spricht für eine Störung des Stoffwechsels. Die Signale der Methyl- und Methylengruppe fallen bei den Prädiabetikern insgesamt ab (vergleiche Bild 38 (b) bis (d)). Darüber hinaus ist beim Diabetiker eine Verschiebung der Signalmaxima dieser beiden Gruppen zu beobachten (Bild 38 (e)).

Eine vergrößerte Abbildung des Glucosesignals einer Plasmaprobe eines Diabetikers vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) dem oralen Glucosetoleranztest ist in Bild 39 zu sehen. Dabei ist zu beobachten, dass das Glucoselevel zwei Stunden nach der Glucoseeinnahme nicht wieder auf den Nüchternblutzuckerspiegel gefallen ist. Das Glucose-Signal ist nach dem Test doppelt so hoch wie zuvor. Dies reproduziert die Ergebnisse des oralen Glucosetoleranztests. Das Signal der ungesättigten Fettsäuren fällt zwei Stunden nach der Glucoseeinnahme im Vergleich zum Glucosespiegel vor der Einnahme stark ab.

Bild 40 zeigt die zugehörigen Lipoproteinprofile der NMR-Spektren eines gesunden Studienteilnehmers, von Prädiabetikern und Diabetikern aus Bild 38. Die Werte von L10 bis L15 sind in Bild 41 zu finden.

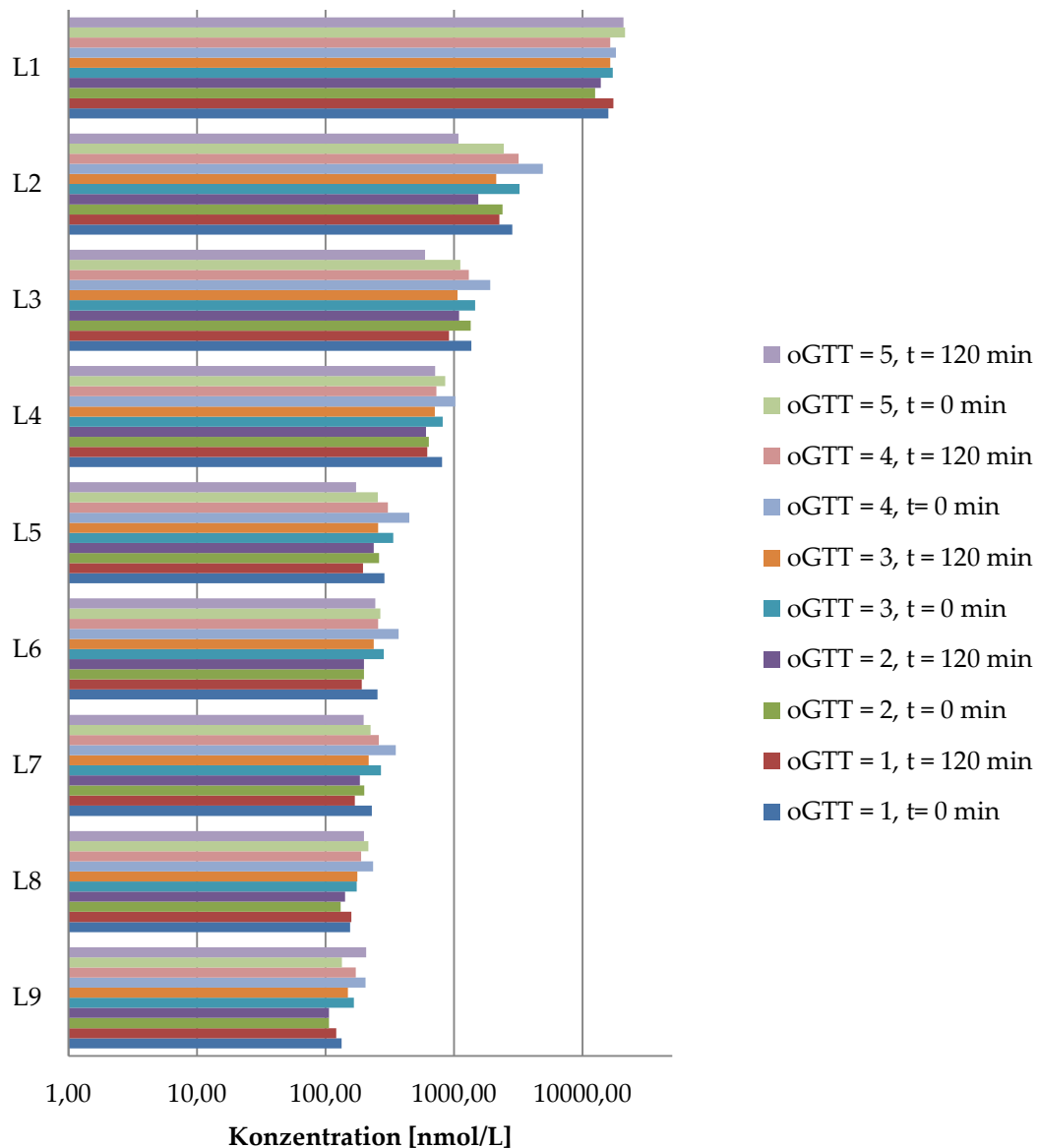


Bild 40: Vergleich Lipoprotein-Konzentrationen L1 bis L9 der NMR-Spektren eines gesunden Studienteilnehmers, von Prädiabetikern und Diabetikern aus Bild 38. Die Konzentrationen von L10 bis L15 sind in Bild 41 zu finden. Abkürzungen: oGTT: oraler Glucosetoleranztest, oGTT-Ergebnisse: 1= gesund, 2= abnorme Nüchtern-glucose, 3= gestörte Glucosetoleranz, 4= abnorme Nüchtern-glucose und gestörte Glucosetoleranz und 5= Diabetiker. L1: Kleines HDL, L2: Mittleres HDL, L3: Großes HDL, L4: sehr großes HDL, L5: sehr kleines LDL, L6: kleines LDL, L7: Mittleres LDL, L8: Großes LDL, L9: sehr großes LDL.

Um Unterschiede zwischen Personen mit gleichem oGTT-Ergebnis zu analysieren, sind in Bild 42 1D-¹H-NMR-Spektren der Blutplasmaproben vor und nach dem oralen Glucosetoleranztest zweier gesunder Studienteilnehmer abgebildet. Hierbei ist ein unter-

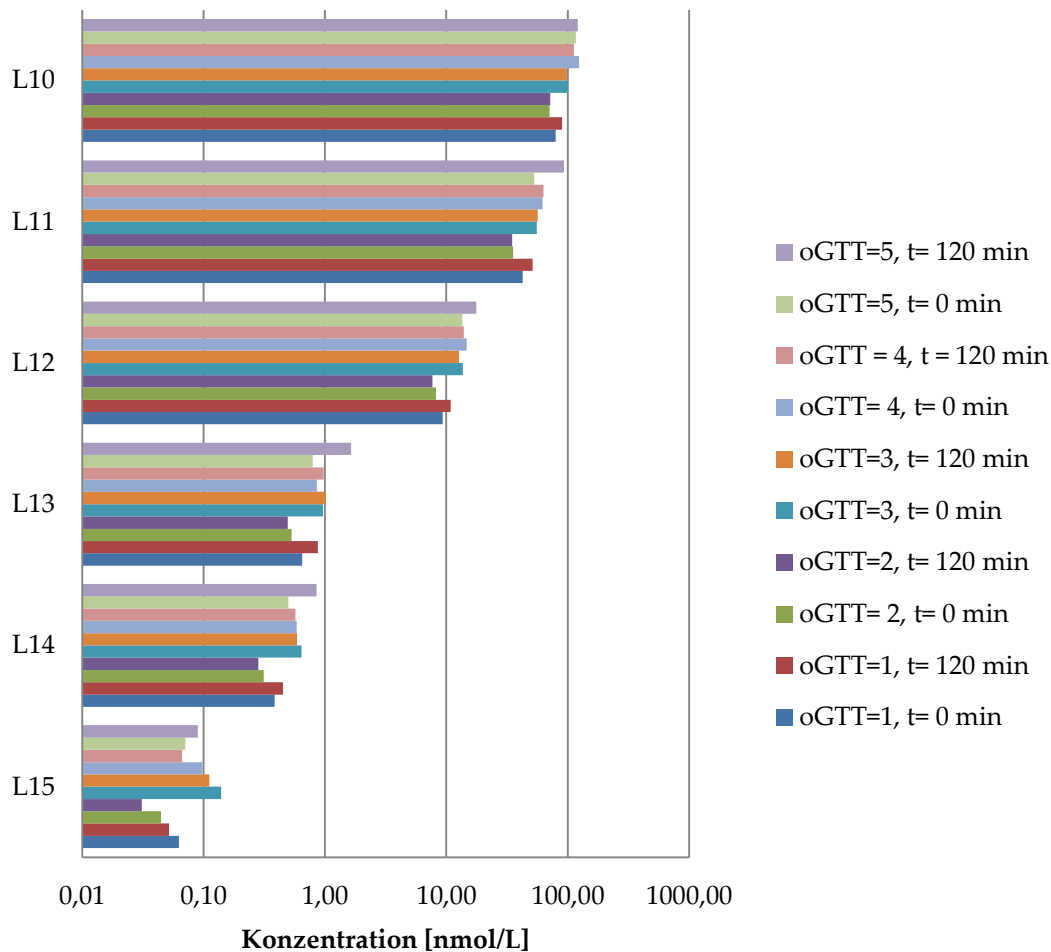


Bild 41: Vergleich der Lipoproteinprofile L10 bis L15 der NMR-Spektren aus Bild 38 (Fortsetzung von Bild 40). Abkürzungen: oGTT: oraler Glucosetoleranztest, oGTT-Ergebnisse: 1= gesund, 2= abnorme Nüchternnglucose, 3= gestörte Glucosetoleranz, 4= abnorme Nüchternnglucose und gestörte Glucosetoleranz und 5= Diabetiker. L10: IDL, L11: Kleines VLDL, L12: Großes VLDL, L13: Remnants, L14: Kleine Chylomikronen, L15: Große Chylomikronen.

schiedliches Verhalten der Signale beobachtbar, d. h. beispielsweise eine Verschiebung des Signalmaximums der Methyl- und Methylengruppe (vergleiche Bild 42 (a)) und ein abfallendes Signal bei Bild 42 (b)). Die Laktat-Konzentration sinkt bei Bild 42 (a) minimal und steigt bei Bild 42 (b) deutlich an.

Bei den Spektren beider Personen ist bei der Nüchterplasmaprobe ein Peak bei 0,858 ppm und einer bei etwa 1,14 ppm zu erkennen.

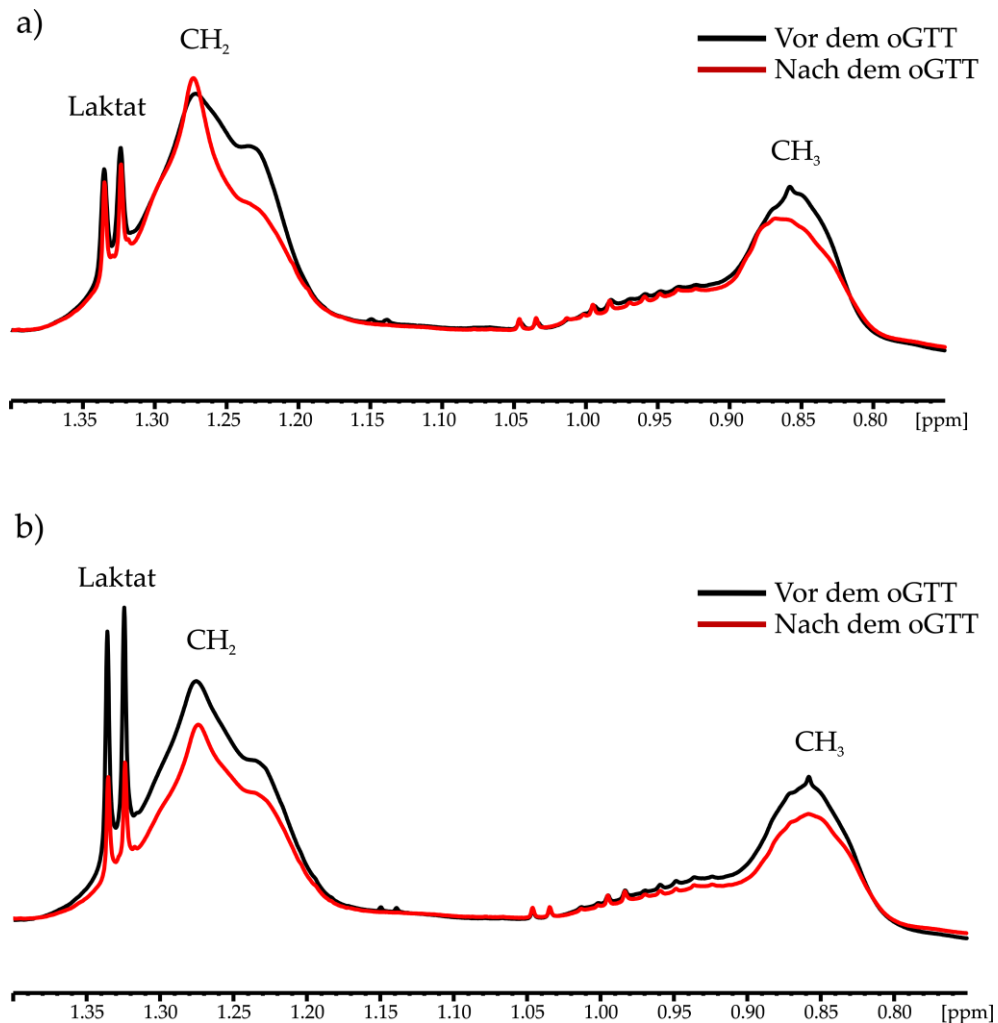


Bild 42: 1D ¹H-NMR-Spektren von gesunden Studienteilnehmern (a) und (b) vor (schwarze Linie) und nach (rote Linie) dem oralen Glucosetoleranztest aufgenommen bei $T=310$ K am 600 MHz-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d*. Die Skalierung ist hierbei nur innerhalb der Spektren (a) und (b) identisch.

3.1.2.3.3 Vergleich der retrospektiven Plasmaproben der Studienteilnehmer

In Bild 43 sind zwei NMR-Spektren eines gesunden Studienteilnehmers zu sehen. Das Spektrum mit der blauen Linie stammt von der ältesten und das rote von der neuesten Rückstellprobe. Die Plasmaproben wurden in einem Zeitintervall von 7 Jahren (2002 und 2009) entnommen. Die neuere Probe hat eine höhere Laktat-Konzentration und das Maximum des Signals bei etwa 0,858 *ppm* ist ebenfalls höher. Darüber hinaus ist eine Veränderung des CH₂-Signals zu beobachten. Das Signal der CH₃-Gruppe ist relativ unverändert.

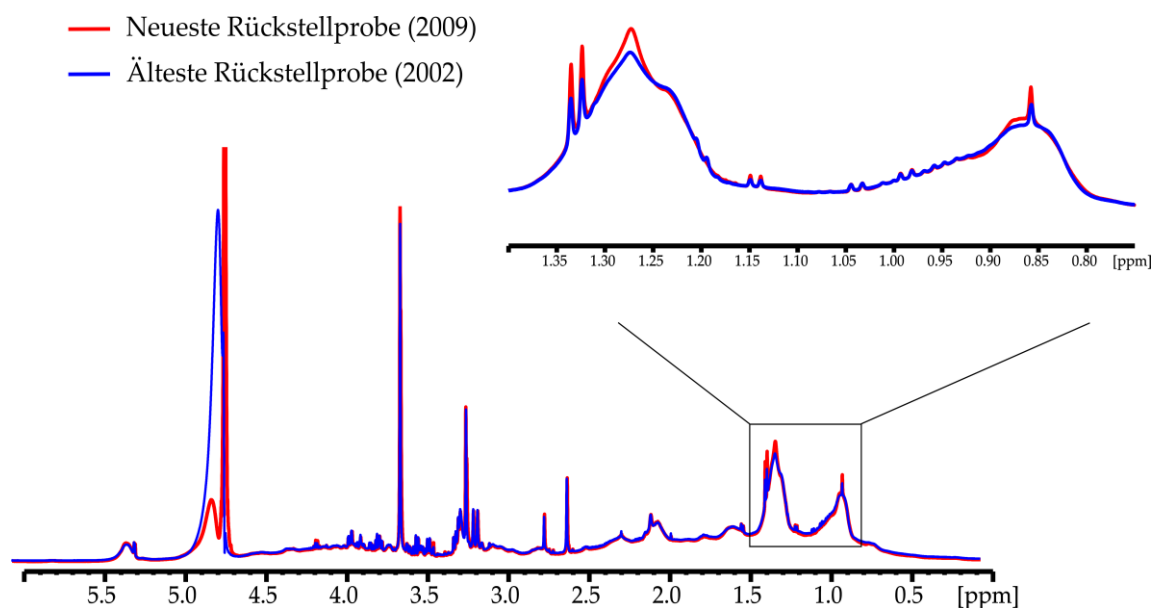


Bild 43: $1D-^1H$ -NMR-Spektrum zweier Rückstellproben eines gesunden Studienteilnehmers. Die rote Kurve zeigt das NMR-Spektrum der neuesten Rückstellprobe (Januar 2009) und die blaue das der ältesten Rückstellprobe (Juli 2002). Die $1D-^1H$ -Spektren wurden bei $T=310$ K am 600 MHz-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* aufgenommen. Die humanen EDTA-Plasmaproben wurden während einer Blutspende entnommen und bei -80 °C in der Biobank gelagert.

Ein exemplarischer zeitlicher Verlauf der Rückstellproben aller oGTT-Gruppen ist in Bild 44 bis Bild 52 zu finden. In Bild 44 (a) werden der Methyl- und Methylenbereich und in (b) das Glucosesignal mit den angrenzenden Resonanzen der ungesättigten Fettsäuren der $1D-^1H$ -NMR-Spektren der Rückstellproben eines gesunden Studienteilnehmers gezeigt. Die zugehörigen Lipoproteinprofile sind in Bild 45 dargestellt.

Zu sehen ist in Bild 44 (a), dass sich innerhalb dieser sieben Jahre die Spektren des Blutplasmas eines gesunden Studienteilnehmers nicht erheblich verändert haben. Die Höhe des Laktatsignals bei 1,33 ppm der ältesten Probe weicht etwas von den übrigen Spektren ab. Darüber hinaus ist eine kleine Veränderung der Form des CH_2 -Signals zu erkennen. Dies zeigt auch das Balkendiagramm der Lipoproteinprofile dieser Proben. Dabei sind die Werte über die sieben Jahre hinweg relativ konstant. Lediglich die Werte der L2-Subklasse sinken stark ab. Die Rückstellprobe aus dem Jahr 2003 hat eine geringere Konzentration der L3 bis L15-Subklassen.

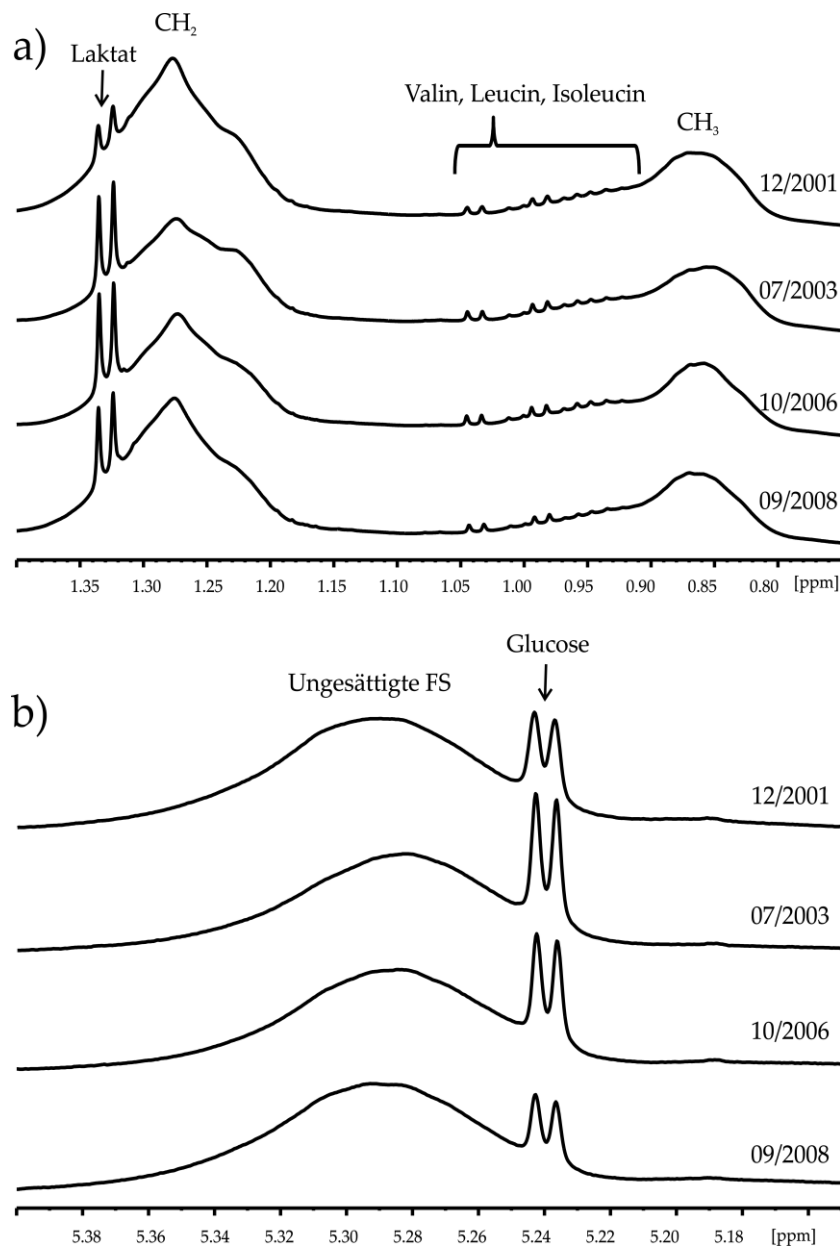


Bild 44: Vergleich des (a) Methyl- und Methylenbereichs und (b) des Bereichs mit dem Glucosesignal und den ungesättigten Fettsäuren der 1D- ^1H -NMR-Spektren der Rückstellproben eines gesunden Studienteilnehmers. Die 1D ^1H -Spektren wurden bei $T=310\text{ K}$ am 600 MHz-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* aufgenommen. Die humanen EDTA-Plasmaproben wurden während einer Blutspende entnommen und bei -80°C in der Biobank gelagert. Die zugehörigen Lipoproteinprofile sind in Bild 45 gezeigt.

In Bild 44 (b) sind die 1D- ^1H -NMR-Spektren mit dem Glucose-Signal und den Resonanzen der ungesättigten Fettsäuren dieses gesunden Studienteilnehmers dargestellt. Die Signalform der ungesättigten Fettsäuren zeigt keine größere Veränderung, jedoch ist die Glucose-Konzentration der jeweiligen Rückstellproben relativ unterschiedlich.

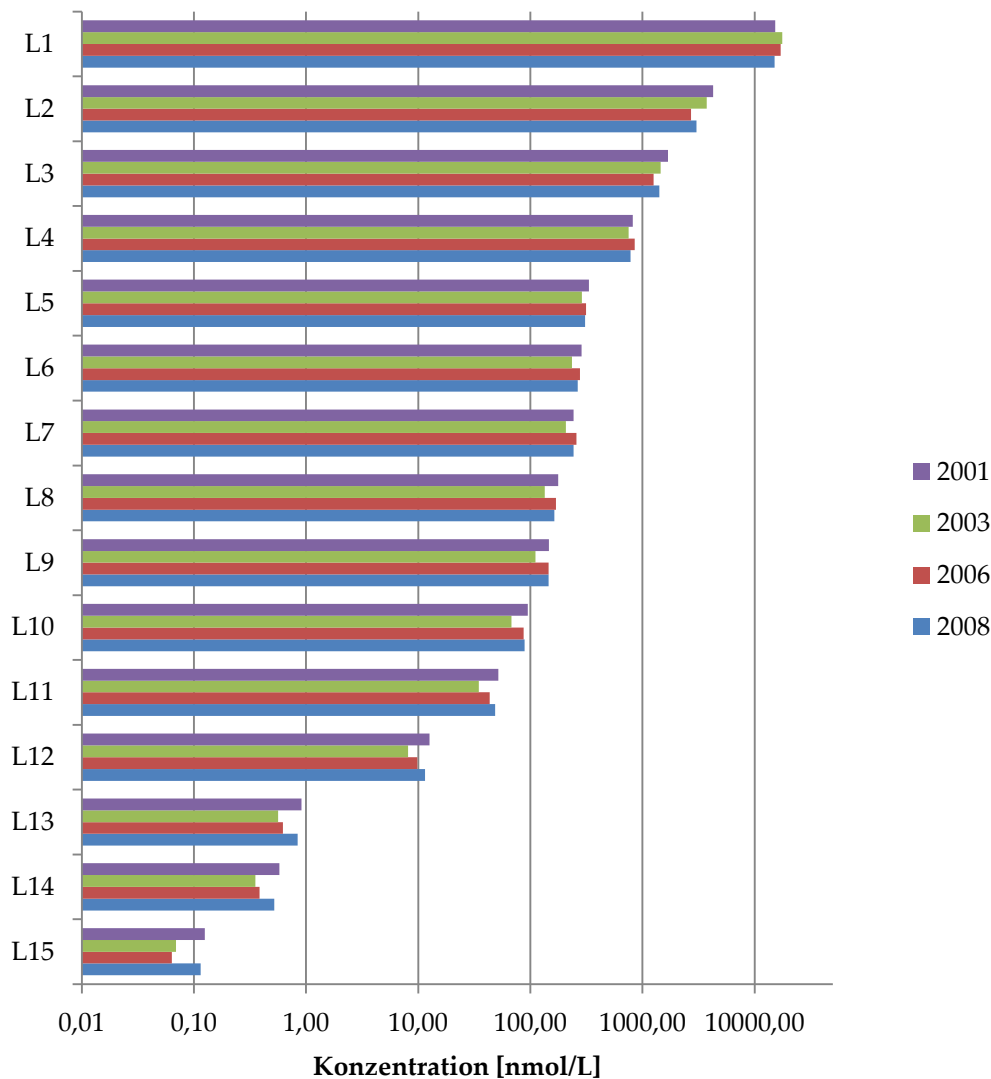


Bild 45: Lipoproteinprofile der Spektren der Rückstellproben von 2001 bis 2008 eines gesunden Studienteilnehmers aus Bild 44. Aufgetragen ist die Konzentration der Lipoproteinsubklassen. Abkürzungen: L1: Kleines HDL, L2: Mittleres HDL, L3: Großes HDL, L4: sehr großes HDL, L5: sehr kleines LDL, L6: kleines LDL, L7: Mittleres LDL, L8: Großes LDL, L9: sehr großes LDL, L10: IDL, L11: Kleines VLDL, L12: Großes VLDL, L13: Remnants, L14: Kleine Chylomikronen, L15: Große Chylomikronen.

In Bild 46 sind die Spektren der Rückstellproben eines Prädiabetikers mit einer abnormen Nüchternplasmaglukose gezeigt. Diese Blutplasmaproben wurden innerhalb von sieben Jahren entnommen. Bild 46 (a) zeigt den Methyl- und Methylenbereich der Spektren. Die Form des Methylsignals verändert sich innerhalb dieser sieben Jahre relativ stark. Der linke Bereich dieses Signals wächst mit zunehmendem Alter des Studienteilnehmers an. Dies bedeutet einen Anstieg des Lipoproteinanteils des VLDL L11,

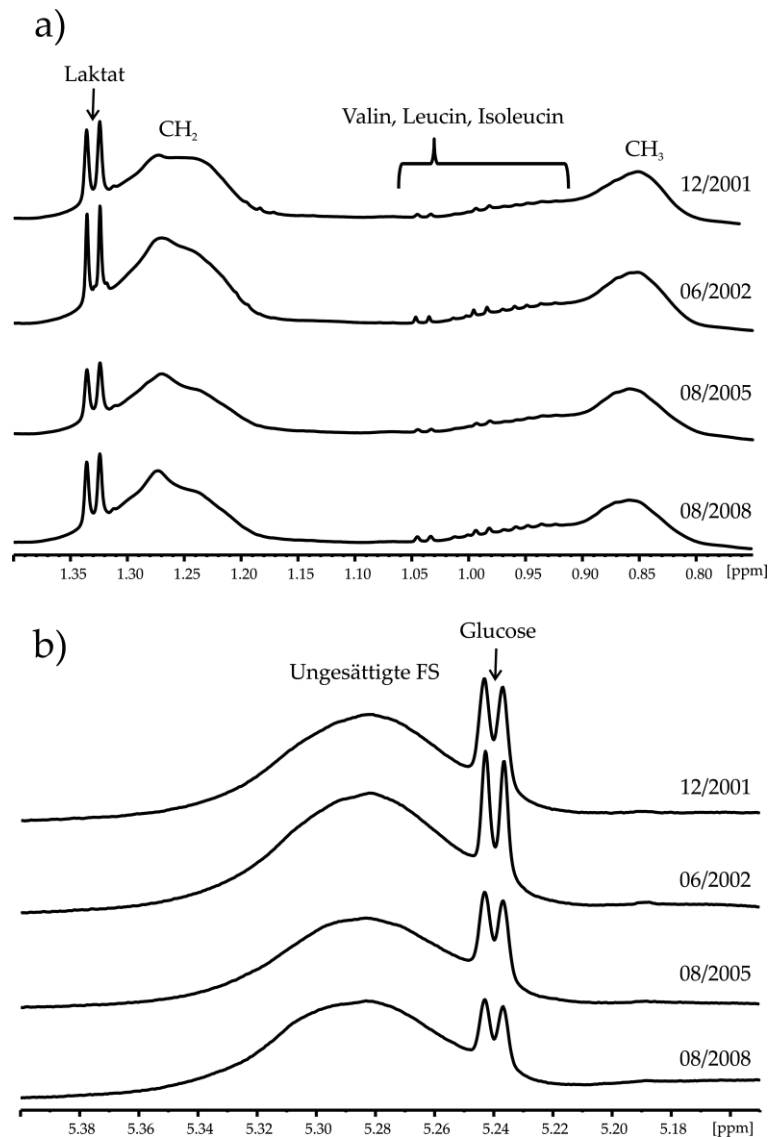


Bild 46: Zeitlicher Verlauf: Vergleich des Methyl- und Methylenbereichs und des Bereichs mit dem Glucosesignal und den ungesättigten Fettsäuren der 1D-¹H-NMR-Spektren der Rückstellproben eines Prädiabetikers mit einer abnormen Nüchtern-glucose. Die 1D-¹H-Spektren wurden bei $T=310$ K am 600 MHz-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* aufgenommen. Die humanen EDTA-Plasmaproben wurden während einer Blutspende entnommen und bei -80 °C in der Biobank gelagert.

aber auch der Remnants und Chylomikronen L13 bis L15 (vergleiche Bild 47). Die Konzentrationen der L2 bis L6-Subklassen nehmen im Verlauf der Jahre stark ab. In Bild 46 (b) ist eine Abnahme der Glucose-Konzentration mit der Zeit zu sehen.

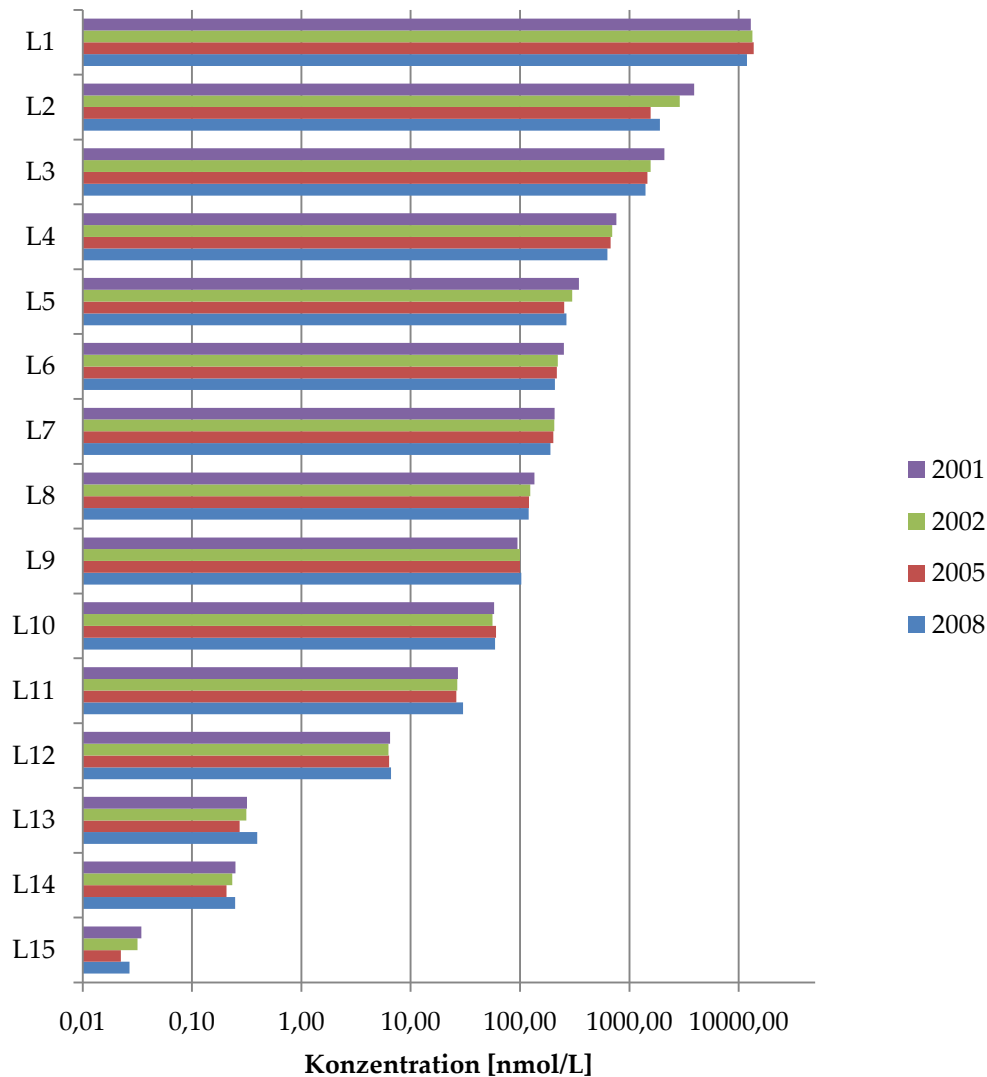


Bild 47: Lipoproteinprofile der Spektren der Rückstellproben von 2001 bis 2008 eines Studienteilnehmers mit abnormer Nüchternnglucose aus Bild 46. Abkürzungen: L1: Kleines HDL, L2: Mittleres HDL, L3: Großes HDL, L4: sehr großes HDL, L5: sehr kleines LDL, L6: kleines LDL, L7: Mittleres LDL, L8: Großes LDL, L9: sehr großes LDL, L10: IDL, L11: Kleines VLDL, L12: Großes VLDL, L13: Remnants, L14: Kleine Chylomikronen, L15: Große Chylomikronen.

Bild 48 zeigt die Spektren der Rückstellproben eines Prädiabetikers mit gestörter Glucosetoleranz. Die Methylensignale der vier Spektren der Rückstellproben unterscheiden sich sowohl in ihrer Höhe als auch in ihrer Form in starkem Maße voneinander (vergleiche Bild 48 (a)). Die neueste Rückstellprobe weist ein weniger spitzes Maximum des Methylensignals auf.

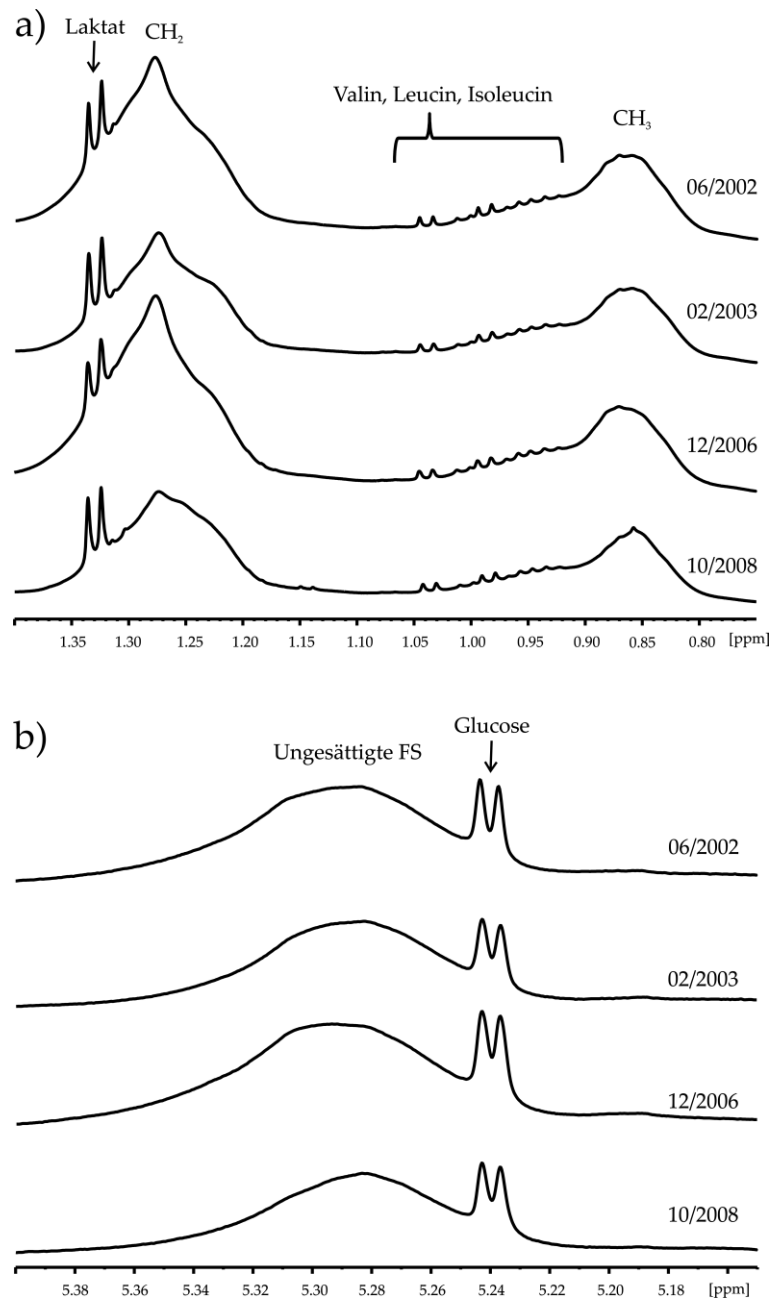


Bild 48: Zeitlicher Verlauf: Vergleich des Methyl- und Methylenbereichs und des Bereichs mit dem Glucosesignal und den ungesättigten Fettsäuren der $1D-^1H$ -NMR-Spektren der Rückstellproben eines Prädiabetikers mit gestörter Glucosetoleranz. Die $1D-^1H$ -Spektren wurden bei $T=310$ K am 600 MHz-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygprr1d* aufgenommen. Die humanen EDTA-Plasmaproben wurden während einer Blutspende entnommen und bei -80 °C in der Biobank gelagert.

Die Methylsignale verändern im Verlauf der sieben Jahre ebenfalls ihre Form. Vergleicht man die in Bild 49 gezeigten Lipoproteinprofile der Spektren aus Bild 48, so

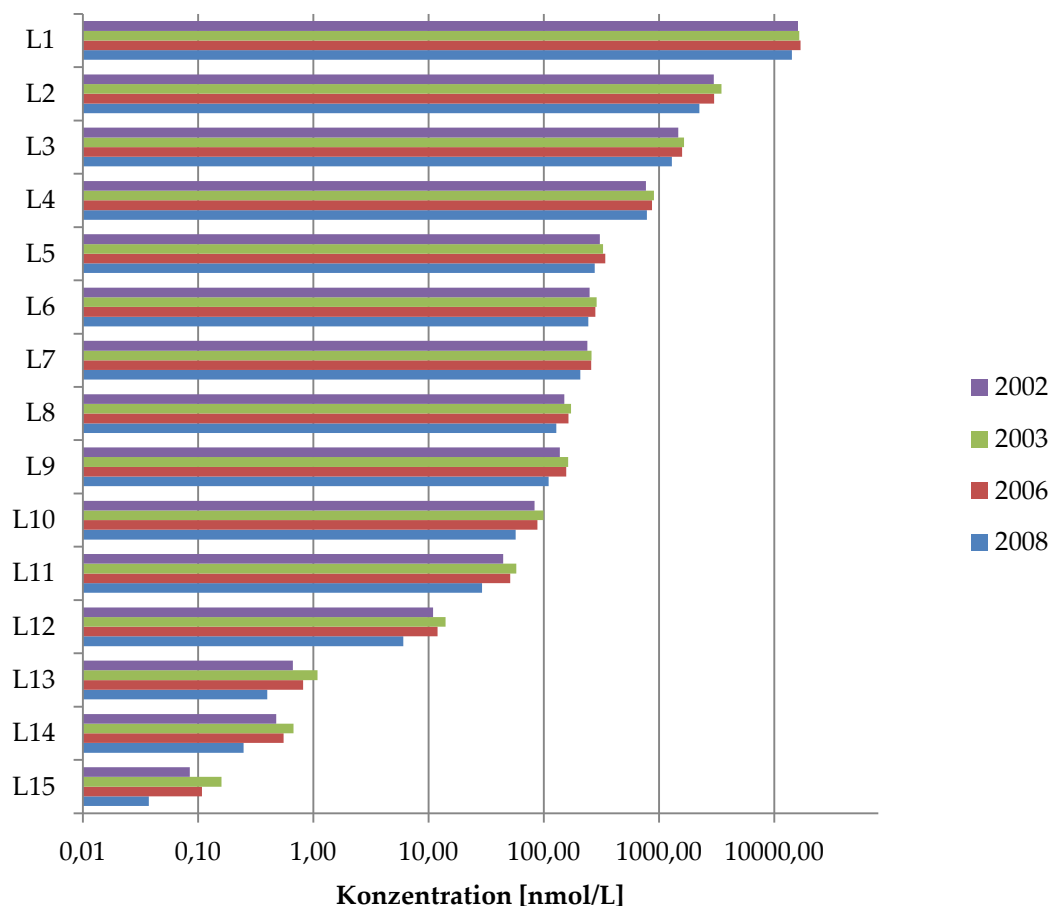


Bild 49: Lipoproteinprofile der Spektren der Rückstellproben von 2002 bis 2008 eines Studienteilnehmers mit gestörter Glucosetoleranz aus. Aufgetragen ist die Konzentration der Lipoproteinsubklassen. Abkürzungen: L1: Kleines HDL, L2: Mittleres HDL, L3: Großes HDL, L4: sehr großes HDL, L5: sehr kleines LDL, L6: kleines LDL, L7: Mittleres LDL, L8: Großes LDL, L9: sehr großes LDL, L10: IDL, L11: Kleines VLDL, L12: Großes VLDL, L13: Remnants, L14: Kleine Chylomikronen, L15: Große Chylomikronen.

erkennt man einen deutlichen Unterschied der Profile von 2003 und 2006 zu den von 2002 und 2008.

Die Konzentrationen der Lipoproteinsubklassen nehmen von 2002 bis 2003 zu und anschließend ab (2006 bis 2008). Das Glucose-Signal und das Signal der ungesättigten Fettsäuren in Bild 48 (b) sind in allen vier Spektren der Rückstellproben relativ konstant.

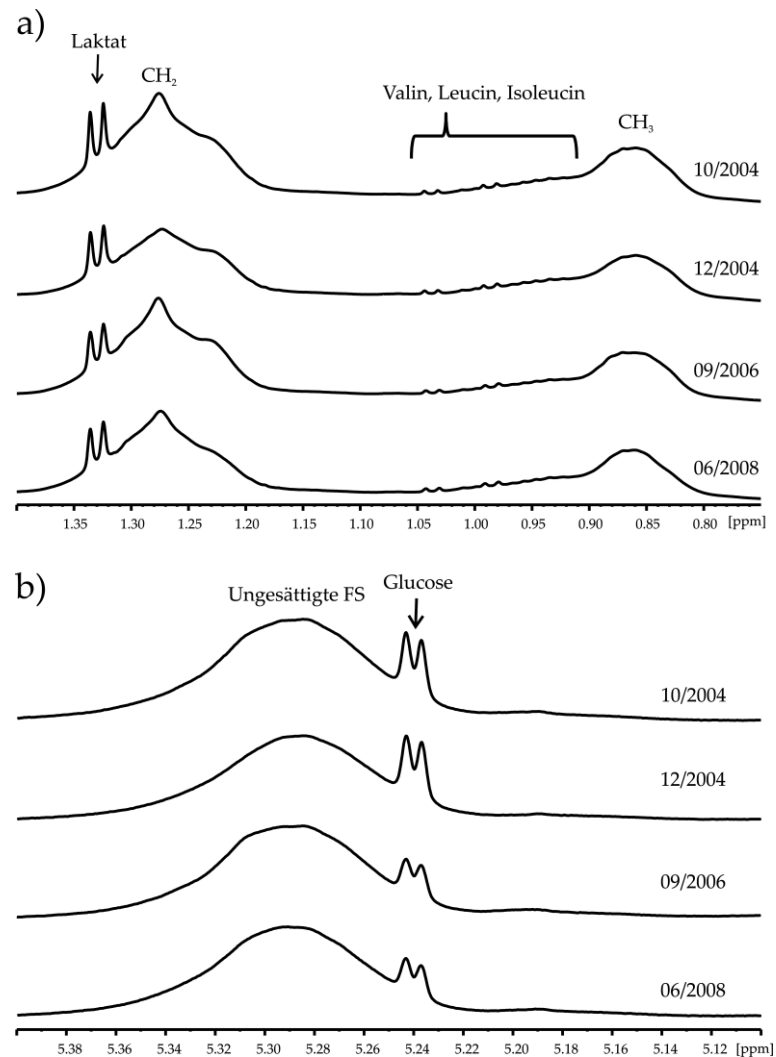


Bild 50: Zeitlicher Verlauf: Vergleich des Methyl- und Methylenbereichs und des Bereichs mit dem Glucose-Signal und den ungesättigten Fettsäuren der 1D-¹H-NMR-Spektren der Rückstellproben eines Prädiabetikers mit IFG und IGT. Die 1D-¹H-Spektren wurden bei T=310 K am 600 MHz-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz noesygppr1d aufgenommen. Die humanen EDTA-Plasmaproben wurden während einer Blutspende entnommen und bei -80 °C in der Biobank gelagert.

In Bild 50 sind Spektren der Rückstellproben eines Prädiabetikers mit abnormer Nüchtern-glucose und gestörter Glucosetoleranz dargestellt. Der CH₂-Bereich in Bild 50 (a) ändert bei den Spektren seine Form im Verlauf der sieben Jahre. Die linke Schulter dieses Signals bleibt hierbei relativ gleich. Diese Spektren der Rückstellproben zeigen starke Unterschiede. Dies kann mit Hilfe der Lipoproteinprofile aus Bild 51 belegt werden. Vor allem die Rückstellprobe von 2006 weicht stark von den übrigen ab.

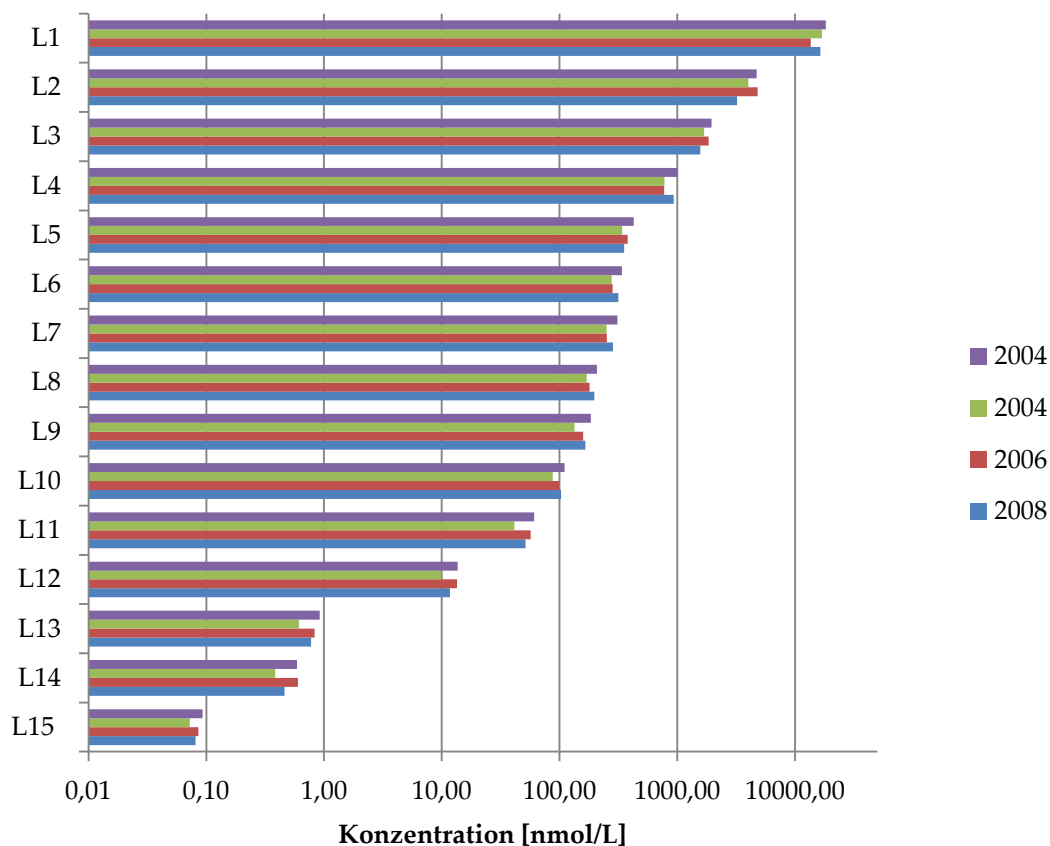


Bild 51: Lipoproteinprofile der Spektren der Rückstellproben von 2004 bis 2008 eines Studienteilnehmers mit abnormer Nüchternnglucose und gestörter Glucoetoleranz aus. Aufgetragen ist die Konzentration der Lipoproteinsubklassen. Abkürzungen: L1: Kleines HDL, L2: Mittleres HDL, L3: Großes HDL, L4: sehr großes HDL, L5: sehr kleines LDL, L6: kleines LDL, L7: Mittleres LDL, L8: Großes LDL, L9: sehr großes LDL, L10: IDL, L11: Kleines VLDL, L12: Großes VLDL, L13: Remnants, L14: Kleine Chylomikronen, L15: Große Chylomikronen.

Der in Bild 50 (b) gezeigte Bereich der Spektren unterscheidet sich nicht signifikant voneinander. Ein minimaler Abfall der Glucose-Konzentration ist zu den neueren Proben hin zu beobachten.

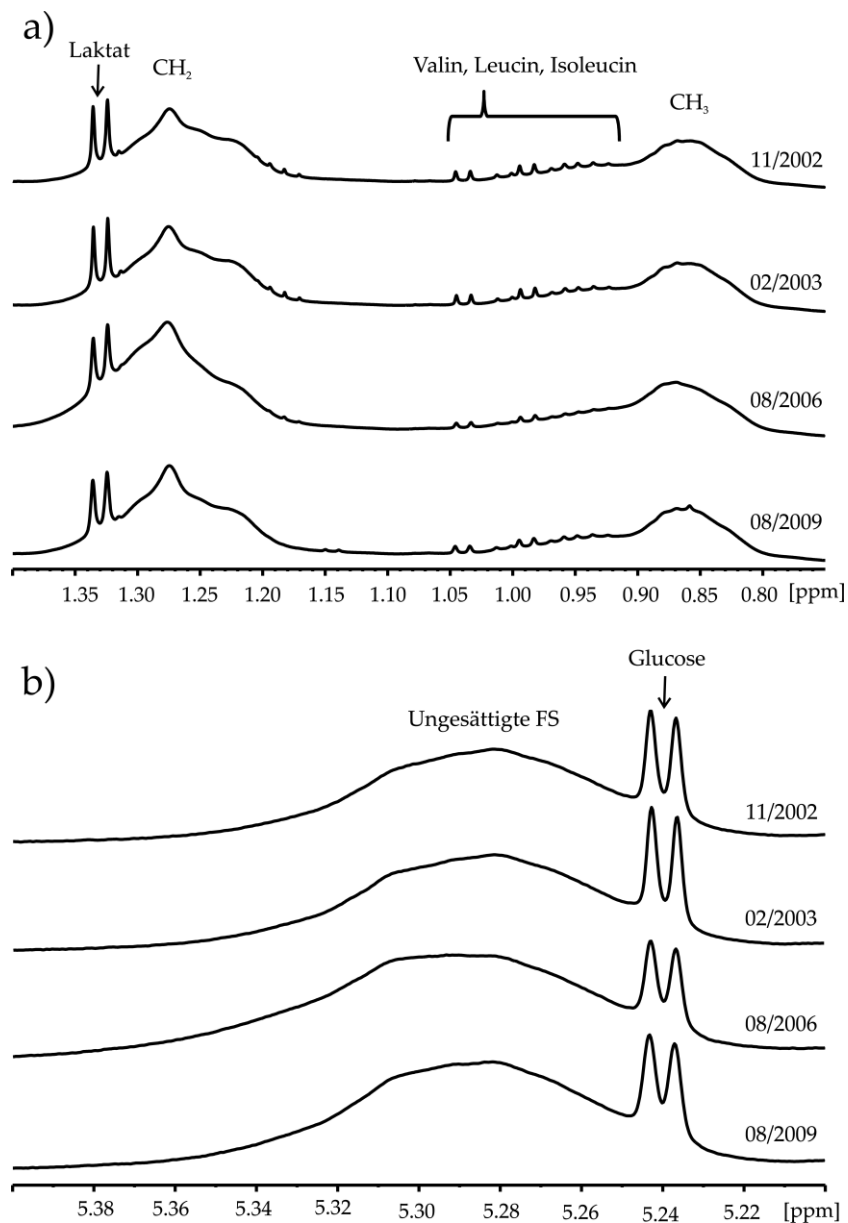


Bild 52: Zeitlicher Verlauf: Vergleich des Methyl- und Methylenbereichs und des Bereichs mit dem Glucose-Signal und den ungesättigten Fettsäuren der $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Spektren der Rückstellproben eines Diabetikers. Die $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Spektren wurden bei $T=310\text{ K}$ am 600 MHz-NMR -Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* aufgenommen. Die humanen EDTA-Plasmaproben wurden während einer Blutspende entnommen und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ in der Biobank gelagert.

Bild 52 zeigt die Spektren der Rückstellproben eines Diabetikers. Die Form des Methylenbereichs der Spektren weicht relativ stark voneinander ab. Die Signale haben im Vergleich zu denen eines gesunden Studienteilnehmers qualitativ eine abweichende

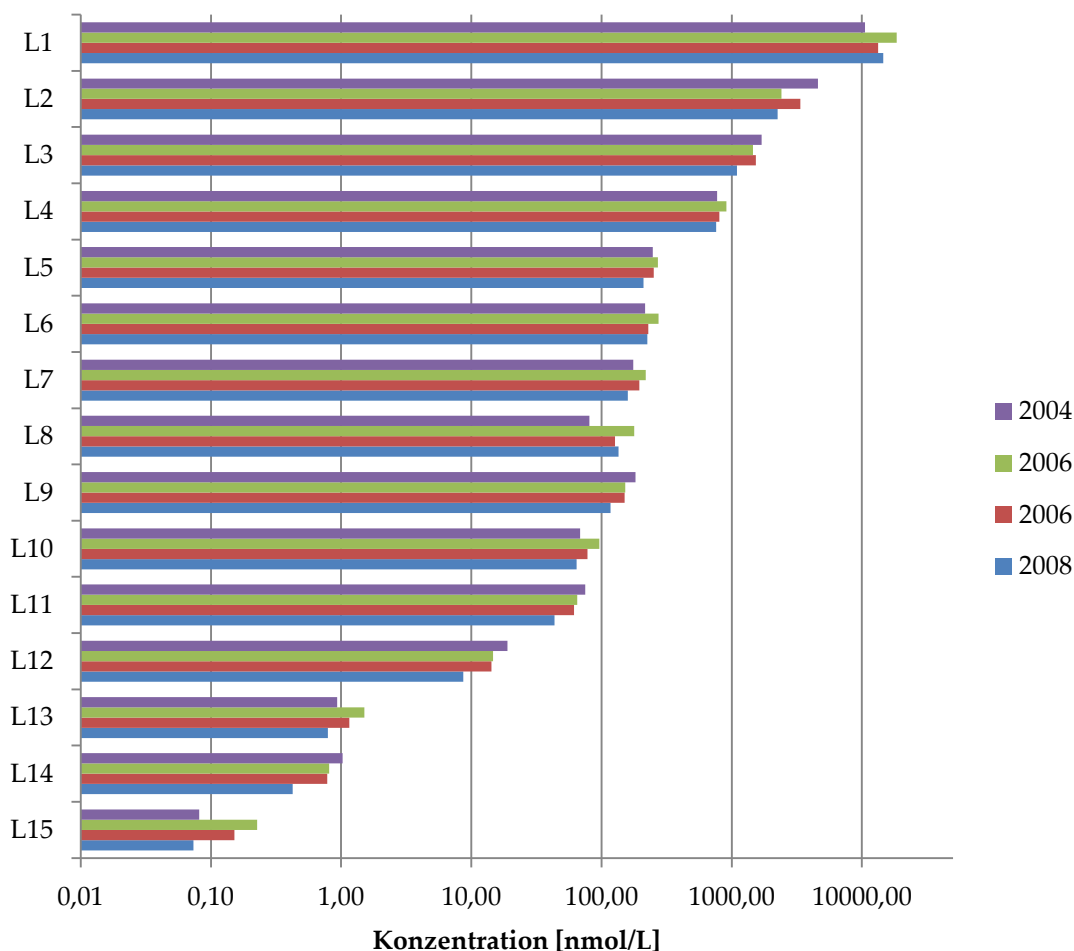


Bild 53: Lipoproteinprofile der Spektren der Rückstellproben von 2004 bis 2008 eines Diabetikers aus Bild 52. Abkürzungen: L1: Kleines HDL, L2: Mittleres HDL, L3: Großes HDL, L4: sehr großes HDL, L5: sehr kleines LDL, L6: kleines LDL, L7: Mittleres LDL, L8: Großes LDL, L9: sehr großes LDL, L10: IDL, L11: Kleines VLDL, L12: Großes VLDL, L13: Remnants, L14: Kleine Chylomikronen, L15: Große Chylomikronen.

Form. Die Lipoproteinprofile in Bild 53 zeigen, dass die Konzentrationen von L9 bis L12 innerhalb der vier Jahre stark sinken.

Keinen signifikanten Unterschied kann man bei dem Glucosesignal und den Signalen der ungesättigten Fettsäuren der vier Rückstellproben in Bild 52 (b) feststellen. Eine Diskussion dieser in den Spektren der Diabetes-Studie beobachteten Veränderungen und Merkmale der gesunden Studienteilnehmer, Prädiabetiker und Diabetiker ist in 4.1 zu finden.

3.1.3 Metabolomische Auswertung der Lipoproteinprofile mit Hilfe der logistischen Regressionsanalyse

In folgendem Abschnitt werden die Ergebnisse der metabolomischen Auswertung der berechneten Lipoproteinprofile dargestellt. Hierbei wird die Auswertung der Daten mit Hilfe der in Abschnitt 1.5.3 erläuterten logistischen Regression bezüglich Biomarker für den Prädiabetes bzw. Typ-2-Diabetes analysiert.

Wie in Abschnitt 2.1.5 beschrieben, wurde vor der Auswertung eine Log-Transformation mit Hilfe des natürlichen Logarithmus der gesamten Daten durchgeführt. Anschließend wird mit Hilfe des Programms R die logistische Regression auf die Daten angewendet. Diese Methode eignet sich aufgrund der binären Zielvariablen für die statistische Analyse dieser Daten. Hierbei wird zuerst untersucht, ob signifikante Unterschiede innerhalb der Lipoproteinsubklassen zwischen den gesunden Studienteilnehmern und den Studienteilnehmern mit Prädiabetes, d. h. Personen mit IFG, IGT oder IFG und IGT, innerhalb der Nüchternplasmaproben existieren. Anschließend werden die Diabetiker dem Kollektiv hinzugefügt. Des Weiteren werden die oGTT-Proben, d. h. die Plasma-Proben, die zwei Stunden nach Glucose-Einnahme entnommen wurden, mit Hilfe dieser statistischen Methode untersucht.

3.1.3.1 Analyse der Nüchternplasmaproben

In folgendem Abschnitt werden die Nüchternplasmaproben, welche zu Beginn des oralen Glucosetoleranztests entnommen wurden, mit Hilfe der logistischen Regressionsanalyse untersucht. In Tabelle 26 ist eine Beschreibung dieses Probenkollektivs zu finden. Dieses Kollektiv umfasst 431 Personen, von denen ein Großteil (etwa 84 %) gesund und prädiabetisch mit IFG sind. Die übrigen oGTT-Gruppen sind deutlich kleiner und besitzen eine Probenanzahl zwischen 20 und 29.

Bei der logistischen Regressionsanalyse der Nüchternplasmaproben wurde zuerst kontrolliert, ob ein Unterschied der Lipoproteinsubklassen unter Berücksichtigung des Basic Modells (Alter, BMI und Geschlecht) zwischen den Gesunden und den Prädiabetikern oder Diabetikern dieses Probenkollektivs besteht. Bei den Lipoproteinsubklassen der Gruppen war kein signifikanter Unterschied festzustellen (Im Folgenden werden die Ergebnisse der logistischen Regression der Nüchternplasmaproben zusammengefasst. Tabelle 41 zeigt die Analyse der gesunden Studienteilnehmer und Prädiabetiker in Hinblick auf Korrelationen.

Tabelle 41 und Tabelle 42 im Anhang). Dasselbe Ergebnis erhält man bei der logistischen Regressionsanalyse der Lipoproteinfraktionen.

Tabelle 26Beschreibung des Probenkollektivs.^{a, b, c}

oGTT- Ergebnis	Alle (n=431)	1 ^c (n=192)	2 ^c (n=169)	3 ^c (n=21)	4 ^c (n=29)	5 ^c (n=20)
Männer	266	101	122	14	15	14
Frauen	165	91	47	7	14	6
Alter [Jahre]	53,9 ± 9,2	52,3 ± 10,4	54,5 ± 7,7	56,4 ± 7,8	56,0 ± 8,7	57,3 ± 6,6
BMI [kg/m ²]	28,54 ± 3,9	27,59 ± 4,0	29,03 ± 3,5	29,89 ± 3,5	30,37 ± 4,5	29,55 ± 4,0
NPG ^a [mmol/l]	102,2 ± 12,8	93,5 ± 4,2	106,5 ± 5,4	96,0 ± 3,5	113,2 ± 6,5	140,0 ± 22,1
PG ^b [mmol/l]	111,7 ± 35,4	100,0 ± 19,2	106,8 ± 21,9	152,7 ± 11,1	160,9 ± 14,4	150,2 ± 103,3

a Nüchternplasmaglucose.*b* Plasmaglucose zwei Stunden nach Glucoseeinnahme.*c* 1: Gesunde Person, 2: abnorme Nüchternglucose, 3: gestörte Glucosetoleranz, 4: gestörte Nüchternglucose und gestörte Glucosetoleranz und 5: Diabetes.

3.1.3.2 Analyse der oGTT-Proben

3.1.3.2.1 Vergleich der gesunden Studienteilnehmer mit den Prädiabetikern

In folgendem Abschnitt werden die Plasma-Proben untersucht, welche zwei Stunden nach Glucose-Einnahme entnommen wurden. Wendet man eine logistische Regression auf das Kollektiv der Gesunden und Prädiabetiker an, so erhält man mit Hilfe des Programms R das in Tabelle 27 zusammengefasste Ergebnis. In die Berechnungen sind als sog. Basic Modell die patientenspezifischen Daten wie das Alter, Geschlecht und der BMI integriert. Hierbei zeigt sich, dass die Lipoproteinsubklassen L2, L5, L11, L12 und L13 signifikante Risikofaktoren für Prädiabetes sind, das heißt $p < 0,05$. Der Regressionskoeffizient β kann wie folgt interpretiert werden: Ist β positiv, so nimmt das Risiko an Prädiabetes zu erkranken mit der Variablen zu. Der Betrag von β gibt das Ausmaß der Veränderung an. Mit steigendem Wert von L5, L12 und L13 sinkt das Prädiabetes-Risiko. Für steigende L2- und L11-Werte, ist das Risiko an Prädiabetes zu erkranken, erhöht. Für L2 ergibt sich ein p-Wert von kleiner 0,001. Das bedeutet, dass für diese Parameter die Nullhypothese verworfen werden kann. Die Nullhypothese besagt, dass

sich die Parameter der gesunden nicht von denen der an Prädiabetes erkrankten Teilnehmern unterscheiden. Wie in Tabelle 27 zu sehen, korreliert auch das Geschlecht, das Alter und der BMI mit dem Gesundheitszustand der Studienteilnehmer. Wie bereits bekannt, steigt mit steigendem Alter und BMI das Risiko an Diabetes zu erkranken. Für Frauen ist das Risiko an Diabetes zu erkranken, signifikant erniedrigt ($OR = 0,55$). Die übrigen Lipoproteinsubklassen (L1, L3, L4 und L6-L10) weisen keinen signifikanten p-Wert auf, d. h. es gilt: $p > 0,05$. Daher kann für diese die Nullhypothese nicht verworfen werden. Des Weiteren findet eine Verschiebung zwischen L11 und den beiden Lipoproteinsubklassen L12 und L13 statt.

Tabelle 27

Logistische Regressionsanalyse der Proben, die zwei Stunden nach Glucose-Einnahme entnommen wurden, der Gesunden und der Prädiabetiker.^{a, b, c}

	Beschreibung	Regressionskoeffizient β_j .	Standardfehler	z-Wert	p-Wert		Mittelwert von Gesunden	Mittelwert von Diabetikern
BMI		0,09	0,03	3,352	0,001	***		
Ge-		-0,59	0,22	-2,62	0,009	**		
schlecht								
Alter		0,03	0,01	2,23	0,026	*		
L1	Kleines HDL	-156,46	103,88	-1,51	0,132		14,99± 1,91	15,39± 2,02
L2	Mittleres HDL	129,58	0,360	3,60	0,000	***	5,11 ± 2,27	5,35 ± 2,22
L3	Großes HDL	-0,83	107,85	-0,77	0,442		4,68 ± 1,72	4,49 ± 1,60
L4	Sehr großes HDL	280,99	222,04	1,27	0,206		5,26 ± 0,84	5,41 ± 0,83
L5	Sehr kleines LDL	-577,00	289,30	-1,99	0,046	*	3,90 ± 1,01	3,90 ± 0,95
L6	Kleines LDL	425,47	403,52	1,05	0,292		5,59 ± 0,97	5,78 ± 1,05
L7	Mittleres LDL	546,55	482,90	1,13	0,258		6,54 ± 1,28	6,71 ± 1,29
L8	Großes LDL	-354,82	411,79	-0,86	0,389		6,44 ± 1,39	6,82 ± 1,73
L9	Sehr großes LDL	-700,01	468,47	-1,49	0,135		7,58 ± 2,59	8,06 ± 2,45
L10	IDL	574,49	650,14	0,88	0,377		6,26 ± 1,83	6,62 ± 1,99
L11	Kleines VLDL	1414,25	679,29	2,08	0,037	*	5,30 ± 2,65	5,72 ± 2,56
L12	Großes VLDL	-1361,66	563,11	-2,42	0,016	*	3,53 ± 2,02	3,67 ± 1,60

L13	Remnants	-465,94	220,83	-2,11	0,035	*	1,49 ± 0,84	1,62 ± 0,91
L14	Kleine Chylo- mikronen	404,05	281,61	1,44	0,151		1,79 ± 1,40	1,86 ± 1,10
L15	Große Chylo- mikronen	0,35	0,65	0,54	0,589		0,77 ± 0,61	0,77 ± 0,61

^a L1-L15: gewichtete Integrale der Gaußkurve der Lipoproteinsubklassen L1 bis L15.

^b ***: $p \leq 0,001$ // **: $0,001 < p \leq 0,01$ // *: $0,01 < p \leq 0,05$.

^c Regressionskoeffizient $\beta > 0$, so nimmt das Risiko an Prädiabetes zu erkranken mit der Variablen zu. Der Betrag von β gibt das Ausmaß der Veränderung an. β gibt den Anstieg pro Einheitsänderung an.

Um eine Aussage über die Qualität der Vorhersage treffen zu können, wird eine ROC (engl.: Receiver operating characteristic)-Kurve erstellt (vgl. Bild 54). Je weiter die Kurve von der Diagonalen abweicht, desto besser kann der Signifikanztest die gesunden Studienteilnehmern von den Prädiabetikern unterscheiden.

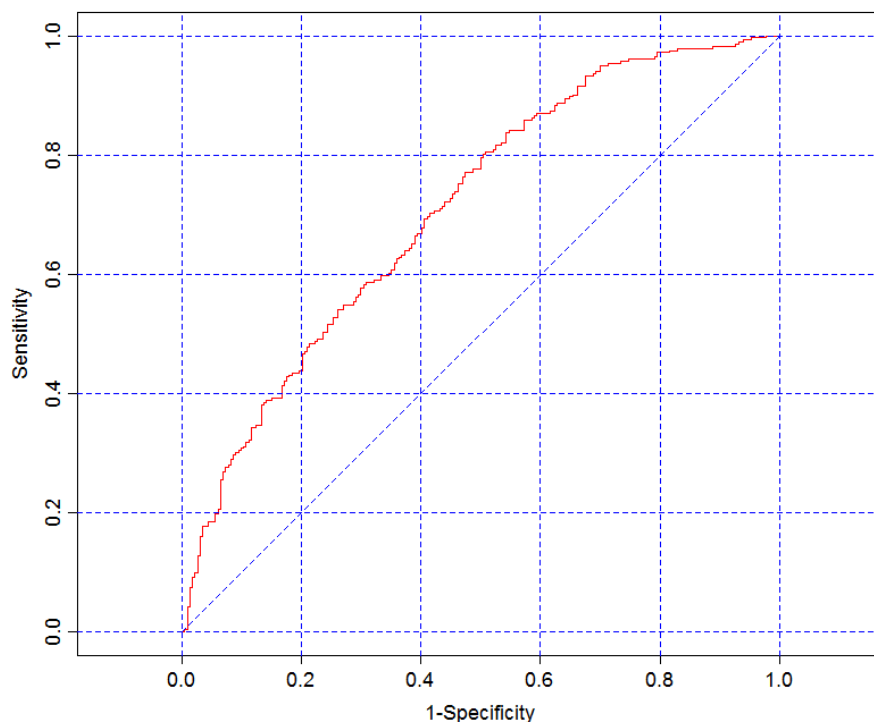


Bild 54: ROC Kurve zur Unterscheidung der Gesunden von den Prädiabetikern: Aufgetragen ist die Sensitivität auf der y -Achse gegen die Spezifität auf der x -Achse. Je näher die Kurve sich der Diagonalen annähert, umso weniger kann man die gesunden Studienteilnehmer von den Prädiabetikern unterscheiden.

3.1.3.2.2 Untersuchung der Lipoproteinklassen

Führt man eine logistische Regressionsanalyse bezüglich der Lipoproteinfraktionen durch, indem man die jeweiligen Lipoproteinsubklassen addiert, so erhält man beim Vergleich von Gesunden und Prädiabetikern das in Tabelle 28 gezeigte Ergebnis. Bei den Elementen des Basic Modells wird ein signifikanter Unterschied zwischen gesunden Studienteilnehmern und solchen, die an Prädiabetes leiden, errechnet. Des Weiteren findet man eine signifikante Korrelation zwischen den Chylomikronen und der Lipoproteinklasse HDL und Prädiabetes. Laut Tabelle 28 steigt mit größer werdendem HDL das Risiko an Prädiabetes zu erkranken. Gegensätzlich verhält sich der Zusammenhang zwischen Prädiabetes und den Chylomikronen. Bei den Lipoproteinklassen VLDL, IDL und LDL existiert kein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Studienteilnehmern und Prädiabetikern.

Tabelle 28

Logistische Regression der oGTT-Proben für die Unterscheidung von Gesunden und Prädiabetikern.^{a, b, c, d}

	Regressions- koeffizient β_j	Standard- fehler	z-Wert	p-Wert	
BMI	0,12	0,03	4,63	3,59e-06	***
Alter	0,02	0,011	2,23	0,02556	*
Geschlecht	-0,64	0,21	-3,04	0,00241	**
Chylomikronen	-211,86	0,76	-2,80	0,00509	**
Remnants	0,83	0,66	1,26	0,20824	
VLDL	197,59	150,37	1,31	0,18886	
IDL	-0,46	130,55	-0,35	0,72583	
LDL	-0,16	136,060	-0,12	0,90391	
HDL	201,60	101,67	1,98	0,04738	*

^a Summe über Lipoproteinsubklassen ergibt die jeweiligen Lipoproteinfraktionen.

^b ***: $p \leq 0,001$ // **: $0,001 < p \leq 0,01$ // *: $0,01 < p \leq 0,05$.

^c: Regressionskoeffizient $\beta > 0$, so nimmt das Risiko an Prädiabetes zu erkranken mit der Variablen zu. Der Betrag von β gibt das Ausmaß der Veränderung an. β gibt den Anstieg pro Einheitsänderung an.

^d: oGTT-Proben: Proben, die zwei Stunden nach der Glucose-Einnahme entnommen wurden.

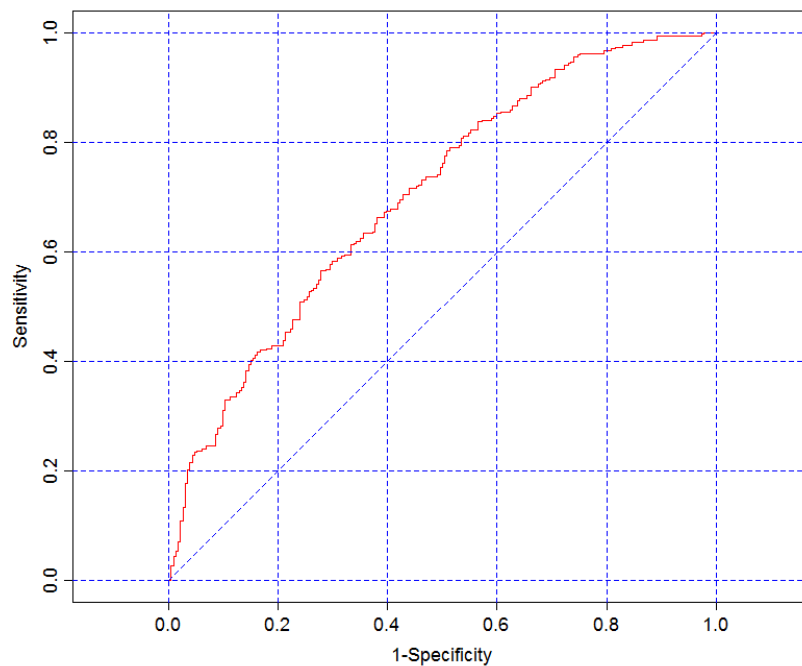


Bild 55: ROC-Kurve des logistischen Regressionsmodells von Gesunden versus Prädiabetikern und Diabetikern.

3.1.3.2.3 Logistische Regressionsanalyse der gesunden und an Prädiabetes und Diabetes erkrankten Studienteilnehmern an den oGTT-Proben

Anschließend wird die logistische Regressionsanalyse auf das gesamte Studienkollektiv angewendet, d. h. auf gesunde Studienteilnehmer, Prädiabetiker und Diabetiker. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 29 dargestellt. Wie bei der logistischen Regression im letzten Abschnitt, bei dem analysiert wurde, ob ein signifikanter Unterschied der Lipoproteinsubklassen und des Basic Modells zwischen den Gesunden und Diabetikern und Prädiabetikern besteht, weisen dieselben Lipoproteinsubklassen (L2, L5, L11, L12 und L13) signifikante Ergebnisse auf. Die zugehörige ROC-Kurve ist in Bild 55 zu sehen.

Tabelle 29

Logistische Regressionsanalyse der oGTT-Proben von Gesunden und Prädiabeikern und Diabetikern.^{a, b, c, d}

		Regressions- koeffizient β_j	Standard- fehler	z-Wert	p-Wert	
BMI		0,10	0,03	3,58	0,0003	***
Geschlecht		-0,62	0,22	-2,86	0,0042	**
Alter		0,03	0,01	2,34	0,0193	*
L1	Kleines HDL	-0,07	0,07	-1,10	0,2723	
L2	Mittleres HDL	148,02	0,36	4,16	0,0000	***
L3	Großes HDL	-115,94	104,98	-1,10	0,2694	
L4	Sehr großes HDL	249,95	214,50	1,17	0,2439	
L5	Sehr kleines LDL	-519,29	274,75	-1,89	0,0587	.
L6	Kleines LDL	437,00	393,89	1,11	0,2672	
L7	Mittleres LDL	442,21	443,99	1,00	0,3193	
L8	Großes LDL	-286,58	399,41	-0,72	0,4731	
L9	Sehr großes LDL	-670,89	444,66	-1,51	0,1314	
L10	IDL	435,37	614,02	0,71	0,4783	
L11	Kleines VLDL	1438,04	659,42	2,18	0,0292	*
L12	Großes VLDL	-1187,19	535,10	-2,22	0,0265	*
L13	Remnants	-449,39	215,17	-2,09	0,0368	*
L14	Kleine Chylomik- ronen	280,88	272,56	1,03	0,3028	
L15	Große Chylomik- ronen	0,33	0,64	0,51	0,6108	

^a L1-L15: gewichtete Integrale der Gaußkurve der Lipoproteinsubklassen L1 bis L15.

^b ***: $p \leq 0,001$ // **: $0,001 < p \leq 0,01$ // *: $0,01 < p \leq 0,05$.

^c Regressionskoeffizient $\beta > 0$, so nimmt das Risiko an Prädiabetes zu erkranken mit der Variablen zu. Der Betrag von β gibt das Ausmaß der Veränderung an. β gibt den Anstieg pro Einheitsänderung an.

^d oGTT-Proben: Proben, die zwei Stunden nach der Glucose-Einnahme entnommen wurden.

Wendet man die logistische Regressionsanalyse auf die Lipoproteinfraktionen an, so ergibt sich das in Tabelle 30 zusammengefasste Ergebnis. Zusätzlich zu BMI, Alter und Geschlecht zeigt sich bei den Chylomikronen und den HDLs ein signifikanter Unter-

schied zwischen den gesunden Studienteilnehmern und den Prädiabetikern und Diabetikern. Mit steigendem Alter, BMI, L2 und L11 steigt das Risiko an Prädiabetes und Diabetes zu erkranken. Für L5, L12 und L13 sinkt das Risiko. Die gesunden und die an Prädiabetes und Diabetes erkrankten Studienteilnehmer unterscheiden sich nicht signifikant bezüglich der übrigen Lipoproteinklassen, wie VLDL, IDL und LDL.

Tabelle 30

Logistische Regressionsanalyse aller oGTT-Gruppen der Studienteilnehmer.^{a, b, c, d}

	Regressions- koeffizient β_j	Standardfeh- ler	z-Wert	p-Wert	
BMI	0,13	0,03	5,13	2,94e-07	***
Alter	0,02	0,01	2,39	0,0171	*
Geschlecht	-0,69	0,20	-3,44	0,0006	***
Chylomikronen	-205,77	0,85	-2,41	0,0160	*
VLDL	272,24	148,48	1,83	0,0667	.
IDL	0,72	114,39	0,63	0,5280	
LDL	-180,17	126,90	-1,42	0,1557	
HDL	276,86	0,98	2,82	0,0048	**

^a Summe über Lipoproteinsubklassen ergibt die jeweiligen Lipoproteinfraktionen.

^b ***: $p \leq 0,001$ // **: $0,001 < p \leq 0,01$ // *: $0,01 < p \leq 0,05$.

^c Regressionskoeffizient $\beta > 0$, so nimmt das Risiko an Prädiabetes zu erkranken mit der Variablen zu. Der Betrag von β gibt das Ausmaß der Veränderung an. β gibt den Anstieg pro Einheitsänderung an.

^d oGTT-Proben: Proben, die zwei Stunden nach der Glucose-Einnahme entnommen wurden.

Mit Hilfe der MATLAB-Routine konnten die Relativkonzentrationen einiger kleiner Metaboliten bestimmt werden. Im Rahmen einer logistischen Regressionsanalyse konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den gesunden Studienteilnehmern und den Prädiabetikern bezüglich der kleinen Metaboliten nachgewiesen werden (vergleiche Tabelle 43 im Anhang).

3.2 Hochdruck-NMR-Messungen an Serum und Lipoproteinen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ebenfalls Hochdruck-NMR-Messungen an Serum und Lipoproteinen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Messungen werden in diesem Abschnitt dargestellt und anschließend in Abschnitt 4.2 diskutiert. Die NMR-Spektren des Serums und der Lipoproteine wurden, wie in Abschnitt 2.2.3 erläutert, druckabhängig (Normaldruck bis 200 MPa in 20 MPa-Intervallen) an einem 800 MHz BRUKER AVANCE NMR-Spektrometer bei den Temperaturen $T = 283K$ und $T = 313K$ aufge-

nommen. In folgendem Abschnitt werden zunächst die druckabhängigen NMR-Spektren des Serums und der einzelnen Lipoproteinklassen qualitativ untersucht. Dabei werden die druckabhängigen Änderungen der Signalmaxima der NMR-Signale charakterisiert. Anschließend wird die Druckabhängigkeit des Integrals eines größeren Spektrenbereichs (von etwa $\delta = -2,00$ bis $3,5$ ppm, siehe Tabelle 16) der Serum- und Lipoprotein-Proben mit Hilfe einer Taylorreihe nach der Funktion (1.3) gefittet und analysiert. Im Anschluss wird die Druckabhängigkeit der CH₂-, CH₃- und Cholin-Kopfgruppen-Signalintegrale der Lipoprotein- und Serum-Proben untersucht. Des Weiteren werden die druckabhängigen Veränderungen der chemischen Verschiebung einzelner Signale der Lipoproteinklassen und des Serums analysiert. Diese Daten werden ebenfalls mit (1.3) gefittet und erläutert. Anschließend folgt die thermodynamische Analyse dieser Daten mit Hilfe eines Drei-Kompartimentmodells nach den Gleichungen (2.3) und (2.16).

Abschließend wird die Reversibilität der Druck- und Temperatureffekte der untersuchten Serum- und Lipoprotein-Proben überprüft.

Die Referenzierung der Spektren mit Hilfe des DSS-Signals wurde bereits von Baumstark in [85] diskutiert. Daher wurde das Spektrum auf das Acetat-Signal referenziert, indem das Acetat-Signal auf $\delta = 1,875$ ppm gesetzt wurde, da DSS, wie bereits von Baumstark beobachtet, mit den Lipoproteinen wechselwirkt. Acetat ist Bestandteil des extrazellulären Puffers, der wie in Abschnitt 2.2.1 gezeigt für die Probenherstellung verwendet wurde.

3.2.1 Qualitative Untersuchung der druckabhängigen 1D-¹H-NMR-Spektren des Serums und der Lipoproteine

Dieser Abschnitt zeigt die Ergebnisse der Hochdruck-NMR-Messungen an Serum und den Lipoproteinen, die, wie in Abschnitt 2.2.1 dargestellt, hergestellt wurden. In diesem Abschnitt werden die druckabhängigen NMR-Spektren auf die Veränderungen ihrer Signalhöhen, chemischer Verschiebung und der Signalform untersucht. Darüber hinaus werden Auffälligkeiten, die während der Druckreihe auftreten, dargestellt. Im Folgenden wird, wie bereits erwähnt, die Höhe einzelner Signale charakterisiert. Hierbei handelt es sich in allen Fällen um das Signalmaximum der jeweiligen Bindung (CH₂- und CH₃-Gruppen oder Cholin-Kopfgruppen), was als Intensität bezeichnet wird. In Tabelle 31 am Ende dieses Abschnitts sind die Änderungen der Signalmaxima der CH₂- und CH₃-Gruppen-Signale der Serum- und Lipoprotein-Proben zusammengefasst.

Zunächst werden die Hochdruck-NMR-Spektren an Serum bei einer Temperatur von $T = 283\text{ K}$ untersucht. In Bild 56 ist ein Überblick über diese druckabhängigen NMR-Spektren im Bereich zwischen $\delta = 4,5$ und $0,0\text{ ppm}$ bei einer Temperatur von $T = 283\text{ K}$ (vergleiche Bild 56 (a)) und $T = 313\text{ K}$ (siehe Bild 56 (b)) dargestellt. Da die größten Veränderungen im Methyl- und Methylenbereich des NMR-Spektrums auftreten,

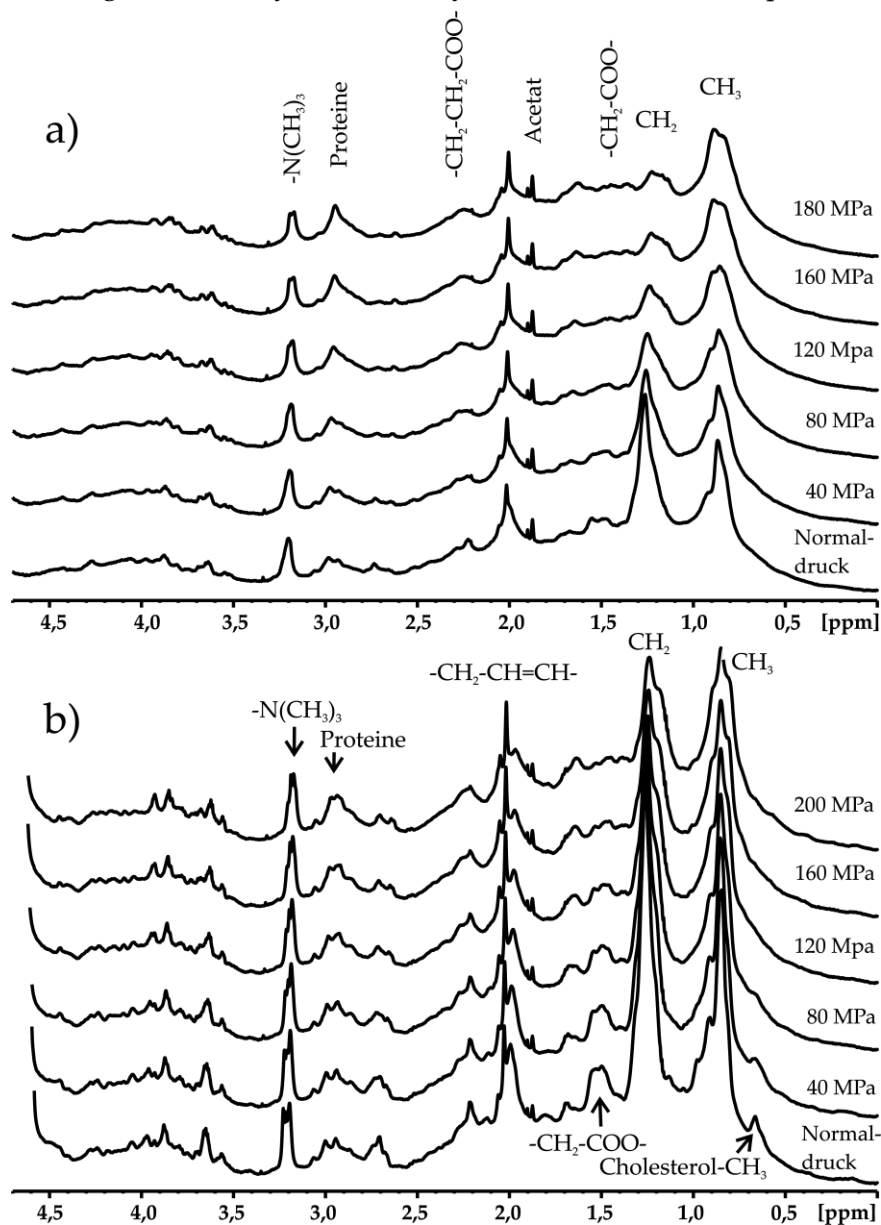


Bild 56: Druckabhängige $1\text{D-}^1\text{H}$ -Spektren von Serum mit der Pulssequenz *noesygppr1d* gemessen an einem 800 MHz -BRUKER-NMR-Spektrometer bei (a) $T=283\text{ K}$ und (b) $T=313\text{ K}$ ($\delta = 0$ bis $4,75\text{ ppm}$, Normaldruck bis $p=200\text{ MPa}$). Eine detailliertere Ansicht des CH_2 - und CH_3 -Bereichs für beide Temperaturen ist in Bild 57 dargestellt. Die Spektren besitzen dieselbe Skalierung.

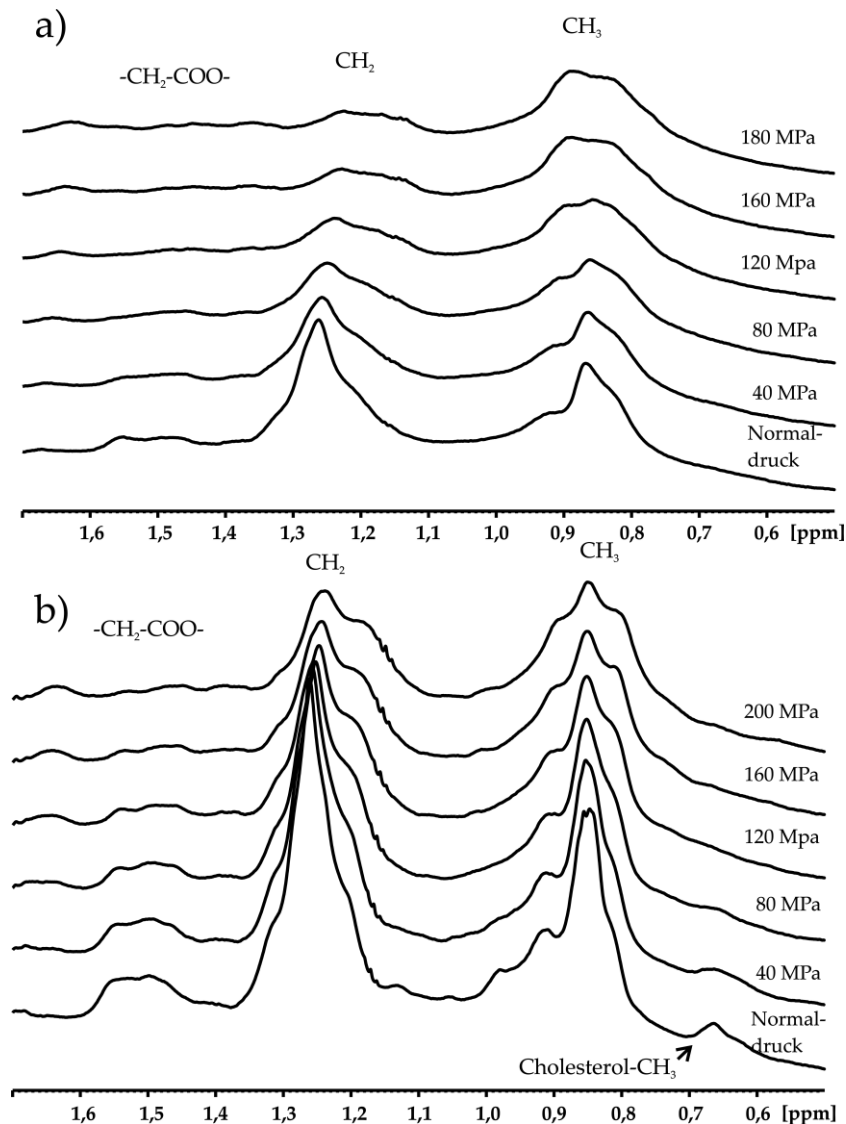


Bild 57: Methyl- und Methylen-signale der druckabhängigen $1\text{D-}^1\text{H}$ -Spektren von Serum mit der Pulssequenz *noesygppr1d* aufgenommen an einem 800 MHz -BRUKER-NMR-Spektrometer bei (a) $T = 283\text{ K}$ und (b) $T = 313\text{ K}$ (ppm-Bereich: $\delta = 0,5$ bis $1,7\text{ ppm}$, Druckbereich: Normaldruck bis $p = 200\text{ MPa}$, 40 MPa Druckintervalle). Diese Abbildungen zeigen einen vergrößerten Ausschnitt aus Bild 56. Die Spektren wurden mit Hilfe derselben Skalierung prozessiert.

werden im Folgenden in erster Linie die druckabhängigen Veränderungen dieses Bereichs gezeigt.

In Bild 57 ist dieser Bereich mit den CH_2 - und CH_3 -Signalen abgebildet. Die Hochdruckmessungen an Serum bei der Temperatur von $T = 283\text{ K}$ sind in Bild 57 (a) zu sehen. Der Übersicht wegen ist nur jedes zweite aufgenommene NMR-Spektrum aufgetragen, was somit ein Druckintervall von $p = 40\text{ MPa}$ bedeutet.

Auffallend ist vor allem die druckabhängige Veränderung im Methyl- und Methylenbereich des Spektrums. Die Peak-Maxima dieser Signale fallen stark ab. Dabei reduziert sich das Signalmaximum der Methylen-Gruppe bis zu einem Druck von $p = 200 \text{ MPa}$ um die Hälfte im Vergleich zum Maximum bei Normaldruck. Das Signalmaximum der Methyl-Gruppe bei $p = 200 \text{ MPa}$ beträgt etwa 18 Prozent weniger als die bei Normaldruck.

In Tabelle 31 ist der prozentuale Signalabfall der CH_2 - und CH_3 -Signale in Abhängigkeit des Drucks zusammengefasst. Zu erkennen ist, dass das Signal der Methyl-Gruppe verglichen mit dem der Methylen-Gruppe deutlich weniger abfällt und bereits bei einem Druck von $p = 100 \text{ MPa}$ sättigt und bis zum Maximaldruck von $p = 200 \text{ MPa}$ nur um etwa 2 Prozent sinkt. Das Signalmaximum der Methylen-Gruppe beträgt bei einem Druck von $p = 100 \text{ MPa}$ 60 % der Signalthöhe bei Normaldruck und bei Maximaldruck etwa 46 %. Das Verhältnis der Signalmaxima des CH_2 - und CH_3 -Bereichs verschiebt sich somit in Abhängigkeit von dem auf die Serum-Probe angelegten Druck. Bei Normaldruck ist das Signal der Methylen-Gruppe erkennbar höher als das der Methyl-Gruppe, wohingegen sich dieses Verhältnis durch den unterschiedlichen druckabhängigen Abfall der Signale umkehrt. Somit ist das Methylensignal bei Maximaldruck sichtbar kleiner als das Methylsignal und ist folglich stärker druckabhängig.

Die Hochdruckmessungen an Serum bei $T = 313 \text{ K}$ sind in Bild 56 (b) und Bild 57 (b) gezeigt. Im Vergleich zu den soeben beschriebenen Messungen bei einer Temperatur von $T = 283 \text{ K}$, verschiebt sich das Verhältnis der CH_2 - und CH_3 -Signale deutlich weniger. Jedoch ist hierbei ebenso das Maximum des Methylensignals erst höher und sinkt dann soweit ab, dass es unterhalb des Signalmaximums der Methyl-Gruppe liegt.

Eine Zusammenfassung des prozentualen Abfalls der Signalthöhe der CH_2 - und CH_3 -Signale in Abhängigkeit des Drucks ist in Tabelle 31 zu sehen. Wie bereits beschrieben, ist der Signalabfall des CH_2 -Signals bei $T = 313 \text{ K}$ nahezu identisch mit dem bei einer Temperatur von $T = 283 \text{ K}$. Das Maximum des CH_3 -Signals sinkt bis zum Maximaldruck um 30 Prozent ab. Dies entspricht einem um etwa 10 % stärkeren Abfall als bei den Messungen bei niedrigerer Temperatur.

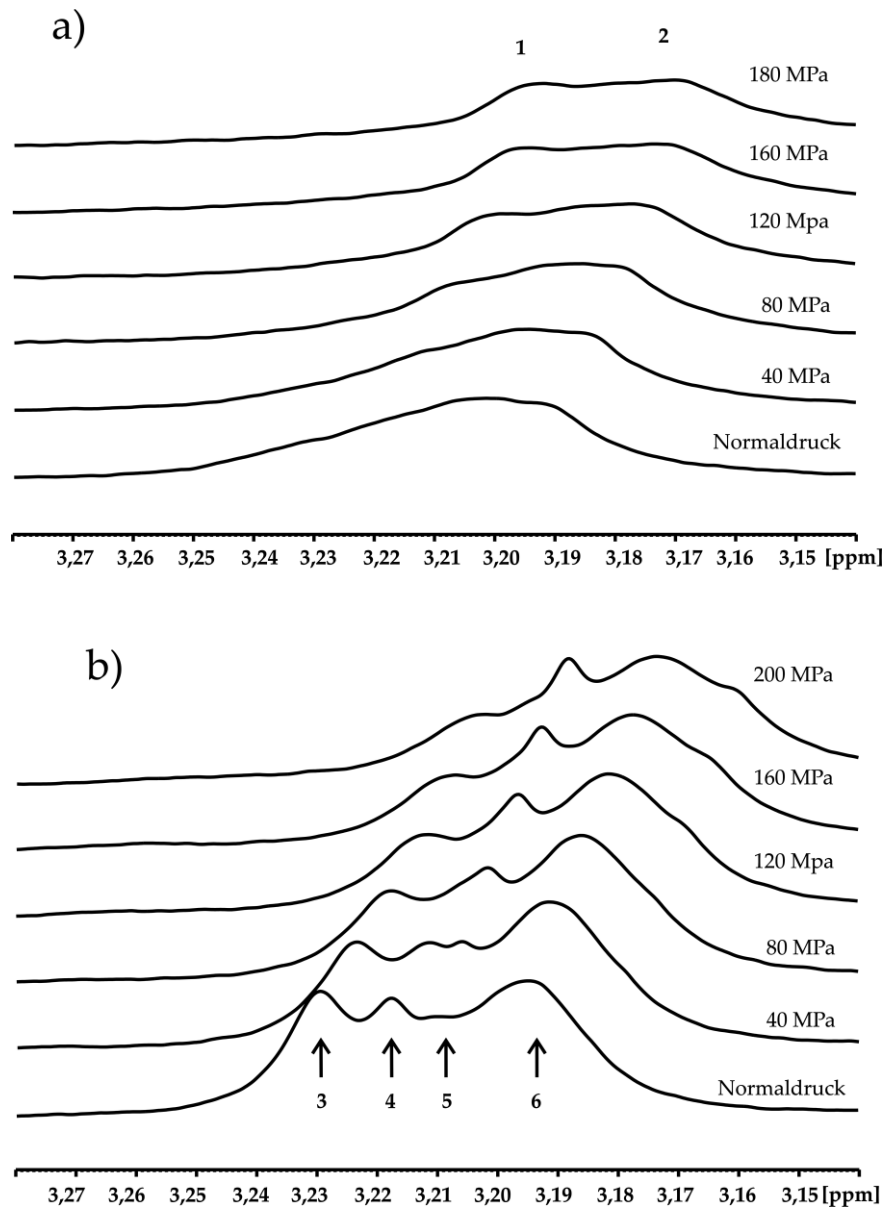


Bild 58: Cholin-Kopfgruppen-Signal des druckabhängigen $1D-^1H$ -Spektrums von Serum gemessen an einem 800 MHz-BRUKER-NMR-Spektrometer mit der Pulsfrequenz *noesygppr1d* bei (a) $T=283\text{ K}$ und (b) $T=313\text{ K}$ ($\delta = 3,14$ bis $3,28\text{ ppm}$, Normaldruck bis $p=200\text{ MPa}$). Das Signal zeigt nach Druckerhöhung eine Signal-Aufspaltung, was für LDL bereits von Murphey et al untersucht wurde [90,91]. Die Spektren wurden mit Hilfe derselben Skalierung prozessiert.

Das Signal der Cholin-Kopfgruppen bei etwa $\delta = 3,2\text{ ppm}$ des NMR-Spektrums ist in Bild 58 gezeigt. Zu erkennen ist eine starke Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen der Cholin-Kopfgruppen bei den Temperaturen $T = 283\text{ K}$ (a) und $T = 313\text{ K}$ (b). Auf die Änderung der chemischen Verschiebung mit dem Druck wird in Abschnitt 3.2.4 genauer eingegangen. Des Weiteren kann man eine Aufspaltung des

Signals bei der höheren Temperatur von $T = 313\text{ K}$ beobachten. Dieses Verhalten wurde bereits für LDL von Murphey et al. untersucht [90,91]. Dabei wurde festgestellt, dass beim LDL „Phosphoglyceride gegen die Sphingomyeline leicht tieffeldverschoben sind“ (Zitat [17], nach [90,91]). Dies folgt aus der unterschiedlichen Umgebung, in welcher sich PC und SM befindet. Bei $T = 283\text{ K}$ scheinen die Cholin-Kopfgruppen-Signale der Phosphoglyceride und Sphingomyeline druckabhängig unterschiedlich stark zu shiften, was eine Aufspaltung des Signals bei höheren Drücken bedeutet (vergleiche Bild 58 (a)). Des Weiteren ist eine Überlagerung der Signale der Bestandteile des Serums, d. h. der Lipoproteine zu erkennen (siehe Bild 69). Weitere Untersuchungen der Druckeffekte bei Hochdruck-NMR-Messungen an Serum werden in den Abschnitten 3.2.2 und 3.2.3 dargestellt.

In Bild 59 ist der Methyl- und Methylenbereich der Hochdruck-NMR-Messungen an VLDL bei den Temperaturen $T = 283\text{ K}$ und $T = 313\text{ K}$ abgebildet. Dabei ist zu erkennen, dass das Signalmaximum der Methylen-Gruppe bei Normaldruck und $T = 283\text{ K}$ etwa doppelt so hoch wie die der Methyl-Gruppe ist (vergleiche Bild 59 (a)). Das Verhältnis dieser beiden Signale bleibt mit steigendem Druck relativ konstant.

In Tabelle 31 sind die Intensitäten der CH_2 - und CH_3 -Signale in Abhängigkeit des Drucks bei $T = 283\text{ K}$ zusammengefasst. Das Signal der CH_2 -Gruppe fällt bis zu einem Druck von $p = 100\text{ MPa}$ im Vergleich zu dem Signal der CH_3 -Gruppe etwas stärker mit steigendem Druck ab, jedoch betragen die Intensitäten beider Signale bei Maximaldruck nur noch zwischen 11 und 16 Prozent der ursprünglichen Signalthöhe bei Normaldruck. Folglich sind die Signale der Methylen- und Methylgruppen des VLDLs stark druckabhängig und verschwinden nahezu bei einem Druck von $p = 200\text{ MPa}$.

Bei $T = 313\text{ K}$ ist das CH_3 -Signal bei Normaldruck circa 70 Prozent kleiner als das CH_2 -Signal (vergleiche Bild 59 (b)). Dieses Verhältnis verändert sich in Abhängigkeit des Drucks, was zu einer Signalintensität der CH_3 -Gruppe führt, die bei Maximaldruck nur noch halb so groß ist wie die der CH_2 -Gruppe. Der in Bild 59 (b) mit „1“ gekennzeichnete Bereich stammt nach [75] von Lipid-Signalen.

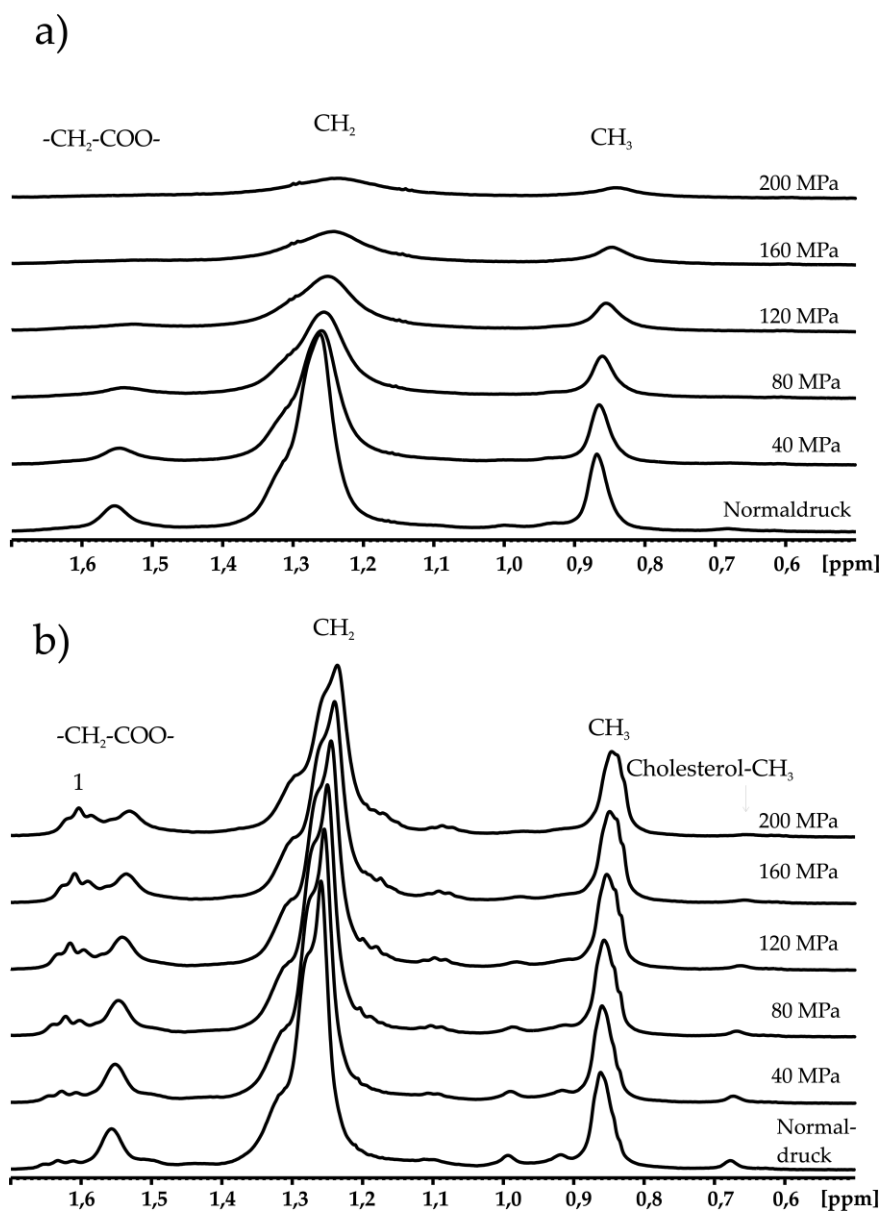


Bild 59: CH_2 - und CH_3 - Bereich des druckabhängigen $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von VLDL aufgenommen an einem 800 MHz-BRUKER-NMR-Spektrometer mit der Pulsfrequenz *noesygppr1d* bei (a) $T=283\text{ K}$ und (b) $T=313\text{ K}$ ($\delta = 0,5$ bis $1,7\text{ ppm}$, Normaldruck bis $p=200\text{ MPa}$). Der mit „1“ ($\delta = 1,65\text{ ppm}$) gekennzeichnete Bereich sind nach [75] Signale, die von Lipiden stammen. Die Spektren wurden mit Hilfe derselben Skalierung prozessiert.

Wie in Tabelle 31 zusammengefasst, bleibt bei $T = 313\text{ K}$ die Intensität des CH_3 -Signals bis zu einem Druck von $p = 100\text{ MPa}$ relativ konstant und nimmt bis 200 MPa nur um circa 13 Prozent ab. Das Signalmaximum des CH_2 -Signals nimmt vergleichsweise gleichmäßig ab. Dabei ist die Intensität bei $p = 200\text{ MPa}$ noch nahezu 60 % der Intensi-

tät bei Normaldruck. Vergleicht man dieses Verhalten mit dem bei $T = 283\text{ K}$, so fällt auf, dass die Druckabhängigkeit der Methyl- und Methylengruppen des VLDLs bei kleinerer Temperatur erheblich stärker ist.

Der Methyl- und Methylenbereich der druckabhängigen Spektren der Hochdruck-

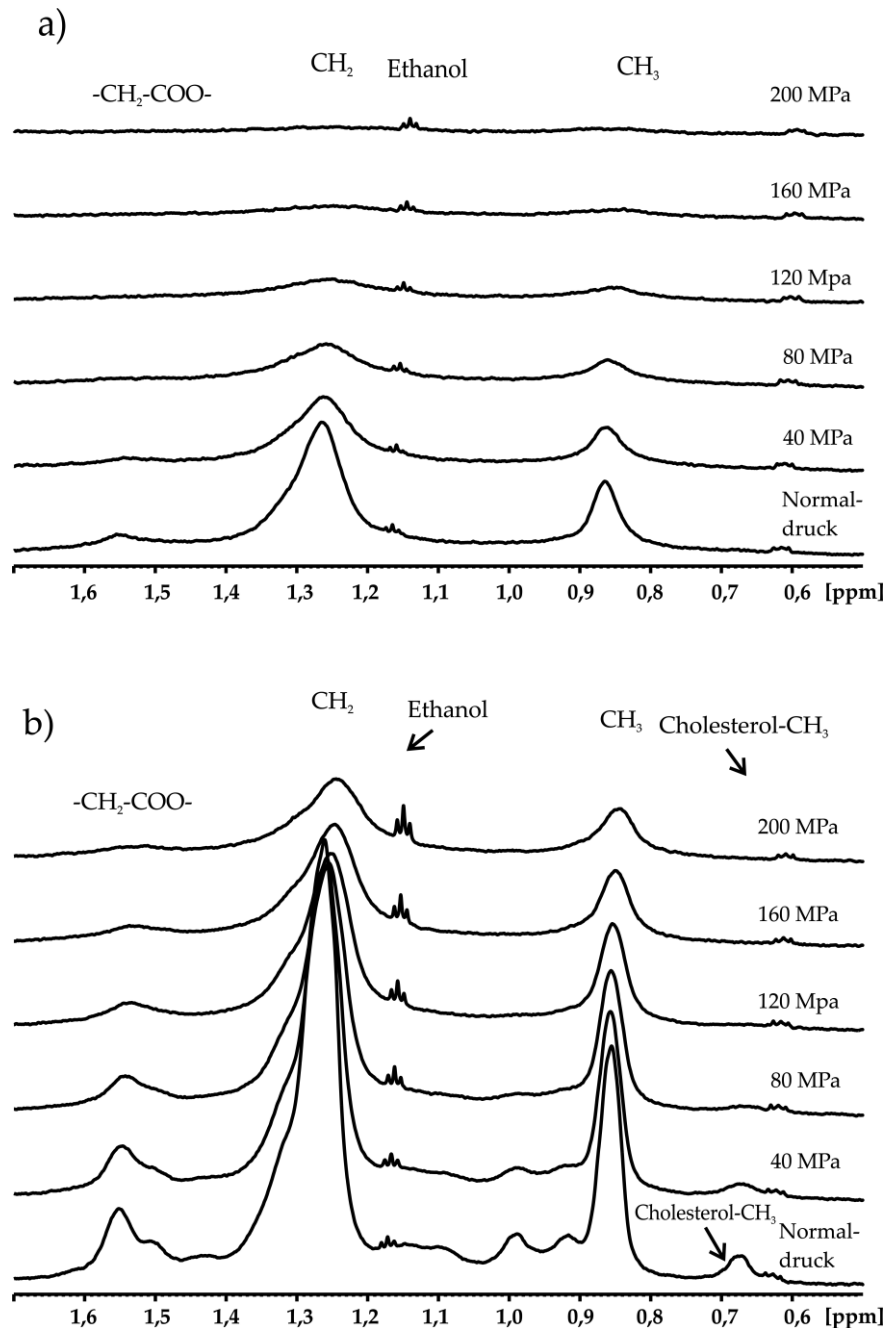


Bild 60 CH_2 - und CH_3 -Bereich eines druckabhängigen $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrums des IDL gemessen an einem $800\text{ MHz-BRUKER-NMR-Spektrometer}$ mit der Pulssequenz *noesygppr1d* bei (a) $T=283\text{ K}$ und (b) $T=313\text{ K}$ von Normaldruck bis $p=200\text{ MPa}$. Die Spektren wurden mit Hilfe derselben Skalierung prozessiert.

NMR-Messungen an der Lipoproteinklasse IDL sind in Bild 60 zu sehen. Hierbei sind starke Intensitätsänderungen zu erkennen. Die Signalintensität der CH₂-Gruppe ist etwa doppelt so groß wie die der CH₃-Gruppe. Dieses Verhältnis nimmt mit dem Druck relativ gleichmäßig ab, wobei das CH₂-Signal minimal schneller abfällt. Bei Erreichen eines Drucks von $p = 100 \text{ MPa}$ liegt die Signalintensität der Methylengruppe bei 27 % und die der Methylgruppe bei 33 % verglichen mit der Intensität bei Normaldruck. Bei Erreichen des Maximaldrucks von 200 MPa betragen die Maxima nur noch 8 % bzw. 12 % der Signalintensität bei Normaldruck. Dies beweist eine starke Druckabhängigkeit der Methyl- und Methylengruppen des IDLs.

Bild 60 (b) zeigen die Hochdruckmessungen an IDL bei einer Temperatur von $T = 313 \text{ K}$ von Normaldruck bis zu einem Druck von $p = 200 \text{ MPa}$. Analog zum druckabhängigen Verhältnis der Signalintensitäten der CH₂- zur CH₃-Gruppe bei $T = 283 \text{ K}$, ist das CH₂-Signal doppelt so hoch wie das Signal der CH₃-Gruppe (vergleiche Bild 60 (b)).

Des Weiteren ist nach Tabelle 31 ein relativ konstanter Signalabfall beider Resonanzen zu sehen. Demnach fällt die Intensität der CH₂-Gruppe bis zu einem Druck von $p = 200 \text{ MPa}$ um 80 Prozent und die der CH₃-Gruppe um 76 % ab. Das heißt, dass die Methyl- und Methylensignale bei einer Temperatur von $T = 313 \text{ K}$ um 10 % weniger abfallen als die bei $T = 283 \text{ K}$ und somit eine weniger starke Druckabhängigkeit aufweisen.

Ein weiteres interessantes Ergebnis beobachtet man bei der Untersuchung des Cholin-Kopfgruppen-Signals bei etwa $\delta = 3,2 \text{ ppm}$ (vergleiche Bild 61). In Bild 61 (a) sind die NMR-Spektren dieses Signals bei $T = 283 \text{ K}$ dargestellt. Aufgrund der Proben-Eigenschaften sind das Signal/Rausch-Verhältnis und somit auch die Spektrenqualität relativ schlecht. Dennoch ist eine starke druckabhängige Änderung der chemischen Verschiebung dieses Signals zu erkennen. Das Signalmaximum des Peaks verschiebt sich mit zunehmendem Druck zu niedrigeren Frequenzen, was bei den bei $T = 313 \text{ K}$ gemessenen Spektren besser zu erkennen ist. Des Weiteren verschwindet das Signal der Cholin-Kopfgruppen bei $p = 200 \text{ MPa}$ nahezu vollkommen.

Bild 61 (b) zeigt das Cholin-Kopfgruppen-Signal bei einer Temperatur von $T = 313 \text{ K}$. Die Spektrenqualität ist aufgrund der Temperaturerhöhung deutlich verbessert. Hierbei findet mit der Druckerhöhung eine Signalaufspaltung statt. Wie bereits für LDL von Murphey et al. untersucht, ist hierbei ebenfalls eine Aufspaltung des Signals zu beobachten.

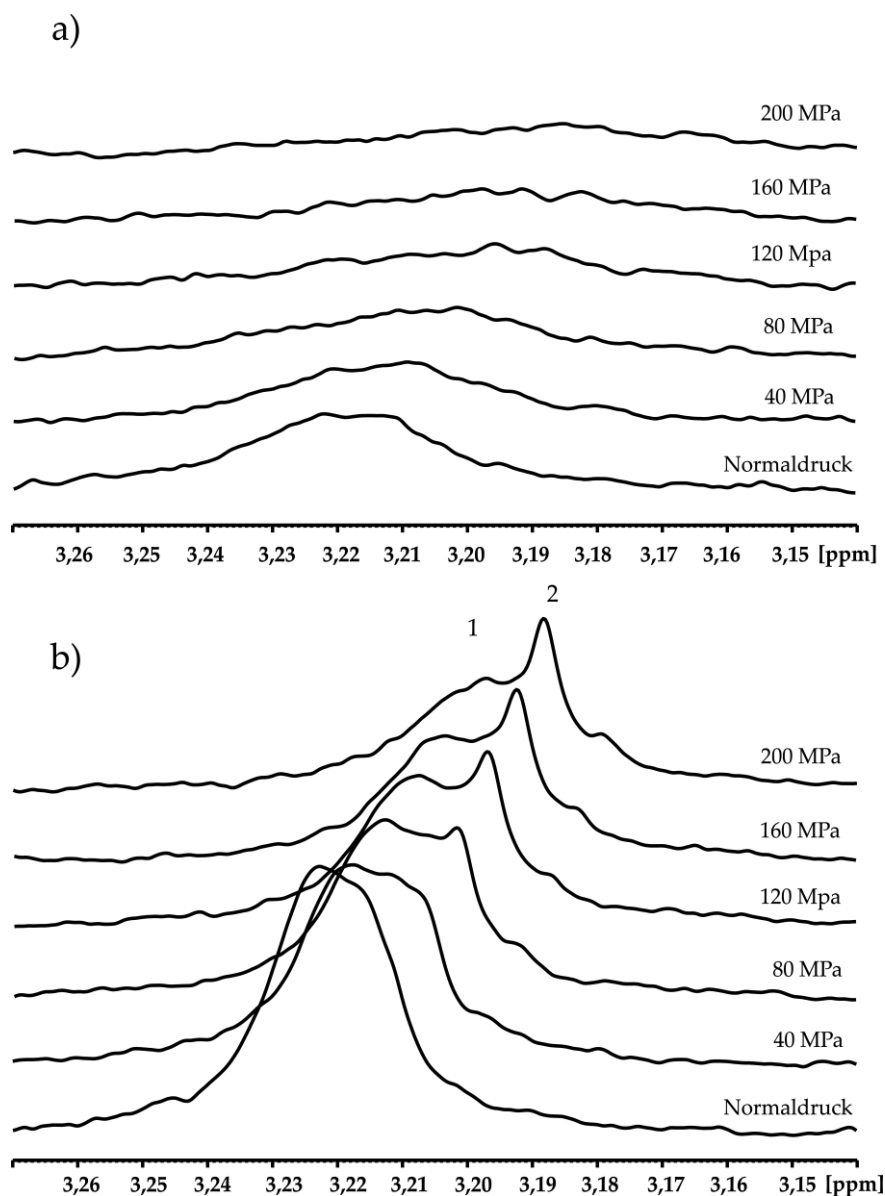


Bild 61: Phospholipidbereich bei einer chemischen Verschiebung von $\delta = 3,22\text{ ppm}$ eines druckabhängigen $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ -Spektrums von IDL aufgenommen an einem 800 MHz- BRUKER-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* bei (a) $T=283\text{ K}$ und (b) $T=313\text{ K}$ von Normaldruck bis $p=200\text{ MPa}$. In (b) ist eine Signalaufspaltung mit den beiden Maxima zu erkennen („1“ bei $3,199\text{ ppm}$ und „2“ bei $3,190\text{ ppm}$). Die Spektren wurden mit Hilfe derselben Skalierung prozessiert.

Wie bereits diskutiert, ist dieses Signal eine Überlagerung der Sphingomyelin- und Phosphatidylcholin-Resonanzen (vergleiche „1“ und „2“ in Bild 61 (b)). Diese Substanzen zeigen eine unterschiedliche Druckabhängigkeit, was daran zu erkennen ist, dass mit Erhöhung des Drucks ein deutliches Signal sichtbar wird (Peak „2“).

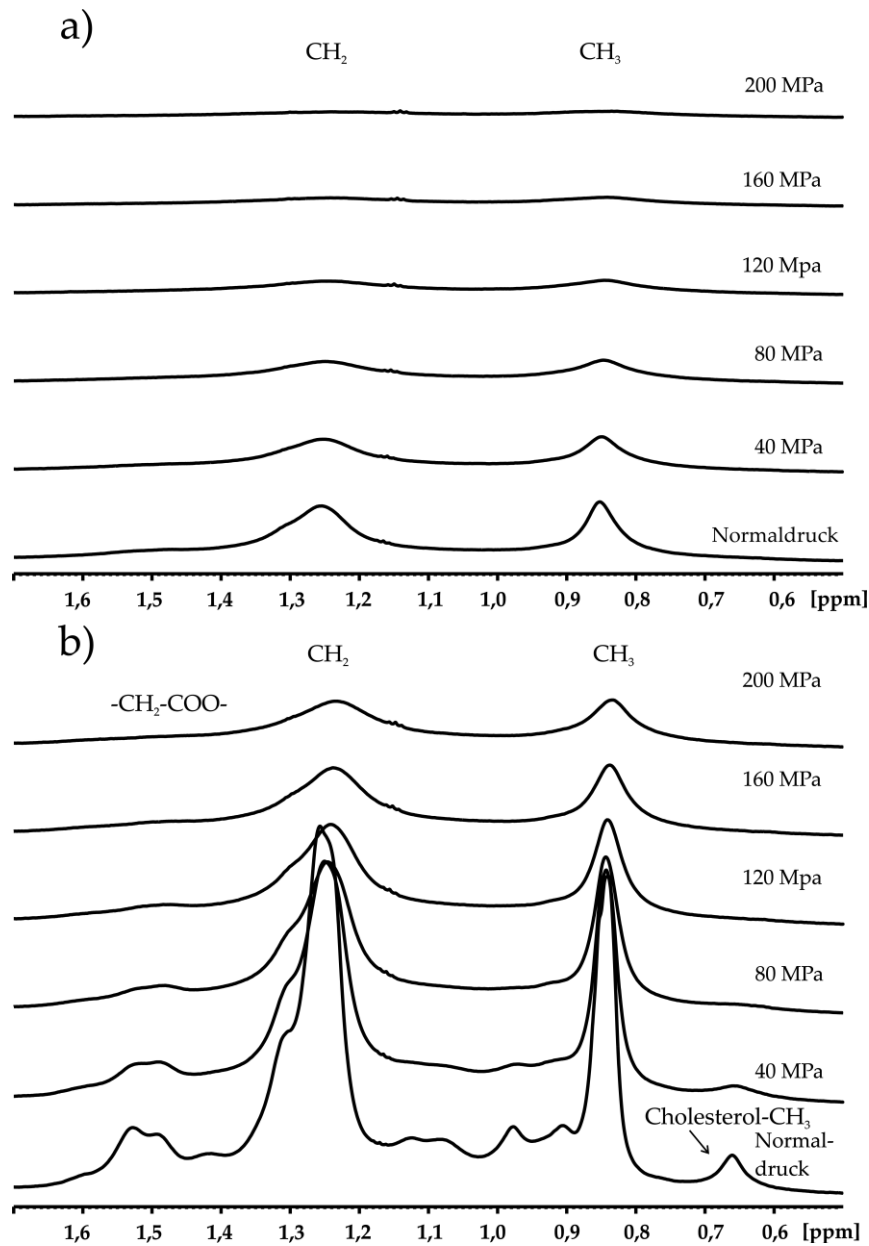


Bild 62: Druckabhängigkeit des Methylen- und Methylbereich der 1D ^1H -NMR-Spektren des LDL aufgenommen an einem 800 MHz-BRUKER-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* bei einer Temperatur von (a) $T=283\text{ K}$ und (b) $T=313\text{ K}$. Die Skalierung ist innerhalb einer Druckreihe identisch, jedoch wurden für die beiden unterschiedlichen Temperaturen verschiedene RG-Werte gewählt ($T=283\text{ K}$: $\text{RG}=128$; $T=313\text{ K}$: $\text{RG}=181$).

Dieses Signal wird für LDL dem Sphingomyelin zugeordnet [90]. Die Höhe dieses Signals bleibt mit steigendem Druck relativ konstant, jedoch kann man eine Verschiebung des Signals zu niedrigeren Frequenzen hin beobachten. Der Bereich des Signals „1“

hängt stärker vom Druck ab und fällt somit deutlich stärker ab. Jedoch ist die Änderung der chemischen Verschiebung für die beiden Signale gleich.

Der Methyl- und Methylenbereich der Hochdruck-NMR-Messungen an der Lipoproteinklasse LDL sind in Bild 62 dargestellt. Dabei fällt auf, dass bei einer Temperatur von $T = 283\text{ K}$ das Signal der Methylgruppe eine höhere Intensität (etwa 10 %) hat als das der Methylengruppe (vergleiche Bild 62 (a)). Dieses Verhalten wird nur bei LDL bei niedrigen Temperaturen beobachtet. Diese Temperaturabhängigkeit von LDL wurde bereits in der Arbeit von Baumstark beobachtet [17]. Bei einer Temperaturerhöhung auf $T = 313\text{ K}$ hingegen ist die Höhe des CH_2 -Signals größer als die des CH_3 -Signals (siehe Bild 62 (b)). Dies ist in Übereinstimmung mit [17]. Wie in Tabelle 31 zu sehen, nehmen die Signalhöhen der Methyl- und Methylengruppen in gleichem Maße mit dem Druck ab, was eine Signalabnahme von Normaldruck zu $p = 200\text{ MPa}$ um 72 Prozent bedeutet. Das Verhältnis der beiden Signale zueinander bleibt folglich erhalten.

Die Hochdruck-Spektren von LDL bei einer Temperatur von $T = 313\text{ K}$ sind in Bild 62 (b) abgebildet. Wie bereits erwähnt, ist hierbei das CH_2 -Signal größer als das CH_3 -Signal. Verglichen mit den Hochdruck-NMR-Messungen bei niedrigerer Temperatur ist das Verhältnis des CH_2 -Signals zum CH_3 -Signal umgekehrt. Das Methylen-Signal ist 10 % größer als das Signal der Methylgruppe. Die Signalhöhen beider Signale nehmen mit steigendem Druck relativ analog zueinander ab (vergleiche Tabelle 31). Des Weiteren sind die Signale bis zu einem Druck von $p = 200\text{ MPa}$ nahezu verschwunden. Die Signalhöhen betragen nur noch sechs bis sieben Prozent der Höhe des Normaldrucks.

In Bild 63 ist die Druckabhängigkeit des Cholin-Kopfgruppen-Signals des LDL-Spektrums bei $T = 283\text{ K}$ gezeigt. Hierbei ist keine eindeutige Signalaufspaltung während der Druckreihe erkennbar. Im Gegensatz dazu ist in (b) für $T = 313\text{ K}$ bereits bei

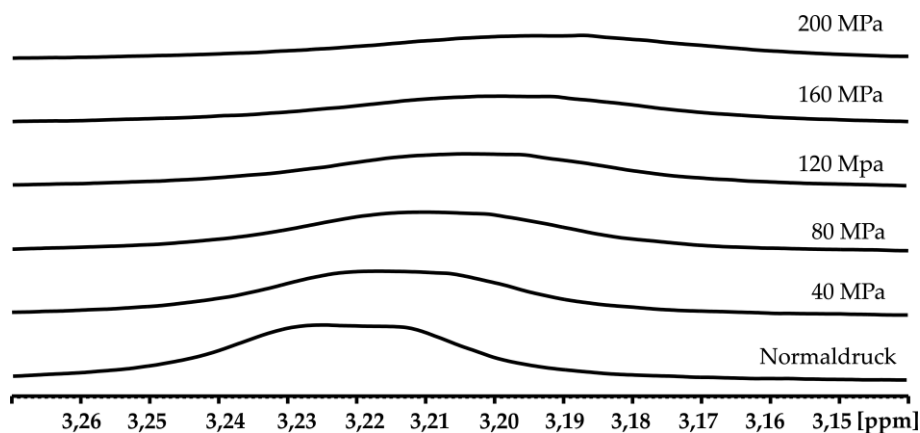


Bild 63: Druckabhängigkeit des Cholin-Kopfgruppen-Signals im LDL-Spektrum aufgenommen an einem 800 MHz-BRUKER-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* bei $T=283\text{ K}$. Die Skalierung der Spektren ist identisch.

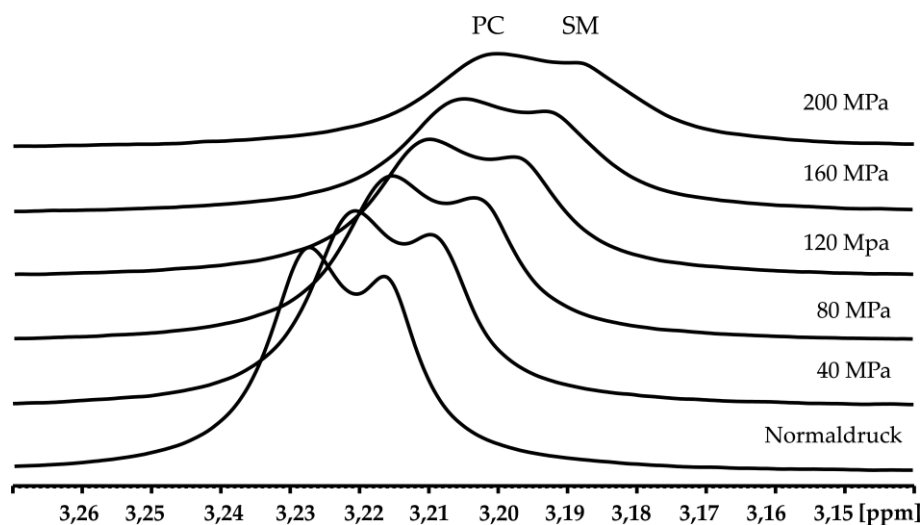


Bild 64: Druckabhängigkeit des Cholin-Kopfgruppen-Signals im LDL-Spektrum aufgenommen an einem 800 MHz-BRUKER-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* bei $T=313\text{ K}$. Bei dem linken Signalmaximum handelt es sich laut [90] um Phosphoglyceride (PC) und bei dem rechten Signalmaximum um das Signal der Sphingomyeline (SM). Die Skalierung der Spektren ist identisch.

Normaldruck eine Aufspaltung des Cholin-Kopfgruppen-Signals in zwei Signale zu beobachten. Bei dem linken Signalmaximum handelt es sich laut [90] um Phosphoglyceride (PC) und bei dem rechten Signalmaximum um das Signal der Sphingomyeline (SM).

Die Hochdruckmessungen mit Hilfe von NMR-Spektroskopie an HDL2 wurden ebenfalls bei den Temperaturen $T = 283\text{ K}$ und 313 K durchgeführt. Einzelne Spektren dieser Messungen sind in Bild 65 gezeigt. In Bild 65 (a) sind die Spektren bei der Temperatur $T = 283\text{ K}$ abgebildet und in Tabelle 31 ist die jeweilige Abnahme der Signalhöhe der CH_2 - und CH_3 -Signale zusammengefasst. Hierbei ist das Methylensignal 25 Prozent größer als das Methylsignal.

Nach Tabelle 31 nehmen die Signalhöhen beider Signale relativ gleichmäßig ab. Das CH_3 -Signal bei einem Druck von $p = 200\text{ MPa}$ ist in etwa halb so groß wie das bei Normaldruck. Das Signal der CH_2 -Gruppe ist nur etwa sieben Prozent kleiner als das der CH_3 -Gruppe.

Die Spektren der Hochdruckmessungen an HDL2 bei $T = 313\text{ K}$ sind in Bild 65 (b) gezeigt. Im Vergleich zu den Spektren bei $T = 283\text{ K}$ ist hierbei wegen der höheren Temperatur das Cholesterol-Signal bei etwa $\delta = 0,65\text{ ppm}$ zu sehen. Das CH_2 -Signalmaximum ist um 40 % größer als das des CH_3 -Signals. Des Weiteren nimmt nach Tabelle 31 das Methylengruppensignal schneller mit steigendem Druck als das Methylgruppensignal ab, so dass die Signalhöhe der Methylengruppe bei $p = 200\text{ MPa}$

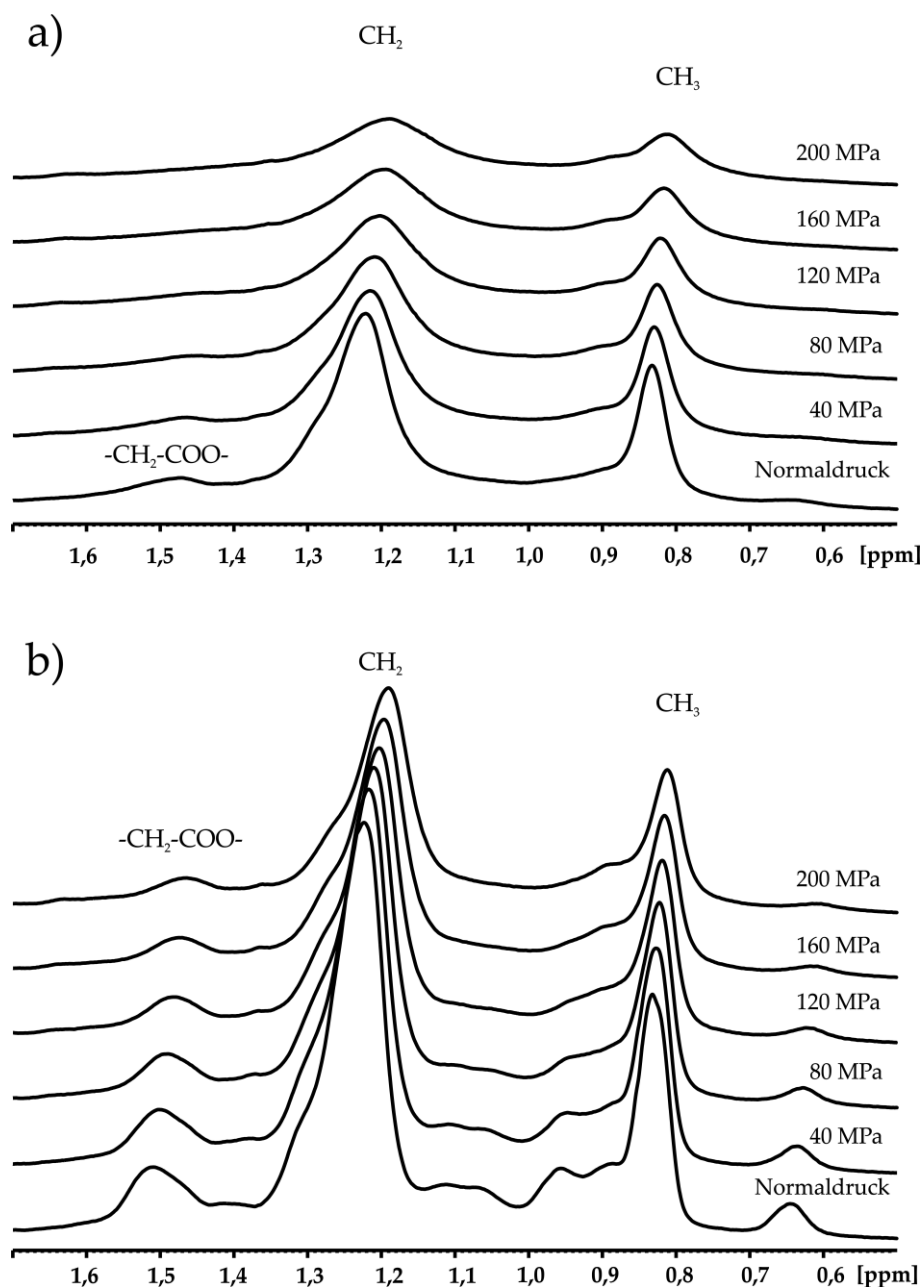


Bild 65: Methylen- und Methylbereich der druckabhängigen $1D$ - 1H -NMR-Spektren des extrahierten HDL2 aufgenommen an einem 800 MHz-BRUKER-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d* bei einer Temperatur von (a) $T = 283$ K und (b) $T = 313$ K. Die Spektren wurden mit Hilfe derselben Skalierung prozessiert.

nur noch 60 Prozent der Höhe bei Normaldruck und die der Methylgruppe nur noch 71 Prozent beträgt. Somit hat sich das Verhältnis beider Signale zueinander bis zu einem Druck von $p = 200$ MPa nur minimal geändert.

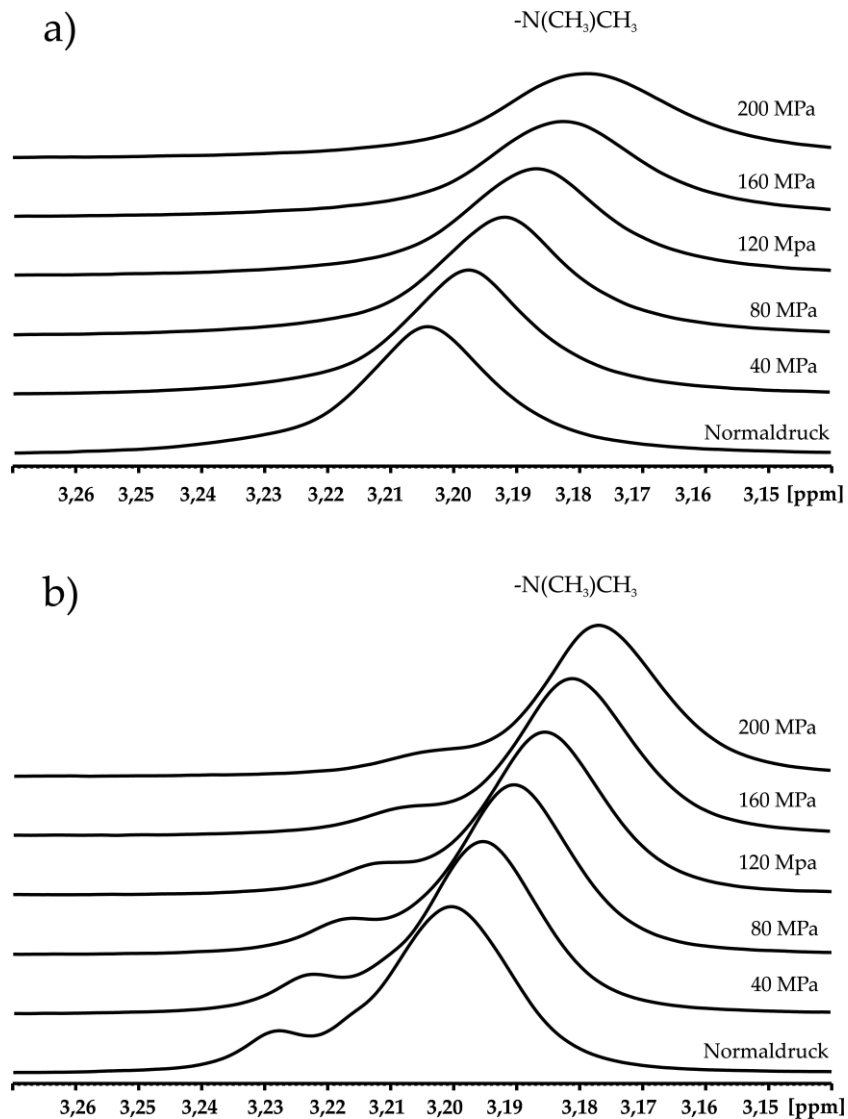


Bild 66: Druckabhängigkeit des Cholin-Kopfgruppen-Signals des $1D\text{-}^1\text{H}$ -Spektren von HDL2 mit der Pulssequenz *noesygppr1d* aufgenommen an einem 800 MHz-BRUKER-NMR-Spektrometer bei einer Temperatur von (a) $T = 283\text{ K}$ und (b) $T = 313\text{ K}$. Die Spektren wurden mit Hilfe derselben Skalierung prozessiert.

Das Cholin-Kopfgruppen-Signal der Spektren von HDL2 bei $T = 283\text{ K}$ und $T = 313\text{ K}$ ist in Bild 66 gezeigt. Eine Aufspaltung dieses Signals, wie beispielsweise für Serum, IDL und LDL, kann hierbei bei beiden Temperaturen nicht beobachtet werden. Des Weiteren ist eine starke Verschiebung des Signals zu kleineren Frequenzen mit steigendem Druck für beide Temperaturen zu erkennen. Vergleicht man die Spektren mit $T = 283\text{ K}$ (Bild 66(a)) und $T = 313\text{ K}$ (Bild 66(b)), so fällt auf, dass das Cholin-Kopfgruppen-Signal bei niedrigerer Temperatur stärker mit steigendem Druck sinkt

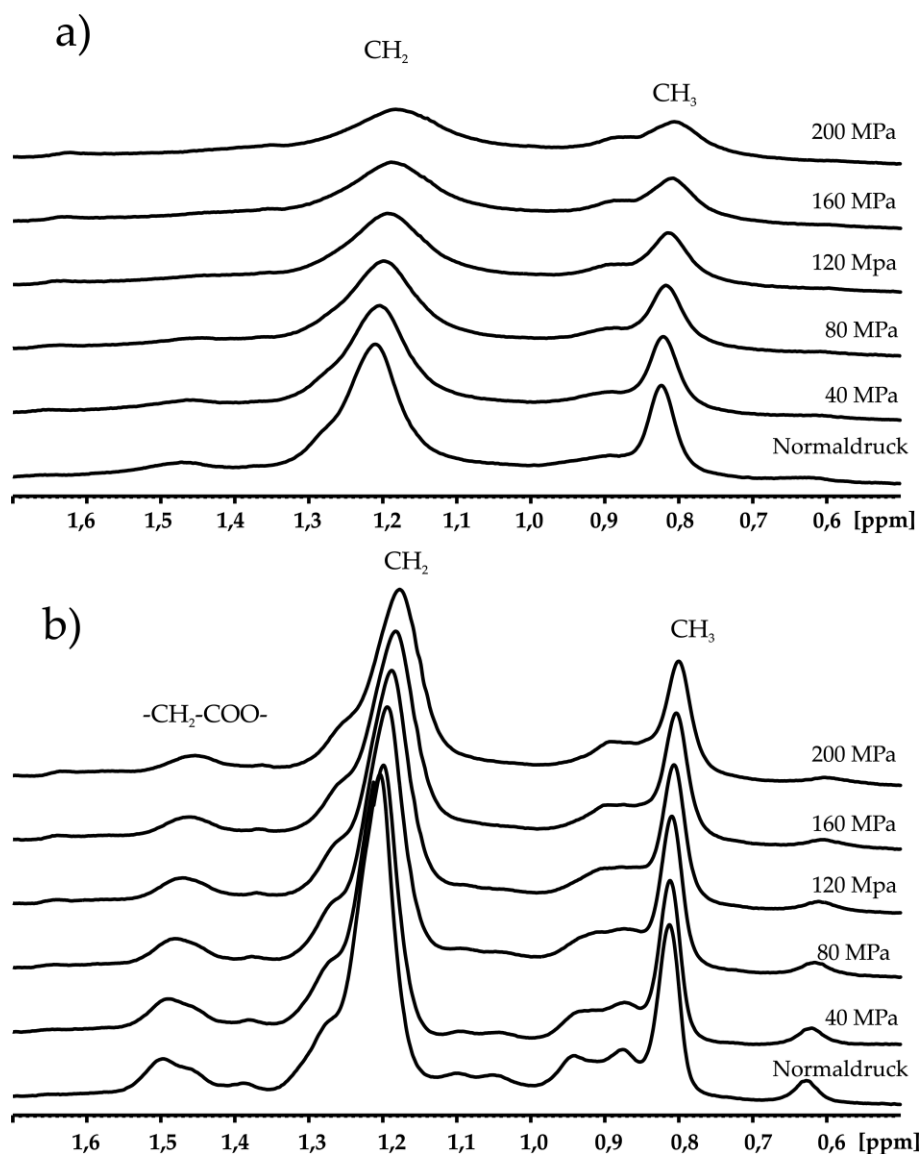


Bild 67: Methylen- und Methylbereich der druckabhängigen $1D$ - 1H -NMR-Spektren des HDL3 bei einer Temperatur von (a) $T = 283$ K und (b) $T = 313$ K. Die Spektren wurden mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-BRUKER-NMR-Spektrometer aufgenommen. Die Spektren wurden mit Hilfe derselben Skalierung prozessiert.

als bei höherer Temperatur. Bei $T = 283$ K beträgt die Signalhöhe bei $p = 200$ MPa nur noch etwa 60 % derer bei Normaldruck. Bei $T = 313$ K hingegen beträgt der Höhenabfall nur etwa 1 %. Das Signal bleibt somit bei steigendem Druck nahezu konstant für hohe Temperaturen.

Der Methyl- und Methylenbereich der Spektren der Hochdruck-NMR-Messungen an HDL3 sind in Bild 67 gezeigt. Die Spektren der Messungen bei $T = 283$ K sind in Bild 67 (a) zu sehen. Das CH_2 -Signal ist 25 % größer als das CH_3 -Signal und gemäß Tabelle

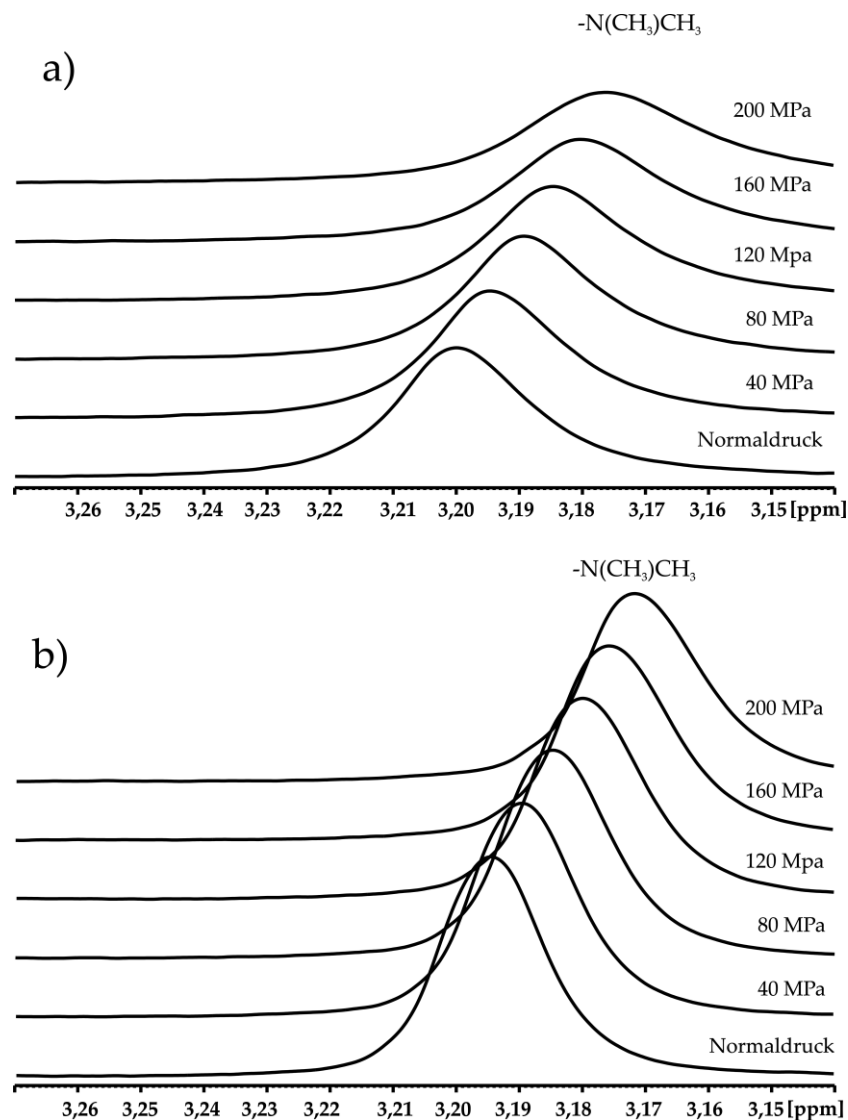


Bild 68: Cholin-Kopfgruppen-Signal der Hochdruckmessungen an HDL3 von Normaldruck bis 200 MPa am 800 MHz-Spektrometer bei (a) $T=283$ K und (b) $T=313$ K. Mit steigendem Druck verschiebt sich das Signal zu kleineren Frequenzen hin. Die Spektren wurden mit Hilfe derselben Skalierung prozessiert.

31 nehmen beide Signale etwa gleich stark mit steigendem Druck ab. Die Intensität des CH_2 -Signals nimmt nur circa um 3 Prozent mehr ab als die des CH_3 -Signals. Insgesamt liegt somit die Intensität der Signale bei $p = 200$ MPa zwischen 36 und 39 Prozent der Intensität bei Normaldruck.

Bild 67 (b) zeigt die Spektren der Hochdruckmessungen an HDL3 bei einer Temperatur von $T = 313$ K. Das Methylgruppen-Signal ist um 42 Prozent kleiner als das Methylengruppen-Signal. Das heißt, dass sich das Verhältnis der beiden Signale zueinander bei beiden Temperaturen deutlich unterscheidet. Die Maxima der CH_2 - und CH_3 -Gruppen-

Signale nehmen nach Tabelle 31 mit steigendem Druck vergleichbar ab, was bedeutet, dass die Signalhöhe bei $p = 200 \text{ MPa}$ 55 % für das CH_2 -Gruppen-Signal bzw. 60 % für das CH_3 -Signal der Höhe bei Normaldruck betragen. Verglichen mit der Abnahme der Signalhöhen bei $T = 283 \text{ K}$, sind die Methyl- und Methylengruppen für $T = 313 \text{ K}$ weniger stark druckabhängig, da das Signal um nahezu 20 % weniger abfällt.

In Bild 68 ist der Bereich des Cholin-Kopfgruppen-Signals der Hochdruck-NMR-Spektren von HDL3 dargestellt. Auffällig ist hierbei eine starke Verschiebung des Signals mit steigendem Druck sowohl bei $T = 283 \text{ K}$ (Bild 68 (a)) als auch bei $T = 313 \text{ K}$ (Bild 68 (b)) zu kleiner Frequenzen hin. Des Weiteren ist das Signal bei $T = 313 \text{ K}$ im Vergleich zu dem Signal bei niedrigerer Temperatur zu kleineren Frequenzen hin verschoben.

Die Signalhöhe des Cholin-Kopfgruppen-Signals bei $T = 283 \text{ K}$ nimmt bis zu einem Druck von $p = 200 \text{ MPa}$ etwa 43 Prozent ab. Bei $T = 313 \text{ K}$ ist die Abnahme des Maximums deutlich kleiner und die Signalhöhe beträgt etwa 87 Prozent des Signals bei Normaldruck. Somit fällt die Signalhöhe des Cholin-Kopfgruppen-Signals bei $T = 283 \text{ K}$ bis zu einem Druck von $p = 200 \text{ MPa}$ um 20 Prozent stärker ab als bei einer Temperatur von $T = 283 \text{ K}$.

Das Cholin-Kopfgruppen-Signal der HDL2- und HDL3-Proben zeigen trotz einer ver-

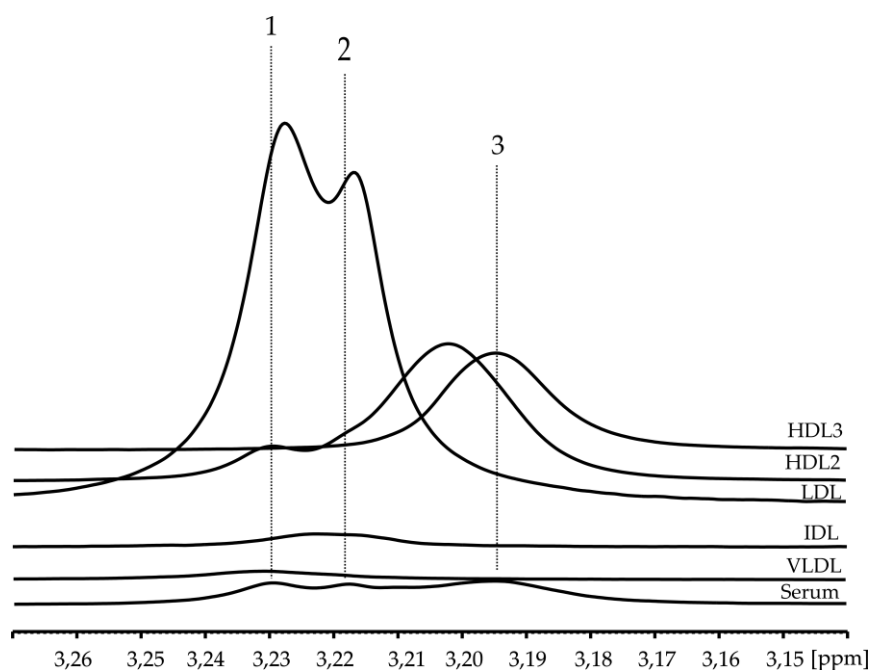


Bild 69: Cholin-Kopfgruppen-Signal der 1D ^1H -NMR-Spektren an Serum und Lipoproteinen aufgenommen an einem 800 MHz-Spektrometer bei Normaldruck und $T = 313 \text{ K}$. 1, 2 und 3 kennzeichnet die Maxima des Cholin-Kopfgruppen-Signals des Serum-Spektrums.

gleichbaren Struktur der Lipoproteine starke Unterschiede. Dies spiegelt wider, was bereits in [92] gezeigt wurde: das Verhältnis von Phosphoglyceride (PC) zu Sphingomyelin (SM) ist bei HDL2 größer als bei HDL3.

Bild 69 zeigt das Cholin-Kopfgruppen-Signal der Serum- und Lipoproteinspektren gemessen bei einer Temperatur von $T = 313\text{ K}$ am 800 MHz-NMR-Spektrometer. 1, 2 und 3 sind die Maxima des Cholin-Kopfgruppen-Signals des Serum-Spektrums. Da Serum sich unter anderem aus den Lipoproteinen zusammensetzt, stellt dieser Bereich eine Überlagerung der Signale dar. Die Signale diffundieren unterschiedlich schnell, was eine abweichende Größe bedeutet (siehe Anhang Bild 98).

In folgender Tabelle 31 sind die Änderungen der Signalmaxima der CH₂- und CH₃-Gruppen-Signale der Serum- und Lipoprotein-Proben zusammengefasst.

Tabelle 31

Qualitativer Vergleich der Druckabhängigkeiten der CH₂- und CH₃-Signalmaxima.^a

Probe	T [K]	Signal	Druck [MPa]	Signalhöhe [% von Signalhöhe bei Normaldruck]
Serum	283	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	283		100	60,2
	283		180	46,3
Serum	283	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	283		100	84,7
	283		180	82,3
Serum	313	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	313		100	68,4
	313		200	45,8
Serum	313	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	313		100	84,7
	313		200	70,4
VLDL	283	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	283		100	35,6
	283		200	11,1
VLDL	283	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	283		100	46,7
	283		200	16
VLDL	313	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	313		100	83

	313		200	59,6
VLDL	313	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	313		100	100
	313		200	87,2
IDL	283	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	283		100	27,1
	283		200	8,3
IDL	283	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	283		100	33,5
	283		200	12,8
IDL	313	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	313		100	49,1
	313		200	19,8
IDL	313	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	313		100	54,6
	313		200	23,6
LDL	283	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	283		100	104
	283		200	27,9
LDL	283	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	283		100	101
	283		200	27,9
LDL	313	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	313		100	15,8
	313		200	6,4
LDL	313	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	313		100	19
	313		200	7,5
HDL2	283	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	283		100	64,5
	283		200	42,8
HDL2	283	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	283		100	69,7
	283		200	49,1
HDL2	313	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	313		100	78,3
	313		200	60,2

HDL2	313	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	313		100	86,4
	313		200	71,1
HDL3	283	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	283		100	58,5
	283		200	36,6
HDL3	283	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	283		100	61,4
	283		200	39,2
HDL3	313	CH ₂ -Gruppe	0,1	100
	313		100	76,8
	313		200	54,6
HDL3^c	313	CH ₃ -Gruppe	0,1	100
	313		100	80,7
	313		200	60,2

^aDas Acetat-Signal wurde hierbei auf $\delta = 1,875$ ppm referenziert.

3.2.2 Druckabhängigkeit eines großen Signalintegrals des Serums und der Lipoproteine

Dieser Abschnitt beschreibt die Ergebnisse der Hochdruck-Messungen bezüglich der Änderungen der Signalintegrale eines größeren Spektrenbereichs von $\delta = -2,00$ bis $3,5$ ppm von Serum und den Lipoproteinen. Hierbei wird ein Teil des Spektrums nach Tabelle 16 integriert. Dies dient der Untersuchung nahezu aller Lipide, die in der Probe beziehungsweise dem Lipoproteinpartikel enthalten sind. Dabei werden nur die DSS-Signale bzw. dessen Integral von dem Spektrum subtrahiert.

Zu Beginn wird die Druckabhängigkeit des Integrals der Signale im Bereich $\delta = -2,00$ bis $3,5$ ppm, gemessen bei einer Temperatur von $T = 283$ K, untersucht.

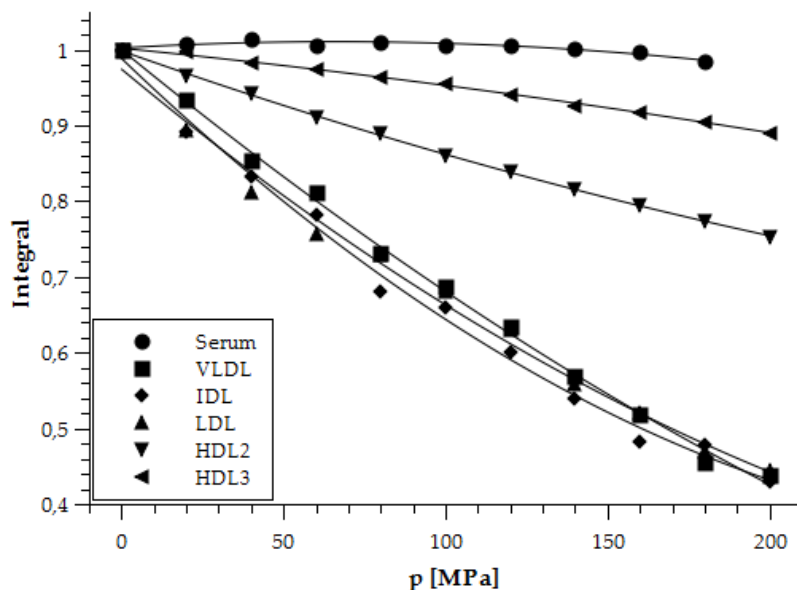


Bild 70: Druckabhängigkeit der Integrale der Signale im Bereich von $\delta = -2,00$ bis $+3,50$ ppm nach Tabelle 16 der Serum- und Lipoprotein-Proben gemessen an einem 800 MHz-Spektrometer bei einer Temperatur von $T=283$ K und einem Druck von $p=0,1$ MPa bis 200 MPa. Die Daten wurden mit der Funktion (2.2) und den Parametern b_1 und b_2 mit $a=1,00$ aus Tabelle 32 gefittet (durchgezogene Linien).

Die Integrale dieses Spektrenbereichs von Serum, VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3 bei $T = 283$ K sind in Bild 70 gegen den Druck p aufgetragen. Die Daten wurden mit der Funktion (2.2) und den Parametern b_1 und b_2 aus Tabelle 32 gefittet (durchgezogene Linien). Die Fit-Kurven befinden sich in sehr guter Übereinstimmung mit den Messwerten.

Zu erkennen ist in Bild 70, dass die Integrale des großen Spektrenbereichs mit steigendem Druck für alle untersuchten Lipoprotein- und Serum-Proben abnehmen. Des Weiteren fällt ein ähnliches Verhalten der Integrale der VLDL-, IDL- und LDL-Proben auf. Die Steigung dieser Fit-Kurven ist in etwa gleich groß. Das Integral der Serum-Probe zeigt ein völlig anderes Verhalten als die soeben genannten Lipoprotein-Proben. Im Gegensatz zu dieser steigt das Integral der Serum-Probe minimal an. Die Kurven der Signal-Integrale von etwa $-2,00$ bis $3,50$ ppm nach Tabelle 16 der HDL2- und HDL3-Proben fallen mit steigendem Druck in etwa gleicher Weise ab.

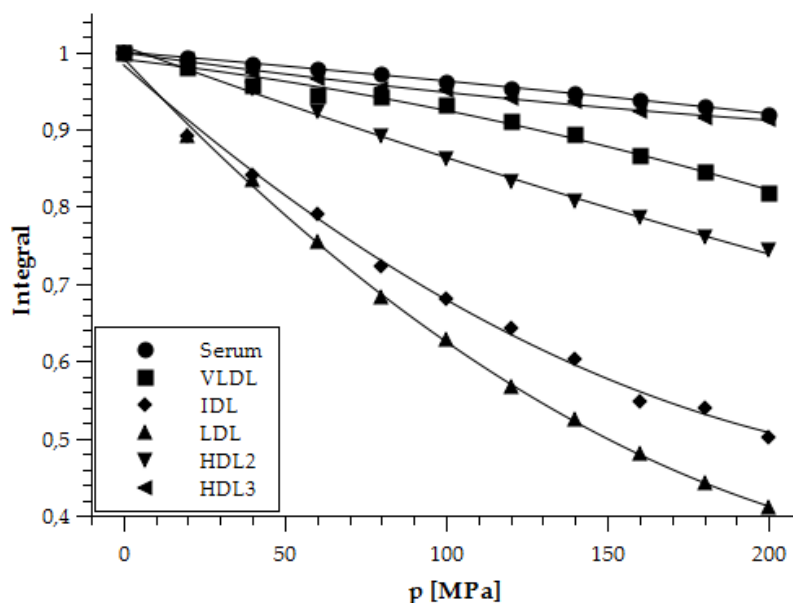


Bild 71: Druckabhängigkeit der Integrale der Signale im Bereich von $\delta = -2,00$ bis $+3,50$ ppm nach Tabelle 16 der Serum- und Lipoprotein-Proben gemessen an einem 800 MHz-Spektrometer bei einer Temperatur von $T=313$ K und einem Druck von $p=0,1$ MPa bis 200 MPa. Die Daten wurden mit der Funktion (2.2) und den Parametern b_1 und b_2 mit $a=1,00$ aus Tabelle 33 gefittet (durchgezogene Linien).

Tabelle 32

Druckabhängigkeit des Integrals der Signale im Bereich von $\delta = -2,00$ bis $+3,50$ ppm nach Tabelle 16. Fit-Parameter b_1 und b_2 der Formel (2.2) mit $a=1,00$ der in Bild 70 gezeigten Kurve bei $T = 283$ K.

Probe	Temperatur [K]	b_1 [$\cdot 10^4$]	b_2 [$\cdot 10^6$]
Serum	283	$2,5 \pm 0,7$	$-1,9 \pm 0,4$
VLDL	283	$-35,1 \pm 1,9$	$3,2 \pm 0,9$
IDL	283	$-41,1 \pm 2,9$	$6,6 \pm 1,4$
LDL	283	$-35,7 \pm 3,4$	$4,5 \pm 1,6$
HDL2	283	$-15,1 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,2$
HDL3	283	$-4,3 \pm 0,4$	$-0,7 \pm 0,2$

Die Integrale der Spektrenbereiche aus Tabelle 16 der Serum- und Lipoprotein-Proben bei $T = 313$ K sind in Bild 71 gegen den Druck p aufgetragen. Die Daten wurden mit der Funktion (2.2) und den Parametern b_1 und b_2 aus Tabelle 33 gefittet (durchgezogene Linien). Die Fit-Kurven befinden sich in sehr guter Übereinstimmung mit den Messwerten.

Tabelle 33

Druckabhängigkeit des Integrals der Signale im Bereich von etwa $\delta = -2,00$ bis $+3,50$ ppm nach Tabelle 16. Fit-Parameter b_1 und b_2 der Formel (2.2) mit $a=1,00$ der in Bild 71 gezeigten Kurve bei $T = 313$ K.

Probe	Temperatur [K]	$b_1 [\cdot 10^4]$	$b_2 [\cdot 10^4]$
Serum	313	$-4,8 \pm 1,4$	$-1,8 \pm 0,7$
VLDL		$-37,1 \pm 2,1$	$6,6 \pm 1,0$
IDL		$-44,4 \pm 1,2$	$7,7 \pm 0,6$
LDL		$-15,4 \pm 0,8$	$1,0 \pm 0,4$
HDL2		$-5,9 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,3$
HDL3		$-4,8 \pm 1,4$	$-1,8 \pm 0,7$

Die Integrale dieses großen Spektrenbereichs nehmen, wie in Bild 71 zu sehen, mit steigendem Druck für alle untersuchten Lipoprotein-Proben und die Serum-Probe ab. Der größte Abfall des Signal-Integrals ist bei den Proben der Lipoproteine LDL und IDL zu erkennen, welche in etwa gleich stark abnehmen. Deutlich geringer sinken die Integrale der übrigen Proben mit steigendem Druck. Das Integral der Serum-Probe zeigt die geringste negative Steigung.

3.2.3 Druckabhängigkeit der CH₂-, CH₃- und Cholin-Kopfgruppen-Signalintegrale der Lipoproteine und des Serums

Dieser Abschnitt fasst die Ergebnisse der Hochdruck-NMR-Messungen an Serum und Lipoproteinen bezüglich der Integrale der CH₂-, CH₃- und Cholin-Kopfgruppen-Signale zusammen. Die Peaks werden mit den in Abschnitt 2.2.3 gezeigten Methoden prozessiert und anschließend integriert. Die Signal-Integrale beim Normaldruck $p = 0,1$ MPa werden der Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit wegen auf Eins gesetzt. Die Signalintegrale wurden in Hinblick auf die Aufnahme-Parameter, wie die Empfängerverstärkung, Anzahl der Scans etc., korrigiert. Die Daten werden nach [87] bezüglich der Kompressibilität von Wasser bei den jeweiligen Bedingungen konvertiert (vgl. Abschnitt 2.2.3).

Tabelle 34

Druckabhängigkeit der CH_2 -, CH_3 -, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterolsignalintegrale mit den Fit-Parameter b_1 und b_2 der Gleichung (2.2) mit $a = 1,00$ bei $T = 283 \text{ K}$ und $T = 313 \text{ K}$.^a

Probe	Peak	Temperatur	$b_1 [\cdot 10^{-3}]$	$b_2 [\cdot 10^{-5}]$
Serum	CH ₂	283	-10,7 ± 1,6	3,48 ± 0,9
VLDL			-7,40 ± 0,6	1,51 ± 0,3
LDL			-8,98 ± 1,1	2,18 ± 0,5
HDL2			-5,29 ± 0,4	1,32 ± 0,2
HDL3			-4,02 ± 0,8	0,86 ± 0,4
Serum	CH ₂	313	-6,62 ± 0,6	1,71 ± 0,3
VLDL			-1,13 ± 0,5	0,10 ± 0,2
LDL			-7,09 ± 1,2	1,92 ± 0,6
HDL2			-3,31 ± 0,4	0,31 ± 0,2
HDL3			-1,84 ± 1,23	0,09 ± 0,6
Serum	CH ₃	283	2,82 ± 3,4	-1,83 ± 1,7
VLDL			-3,25 ± 2,2	-0,73 ± 1,0
LDL			-4,06 ± 2,0	0,13 ± 1,0
HDL2			0,32 ± 4,7	-1,38 ± 2,3
HDL3			-0,71 ± 1,7	0,47 ± 0,8
Serum	CH ₃	313	1,10 ± 1,3	1,45 ± 0,6
VLDL			-0,37 ± 0,7	0,03 ± -0,4
LDL			-4,60 ± 1,2	0,81 ± 0,6
HDL2			-6,52 ± 3,1	2,63 ± 1,5
HDL3			-5,69 ± 1,25	2,50 ± 0,6
Serum	Cholin	283	3,69 ± 2,8	-2,80 ± 1,5
VLDL			-2,55 ± 1,4	-0,35 ± 0,7
LDL			-2,11 ± 0,3	0,11 ± 0,2
HDL2			-0,57 ± 0,3	-0,12 ± 0,1
HDL3			-0,73 ± 0,5	0,17 ± 0,2
Serum	Cholin	313	-3,46 ± 0,8	1,22 ± 0,4
VLDL			-3,52 ± 1,1	0,99 ± 0,5
LDL			-1,99 ± 0,2	-0,04 ± 0,1
HDL2			-1,05 ± 0,2	0,07 ± 0,1
HDL3			-0,26 ± 0,2	-0,04 ± 0,1
VLDL	Cholesterol	313	-2,96 ± 0,5	-0,224 ± 2,6
HDL2			-6,64 ± 0,5	-12,00 ± 2,4

HDL3 $-3,29 \pm 0,4$ $1,30 \pm 1,8$

^a Die Integrale wurden in Hinblick auf die Aufnahme-Parameter, wie die Empfängerverstärkung, Anzahl der Scans etc., korrigiert. Die Daten werden nach (1.17) bezüglich der Kompressibilität von Wasser bei den jeweiligen Bedingungen konvertiert.

Exemplarisch ist in Bild 72 die Druckabhängigkeit des CH₂-Signalintegrals der Lipoprotein- und Serum-Proben bei einer Temperatur von $T = 283 \text{ K}$ dargestellt.

Die Daten wurden mit der Funktion (2.2) nach der Funktion (1.3) und den Parametern b_1 und b_2 mit $a = 1,00$ aus Tabelle 34 gefittet (durchgezogene Linien). Die Fit-Kurven befinden in sehr guter Übereinstimmung mit den Messwerten. Die Integrale des Peaks der HDL2- und HDL3-Proben sind relativ identisch. Die Integrale des CH₂-Signals der VLDL- und LDL-Probe fällt stärker ab als die HDL-Proben. Bei dem Peak des Serum-Materials fällt die Fläche des Signals nach der Druckerhöhung von $p = 20 \text{ MPa}$ auf 40 MPa stark ab und bleibt dann relativ konstant.

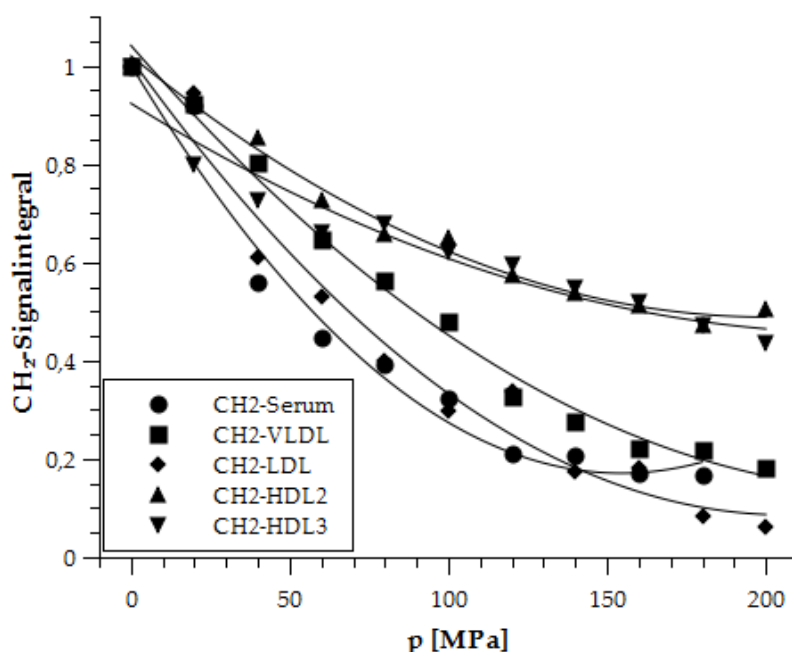


Bild 72: Druckabhängigkeit des CH₂-Signalintegrals der Serum- und Lipoprotein-Proben gemessen an einem 800 MHz-Spektrometer bei einer Temperatur von $T=283 \text{ K}$ und einem Druck von Normaldruck bis $p=200 \text{ MPa}$. Die Daten wurden mit der Funktion (2.2) nach der Funktion (1.3) und den Parametern b_1 und b_2 mit $a=1,00$ aus Tabelle 34 gefittet (durchgezogene Linien).

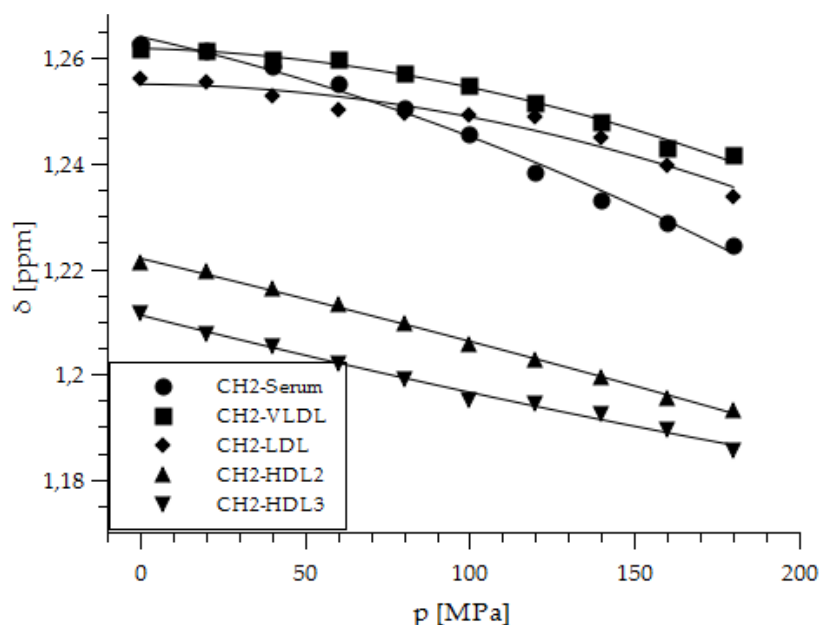


Bild 73: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des CH₂-Gruppen-Signals der Serum- und Lipoprotein-Proben bei Erhöhung des Drucks von Normaldruck auf $p = 200$ MPa und $T = 283$ K an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d*. Die Daten werden mit der Funktion (2.2) mit den berechneten Fit-Parameter a , b_1 und b_2 aus Tabelle 35 angenähert.

3.2.4 Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der CH₂-, CH₃-, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterol-Signale der Lipoproteine und des Serums

Dieser Abschnitt beschreibt die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen verschiedener Signale in den NMR-Spektren von Serum und den Lipoproteinen.

Hierzu werden die chemischen Verschiebungen δ aus den 1D-¹H-NMR-Spektren mit der *noesygppr1d*-Pulssequenz ausgelesen und gegen den Druck p aufgetragen. Das Acetat-Signal wurde auf $\delta = 1,875$ ppm referenziert.

Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des CH₂-Gruppen-Signals der Serum- und Lipoprotein-Proben, gemessen bei $T = 283$ K an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer, ist in Bild 73 gezeigt. Des Weiteren sind die Messwerte mit der Funktion (2.2) und den Parametern a , b_1 und b_2 aus Tabelle 35 gefittet (durchgezogene Linien).

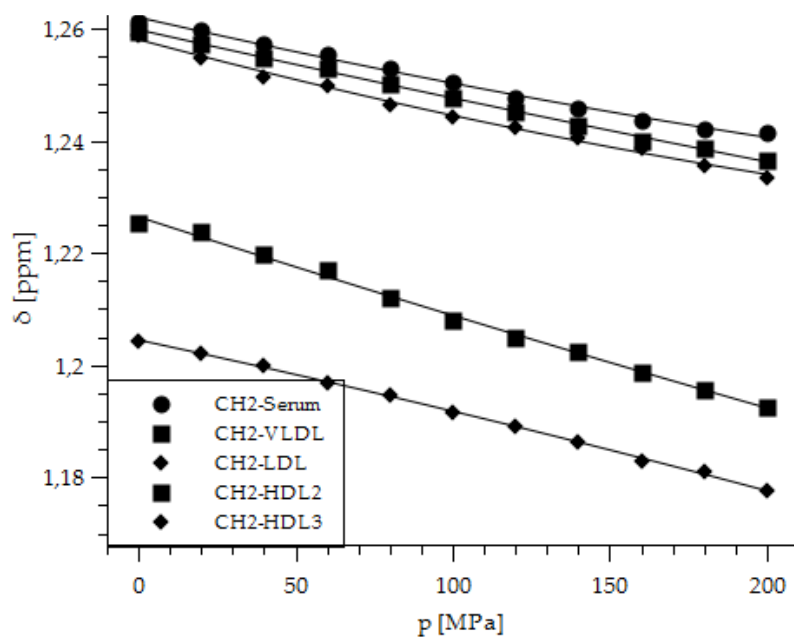


Bild 74: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des CH_2 -Gruppen-Signals der Serum- und Lipoprotein-Proben bei Erhöhung des Drucks von Normaldruck auf $p = 200 \text{ MPa}$ und $T = 313 \text{ K}$ an einem 800 MHz -NMR-Spektrometer mit der Pulssequenz *noesygppr1d*. Die Daten werden mit der Funktion (2.2) mit den berechneten Fit-Parameter a , b_1 und b_2 aus Tabelle 35 angenähert.

Die chemische Verschiebung des Signals wandert mit steigendem Druck für die Lipoprotein-Proben und die Serum-Probe zu niedrigeren Frequenzen. Die Fit-Kurven der chemischen Verschiebungen des CH_2 -Signals des HDL2 und HDL3 weisen in etwa die gleiche Steigung auf. Am stärksten wandert das CH_2 -Gruppen-Signal der Serum-Probe in Richtung niedrigerer Frequenzen.

In Bild 74 ist die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des CH_2 -Gruppen-Signals der Serum- und Lipoprotein-Proben bei Erhöhung des Drucks von Normaldruck auf $p = 200 \text{ MPa}$ und bei einer Temperatur von $T = 313 \text{ K}$ an einem 800 MHz -NMR-Spektrometer gezeigt. Die Messwerte wurden mit der Funktion (2.2) mit den Parametern a , b_1 und b_2 aus Tabelle 35 gefittet (durchgezogene Linien). Die Werte der chemischen Verschiebung der Serum- und Lipoprotein-Proben fallen linear mit steigendem Druck ab. Die Steigung aller Fit-Kurven ist hierbei nahezu identisch.

Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der CH_3 -, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterol-Signale der Serum- und Lipoprotein-Proben sind in Abschnitt 3.2.5.2 gezeigt.

Tabelle 35

Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der CH₂-, CH₃- und Cholin-Kopfgruppen-Signale mit den berechneten Fit-Parameter a , b_1 und b_2 der Gleichung (2.2) mit bei $T = 283\text{ K}$ und $T = 313\text{ K}$.^a

Probe	Signal	T [K]	a	$b_1 [\cdot 10^{-5}]$	$b_2 [\cdot 10^{-7}]$
Serum	CH ₂	283	1,26	-14,06 ± 3,0	-4,89 ± 1,6
VLDL			1,26	-1,63 ± 1,8	-5,78 ± 1,0
LDL			1,26	-0,42 ± 3,8	-5,80 ± 2,0
HDL2			1,22	-15,00 ± 1,2	-0,76 ± 0,6
HDL3			1,213	-15,87 ± 1,8	1,19 ± 0,9
Serum	CH ₂	313	1,26	-12,78 ± 1,0	1,04 ± 0,5
VLDL			1,26	-12,58 ± 0,7	0,41 ± 0,3
LDL			1,26	-15,03 ± 1,1	1,51 ± 0,5
HDL2			1,23	-18,11 ± 1,4	0,54 ± 0,7
HDL3			1,20	-11,94 ± 0,5	-0,75 ± 0,3
Serum	CH ₃	283	0,87	-1,17 ± 2,60	-6,40 ± 1,4
VLDL			0,87	-8,08 ± 1,7	-2,85 ± 0,9
LDL			0,85	-6,14 ± 1,40	-0,92 ± 0,8
HDL2			0,83	-9,17 ± 1,5	-0,50 ± 0,8
HDL3			0,82	-4,63 ± 0,7	-2,52 ± 0,4
Serum	CH ₃	313	0,86	-4,69 ± 0,8	0,70 ± 0,4
VLDL			0,86	-6,27 ± 0,9	-0,88 ± 0,4
LDL			0,84	1,23 ± 0,7	-2,92 ± 0,4
HDL2			0,84	-14,51 ± 1,8	2,09 ± 0,9
HDL3			0,81	-3,26 ± 0,6	-1,70 ± 0,3
Serum	Cholin	283	3,19	-18,72 ± 1,5	3,47 ± 0,8
LDL			3,22	-15,65 ± 1,0	1,12 ± 0,5
HDL2			3,20	-17,04 ± 0,3	2,22 ± 0,1
HDL3			3,20	-14,19 ± 0,2	1,18 ± 0,11
Serum	Cholin	313	3,20	-12,85 ± 1,0	0,85 ± 0,5
VLDL			3,23	-14,43 ± 1,0	0,91 ± 0,5
LDL			3,22	-18,93 ± 0,3	2,46 ± 0,2
HDL2			3,20	-13,07 ± 0,3	0,67 ± 0,1
HDL3			3,19	-12,95 ± 0,4	0,71 ± 0,2

^aDas Acetat-Signal wurde auf 1,875 ppm referenziert.

3.2.5 Thermodynamische Auswertung der Hochdruck-NMR-Daten

Wie bereits in Abschnitt 3.2.2 bis 3.2.4 gezeigt, sind die Messergebnisse zur Untersuchung mit Hilfe eines thermodynamischen Modells nach Abschnitt 1.4.2 geeignet. Hierbei werden die Messdaten mit der Funktion (2.3) und (2.16) angenähert.

3.2.5.1 Druckabhängigkeit der Änderungen der CH₂-, CH₃-, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterol-Signalintegrale

In diesem Abschnitt wird die Änderung einzelner Signalintegrale mit steigendem Druck untersucht. Hierbei werden die Messergebnisse, die bereits in Abschnitt 3.2.3 gezeigt wurden, mit Hilfe der Funktion (2.16) gefittet. Daraus resultieren die physikalischen Größen ΔG_0 und ΔV_0 , welche bereits für die Integrale eines großen Frequenzbereichs der Serum- und Lipoprotein-Proben dargestellt wurden. Des Weiteren wird das Verhältnis der Konzentrationen der Kompartimente B und C als c angegeben. Das Kompartiment B enthält Lipide, die unabhängig von der Temperatur immer sichtbar sind. Das Kompartiment C enthält Lipide, die in einem Phasenübergang involviert

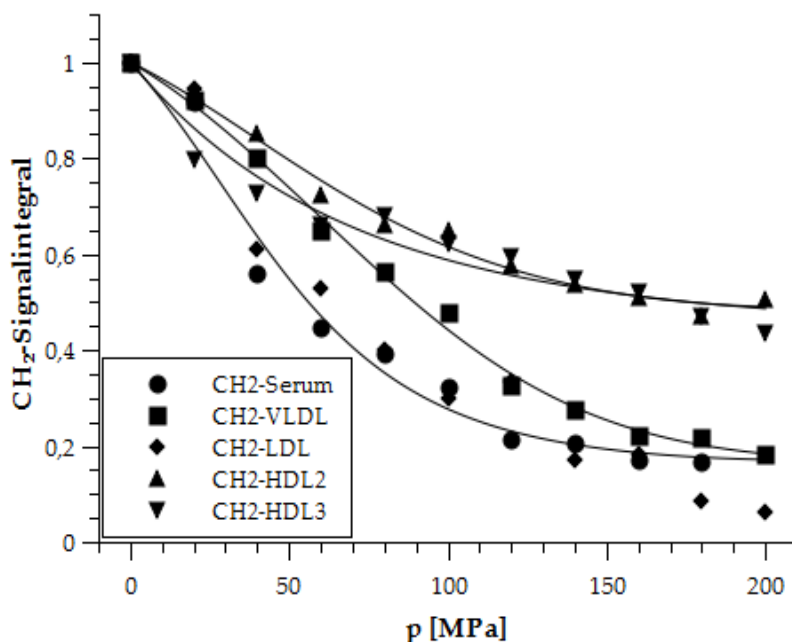


Bild 75: CH₂-Signalintegral der Serum und Lipoprotein-Proben gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=283$ K in Abhängigkeit des Drucks. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.16) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

sind. Nach dem Phasenübergang sind die Lipide zu breit, um detektiert zu werden (siehe Abschnitt 2.2.3).

Tabelle 36 am Ende dieses Abschnitts fasst alle Ergebnisse der thermodynamischen Auswertung der CH_2 -, CH_3 -, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterol-Signalintegrale aller Lipoprotein- und Serum-Proben mit der Gleichung (2.16) zusammen.

In Bild 75 ist die Druckabhängigkeit der CH_2 -Signalintegrals der Serum- und Lipoprotein-Proben bei einer Temperatur von $T = 283 \text{ K}$ gegen den Druck p aufgetragen. Die Messwerte werden mit der Funktion (2.16) und den Parametern aus Tabelle 36 gefittet, was als Linie im Graphen zu sehen ist. Die Integralwerte des CH_2 -Signals der LDL-Probe sind mit Hilfe der Funktion (2.16) nicht fitbar. Die Änderung der Gibbs-Energie bei Standardbedingungen der Proben liegt im Bereich zwischen $\Delta G_0 = -3$ und $1,56 \text{ kJ/mol}$, mit Ausnahme des ermittelten ΔG_0 -Werts der HDL2-Probe von $\Delta G_0 = 11,32 \text{ kJ/mol}$. Die Änderung des molaren Teilvolumens nimmt negative Werte an. Die Fit-Kurven befinden sich in sehr guter Übereinstimmung mit den Messwerten der CH_2 -Signalintegrale bei $T = 283 \text{ K}$.

Bild 76 zeigt die CH_2 -Signalintegrale der Serum- und Lipoprotein-Proben, gemessen bei einer Temperatur von $T = 313 \text{ K}$ in Abhängigkeit des Drucks p . Hierbei sind mit

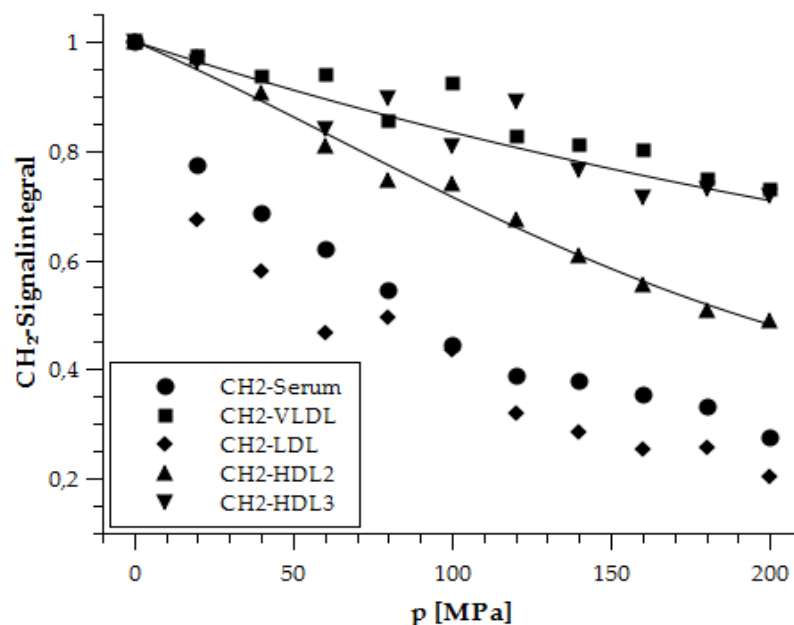


Bild 76: CH_2 -Signalintegral der Serum und Lipoprotein-Proben gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=313 \text{ K}$ in Abhängigkeit des Drucks. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.16) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

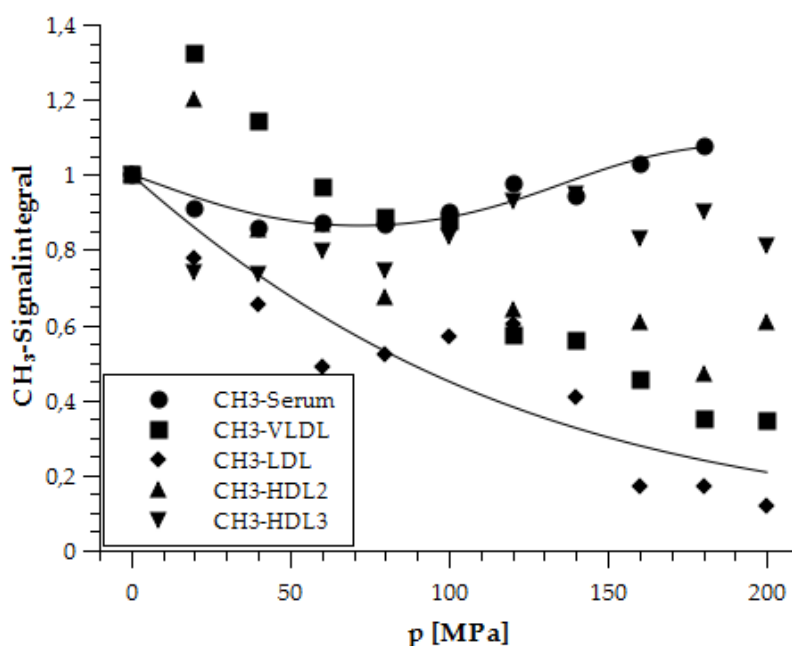


Bild 77: CH_3 -Signalintegral der Serum und Lipoprotein-Proben gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=283\text{ K}$ in Abhängigkeit des Drucks. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.16) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

Hilfe der Funktion (2.16) nur die Werte der HDL2- und HDL3-Probe zu fitten. Jedoch ist ebenso für diese Integralwerte der Fit-Fehler sehr groß. Für die Änderung der freien Standardenthalpie ΔG_0 werden mit Hilfe des Fit-Algorithmus Werte wie folgt berechnet: $\Delta G_0 = -7,91$ und $-20,35\text{ kJ/mol}$. Die CH_2 -Signalintegrale der Serum- und Lipoprotein-Proben können nur mit einem sehr großen Fit-Fehler mit Hilfe der Funktion (2.16) angenähert werden.

Die Ergebnisse der thermodynamischen Auswertung der Druckabhängigkeit des CH_3 -Signalintegrals der Serum- und Lipoprotein-Proben, gemessen bei einer Temperatur von $T = 283\text{ K}$ an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer, sind in Tabelle 36 und Bild 77 zusammengefasst. Zudem wird die Änderung der Gibbs-Energie bei Standardbedingungen ΔG_0 mit Hilfe des in [85] bestimmten $\Delta H(T_m)$ -Werts nach der Funktion (2.4) für die LDL-, HDL2- und HDL3-Probe berechnet, als Konstante in die Funktion (2.16) eingesetzt und anschließend der Parameter ΔV_0 bestimmt (siehe Tabelle 36).

Die CH_3 -Signalintegrale der HDL3-Probe sind mit Hilfe der Funktion (2.16) und ΔG_0 nach [85] nicht fitbar. Für die Serum-Probe ergeben sich folgende Werte: $\Delta G_0 = 2,83\text{ kJ/mol}$ und $\Delta V_0 = -100,51\text{ mL/mol}$. Die Änderung der freien Standardenthalpie variiert je nach Probe stark. Für die VLDL-Probe wird folgender ΔG_0 -Wert berechnet:

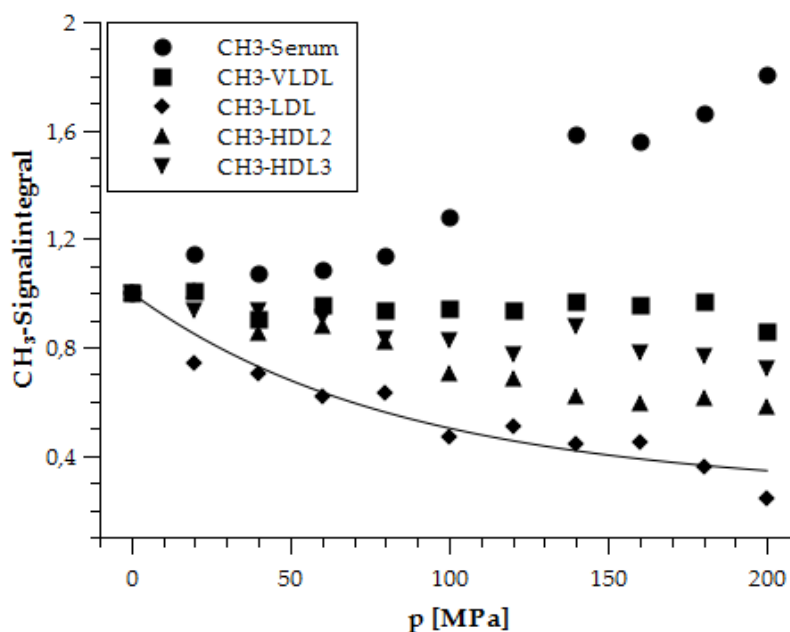


Bild 78: CH_3 -Signalintegrale der Serum und Lipoprotein-Proben gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=313\text{ K}$ in Abhängigkeit des Drucks von 0,1 MPa bis 200 MPa. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.16) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

$\Delta G_0 \approx +23\text{ kJ/mol}$, wobei der Fit-Fehler sehr groß ist. Eine thermodynamische Auswertung der Daten der HDL3-Probe war aufgrund des Kurvenverlaufs nicht möglich.

Nach der Temperaturerhöhung von $T = 283\text{ K}$ auf $T = 313\text{ K}$ können die in Bild 78 gezeigten Druckabhängigkeiten der CH_3 -Signalintegrale beobachtet werden. Die mit Hilfe der Fit-Funktion (2.16) berechneten Parameter sind in Tabelle 36 gezeigt. Die Messdaten der VLDL-, HDL2- und HDL3-Probe sind aufgrund ihres relativ linearen, fast konstanten Kurvenverlaufs mit Hilfe der Funktion (2.16) nicht fitbar.

Der ΔG_0 -Wert wurde mit Hilfe von [85] und Gleichung (2.4) zu $\Delta G_0 = +7,27\text{ kJ/mol}$ berechnet und in (2.16) eingesetzt. Daraus ergibt sich für die Änderung des molaren Teilvolumens der LDL-Probe: $\Delta V_0 = -150,3\text{ mL/mol}$. Die Druckabhängigkeit des CH_3 -Signalintegrals der LDL-Probe befindet sich in sehr guter Übereinstimmung mit der Fit-Kurve (vgl. Bild 78). Das Signalintegral der Methyl-Gruppe nimmt innerhalb des Serum-Spektrums mit steigendem Druck zu.

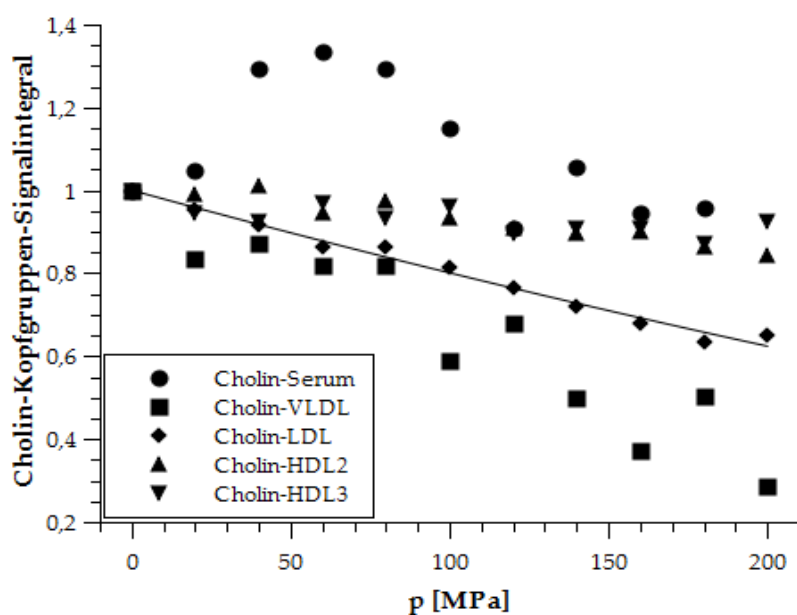


Bild 79: Cholin-Kopfgruppen-Signalintegral der Serum und Lipoprotein-Proben gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=283$ K in Abhängigkeit des Drucks von 0,1 MPa bis 200 MPa. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.16) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

In Bild 79 sind die Werte der Cholin-Kopfgruppen-Signalintegrale gemessen bei $T = 283$ K, gegen den Druck p aufgetragen. Die Daten der Serum-, VLDL-, HDL2- und HDL3-Probe können auf Grund ihrer Form nicht mit Hilfe der Funktion (2.16) angenähert werden. Somit kann die Änderung des molaren Teilvolumens ΔV_0 mit Hilfe von [85] nur für die LDL-Probe berechnet werden: $\Delta V_0 = -3,03$ mL/mol.

Die Druckabhängigkeit des Cholin-Kopfgruppen-Signalintegrals bei einer Temperatur von $T = 313$ K ist in Bild 80 dargestellt. Die mit Hilfe der Funktion (2.16) berechneten Fit-Parameter können anhand der Tabelle 36 wie folgt zusammengefasst werden: die mit [85] bestimmten ΔG_0 -Werte für LDL und HDL2 sind positiv und ΔG_0 der VLDL-Probe ist nach Bestimmung mit Hilfe der Fit-Funktion (2.16) negativ, wobei hierbei der Fit-Fehler aufgrund der Messdaten sehr groß ist. Für die Änderung des molaren Teilvolumens ΔV_0 werden definitionsgemäß negative Werte ermittelt.

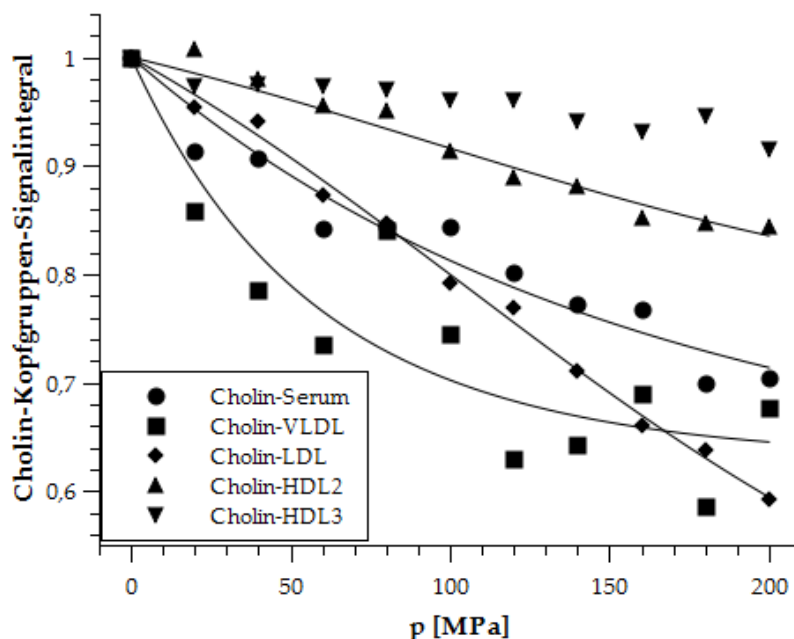


Bild 80: Cholin-Kopfgruppen-Signalintegrale der Serum und Lipoprotein-Proben gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=313\text{ K}$ in Abhängigkeit des Drucks von 0,1 MPa bis 200 MPa. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.16) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

Darüber hinaus wird das Cholesterol-C18-Signalintegral auf seine Druckabhängigkeit und die daraus erkennbaren thermodynamischen Eigenschaften untersucht. Dabei wird zunächst das Verhalten dieses Signalintegrals bei einer Temperatur von $T = 313\text{ K}$ analysiert. Diese Messdaten und die zugehörigen Fit-Kurven mit den Parametern aus Tabelle 36 sind in Bild 81 für die VLDL-, HDL2- und HDL3-Proben gezeigt. Für die übrigen Proben (Serum, IDL und LDL) und für eine Temperatur von $T = 283\text{ K}$ war eine Berechnung der Signalintegrale aufgrund der Spektren-Eigenschaften nicht möglich. Die mit Hilfe von [85] bestimmten Änderungen der Gibbs-Energien sind für alle drei Proben positiv. Die Änderung des molaren Teilvolumens ergibt Werte zwischen $\Delta V_0 = -50$ und -33 mL/mol . Die Messdaten befinden sich in sehr guter Übereinstimmung mit den Fit-Kurven (siehe Bild 81).

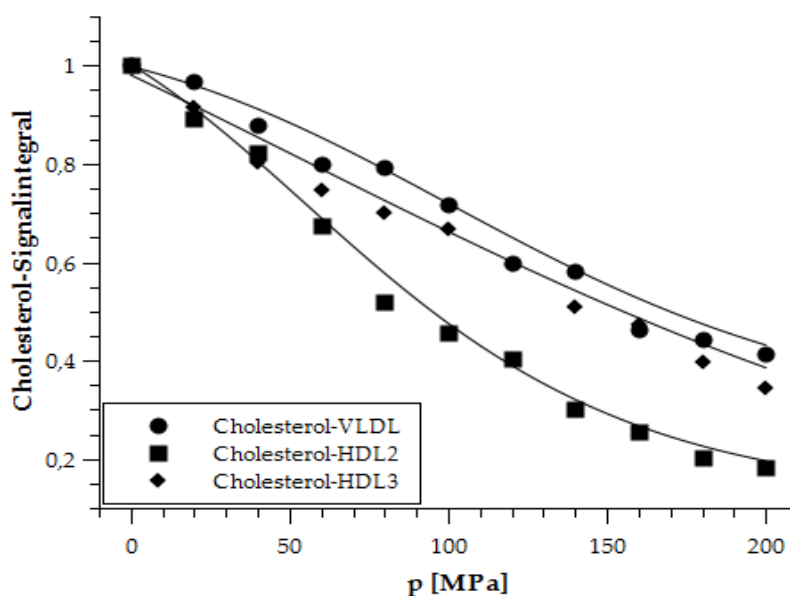


Bild 81: Druckabhängigkeit des Cholesterol-Signalintegrals gemessen an einem 800MHz-NMR-Spektrometer bei einer Temperatur von $T=313$ K mit der Pulssequenz *noesygprr1d*. Die Volumen-Werte wurden auf 1 normiert und gegen den Druck aufgetragen. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.16) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 36 zusammengefasst.

Tabelle 36

Druckabhängigkeit der CH_2 -, CH_3 -, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterol-Signalintegrale der Lipoprotein- und Serum-Proben. Die Messungen wurden an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei den Temperaturen $T = 283$ K und $T = 313$ K bei einem Druckbereich zwischen $0,1$ MPa und 200 MPa mit einer *noesygprr1d* Pulssequenz aufgenommen. Die Fit-Parameter c , ΔG_0 und, ΔV_0 wurden mit Hilfe der Druckabhängigkeit der Integral-Werte mit der Gleichung (2.16) berechnet.^{a, b, c, d, f}

Probe	Signal	T [K]	c	$\Delta G_0 \left[\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right]$	$\Delta V_0 \left[\frac{\text{mL}}{\text{mol}} \right]$
Serum	CH_2	283	$7,81 \pm 4,97$	$1,56 \pm 2,37$	$-69,60 \pm 26,28$
VLDL			$14,77 \pm 52,6$	$-1,52 \pm 12,3$	$-16,74 \pm 37,5$
HDL2			$0,74 \pm 0,16$	$11,32^f$	$-171,57 \pm 28,08$
HDL3			$5,26 \pm 0,85^f$	$-3,00^f$	$-39,79 \pm 7,71^f$
HDL2	CH_2	313	$-1,00^c$	$-20,35^a$	$-9,53 \pm 84,8$
HDL3			$82,35^a$	$-7,91^a$	$-6,61^a$
Serum	CH_3	283	$0,55 \pm 1,5$	$2,83 \pm 3,7$	$-100,51 \pm 138,0$
VLDL			$-1,00 \pm 0,7^d$	$23,48^{a, d}$	$-25,78 \pm 31,4^d$

LDL			-89,08 ^a	-6,03 ^b	-14,91 ± 9,36
HDL2			2,19 ± 0,4	1,70	-54,95 ± 42,2
HDL3			e	0,17	e
LDL	CH ₃	313	1,51 ± 0,30 ^c	7,27	-150,30 ± 26,81 ^c
LDL	Cholin	283	-55,59 ± 67,35	-7,29	-3,03 ± 2,88 ^c
VLDL	Cholin	313	17,86 ^a	-8,43 ^a	-43,42 ^a
LDL			2,20 ± 0,79 ^c	2,93 ^b	-27,98 ± 3,87 ^c
HDL2			0,44 ± 0,19	2,64 ^b	-28,50 ± 9,84
VLDL	Cholesterol	313	3,69 ± 3,12 ^c	3,79 ± 1,42 ^c	-40,25 ± 15,20 ^c
HDL2			8,91 ± 2,13	2,87 ^b	-50,82 ± 2,50
HDL3			6,04 ± 3,57	2,19 ^b	-33,96 ± 4,89

a Werte besitzen einen großen Fit-Fehler.

b ΔG_0 aus [85]

c Nelder-Mead Simplex

d Unscaled Levenberg-Marquardt

e Messdaten sind nicht fitbar.

f Iterative Näherung.

3.2.5.2 Chemische Verschiebung

Die in Abschnitt 3.2.4 gezeigte Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der CH₂-, CH₃-, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterol-Signale wird in folgendem Abschnitt in Hinblick auf die thermodynamischen Eigenschaften untersucht. Hierfür werden die Messdaten mit Hilfe der Funktion (2.3) gefittet, wodurch die physikalischen Größen ΔG_0 , ΔV_0 und $\Delta\beta'$ berechnet werden können. Für die gesamten Daten wird $\Delta\beta' = 0$ gesetzt, da die Daten ansonsten nicht angenähert werden können. Das Acetat-Signal wurde wie in Abschnitt 3.2.4 auf $\delta = 1,875$ ppm referenziert.

Die thermodynamischen Analysen der Änderung der chemischen Verschiebung des CH₂-Signals der Serum-, VLDL- und LDL-Proben bei einer Temperatur von $T = 283$ K ist in Bild 82 gezeigt. Dabei stellen die Linien die Fit-Kurven der Funktion (2.3) mit den Parametern aus Tabelle 37 dar. Die Daten der LDL-Probe können mit Hilfe der Funktion (2.3) nicht gefittet werden.

Die zugehörigen Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebung des CH₂-Signals der HDL2- und HDL3-Proben sind in Bild 83 dargestellt.

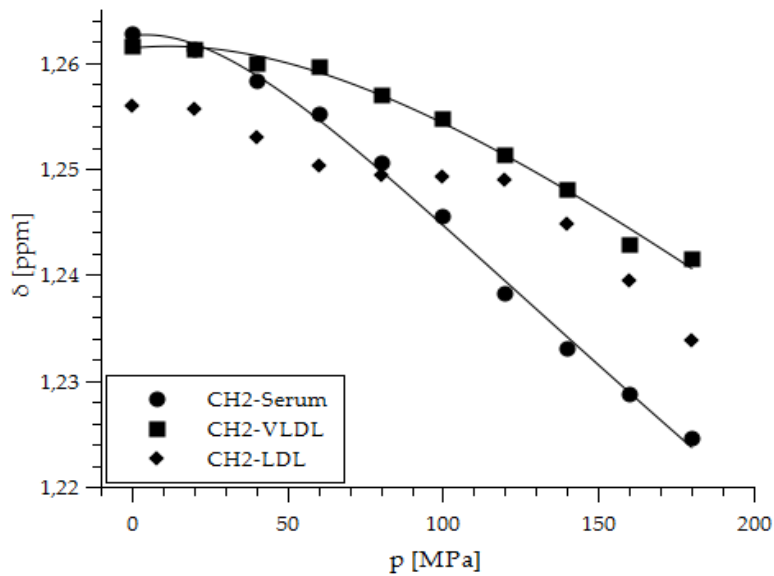


Bild 82: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung δ des CH_2 -Signals der Serum-VLDL- und LDL-Proben gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=283\text{ K}$ in Abhängigkeit des Drucks. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.3) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

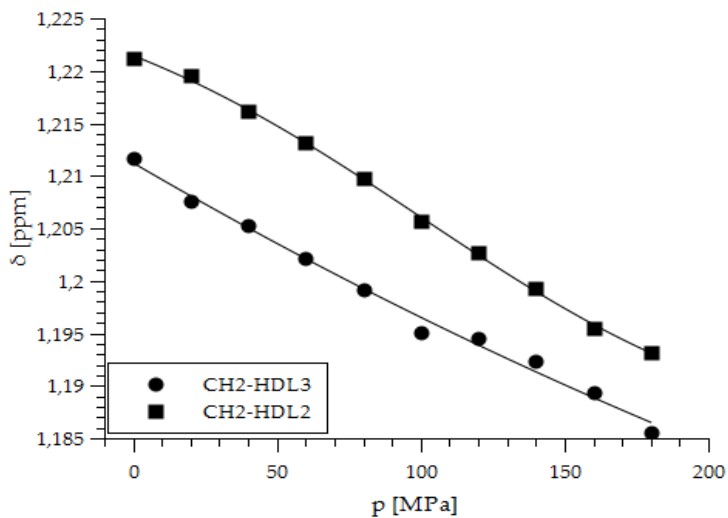


Bild 83: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung δ des CH_2 -Signals der HDL2- und HDL3 -Proben gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=283\text{ K}$ in Abhängigkeit des Drucks. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.3) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 37 zusammengefasst

Dabei wird das Signal bei beiden Proben in etwa um denselben Betrag in Richtung kleinerer ppm-Werte verschoben.

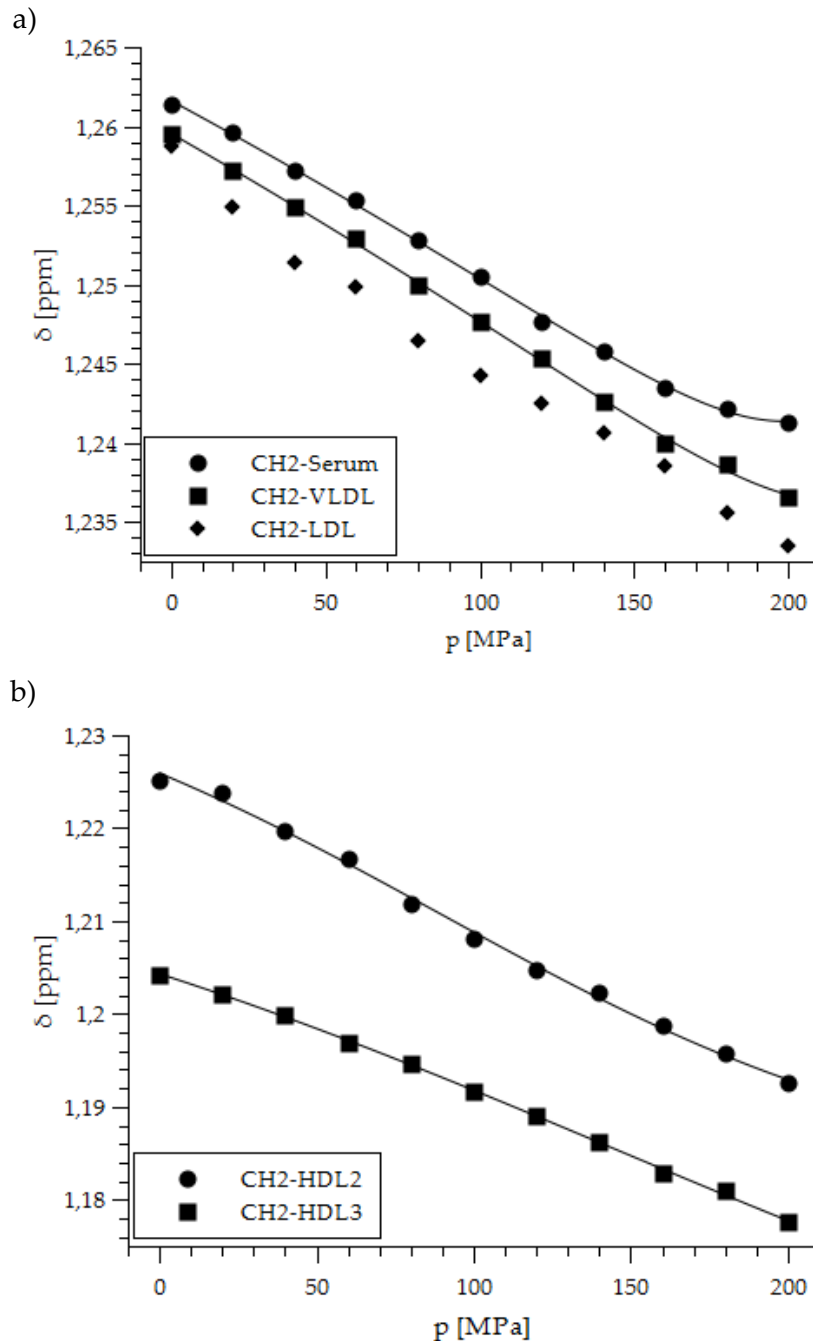


Bild 84: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung δ des CH₂-Signals der (a) Serum-, VLDL- und LDL- und (b) der HDL-Proben gemessen mit der Pulssequenz noesygppr1d an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=313$ K in Abhängigkeit des Drucks. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.3) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

Die berechnete freie Standardenthalpie ΔG_0 nimmt für Serum und VLDL negative und für die HDL2- und HDL3-Proben positive Werte an. Die Näherung der Daten mit Hilfe

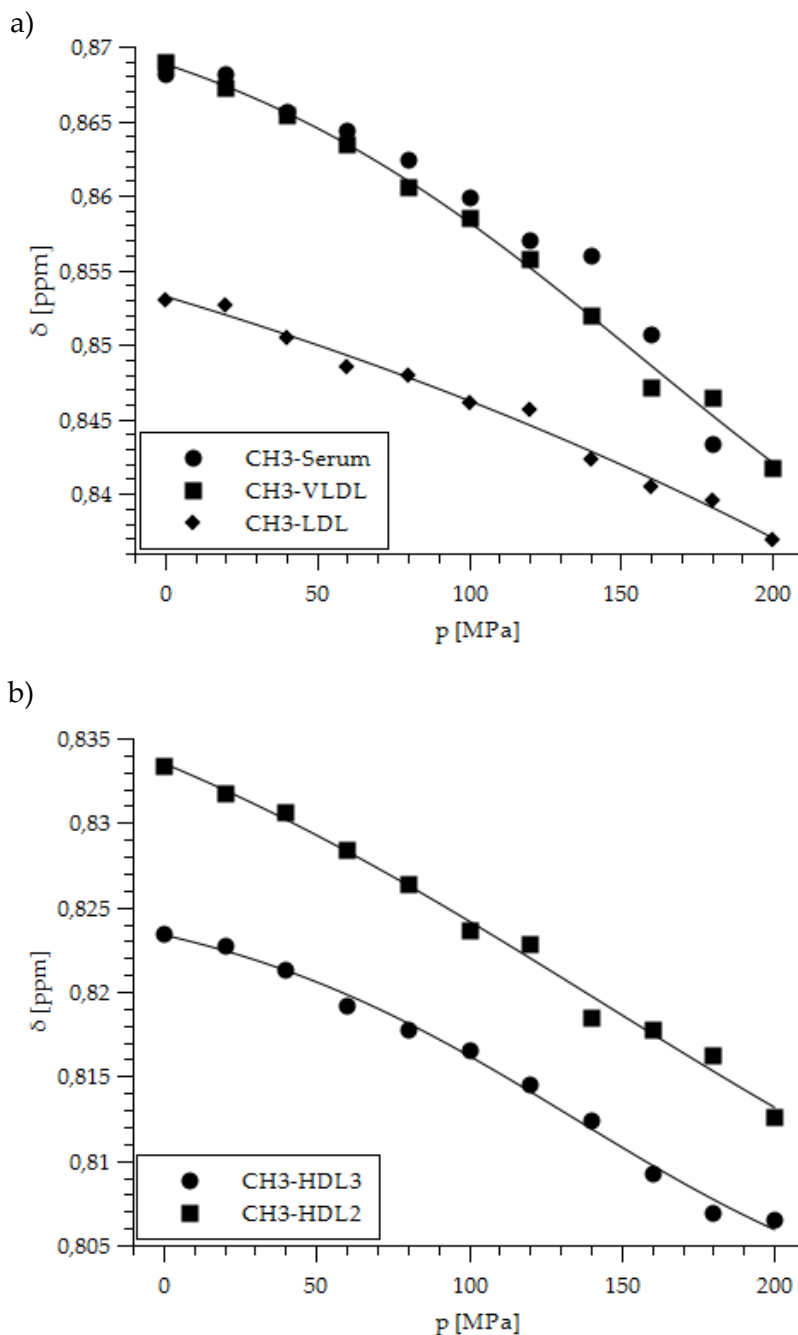


Bild 85: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung δ des CH_3 -Signals der (a) Serum-, VLDL- und LDL- und (b) der HDL-Proben gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=283$ K in Abhängigkeit des Drucks. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.3) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

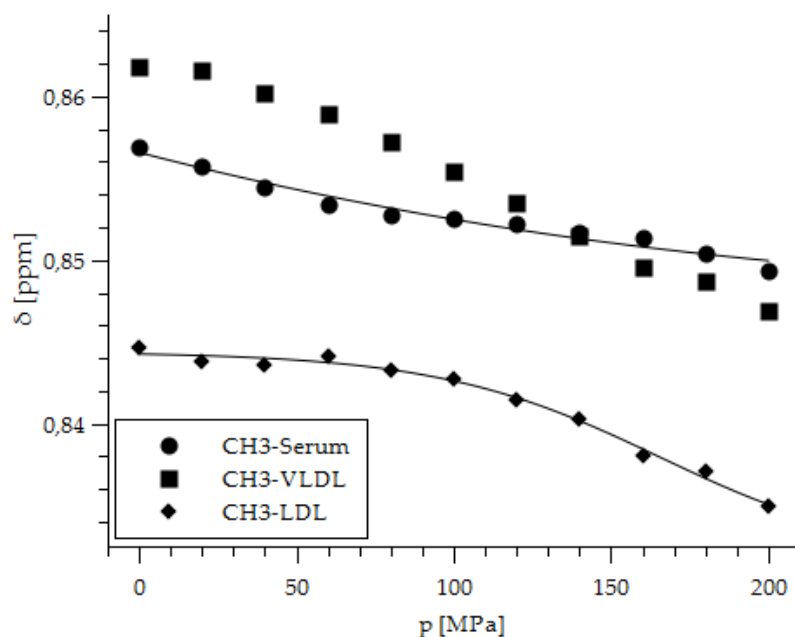


Bild 86: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung δ des CH_3 -Signals der Serum-, VLDL- und LDL-Proben gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=313\text{ K}$ in Abhängigkeit des Drucks. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.3) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

der Funktion (2.3) ergibt für die Änderung des molaren Teilvolumens ΔV_0 aller Proben Werte zwischen $-0,95$ und $-2,50\text{ mL/mol}$.

Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des CH_2 -Signals der Serum-, VLDL- und LDL-Proben, gemessen bei einer Temperatur von $T = 313\text{ K}$, ist in Bild 84 dargestellt. Die zugehörigen Fit-Kurven, welche mit Hilfe der Funktion (2.3) berechnet werden, mit den Parametern aus Tabelle 37 sind als Linien innerhalb des Graphen zu sehen. Diese befinden sich in sehr guter Übereinstimmung mit den Messdaten der chemischen Verschiebung. Die Daten der HDL2- und HDL3-Proben sind in (b) gezeigt. Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des CH_2 -Signals der LDL-Probe kann mit Hilfe der Funktion (2.3) nicht gefittet werden.

Die Änderung der freien Standardenthalpie besitzt für alle Proben positive Werte.

Das molare Teilvolumen ΔV_0 der VLDL-Probe liegt bei etwa $\Delta V_0 = -3,3\text{ mL/mol}$ und $\Delta V_0 = -3,6\text{ mL/mol}$ für die Serum-Probe. Das Methylen-Signal innerhalb der Spektren aller Serum- und Lipoprotein-Proben shiftet bei Erhöhung des Drucks auf die Probe in Richtung niedriger Frequenzen.

Die chemische Verschiebung des CH_3 -Signals der Serum-, LDL- und VLDL-Probe, gemessen bei einer Temperatur von $T = 283\text{ K}$, in Abhängigkeit des Drucks p ist in Bild

85 gezeigt. Die Messwerte fallen mit steigendem Druck ab. Die Kurven der Serum- und VLDL-Probe besitzen in etwa denselben Verlauf. Die Daten der Serum-Probe können mit Hilfe der Gleichung (2.3) nicht gefittet werden. Nach Tabelle 37 sind die ΔG_0 -Werte aller Proben positiv und liegen zwischen 0,13 und 0,21 kJ/mol . Die Fit-Kurven befinden sich in guter Übereinstimmung mit den Messdaten.

Die thermodynamische Analyse der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des CH_3 -Gruppen-Signals der Serum- und Lipoprotein-Proben mit Hilfe der Fit-Funktion (2.3) und den Parametern aus Tabelle 37 bei einer Temperatur von $T = 313 \text{ K}$ sind in Bild 86 und Bild 87 gezeigt. Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des Methyl-Signals der Serum-Probe ist mit Hilfe der Gleichung (2.3) nicht fitbar. Für die freie Standardenthalpie der VLDL-, LDL- und HDL3-Probe ergeben sich positive Werte und für HDL2 ein negativer Wert. Die Fit-Kurven in Bild 86 und Bild 87 befinden sich in guter Übereinstimmung mit den Werten der chemischen Verschiebung des CH_3 -Signals.

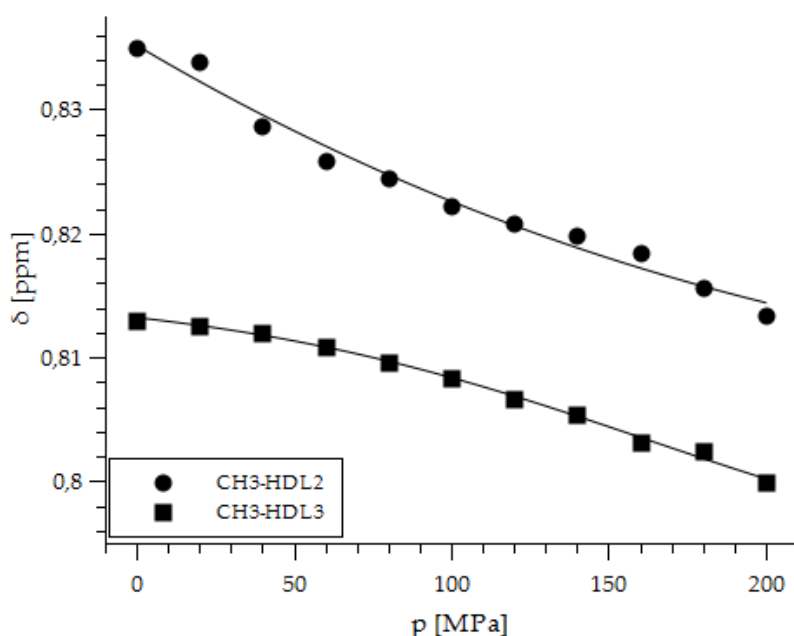


Bild 87: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung δ des CH_3 -Signals der HDL2- und HDL3-Proben gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei $T=313 \text{ K}$ in Abhängigkeit des Drucks. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.3) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

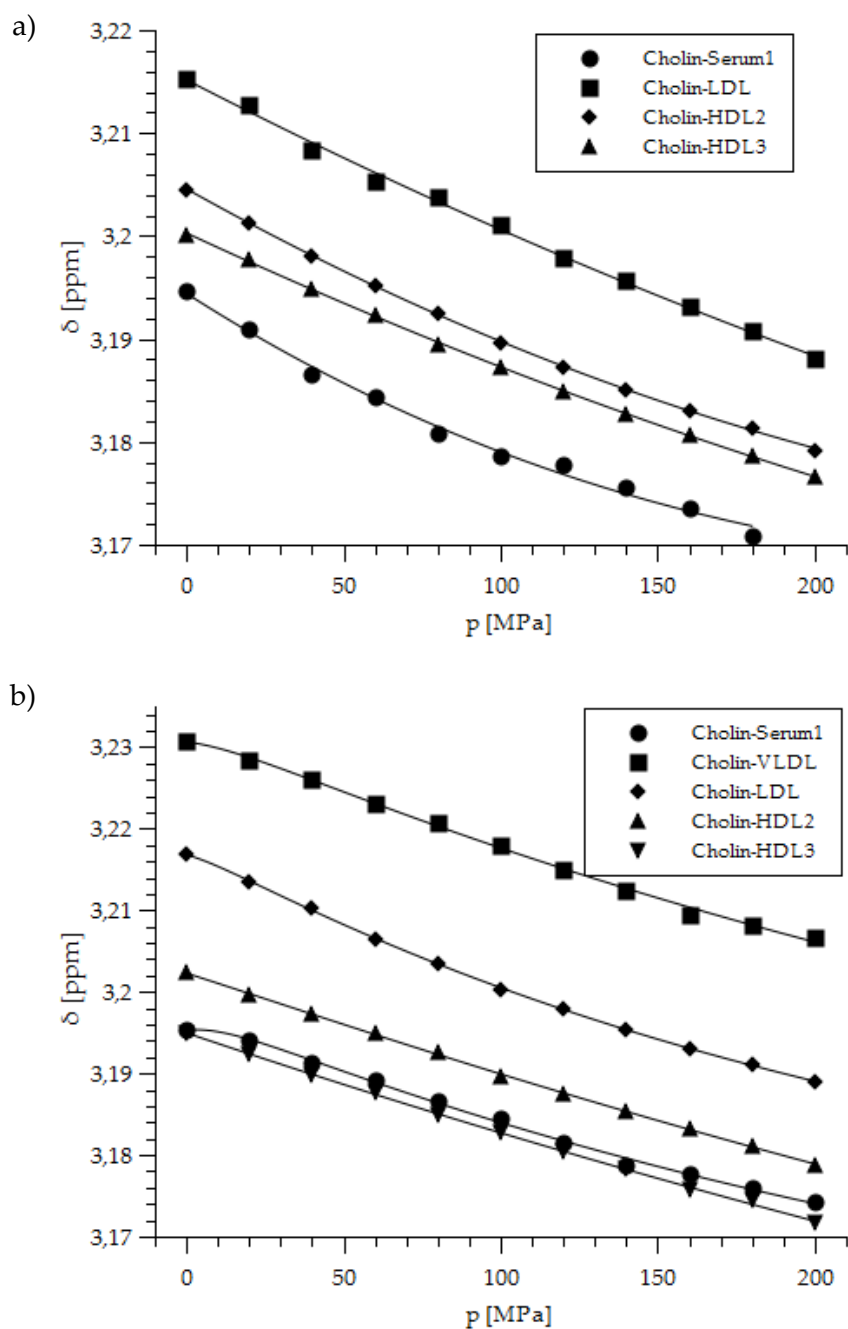


Bild 88: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung δ des Cholin-Kopfgruppen-Signals der Serum und LDL-, HDL2 und HDL3-Proben gemessen mit der Pulssequenz noesygppr1d an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei (a) $T=283$ K und (b) $T=313$ K in Abhängigkeit des Drucks. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.3) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

Bild 88 (a) zeigt die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des Cholin-

Kopfgruppen-Signale der Serum- und Lipoprotein-Proben bei einer Temperatur von $T = 283 \text{ K}$ mit den jeweiligen Fit-Kurven. Die zugehörigen Fit-Parameter sind in Tabel-

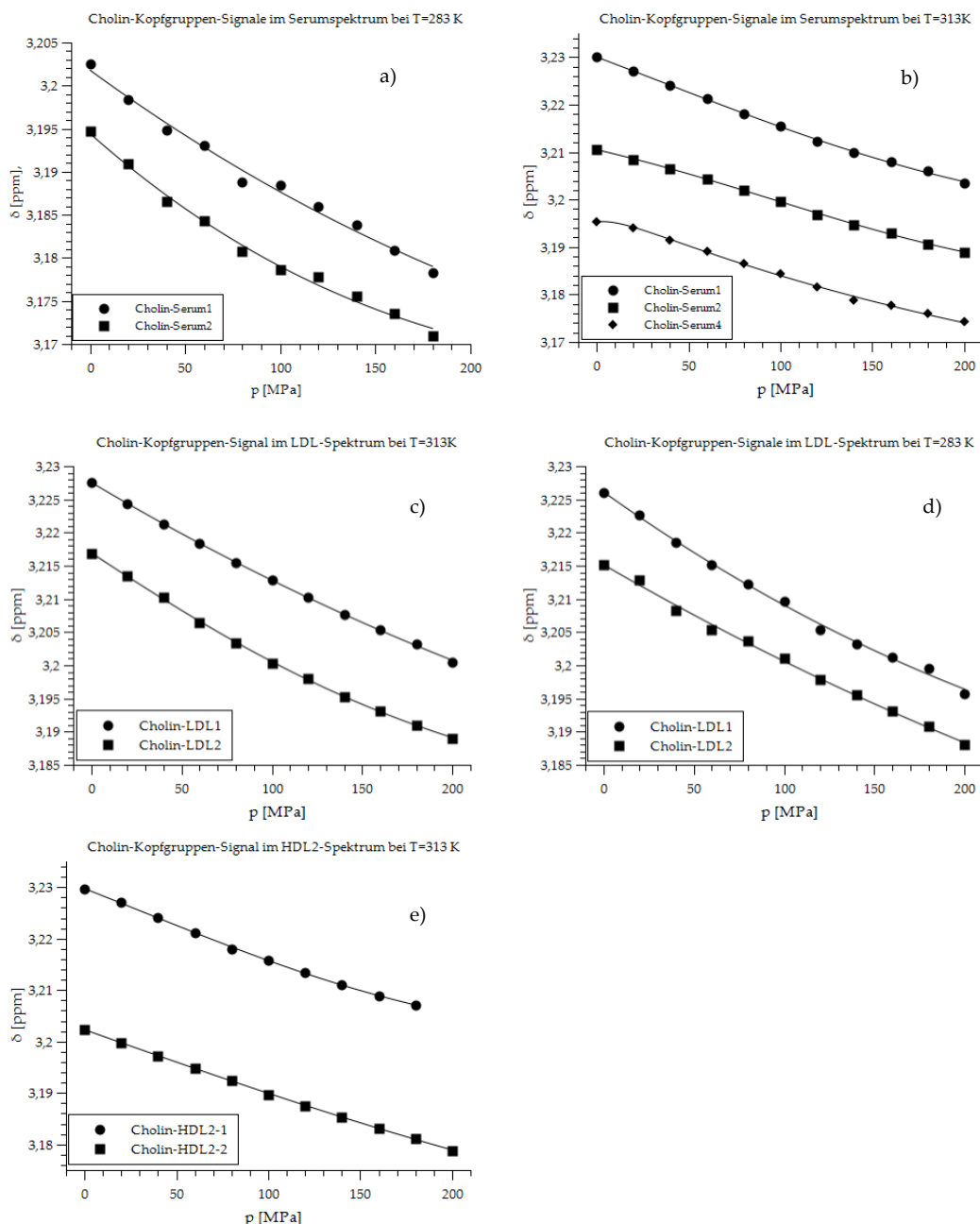


Bild 89: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung δ der verschiedenen Cholin-Kopfgruppen-Signale der Serum-Probe gemessen mit der Pulssequenz *noesygppr1d* an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei (a) $T=283 \text{ K}$ und (b) $T=313 \text{ K}$ in Abhängigkeit des Drucks und (c) der LDL- Probe bei $T=313 \text{ K}$ und (d) $T=283 \text{ K}$ und (e) der HDL2-Probe bei $T=313 \text{ K}$. Die Daten werden mit Hilfe der Funktion (2.3) gefittet. Die Fit-Parameter sind in Tabelle 37 zusammengefasst.

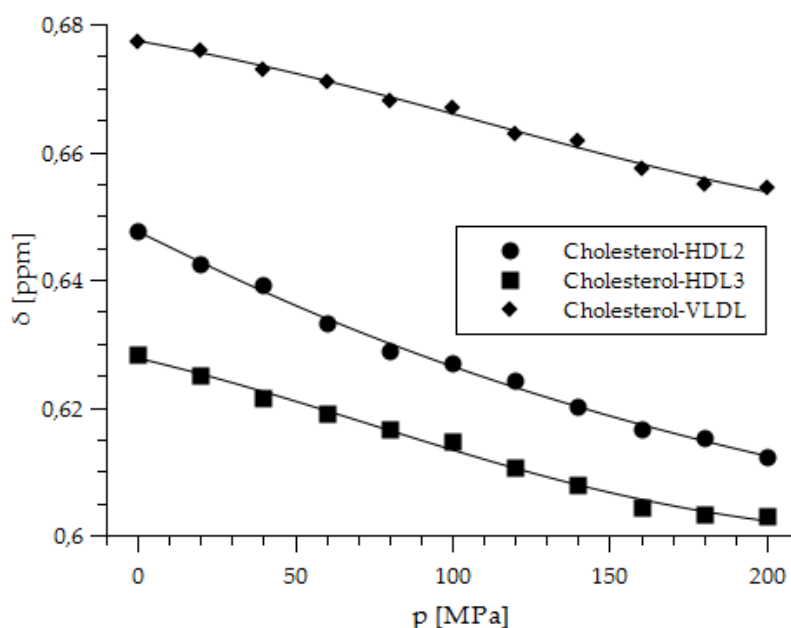


Bild 90: Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des Cholesterol-Signals gemessen an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei einer Temperatur von $T=313\text{ K}$ mit der Pulssequenz *noesygppr1d*. Die ppm-Werte bei Normaldruck wurden gleich 1 gesetzt und gegen den Druck aufgetragen. Die Linie zeigt die Fit-Kurve mit der Funktion (2.3).

le 37 zusammengefasst.

Das Cholin-Kopfgruppen-Signal verschiebt sich mit steigendem Druck in Richtung niedriger Frequenzen. Die Fit-Kurven befinden sich in guter Übereinstimmung mit den Messwerten und fallen nahezu parallel zueinander ab. Die mit Hilfe der Fit-Funktion (2.3) gewonnenen Werte für ΔG_0 besitzen ein negatives Vorzeichen und nehmen Werte zwischen $-0,06$ und $-0,01\text{ kJ/mol}$ an. Die Änderung des molaren Teilvolumens ΔV_0 liegt im Bereich von $-0,83$ und $-0,20\text{ mL/mol}$.

Nach Erhöhung der Messtemperatur von $T = 283\text{ K}$ auf $T = 313\text{ K}$ ergibt sich die in Bild 88 (b) dargestellten Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebung des Cholin-Kopfgruppen-Signals mit den aus Gleichung (2.3) gewonnenen Fit-Kurven. Die Parameter sind in Tabelle 37 gezeigt.

Im Graphen ist zu erkennen, dass alle Lipoprotein-Proben ein vergleichbares Verhalten der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung dieses Signals aufweisen. Die δ -Werte des Cholin-Kopfgruppen-Signals aller Proben fallen mit steigendem Druck linear und parallel zueinander ab. Mit Hilfe der Gleichung (2.3) werden für alle Proben negative Werte für die freie Standardenthalpie berechnet (vgl. Tabelle 37). Die Fit-

Kurven befinden sich in sehr guter Übereinstimmung mit den Werten der chemischen Verschiebung.

In Bild 89 sind die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen aller Cholin-Kopfgruppen-Signale der Serum-, LDL- und HDL2-Proben gezeigt. Die übrigen Spektren weisen nur ein sichtbares Cholin-Kopfgruppen-Signal auf.

Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des Cholesterol-Signals der VLDL-, HDL2- und HDL3-Probe bei einer Temperatur von $T = 313\text{ K}$ ist in Bild 90 dargestellt. Mit Hilfe der Funktion (2.3) wurden die Parameter aus Tabelle 37 berechnet. Das Ergebnis der Fit-Routine ergibt negativ Änderungen der freien Standardenthalpie ΔG_0 für die HDL2-Probe und positiv für die VLDL- und HDL3-Probe.

Tabelle 37

Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des CH_2 -, CH_3 -, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterol-Signals der Lipoprotein- und Serum-Proben. Die Messungen wurden an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer bei den Temperaturen $T = 283\text{ K}$ und $T = 313\text{ K}$ bei einem Druckbereich zwischen 0,1 MPa und 200 MPa mit einer noesygppr1d Pulssequenz aufgenommen.^{a, b, c, d}

Probe	Peak	T [K]	δ_1	δ_2	$\Delta G_0 \left[\frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right]$	$\Delta V_0 \left[\frac{\text{mL}}{\text{mol}} \right]$
Serum	CH ₂	283	0,98 ± 0,11	0,33 ± 0,13	-0,28 ± 0,03	-2,50 ± 0,96
VLDL			0,66 ± 0,74	0,70 ± 0,86	-0,28 ± 0,02	-0,95 ± 0,80
LDL			b	b	b	b
HDL2			1,23 ± 0,00	-0,05 ± 0,00	0,15 ± 0,02	-1,32 ± 0,19
HDL3			1,23 ± 0,00	-0,05 ± 0,01	0,15 ± 0,02	-1,32 ± 0,19
Serum	CH ₂	313	1,34 ± 0,02	-0,11 ± 0,02	1,03 ± 0,11	-3,62 ± 0,63
VLDL			1,35 ± 0,02	-0,13 ± 0,03	1,03 ± 0,14	-3,32 ± 0,81
LDL			b	b	b	b
HDL2			1,24 ± 0,01	-0,07 ± 0,02	0,12 ± 0,04	-1,14 ± 0,36
HDL3			1,23 ± 0,01	-0,09 ± 0,03	0,12 ± 0,02	-0,71 ± 0,29
Serum	CH ₃	283	b	b	b	b
VLDL			0,87 ± 0,00	-0,04 ± 0,01	0,21 ± 0,05	-1,51 ± 0,57
LDL			0,86 ± 0,04	-0,06 ± 0,23	0,13 ± 0,09	-0,58 ± 1,78
HDL2			0,84 ± 0,02	-0,05 ± 0,05	0,13 ± 0,06	-0,80 ± 0,75
HDL3			0,83 ± 0,00	-0,03 ± 0,01	0,20 ± 0,04	-1,42 ± 0,44
Serum	CH ₃	313	b	b	b	b
VLDL			0,86 ± 0,00	-0,02 ± 0,00	0,24 ± 0,02	-1,89 ± 0,22
LDL			0,84 ± 0,00	-0,01 ± 0,00	0,48 ± 0,07	-2,78 ± 0,61

HDL2			$0,87 \pm 0,14^c$	$-0,08 \pm 0,18^c$	$-0,01 \pm 0,27^c$	$-0,77 \pm 1,28$
HDL3			$0,82 \pm 0,00$	$-0,03 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,03$	$-1,40 \pm 0,44$
Serum	Cholin	283	$3,24 \pm 0,12$	$-0,09 \pm 0,14$	$-0,02 \pm 0,18$	$-0,83 \pm 0,88$
			$4,00^a$	$-0,99^a$	$-0,17^a$	$-0,20^a$
LDL			$3,32 \pm 0,52$	$-0,18 \pm 0,68$	$-0,02 \pm 0,29$	$-0,33 \pm 0,94$
			$3,98^a$	$-0,94^a$	$-0,16^a$	$-0,21^a$
HDL2			$3,32 \pm 0,12$	$-0,17 \pm 0,15$	$-0,06 \pm 0,07$	$-0,45 \pm 0,20$
HDL3			$3,26 \pm 0,04$	$-0,12 \pm 0,05$	$-0,01 \pm 0,04$	$-0,45 \pm 0,16$
Serum	Cholin	313	$3,15 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$-0,29 \pm 0,04$	$-8,47 \pm 1,71$
			$3,26 \pm 0,01$	$-0,07 \pm 0,02$	$+0,04 \pm 0,03$	$-0,85 \pm 0,02$
			$3,22 \pm 0,00$	$-0,05 \pm 0,00$	$0,12 \pm 0,02$	$-1,11 \pm 0,18$
VLDL			$3,17 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,02$	$-0,35 \pm 0,06$	$-6,54 \pm 1,98$
LDL			$3,17 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,00$	$-0,39 \pm 0,03$	$-10,61 \pm 0,61$
			$4,45^a$	$-1,51^a$	$-0,19^a$	$-0,15$
HDL2			$3,10 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,03$	$-0,56 \pm 0,14$	$-3,61 \pm 0,99$
			$3,26 \pm 0,01$	$-0,07 \pm 0,02$	$-0,04 \pm 0,03$	$-0,92 \pm 0,24$
HDL3			$3,30 \pm 0,36^c$	$-0,19 \pm 0,49^c$	$-0,03 \pm 0,21^c$	$-0,30 \pm 0,60$
VLDL	Cholesterol	313	$0,69 \pm 0,01$	$-0,05 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,06$	$-1,22 \pm 0,54$
HDL2			$0,59 \pm 0,01^c$	$0,08 \pm 0,03^c$	$-0,53 \pm 0,58^c$	$-10,94 \pm 3,14$
HDL3			$0,64 \pm 0,01$	$-0,05 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,06$	$-1,40 \pm 0,52$

^a Werte besitzen einen großen Fit-Fehler.

^b Messdaten sind nicht fitbar.

^c Fit-Algorithmus: Nelder-Mead Simplex.

^d Die Fit-Parameter δ_1 , δ_2 , ΔG_0 und ΔV_0 wurden mit Hilfe der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung mit der Gleichung (2.3) berechnet. Es gilt: $\Delta\beta' = 0$.

3.2.6 Druck- und Temperatur-Reversibilität der Effekte an Serum und Lipoproteinen

Eine entscheidende Rolle bei der Untersuchung von Hochdruck-NMR-Messungen spielt die Reversibilität der Druckeffekte nach Entfernen des Drucks auf die Probe. Daher wurden im Rahmen der Hochdruckmessungen nach Druckerhöhung auf $p = 200 \text{ MPa}$ 1D- ^1H -Spektren der Probe bei Normaldruck aufgenommen. Nach Temperatur- und Druckerhöhung wurden die Anfangsparameter wiederhergestellt, das heißt $T = 283 \text{ K}$ und Normaldruck.

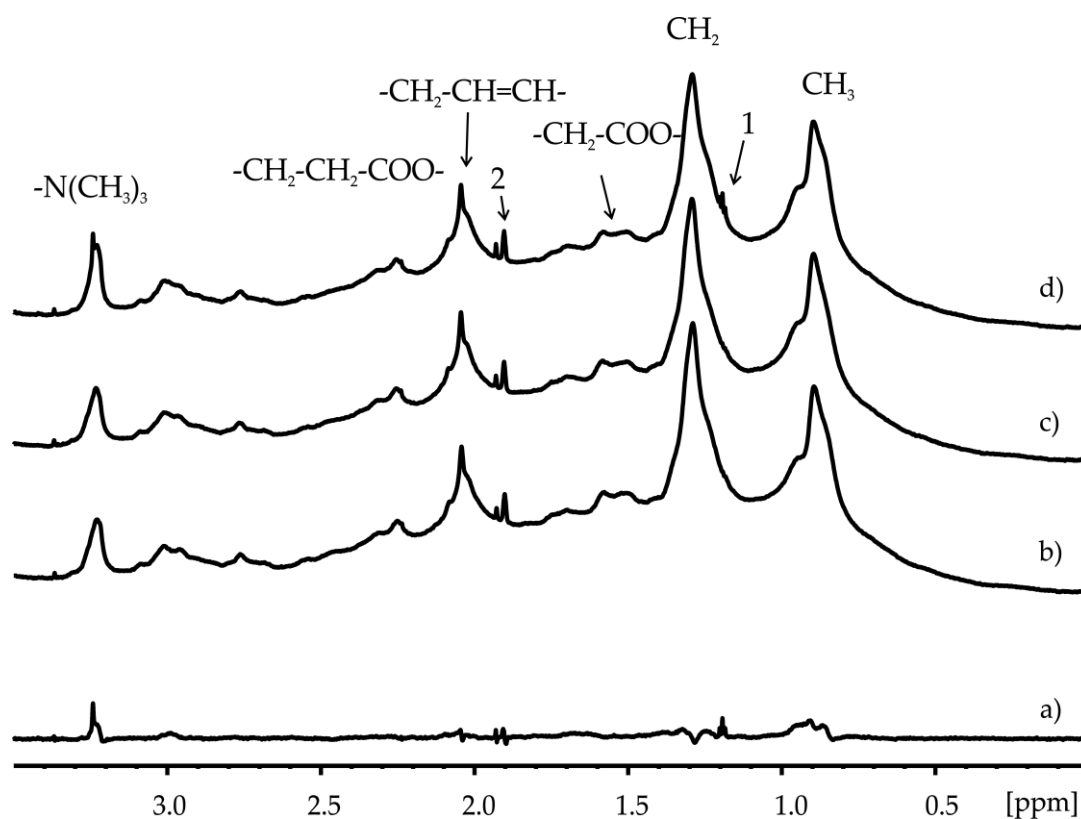


Bild 91: 1D ^1H -NMR-Spektren von Serum zur Kontrolle der Reversibilität der Druck- und Temperatureffekte bei $T=283 \text{ K}$ und Normaldruck. (a) zeigt die Differenz des Spektrums (d) und (b). Spektrum (b) wurde vor Beginn der Hochdruckmessreihe bei $T=283 \text{ K}$ und Normaldruck aufgenommen. Spektrum (c) zeigt das Messergebnis nach der ersten Druckreihe und Spektrum (d) das nach Temperaturerhöhung auf $T=313 \text{ K}$, Druckerhöhung und anschließendem Wiederherstellen der ursprünglichen Parameter. Das Signal „1“ bei etwa $1,17 \text{ ppm}$ ist mit Hilfe von Spike-In-Experimenten dem Ethanol zuzuordnen. Ein weiteres Signal befindet sich beim Cholin-Kopfgruppen-Signal bei etwa $3,2 \text{ ppm}$. Das Signal „2“ ist der Substanz Acetat zuzuordnen, welche Bestandteil des extrazellulären Puffers ist.

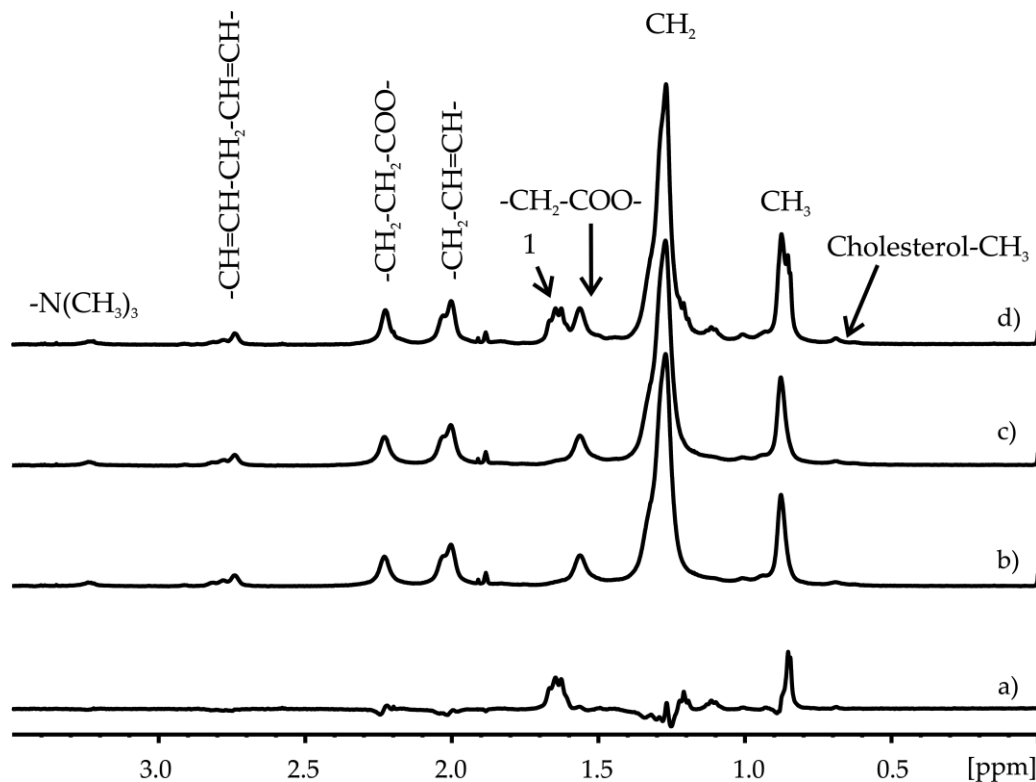


Bild 92: $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Spektren von VLDL zur Kontrolle der Reversibilität der Druck- und Temperatureffekte bei $T=283\text{ K}$ und Normaldruck. Spektrum (a) zeigt die Differenz des Spektrums (d) und (b). Spektrum (b) wurde vor Beginn der Hochdruckmessreihe bei $T=283\text{ K}$ und Normaldruck aufgenommen. Spektrum (c) zeigt das Messergebnis nach der ersten Druckreihe und Spektrum (d) das nach Temperaturerhöhung auf $T=313\text{ K}$, Druckerhöhung und anschließendem Wiederherstellen der ursprünglichen Parameter. Das Signal „1“ tritt nach Temperatur- und Druckerhöhung auf und kann keiner Substanz zugeordnet werden.

Die Ergebnisse dieser Messungen an Serum sind in Bild 91 dargestellt. Dabei ist in Bild 91 (a) das Spektrum bei Normaldruck und $T = 283\text{ K}$. Bild 91 (b) zeigt das Ergebnis der Messung nach Druckerhöhung und Entfernen des Drucks. In Bild 91 (c) ist die Messung nach der Temperaturerhöhung auf $T = 313\text{ K}$, der Druckerhöhung und anschließendem Wiederherstellen der ursprünglichen Anfangsparameter ($T = 283\text{ K}$ und Normaldruck) dargestellt.

Die Methyl- und Methylensignale weisen eine vollständige Druck- und Temperatur-Reversibilität auf. Dies gilt auch für die übrigen Signale des Spektrums. Von Bild 91 (b) zu (c) treten jedoch zusätzliche Signale bei etwa $\delta = 1,17\text{ ppm}$ und beim Cholin-Kopfgruppen-Signal bei etwa $\delta = 3,2\text{ ppm}$ auf. Da es sich dabei um relativ schmale Peaks handelt, kann man davon ausgehen, dass diese Signale niedermolekularen Substanzen zuzuordnen sind. Der Tripletts-Peak bei $\delta = 1,17\text{ ppm}$ kann mit Hilfe der Referenz-

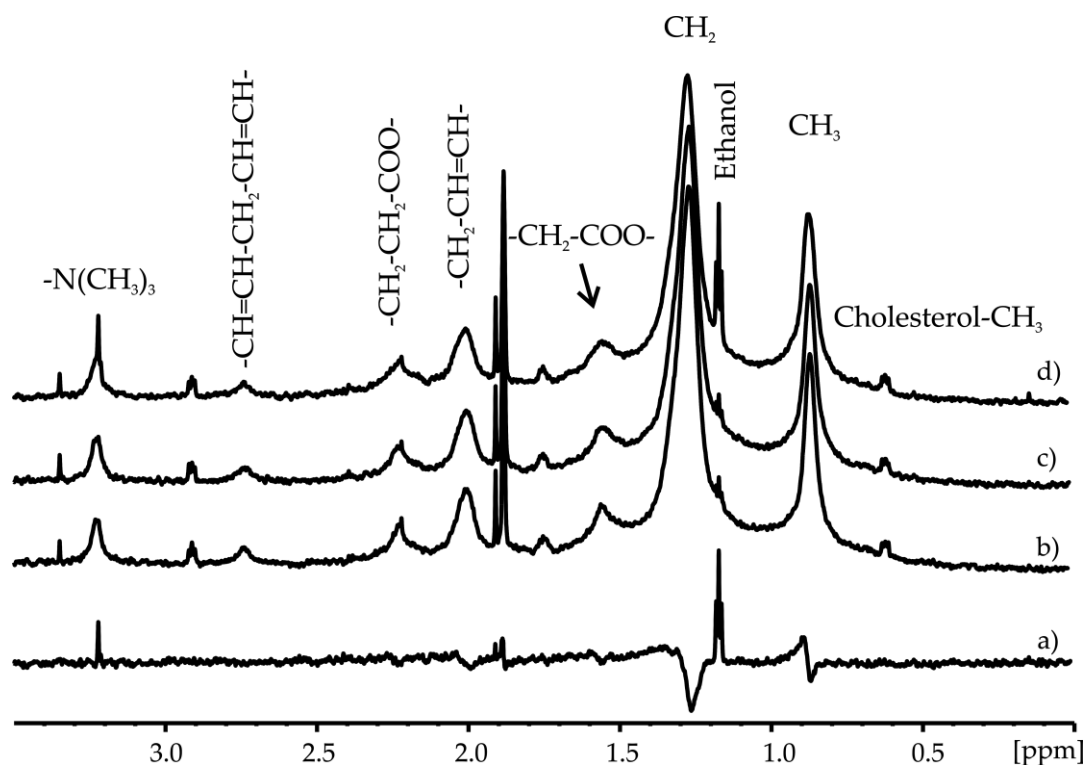


Bild 93: $1D$ - 1H -NMR-Spektren von IDL zur Kontrolle der Reversibilität der Druck- und Temperatureffekte bei $T=283$ K und Normaldruck. (a) zeigt die Differenz des Spektrums (d) und (b). Spektrum (b) wurde vor Beginn der Hochdruckmessreihe bei $T=283$ K und Normaldruck aufgenommen. Spektrum (c) zeigt das Messergebnis nach der ersten Druckreihe und Spektrum (d) das nach Temperaturerhöhung auf $T=313$ K, Druckerhöhung und anschließendem Wiederherstellen der ursprünglichen Parameter.

renzspektren dem Ethanol zugeordnet werden. Die Ursache für das Auftreten des Ethanols nach Druckerhöhung ist, dass in den Leitungen der Hochdruckanlage minimale Mengen an Ethanol vorhanden sind. Die Membran kann teilweise bei Druckerhöhung undicht werden. Daher ist eine geringe Konzentration von Ethanol detektierbar.

Die Reversibilität von VLDL wird mit Hilfe der in Bild 92 gezeigten Spektren überprüft. Die Auftragung der Spektren in dieser Abbildung wurde analog zu der in Bild 91 gewählt. Die Spektren sind trotz Temperatur- und Druckerhöhung nahezu vollständig reversibel, jedoch tritt nach Temperatur- und Druckerhöhung bei etwa $\delta = 1,638$ ppm ein Signal und bei $\delta = 0,853$ ppm ein Nebenmaximum im Methylbereich auf. Dieser Druck- und/ oder Temperatureffekt verschwindet auch nach längerer Zeit (12 Stunden) und erneuter Messung der Probe nicht.

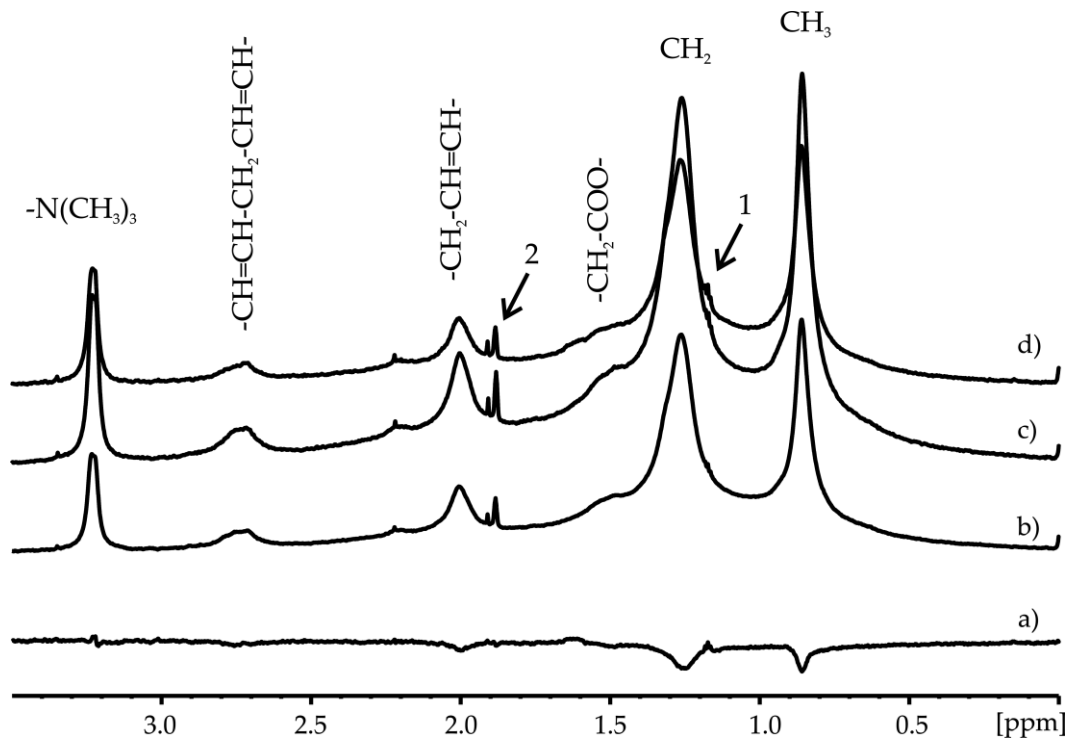


Bild 94: $1D\text{-}^1\text{H-NMR}$ -Spektren von LDL zur Kontrolle der Reversibilität der Druck- und Temperatureffekte bei $T=283\text{ K}$ und Normaldruck. (a) zeigt die Differenz des Spektrums (d) und (b). Spektrum (b) wurde vor Beginn der Hochdruckmessreihe bei $T=283\text{ K}$ und Normaldruck aufgenommen. Spektrum (c) zeigt das Messergebnis nach der ersten Druckreihe und Spektrum (d) das nach Temperaturerhöhung auf $T=313\text{ K}$, Druckerhöhung und anschließendem Wiederherstellen der ursprünglichen Parameter. Das Signal „1“ bei etwa $1,17\text{ ppm}$ ist mit Hilfe von Spike-In-Experimenten dem Ethanol zuzuordnen. Ein weiteres Signal befindet sich beim Cholin-Kopfgruppen-Signal bei etwa $3,2\text{ ppm}$. Das Signal „2“ ist der Substanz Acetat zuzuordnen, welche Bestandteil des extrazellulären Puffers ist.

Die Kontrollmessungen der IDL-Probe sind in Bild 93 dargestellt. Die Spektren sind trotz Temperatur- und Druckerhöhung nahezu vollständig reversibel, jedoch tritt nach Temperatur- und Druckerhöhung im Bereich des Cholin-Kopfgruppen-Signals ein zusätzlicher mit dem bei Serum vergleichbaren Peak auf. Das Ethanol-Signal bei $\delta = 1,17\text{ ppm}$ ist bei dieser Probe bereits bei Messbeginn sichtbar und scheint sich durch Temperatur- und Druckerhöhung zu verstärken. Die Druck- und Temperatureffekte der übrigen Signale sind vollständig reversibel.

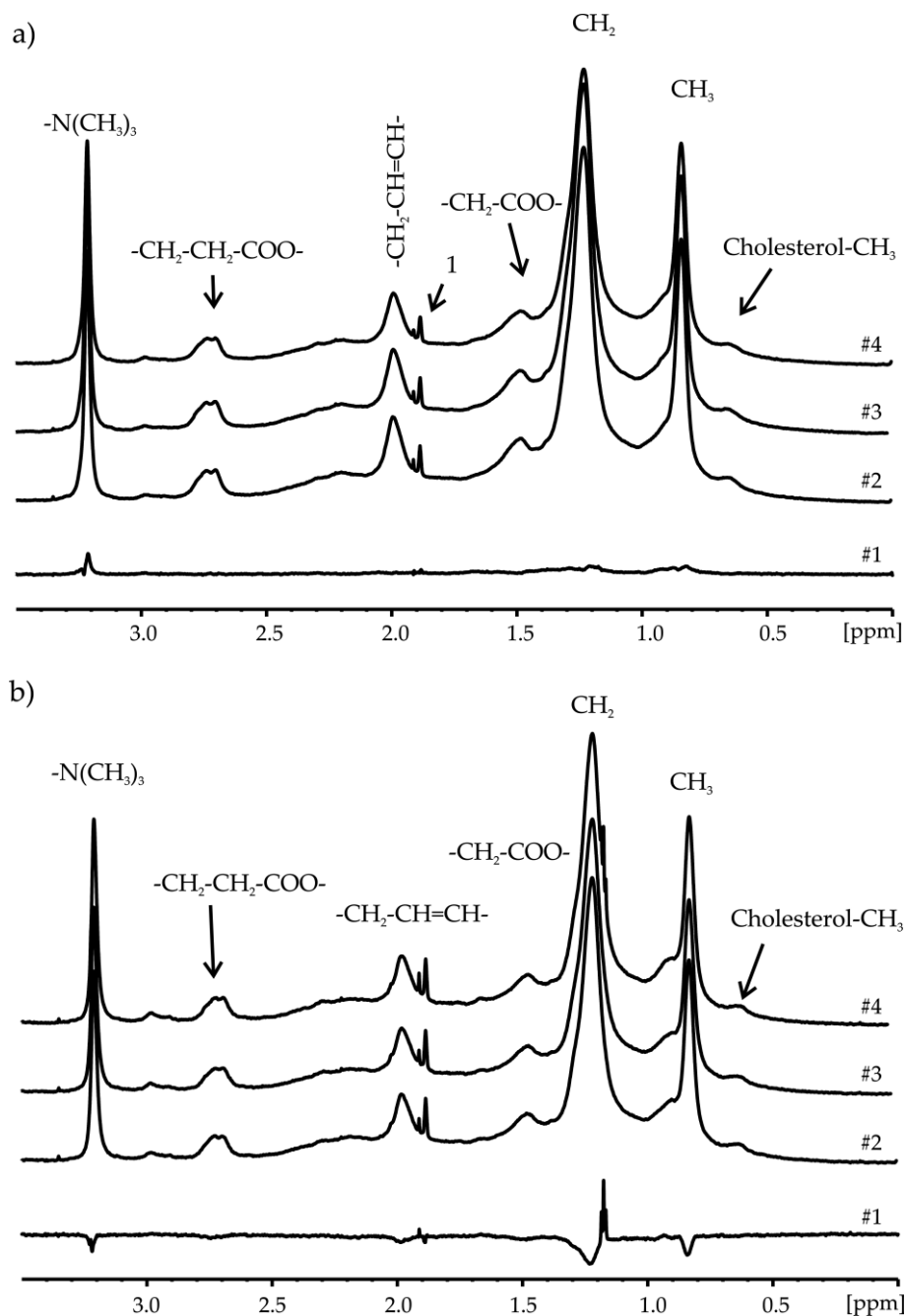


Bild 95: $1\text{D-}^1\text{H-NMR}$ -Spektren von (a) HDL2 und (b) HDL3 zur Kontrolle der Reversibilität der Druck- und Temperatureffekte bei $T=283\text{ K}$ und Normaldruck. Spektrum #1 zeigt die Differenz des Spektrums (#4) und (#2). (#2) wurde vor Beginn der Hochdruckmessreihe bei $T=283\text{ K}$ und Normaldruck aufgenommen. Spektrum (#3) zeigt das Messergebnis nach der ersten Druckreihe und Spektrum (#4) das nach Temperaturerhöhung auf $T=313\text{ K}$, Druckerhöhung und anschließendem wiederherstellen der ursprünglichen Parameter. Das Signal „1“ ist der Substanz Acetat zuzuordnen, welche Bestandteil des extrazellulären Puffers ist.

In Bild 94 sind die Spektren der Messungen an LDL zur Überprüfung der Reversibilität

der Druck- und Temperatureffekte gezeigt. Die drei Spektren sind nahezu identisch bis auf das Ethanol-Signal bei etwa $\delta = 1,17 \text{ ppm}$, welches nach Temperatur- und Druckerhöhung zu erkennen ist

Um die Reversibilität der Druck- und Temperatureffekte beim HDL2 zu überprüfen, wurden die Spektren wie für die bisher gezeigten Lipoproteine und Serum in Bild 95 (a) aufgetragen. Hierbei sind die Spektren sowohl nach Druck- als auch nach Temperatur- und Druckerhöhung identisch. Jedes Signal nimmt wieder seine ursprüngliche Form an, was eine vollständige Druck- und Temperaturreversibilität bedeutet.

Analog zu HDL2 konnte ebenfalls die Reversibilität der Temperatur- und Druckeffekte bei HDL3 nachgewiesen werden. Die Spektren sind in Bild 95 (b) dargestellt und zeigen keine Veränderungen, nachdem nach Druck- und Temperaturerhöhung die ursprünglichen Parameter wiederhergestellt wurden.

Aufgrund der in diesem Abschnitt gezeigten Messergebnisse konnte die Reversibilität der Temperatur- und Druckeffekte bezüglich der Methyl- und Methylengruppen der Serum- und Lipoprotein-Proben bestätigt werden. Im Allgemeinen treten nur Veränderungen kleinerer Metaboliten auf. Hierbei ist die Substanz Ethanol meist nach Temperatur- und Druckerhöhung zu erwähnen. Wie bereits diskutiert, enthält das Wasser der Hochdruckleitung geringe Mengen von Ethanol. Somit kann Ethanol bei Anlegen eines hohen Drucks durch die Membran von den Leitungen in die Probe gelangen.

4. Diskussion der Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die in Abschnitt 3 dargestellten Messergebnisse sowohl der Diabetesstudie als auch der Hochdruckmessungen mit Hilfe aktueller Forschungsgrundlagen diskutiert und mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen verglichen. Dabei wird mit der Diskussion der Ergebnisse der Diabetesstudie begonnen. Anschließend werden die Effekte der Hochdruckmessungen bezüglich ihrer möglichen Ursachen analysiert.

4.1 Diskussion der Ergebnisse der Diabetesstudie

Dieser Absatz fasst die in Abschnitt 3.1 gewonnenen Ergebnisse kurz zusammen und diskutiert diese mit Hilfe aktueller Forschungsgrundlagen. Die diskutierten Ergebnisse sind nach bestem Wissen und Gewissen mit Hilfe zugrundeliegender Literatur dargestellt.

Entscheidend für die Wahl der NMR-Spektroskopie als Messmethode für die Analyse der Diabetesstudie ist die Tatsache, dass hierbei keine physikalische oder chemische Probenvorbehandlung notwendig ist und die Proben somit nicht zerstört werden. Um die Proben für andere Messmethoden wiederverwenden zu können, wurde zudem auf einen internen Standard verzichtet.

Dabei ist dies die erste Analyse eines Probenkollektivs mit rund neuntausend Rückstellproben zu 618 Studienteilnehmern mit Prädiabetes, Diabetes und Teilnehmern im Normbereich. Die Kollektivbeschreibung der Diabetesstudie hat ergeben, dass das aus 618 Studienteilnehmern bestehende Kollektiv mit den zugehörigen Rückstellproben interessante Ergebnisse bezüglich eventueller Biomarker für die Diabetesfrüherkennung erwarten lässt. Bei einem Großteil der Studienteilnehmer liegen mindestens eine der folgenden patientenspezifischen Daten, wie beispielsweise Alter und Body Mass Index, im risikogefährdeten Bereich. Diese wurden bereits in der Literatur als solche

identifiziert [19,93,94]. Als Risikofaktoren für Diabetes gelten hierbei, wenn das Alter der Person mehr als 45 Jahre beträgt und/oder der BMI größer als $27,7 \text{ kg/m}^2$ ist [94]. Das Kollektiv spiegelt die Bevölkerung, für die eine Diabetesfrüherkennung besonders von Bedeutung ist, gut wieder. Es sind somit sowohl gesunde Personen, die entweder gefährdet oder nicht gefährdet sind, an Typ-2-Diabetes zu erkranken, als auch bereits an Prädiabetes oder Diabetes leidende Personen an der Studie beteiligt. Die Kollektivgröße ist ausreichend, um signifikante Ergebnisse der statistischen Auswertemethoden erhalten zu können.

Die Hauptkomponentenanalyse der gesamten Spektren aus Abschnitt 3.1.2 brachte keine signifikanten Ergebnisse. Dies war zu erwarten, da die Plasmaproben viele hochmolekulare Substanzen beinhalten, welche zu breiten Signalen (beispielsweise von Lipoproteinen) und einem breiten Untergrundsignal, welches unter anderem von dem Protein Albumin stammt, führen. Dies erschwert die Auswertung der darüber liegenden scharfen Peaks mit Hilfe von Bucketing-Methoden. Die Integration dieser Rechtecke liefert aufgrund dieses Untergrunds keine signifikanten Ergebnisse zur Früherkennung von Typ-2-Diabetes.

Um eventuelle Unterschiede zwischen gesunden Studienteilnehmern und Prädiabetikern oder Diabetikern im NMR-Spektrum des Blutplasmas festzustellen, wurden die Spektren qualitativ analysiert. Des Weiteren wurden diese Ergebnisse mit den jeweiligen Lipoproteinprofilen verglichen. Diesbezüglich wurde bei der Analyse der Spektren der Nüchternplasmaproben eines gesunden Studienteilnehmers und eines Diabetikers ein signifikanter Unterschied im Bereich der Resonanzen der CH_2 - und CH_3 -Gruppen festgestellt. Dieser Bereich der Methyl- und Methylengruppen wurde bereits von mehreren Forschungsgruppen zur Quantifizierung von Lipoproteinklassen bzw. -subklassen untersucht [95,96]. Hierzu werden die Formen der CH_2 - und CH_3 -Signale mit Hilfe von Lorentz-Funktionen der Lipoprotein(sub-)klassen gefittet. Demnach setzen sich diese Bereiche aus den Resonanzen der Lipoprotein(sub-)klassen zusammen. Somit kann man beim Vergleich der Nüchternplasmaproben eines gesunden Studienteilnehmers und eines Diabetikers nach Bild 31 und beim Vergleich der Lipoproteinprofile folgende Schlussfolgerungen ziehen: beim Diabetiker ist die VLDL-Konzentration im Nüchternblutplasma höher und die HDL- und LDL-Konzentration niedriger als bei einer gesunden Person. In Tabelle 38 sind die berechneten Teilchenzahlen der Lipoproteinklassen des Diabetikers und des gesunden Studienteilnehmers dargestellt, welche von numares bestimmt wurden. Diese belegen ebenfalls, dass der Diabetiker eine höhere Anzahl an Chylomikronen und VLDL aufweist als der gesunde Studienteilnehmer. Die Anzahl der HDLs und LDLs ist bei dem gesunden Studienteilnehmer höher.

Tabelle 38

Vergleich der Lipoprotein-Teilchenanzahl eines gesunden Studienteilnehmers und eines Diabetikers aus Bild 31.

Teilchenanzahl	Gesunder Studienteilnehmer	Diabetiker
Chylomikronen	0,87	1,46
VLDL	135	159
LDL	1324	1238
HDL	26066	23353

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die gewichteten Integrale der Lipoproteinsubklassen als Grundlage für die statistische Auswertung herangezogen. Die Integrale der Fit-Kurven der Lipoproteinsubklassen korrelieren mit den Teilchenzahlen. Das heißt, dass mit Hilfe der Ergebnisse, die mit Hilfe der Integrale der modellierten Kurven der 15 Lipoproteinsubklassen L1 bis L15 erzielt wurden, eine Aussage über die Lipoprotein-Teilchenzahl getroffen werden kann. Für die qualitative Analyse der Spektren wurden die Konzentrationen der einzelnen Lipoproteinsubklassen herangezogen.

Außerdem unterscheidet sich die Höhe des Laktat-Signals, was verschiedene Laktat-Konzentrationen bedeutet. Die Laktat-Konzentration im Nüchternblutplasma ist bei dem Diabetiker höher als bei der gesunden Person. Die Ursache hierfür könnte der erhöhte Blutzuckerspiegel beim Diabetiker sein. Mit Hilfe der Glykolyse wird nach [97] Glucose zu Pyruvat umgewandelt (siehe Bild 96). Bei der Milchsäuregärung findet eine Umwandlung von Pyruvat zu Laktat statt [98]. Dies könnte somit ein Grund für die erhöhte Laktat-Konzentration beim Diabetiker sein. Dies konnte bereits im Jahr 1988 von Reaven et al. beobachtet werden [99]. Nach [100] wurde von Ohlsson et al. ein erhöhter Ruhelaktat-Spiegel als Biomarker für Typ-2-Diabetes identifiziert. Somit spielt Laktat als Biomarker für Diabetes bereits seit über 20 Jahren eine bedeutende Rolle.

Des Weiteren ist bei den Nüchternplasmaproben der Studienteilnehmer ein zusätzlicher Peak im Methylbereich bei etwa $\delta = 0,857$ ppm zu sehen. Es scheint sich dabei um eine niedermolekulare Substanz zu handeln, da dieser Peak bei den Messungen mit der diffusionsgewichteten Pulssequenz ledbpgppr2s1d mit einer Gradientenstärke von 40 % verschwunden ist. Die Multiplizität des Signals ist ein Singulett mit einer Linienbreite von etwa $\Delta = 1,77$ Hz. Da es sich um ein Singulett handelt, existieren keine gleichartigen Kopplungspartner. Dieses Signal ist bei den Spektren der Diabetiker stärker ausgeprägt, jedoch bei allen Patientengruppen vorhanden. Eine Zuordnung dieses Signals ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Ein Dublett-Signal mit dem Kopplungsparameter $J(HH) = 6,49$ Hz, das bei den Nüchternplasmaproben bei $\delta = 1,143$ ppm auftritt, wird anschließend genauer diskutiert.

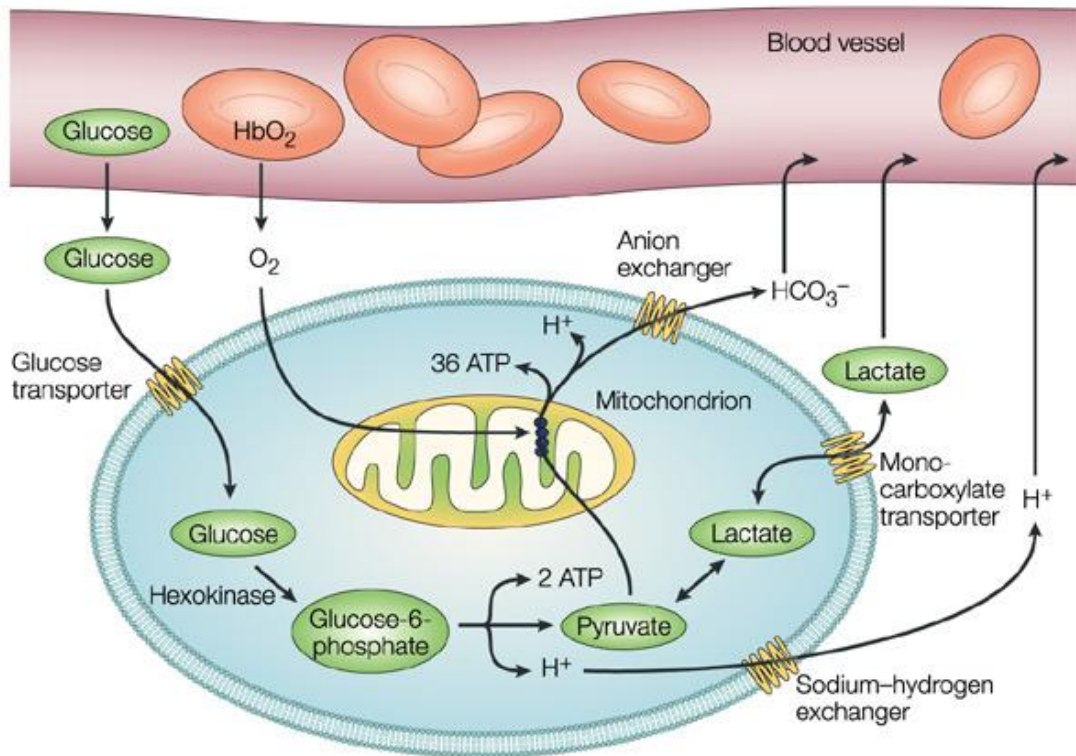
Jedoch ist bereits hier zu erwähnen, dass dieser Peak nahezu ausschließlich bei den nüchternen Personen auftritt.

Der Vergleich der Lipoproteinprofile und Spektren der Nüchternplasmaproben und der Proben zwei Stunden nach Glucoseeinnahme eines Diabetikers mit denen einer gesunden Person zeigt eine starke Reaktion auf die Glucoseeinnahme. Im Bereich der kleinen Lipoproteine (L2 bis L5) sinkt die Konzentration zwei Stunden nach Glucoseeinnahme stark ab. Im Bereich L8 bis L15 (großes LDL bis große Chylomikronen) jedoch nehmen die Integrale nach Glucoseeinnahme zu. Dies gilt sowohl für den Diabetiker als auch für den gesunden Studienteilnehmer. Jedoch ist die Reaktion auf die Glucoseeinnahme bei der gesunden Person im Bereich L9 bis L15 viel stärker als die beim Diabetiker.

Bei der Analyse der Spektren und Lipoproteinprofile der Rückstellproben, entnommen in einem Zeitraum von acht Jahren, eines gesunden Studienteilnehmers sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Im Gegensatz dazu verändern sich die Form der Spektren und die zugehörigen Werte des Lipoproteinprofils der Rückstellproben eines Prädiabetikers mit abnormer Nüchternblutglucose stark. Dabei fällt vor allem eine veränderte Form des Methylenbereichs im Spektrum auf. Eine Analyse dieses Bereichs unter Verwendung der Lipoproteinprofile zeigt eine Abnahme der Werte des mittleren und großen HDLs. Ein minimaler Anstieg des Bereichs von sehr großem LDL (L9) bis hin zum großen VLDL (L12) kann ebenfalls beobachtet werden.

Die Spektren der Rückstellproben eines Studienteilnehmers mit gestörter Glucosetoleranz zeigen eine Veränderung in der Form und Höhe der Signale der Methylengruppen. Die Werte der Lipoproteinsubklassen variieren innerhalb der sechs Jahre sehr.

Bei einem Prädiabetiker mit abnormer Nüchternblutglucose und gestörter Glucosetoleranz sinkt nach Betrachtung der Spektren der Rückstellproben und der Lipoproteinprofile die Konzentration des mittleren und großen HDL. Bei Vergleich der Werte des Lipoproteinprofils der 4 Rückstellproben, entnommen innerhalb von vier Jahren, zeigt sich eine steigende Tendenz der größeren Lipoproteine, beginnend mit dem kleinen LDL (L6).



Nature Reviews | Cancer

Bild 96: Glykolyse: Die Glukose wird von den Blutgefäßen über sog. Glukosetransporter in der Zelle mit Hilfe der Hexokinase in Glukose-6-Phosphat umgewandelt. Anschließend kann dieses unter ATP- und H⁺-Abgabe in Pyruvat umgewandelt werden, welches anschließend bei der Milchsäuregärung in Laktat umgeformt wird [127] (aus [127]).

Bei den Rückstellproben eines Diabetikers ist die größte Veränderung innerhalb der sieben Jahre festzustellen. Hierbei findet innerhalb dieses Zeitraums eine Umverteilung der Lipoproteine im Blutplasma statt. Dabei sinkt vor allem die Konzentration des mittleren und größeren HDLs bei den neueren Proben immer weiter, was sich sowohl bei qualitativer Betrachtung als auch im Lipoproteinprofil zeigt. Zudem sinken die VLDL-Werte im Verlauf der vier Jahre. Dies bestätigt die in Abschnitt 3.1.3 mit Hilfe der logistischen Regressionsanalyse gewonnenen Ergebnisse. Hierbei wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied für das mittlere HDL (L2) festgestellt.

Zusätzlich sind bei der neuesten Rückstellprobe zwei zusätzliche Peaks im Gegensatz zu den übrigen Spektren bei etwa $\delta = 0,875$ ppm und 1,143 ppm zu sehen. Die Glukose-Konzentration und der Bereich der ungesättigten Fettsäuren bleiben innerhalb der Blutspenden relativ konstant.

Unabhängig von dem jeweiligen Ergebnis des oralen Glukosetoleranztests sind zwei erhebliche Unterschiede zwischen den Blutplasmaproben vor und nach diesem Test

festzustellen, welche bereits zu Beginn dieses Abschnitts erwähnt wurden. Zum einen das Dublett bei $\delta = 1,143$ ppm. Dieser Peak tritt in erster Linie bei den Nüchternplasma-proben auf und ist bei den Proben, die zwei Stunden nach der Glucose-Einnahme entnommen wurden, nicht sichtbar. Zum anderen ist bei den Nüchternplasma-proben beim Maximum des Bereichs der Methylenresonanzen bei etwa $\delta = 0,857$ ppm ein Peak zu erkennen, der bei den zweiten Proben des oralen Glucosetoleranztests nicht zu finden ist.

Betrachtet man die Ergebnisse der logistischen Regression der gefitteten Lipoprotein-profile, so kann ein Zusammenhang zwischen einzelnen Lipoproteinsubklassen und Diabetes bzw. Prädiabetes festgestellt werden. Die statistische Auswertungsmethode der logistischen Regression wurde aufgrund der binären Zielvariablen gewählt. Diese Methode wurde ebenfalls von Wang et. al in [9] für medizinische Daten, die mit Hilfe von Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (kurz: LC-MS) gewonnen wurden, verwendet. Wang untersuchte hierbei ein Kollektiv aus 2422 gesunden Personen, welches zwölf Jahre prospektiv beobachtet wurde. 201 Studienteilnehmer entwickelten während dieser Studie Diabetes. Er matchte dabei das Kollektiv nach dem Alter, Body Mass Index und der Nüchtern-glucose. Wang erkannte hierbei eine starke Korrelation zwischen den Aminosäuren Isoleucin, Leucin, Valin, Tyrosin und Phenylalanin und der Diabeteserkrankung. Mit der Kombination aus den drei Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Tyrosin konnte eine Diabetesfrüherkennung realisiert werden [9]. Diese Ergebnisse zeigen, welche entscheidende Rolle Aminosäuren bei der Entwicklung von Diabetes besitzen.

Bei der logistischen Regressionsanalyse der Blutplasma-proben, die zwei Stunden nach der Glucoseeinnahme entnommen wurden, konnte eine signifikante Korrelation zwischen folgenden Lipoproteinsubklassen und Prädiabetes ermittelt werden: L2 (mittleres HDL), L5 (sehr kleines LDL) und L11-L13 (kleines und großes VLDL und Remnants). Als sogenanntes Basic Modell wurden jeweils das Alter, der Body Mass Index und das Geschlecht des Studienteilnehmers mitgefittet, da diese patientenspezifischen Daten bekanntermaßen laut Literatur stark mit Diabetes korrelieren [19,93,94]. Eine Veränderung dieser Lipoproteinsubklassen wurde auch bei der logistischen Regressionsanalyse von gesunden Studienteilnehmern und Studienteilnehmern mit Prädiabetes und Diabetes beobachtet. Somit konnten die von Wang et al. in [7] identifizierten erhöhten Konzentrationen der VLDL-Subklassenpartikel bei den Prädiabetikern und Diabetikern reproduziert werden. Des Weiteren wurde eine Veränderung der Konzentration des mittleren HDLs festgestellt, was sich ebenfalls in Übereinstimmung mit [9] befindet. Dabei ist zu beachten, dass Wang et al. die Einteilung der Lipoproteinsubklassen bezüglich ihrer Größe anders als in Tabelle 4 definiert. Geht man somit von der

gleichen Partikelgröße aus, stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen von Wang et al. überein (vergleiche Tabelle 39).

Tabelle 39

Klassifizierung der Lipoproteinsubklassen nach numares und Wang et al. aus [7].

NMR Lipoprotein-subfraktionen	Zugehörige Lipoproteinsubfraktion (numares)	Lipoprotein-subfraktion (Wang et al.)	Partikeldurchmesser [nm] (Wang et al.)	Partikeldurchmesser [nm] (numares)
L15	Große Chylomikronen			>150
L14	Kleine Chylomikronen			100-150
L13	Remnants	CM/größte VLDLs	≥ 75	80-100
L12	Große VLDLs	Sehr große VLDLs	64	60-80
L11	Kleine VLDLs	Große VLDLs	53,6	40-60
		Mittlere VLDLs	44,5	
L10	IDL	Kleine VLDLs	36,8	30-40
		Sehr kleine VLDLs	31,3	
L9	Sehr große LDLs	IDL	28,6	25-30
		Große LDL	25,5	
L8	Große LDLs	Mittlere LDL	23	22-25
L7	Mittlere LDLs			21-22
L6	Kleine LDLs			19-21
L5	Sehr kleine LDLs	Kleine LDLs	18,7	16-19
L4	Sehr große HDLs	Sehr große HDLs	14,3	13-16
L3	Große HDLs	Große HDLs	12,1	10-13
		Mittlere HDLs	10,9	
L2	Mittlere HDLs	kleine HDLs	8,7	8,5-10
L1	Kleine HDLs			7-8,5

Die logistische Regressionsanalyse der Nüchternplasmaproben wies keine signifikanten Korrelationen zwischen Lipoproteinsubklassen und Diabetes bzw. Prädiabetes auf. Eine mögliche Ursache dafür könnte der unterschiedliche Metabolismus nach der Glucoseaufnahme sein, der je nach Krankheitsstadium voneinander abweicht. Nach der Glucoseaufnahme wird die Glucose, wie bereits in Abschnitt 1.2.1 erwähnt, abgebaut oder zur Glycogensynthese verwendet. Steigt der Blutzuckerspiegel an, so wird die Insulinsekretion verstärkt, was zu einer verstärkten Aufnahme der Glucose im Fett- und Muskelgewebe führt. Dabei findet im Fettgewebe erst eine Umwandlung der Glucose zu Glycerol und dann zu Acetyl-CoA statt. Anschließend wird es in der Liponeogenese als Triglyceride gespeichert [101]. Eine Stoffwechselstörung wie Diabetes oder Prädiabetes kann somit zu unterschiedlich starken Reaktionen auf die Glucoseaufnahme

führen. Dies würde die starken Unterschiede einzelner Lipoproteine zwischen Diabetikern oder Prädiabetikern und gesunden Personen erklären. Die Nüchternplasmaproben aller Studienteilnehmer unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, was sich durch das lange Fasten von zwölf Stunden erklären lassen würde. Hierbei scheint der Unterschied zwischen den berechneten Lipoproteinprofilen aufgrund der Tatsache, dass keine Nährstoffe metabolisiert werden müssen, relativ gering zu sein.

Eine Analyse der mit Hilfe der am Lehrstuhl geschriebenen Routine in MATLAB aus Abschnitt 3.1.2.2 gewonnenen Daten der niedermolekularen Metaboliten mittels logistischer Regression zeigte keinen signifikanten Zusammenhang zwischen diesen und dem Grad der Diabeteserkrankung. Weitere Untersuchungen dieser Daten und eine Verbesserung der Methode konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht beendet werden.

Wie in [102] von Howard zusammengefasst, spielt der Metabolismus der Lipoproteine für die Diabeteserkrankung eine bedeutende Rolle und wurde bereits von vielen Gruppen untersucht [7,9]. Dabei konnte man bei einigen Studien eine erhöhte VLDL-Konzentration bei Typ-2-Diabetikern feststellen [103,104,105,106,107,108,109]. Eine Übersicht aus [103] der Abweichungen der Lipoproteinspiegel und die damit zusammenhängenden Veränderungen des Stoffwechsels ist in Tabelle 40 gezeigt.

Tabelle 40

Abweichungen der Lipoproteinspiegel und deren Konsequenzen für den Lipidstoffwechsel bei Typ-2-Diabetikern.

Lipoproteinklasse	Veränderung des Stoffwechsels
VLDL (↑)	Erhöhte Produktion der Triglyceride und apoB Verminderter Abbau der Triglyceride und apoB Angereichert in Remnants Verstärkte Induktion der zellulären Lipidansammlung
LDL (↑→)	Erhöhte Herstellung von apoB Verminderter rezeptorgesteuerter Abbau Kleinere Größe, höhere Dichte Anreicherung von Triglyceriden Glykierung Oxidation
HDL (↓)	Erhöhter Abbau von apoB Kleinerer Anteil von HDL2 Anreicherung von Triglyceriden Glykierung Verringerter reverser Cholesterol-Transport

Quelle: [103].

In Mallol et al. ist ebenfalls eine Übersicht einiger Studien zu Typ-1 und Typ-2-Diabetes mit Hilfe von ^1H -NMR-Spektroskopie gezeigt [47]. Im Allgemeinen konnte im Rahmen mehrerer Studien validiert werden, dass die Konzentration sowohl des gesamten, des großen und kleinen VLDL als auch des gesamten, des mittleren und kleinen LDL bei Diabetikern erhöht und die Konzentration des großen LDL und gesamt HDL bei Diabetikern erniedrigt ist [110,111,112].

Eine Senkung der VLDL-Konzentration kann durch Verbesserung des Blutzuckerspiegels erzielt werden, was darauf schließen lässt, dass die Überproduktion von der Hyperglykämie induziert ist [113,114,115,116]. Wang et al. veröffentlichte im Jahr 2012 Ergebnisse einer Studie mit neuntausend Männern, bei der die Lipoproteinsubklassen mit Hilfe der statistischen Methode ANOVA hinsichtlich eventueller Biomarker für Typ-2-Diabetes untersucht wurden [7]. Dabei nahmen sowohl gesunde Personen als auch Prädiabetiker und Diabetiker an dieser Studie teil. Im Rahmen dieser Auswertung wurde im Bereich der Methyl- und Methylengruppen unter Verwendung von VLDL-Referenzspektren bei den Diabetikern einen höheren VLDL-Spiegel als bei den gesunden Studienteilnehmern beobachtet. Allgemein konnte eine Korrelation zwischen den Konzentrationen der Lipoproteinsubklassen und einer abnormen Glucosetoleranz festgestellt werden. All diese Untersuchungen und Ergebnisse konnten im Rahmen der Diabetesstudie reproduziert werden. Laut [117] ist bei den Diabetikern zudem die VLDL-Apo-B-Produktion erhöht, was zu einer höheren Konzentration von VLDL-Remnants führt. Diese Partikel sind sehr cholesterolreich und können somit eine Atherosklerose hervorrufen, was wiederum starke Folgeerkrankungen und Risiken mit sich bringt. Die Übereinstimmung der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen anderer Gruppen zeigt, dass sowohl die Messmethode der NMR-Spektroskopie als auch das statistische Auswerteverfahren mit Hilfe der logistischen Regressionsanalyse sehr gute Ergebnisse liefern. Hierbei zeigen sich starke Unterschiede zwischen dem Lipoprotein-stoffwechsel einer gesunden Person oder eines Prädiabetikers oder Diabetikers. Vor allem die VLDL-Partikel spielen eine sehr wichtige Rolle als Diabetesmarker. Darüber hinaus können weitere bereits bekannte Biomarker für Typ-2-Diabetes festgestellt werden. Dazu zählen wie bereits erwähnt Laktat und Glucose. Der Blutzuckerspiegel ist hierbei der bekannteste Vertreter für die Diabetesdiagnose. Mit Hilfe dieses Glucoselevels wird im Rahmen des oralen Glucosetoleranztests Prädiabetes und Diabetes diagnostiziert. Die NMR-Spektren zeigen große Unterschiede sowohl im Bereich der Methyl- und Methylengruppen als auch der niedermolekularen Substanzen zwischen den jeweiligen Studienteilnehmern. Somit sind bei der weiteren Analyse der Daten zusätzliche Marker für die Diabetesfrüherkennung zu erwarten. Dabei spielt nicht nur die Analyse der hochmolekularen sondern auch der niedermolekularen Substanzen eine

entscheidende Rolle. Des Weiteren sind genauere Analysen der Rückstellproben in Hinblick auf Trends bei der Diabetesentwicklung vonnöten, um die Typ-2-Diabeteserkrankung frühzeitig diagnostizieren zu können.

4.2 Diskussion der Hochdruck-Messergebnisse an Lipoproteinen und Serum

Dieses Kapitel diskutiert die in Abschnitt 3.2 erzielten Ergebnisse bezüglich der Hochdruck-NMR-Messungen an Serum und Lipoproteinen. Die qualitativen Analysen der Hochdruck-NMR-Spektren ergaben bei dem größten Lipoproteinpartikel, dem VLDL, und dem Serum größere Druckeffekte bei der CH_2 -Gruppe als bei der CH_3 -Gruppe. Bei den kleineren Lipoprotein-Partikeln zeigt sich für die CH_2 - und die CH_3 -Gruppe eine etwa gleich starke Druckabhängigkeit der Signale. Des Weiteren waren die Druckeffekte bei einer Temperatur von $T = 283 \text{ K}$ größer als bei einer höheren Temperatur von $T = 313 \text{ K}$. Das Signal der Cholin-Kopfgruppe ist bei größeren Lipoprotein-Partikeln bei höherer Temperatur ($T = 313 \text{ K}$) aufgespalten und es sind die einzelnen Signale des Sphingomyelin und Phosphatidylcholin zu erkennen. Dabei waren höhere Druckeffekte und somit ein stärkerer Signalabfall bei dem Phosphatidylcholin zu beobachten. Dies gilt für die Serum-, IDL- und LDL-Proben. Das Cholin-Kopfgruppen-Signal ist bei den HDL-Proben nicht aufgespalten. Hierbei fand eine starke Verschiebung des Signals zu kleinen Frequenzen hin statt. Sphingomyelin ist laut Literatur [118] in allen Lipoproteinen auf der äußeren Membran enthalten.

In Abschnitt 3.2.5.1 sind die Ergebnisse der thermodynamischen Auswertung der CH_2 -, CH_3 -, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterol-Signalintegrale mit Hilfe des Drei-Kompartiment-Modells mit der Funktion (2.16) zusammengefasst. Nahezu alle gewonnenen Ergebnisse wurden mit Hilfe des nach [85] berechneten ΔG_0 -Wertes gefittet. Die Änderung des Kompressibilitätsfaktors $\Delta\beta'$ wurde im Rahmen dieser Auswertung vernachlässigt. Im Allgemeinen ist der Fehler der Dekonvolution der breiten Methylen- und Methylsignale relativ groß. Dies liegt vor allem an dem breiten Untergrund. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, analog zu [85], dieser Schwierigkeit entgegenzuwirken, indem ein Cholesterol-Referenzspektrum von den jeweiligen Serum- und Lipoprotein-Spektren subtrahiert wird. Dazu wird das Cholesterol-Signal der Cholesterol-Probe und der jeweiligen Serum- und Lipoproteinproben mit Hilfe eines

geeigneten Wertes der Linienbreite zur Deckung gebracht. Diese Methode verbessert die Grundlinie und erleichtert somit die Dekonvolution der breiten Signale.

Die Druckabhängigkeit des CH_2 -Signalintegrals ergibt für die HDL2-Probe vom Betrag her den größten ΔG_0 -Wert. Positive Werte für ΔG_0 ergeben sich für Serum und HDL2, negative für VLDL und HDL3. Bei Temperaturerhöhung sind die ΔG_0 -Werte der HDL-Proben beide negativ.

Die thermodynamische Analyse des CH_3 -Signalintegral bei Druckerhöhung bei einer Temperatur von $T = 283 \text{ K}$ bereitet trotz der Subtraktion des Cholesterol-Signale Schwierigkeiten. Somit besitzen die Daten einen sehr hohen Fehler und sind stark veräusert. Die Daten der Serum-, LDL- und HDL2-Probe konnten mit Hilfe der Funktion (2.16) gefittet werden. ΔG_0 nimmt für die Serum- und HDL2-Proben positive Werte an und für die LDL-Probe einen negativen Wert mit Hilfe von [85].

Nach Erhöhung der Temperatur auf $T = 313 \text{ K}$ bleibt die Druckabhängigkeit der CH_3 -Signalintegrale nahezu konstant. Lediglich für die Serum-Probe nimmt das Integral stark zu. Die übrigen Daten wurden aufgrund der Form nicht mit Hilfe des Dreikompartiment-Modells gefittet.

Die Cholin-Kopfgruppen-Signalintegrale sind bis auf das der LDL-Probe nahezu druckunabhängig. Daher konnten nur die LDL-Daten thermodynamisch analysiert werden. Dabei wurde für ΔG_0 mit [85] ein Wert von $-7,29 \text{ kJ/mol}$ berechnet und $\Delta V_0 = -3,03 \text{ mL/mol}$. Die Serum-Probe zeigte einen nicht mit Hilfe dieses spezifischen Modells fitbaren Kurvenverlauf, bei dem das Cholin-Kopfgruppen-Signalintegral bis zu einem Druck von $p = 60 \text{ MPa}$ ansteigt und anschließend mit steigendem Druck abfällt.

Die Messdaten bei $T = 313 \text{ K}$ konnten für VLDL, LDL und HDL2 mit Hilfe des Dreikompartiment-Modells gefittet werden. Hierfür wurden Werte für die Änderung des molaren Teilvolumens im Bereich zwischen $-43,42$ und $-27,98 \text{ mL/mol}$ berechnet.

Die Kurven des Cholesterol-Signalintegrals bei $T = 313 \text{ K}$ der VLDL-, HDL2- und HDL3-Proben haben die Form einer Sigmoidfunktion. Mit Hilfe der Funktion (2.16) können die Daten angenähert werden und man erhält für die drei Proben positive ΔG_0 -Werte, wobei ΔG_0 für die HDL-Proben mit Hilfe der Daten aus [85] berechnet wurden.

In Abschnitt 3.2.5.2 wurde zudem die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der CH_2 -, CH_3 -, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterol-Signale mit Hilfe der Gleichung (2.3) thermodynamisch ausgewertet. Dabei wurde jeweils das Signalmaximum beobachtet. Zudem wurden die Spektren auf Acetat bei $\delta = 1,875 \text{ ppm}$ referenziert, da wie bereits von Baumstark diskutiert, DSS mit den Lipoproteinen zu wechselwirken scheint. Acetat ist Bestandteil des extrazellulären Puffers, der wie in Abschnitt 2.2.1 gezeigt für die Probenherstellung verwendet wurde.

Hierbei fallen die ΔG_0 -Werte deutlich kleiner aus als bei der Analyse der Daten der Signalintegrale aus Abschnitt 3.2.5.1. Die Änderung der chemischen Verschiebung des CH_2 -Signals ergibt bei einer Temperatur von $T = 283 \text{ K}$ für die Serum und VLDL-Proben ein negatives Vorzeichen von ΔG_0 und für die HDL-Proben ein positives. Für eine Temperatur von $T = 313 \text{ K}$ ergeben sich ausschließlich positive Werte von ΔG_0 .

Das Verhalten des CH_3 -Signals bei Druckerhöhung ist für die chemische Verschiebung deutlich einfacher zu analysieren. Der Grund hierfür liegt in der Komplexität des CH_3 -Signals. Die Dekonvolution des CH_3 -Gruppen-Signals verursacht somit einen größeren Fehler. Mit Hilfe der Gleichung (2.3) konnten für die Messdaten der chemischen Verschiebung des Methyl-Signals bei $T = 283 \text{ K}$ Änderungen der Standardenthalpie von 0,13 und 0,21 kJ/mol berechnet werden. Somit nimmt ΔG_0 ausschließlich positive Werte an. berechnet. Die ΔG_0 -Werte sind bei $T = 313 \text{ K}$, im Gegensatz zu den Werten bei $T = 283 \text{ K}$, negativ.

Die Analyse der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des Cholin-Kopfgruppen-Signals bei einer Temperatur von $T = 283 \text{ K}$ mit Hilfe der Gleichung (2.3) ergibt für die Änderung der freien Standardenthalpie für alle Proben positive Werte. Für die Proben, bei denen die Signale eine Aufspaltung aufweisen, wurden die einzelnen Signale getrennt analysiert. Wie jedoch Bild 89 zeigt, verhalten sich die Signale bei Druckerhöhung nahezu gleich.

Die chemische Verschiebung des Cholin-Kopfgruppen-Signals im Serum- und Lipoprotein-Spektrum gemessen bei einer Temperatur von $T = 313 \text{ K}$ verschiebt sich relativ linear mit steigendem Druck zu niedrigen Frequenzen. Mit Hilfe der Gleichung (2.3) können die Änderung der freien Standardenthalpie und des molaren Teilvolumens der Proben untersucht werden. Die Analyse der drei Maxima des Cholin-Kopfgruppen-Signals innerhalb des Serumspektrums ergibt für die Änderung der freien Standardenthalpie, abgesehen vom ersten Peak, positive Werte. Für VLDL, LDL, HDL2 und HDL3 wurden negative ΔG_0 -Werte berechnet. Die Nebenmaxima des Cholin-Kopfgruppen-Bereichs verschieben sich in nahezu gleicher Form innerhalb eines Spektrums zu niedrigen ppm-Werten.

Die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des Cholesterol-Signals wurde für die VLDL, HDL2- und HDL3-Probe, gemessen bei einer Temperatur von $T = 313 \text{ K}$, thermodynamisch ausgewertet. Die Daten besitzen eine lineare Steigung und fallen mit steigendem Druck ab. Für HDL2 konnte die Kurve mit Hilfe eines negativen ΔG_0 -Werts und für VLDL und HDL3 mit Hilfe positiven ΔG_0 -Werte angenähert werden.

Für die geringere Temperatur und die übrigen Proben konnte das Cholesterol-Signal aufgrund der Spektren-Eigenschaften nicht analysiert werden.

Für die thermodynamische Auswertung der Lipoprotein-Proben war die Verwendung der mit Hilfe der Enthalpie $\Delta H(T_m)$ von Baumstark in [85] ermittelten Werte für die Änderung der freien Standardenthalpie notwendig. Dies verbesserte die Ergebnisse des Fit-Algorithmus. Daher sind die Ergebnisse der Temperaturabhängigkeit der Lipoproteine nur in wenigen Fällen mit den erzielten Druckabhängigkeiten vergleichbar. Baumstark zeigte ebenfalls eine relativ hohe Schmelztemperatur der Cholin-Kopfgruppen. Diese befinden sich auf der Außenseite des Lipoprotein-Komplexes. Diese Temperatur liegt zwischen den beiden im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Messtemperaturen.

Man geht im Rahmen dieses Modells von drei Kompartimenten aus: A enthält Lipidsignale, die zu breit sind, um detektiert zu werden, die Konzentration c_A dieser Lipide bzw. funktionelle Gruppen dieser Lipide ist temperaturunabhängig. Ein zweites Kompartiment B enthält Lipide, die unabhängig von der Temperatur immer sichtbar sind. Ein drittes Kompartiment C enthält Lipide, die in einem Phasenübergang involviert sind, nach dem Phasenübergang sind die Lipide zu breit, um detektiert zu werden (langsamer Austausch).

Die thermodynamische Analyse der chemischen Verschiebung der Methyl- und Methylengruppen-Signale ist mit einem großen Fehler versehen, da sich diese Signale aus mehreren Signalen zusammensetzen. Dabei ist die Bestimmung der chemischen Verschiebung des Signals im Rahmen einer Druckreihe erschwert, da die einzelnen Signale unterschiedlich stark shiften. Des Weiteren kann man diese Signale nur schwer voneinander trennen. Im Gegensatz dazu ist die Analyse der chemischen Verschiebung schmaler Signale, wie dem der Cholin-Kopfgruppen, weniger fehlerbehaftet.

Als weitere Untersuchungen können zudem die Druckabhängigkeiten weiterer Lipid-Signale der Lipoprotein-Proben ausgewertet werden.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der NMR-Spektroskopie das aus Humanblut gewonnene Plasma bzw. Serum in Hinblick auf dessen charakteristischen Eigenschaften untersucht. Hierbei wurde im ersten Teil der Arbeit eine Studie zur Diabetesfrüherkennung untersucht. Das Kollektiv besteht aus 618 Studienteilnehmern mit verschiedenen Schweregraden der Typ-2-Diabetes-Erkrankung wie gesund, IFG, IGT, IFG und IGT und Diabetes. Hierzu wurden die Daten nach Korrelationen zwischen den Lipoproteinsubklassen und somit dem Lipoproteinprofil, welches mit Hilfe von Auswertemethoden nach [44] berechnet werden kann, und der Erkrankung statistisch analysiert. Zusätzlich stehen sog. Rückstellproben dieser Studienteilnehmer zur Verfügung. Dabei handelt es sich um retrospektive Proben, die innerhalb von durchschnittlich 6 Jahren während des Blutspendens entnommen wurden. Das Ziel der Studie liegt wie bereits erwähnt darin, Biomarker für Prädiabetes und Typ-2-Diabetes zu finden. Das Plasma wurde mit Hilfe eines 600 MHz BRUKER NMR-Spektrometers bei einer Temperatur von $T = 310\text{ K}$ mit den Pulssequenzen `noesygppr1d` gemessen. Anschließend wurden die Messdaten prozessiert und das Lipoproteinprofil jeder Probe mit Hilfe der diffusionsgewichteten Spektren von `numares` nach [44] berechnet. Die NMR-Spektren wurden zu Beginn qualitativ untersucht. Dabei konnten folgende Auffälligkeiten beobachtet werden. Zum einen scheint man im Bereich der Methyl- und Methylengruppen unter Verwendung von VLDL-Referenzspektren bei den Diabetikern einen höheren VLDL-Spiegel als bei den gesunden Studienteilnehmern zu erkennen. Dies wurde bereits von vielen Gruppen beobachtet und konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Des Weiteren konnten zwei Besonderheiten beim Vergleich der Nüchternplasma-Probe und der Probe, die zwei Stunden nach Glucose-Einnahme entnommen wurde, festgestellt werden. Die Nüchternplasma-Proben weisen zwei zusätzliche Signale auf: ein Singulett bei etwa $\delta = 0,857\text{ ppm}$ und ein Dublett bei etwa $\delta = 1,143\text{ ppm}$. Das Singulett konnte im Rahmen der Arbeit nicht zugeordnet werden. Darüber hinaus wurde der Verlauf der Rückstellproben der Studienteilnehmer qualitativ analysiert.

Hierbei konnte eine signifikante Veränderung der Spektren der Rückstellproben der Diabetiker und Prädiabetiker beobachtet werden. Im Allgemeinen waren ein Anstieg des VLDL und eine Abnahme der HDL- und LDL-Konzentration zu erkennen. Qualitativ konnte man eine Verschiebung des Lipoproteinprofils erkennen, welche abhängig von dem Schweregrad der Erkrankung ist. Um die Daten mit Hilfe statistischer Auswertemethoden analysieren zu können, mussten diese aufgrund ihrer Verteilungen log-transformiert werden, das heißt mit Hilfe des natürlichen Logarithmus transformiert werden. Anschließend konnten diese Daten mit Hilfe der logistischen Regressionsanalyse in Hinblick auf Korrelationen zwischen dem Diabetes bzw. Prädiabetes und den Lipoproteinsubklassen untersucht werden. Dabei konnte bei den Proben, die zwei Stunden nach Glucoseeinnahme entnommen wurden, ein signifikanter Unterschied der verschiedenen Diabetes-Gruppen bei folgenden Subklassen ermittelt werden: L2 (mittleres HDL), L5 (sehr kleines LDL) und L11-L13 (kleines und großes VLDL und Remnants). Als Basic Modell wurden jeweils das Alter, der BMI und das Geschlecht des Studienteilnehmers mitgefittet, welche laut Literatur stark mit Diabetes korrelieren [19,93,94]. Die Unterschiede innerhalb des Lipoproteinprofils der Nüchternplasma-Proben waren nach der logistischen Regressionsanalyse nicht signifikant.

Der zweite Teil der Arbeit widmet sich den Messergebnissen der Hochdruck-NMR-Messungen an Serum und den Lipoproteinen. Dabei wurden die Lipoprotein-Proben aus dem Serum mit Hilfe der sequentiellen Ultrazentrifugation extrahiert. Dadurch konnten VLDL, IDL, LDL, HDL2 und HDL3-Proben aus der Serum-Probe gewonnen werden. Diese Proben wurden bei den Temperaturen von $T = 283\text{ K}$ und $T = 313\text{ K}$ an einem 800 MHz BRUKER NMR-Spektrometer vermessen. Hierbei wurde in 20 MPa-Schritten der Druck von Normaldruck bis $p = 200\text{ MPa}$ erhöht. Anschließend wurde die Reversibilität der Druck- und Temperatur-Effekte überprüft.

Die qualitativen Analysen der Hochdruck-NMR-Spektren ergaben beim VLDL und dem Serum größere Druckeffekte bei der CH_2 -Gruppe als bei der CH_3 -Gruppe. Bei den kleineren Lipoprotein-Partikeln zeigte sich für die CH_2 - und die CH_3 -Gruppe eine etwa gleich starke Druckabhängigkeit der Signale. Des Weiteren waren die Druckeffekte bei einer Temperatur von $T = 283\text{ K}$ größer als bei $T = 313\text{ K}$. Das Signal der Cholin-Kopfgruppe ist bei größeren Lipoprotein-Partikeln bei höherer Temperatur ($T = 313\text{ K}$) aufgespalten und es sind die einzelnen Signale des Sphingomyelin und Phosphatidylcholin zu erkennen. Hierbei zeigten sich höhere Druckeffekte und somit ein stärkerer Signalabfall bei dem Phosphatidylcholin. Dies gilt für die Serum-, IDL- und LDL-Proben. Das Cholin-Kopfgruppen-Signal ist bei den HDL-Proben nicht aufgespalten. Hierbei fand eine starke Verschiebung des Signals zu kleinen Frequenzen hin statt.

Des Weiteren wurden die Druckabhängigkeiten der Integrale und chemischen Verschiebungen der CH₂-, CH₃-, Cholin-Kopfgruppen- und Cholesterol-Signale bei den Temperaturen $T = 283\text{ K}$ und $T = 313\text{ K}$ sowohl mit Hilfe eines Fits mit der Taylorreihen-Funktion (2.2) als auch mit Hilfe der thermodynamischen Funktionen (2.16) und (2.3) untersucht. Dabei konnten für die Serum- und Lipoprotein-Proben die Änderungen der Gibbs-Energie ΔG_0 und die Volumenänderung ΔV_0 bei Standardbedingungen bestimmt werden.

Bei Analyse der Integrale der CH₂-, CH₃- und Cholin-Kopfgruppen-Signale wurde ΔG_0 , falls vorhanden, mit Hilfe des $\Delta H(T_m)$ aus [85] und für $\Delta\beta' = 0$ berechnet. Bei Analyse der Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung der Signale ergaben sich das Spektrum auf das Acetat-Signal, das vom extrazellulären Puffer stammt, auf $\delta = 1,875\text{ ppm}$ referenziert, da Beobachtungen von Baumstark gezeigt haben, dass DSS mit den Lipoproteinen wechselwirken kann. Die Auswertung des CH₂-Signals zeigt für beide Temperaturen für die Serum- und VLDL-Probe nahezu gleiche ΔG_0 -Werte. Die Ergebnisse der HDL2- und HDL3-Proben gleichen sich untereinander ebenfalls. Für die Serum-Probe war die Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebung des Methyl-Signals nicht mit Hilfe des Drei-Kompartiment-Modells auszuwerten. ΔG_0 nimmt für alle Proben mit Ausnahme der HDL2-Probe bei $T = 313\text{ K}$ negative Werte an.

Des Weiteren wurde die Änderung der freien Standardenthalpie mit Hilfe der chemischen Verschiebung des Cholin-Kopfgruppen-Signals für die Serum- und Lipoprotein-Proben bestimmt. Hierbei wurde ebenfalls nachgewiesen, dass sich bei Aufspaltung dieses Signals die Nebenmaxima in gleicher Form in Abhängigkeit des Drucks verschieben. Des Weiteren konnte die Reversibilität aller untersuchten Temperatur- und Druckeffekte nachgewiesen werden.

Anhang

A Tabellen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der logistischen Regression der Nüchternplasma-
maproben zusammengefasst. Tabelle 41 zeigt die Analyse der gesunden Studienteil-
nehmer und Prädiabetiker in Hinblick auf Korrelationen.

Tabelle 41

Vergleich der gesunden Studienteilnehmern mit den Prädiabetikern mit Hilfe der Nüchtern-
plasma-proben.^{a, b}

	Regressions- koeffizient β_j	Standard- fehler	z-Wert	p-Wert	
BMI	0,1138	0,0325	3,502	0,0005	***
Alter	0,0436	0,0124	3,516	0,0004	***
Geschlecht	-0,3610	0,2551	-1,415	0,1570	
L1	-0,1746	100,161	-0,174	0,8616	
L2	-0,1834	0,8021	-0,229	0,8191	
L3	0,4011	190,226	0,211	0,8330	
L4	-218,79	338,903	-0,646	0,5186	
L5	-0,3214	413,487	-0,078	0,9381	
L6	0,8775	502,812	0,175	0,8615	
L7	-323,47	704,167	-0,459	0,6460	
L8	375,51	479,598	0,783	0,4336	
L9	758,73	663,894	1,143	0,2531	
L10	-777,38	846,306	-0,919	0,3583	
L11	-956,89	926,047	-1,033	0,3015	
L12	1042,613	844,669	1,234	0,2171	

L13	395,088	326,669	1,209	0,2265
L14	-359,81	509,108	-0,707	0,4797
L15	-0,8959	137,221	-0,653	0,5138

^a ***: $p \leq 0,001$ // **: $0,001 < p \leq 0,01$ // *: $0,01 < p \leq 0,05$.

^b Regressionskoeffizient $\beta > 0$, so nimmt das Risiko an Prädiabetes zu erkranken mit der Variablen zu.

Tabelle 42 fasst die Ergebnisse der Analyse der Nüchternplasmaproben der gesunden Studienteilnehmer, Prädiabetiker und Diabetiker mit Hilfe der logistischen Regression zusammen.

Tabelle 42

Logistische Regressionsanalyse der Nüchternplasmaproben der Gesunden und der Prädiabetiker und Diabetiker.^{a,b}

	Regressions- koeffizient β_j	Standard- fehler	z-Wert	p-Wert	
BMI	0,1144	0,0319	3,592	0,0003	***
Alter	0,0463	0,0122	3,792	0,0001	***
Geschlecht	-0,3482	0,2512	-1,386	0,1656	
L1	-0,2350	0,9919	-0,237	0,8128	
L2	0,1030	0,7834	0,131	0,8954	
L3	-0,1591	184,47	-0,086	0,9313	
L4	-0,8751	326,21	-0,268	0,7885	
L5	-116,82	404,305	-0,289	0,7726	
L6	116,474	494,548	0,236	0,8138	
L7	-120,681	689,175	-0,175	0,8610	
L8	247,182	470,029	0,526	0,5990	
L9	381,685	645,551	0,591	0,5543	
L10	-726,101	836,557	-0,868	0,3854	
L11	-486,320	894,680	-0,544	0,5867	
L12	964,568	819,862	1,176	0,2394	
L13	308,309	314,824	0,979	0,3274	
L14	-469,027	496,968	-0,944	0,3453	
L15	-0,5619	133,077	-0,422	0,6728	

^a ***: $p \leq 0,001$ // **: $0,001 < p \leq 0,01$ // *: $0,01 < p \leq 0,05$.

^b Regressionskoeffizient $\beta > 0$, so nimmt das Risiko an Prädiabetes zu erkranken mit der Variablen zu.

Die Analyse der kleinen Metaboliten der Spektren mit Hilfe der logistischen Regression ist in der Tabelle 43 zu finden.

Tabelle 43

Logistische Regressionsanalyse der oGTT-Proben der gesunden Personen und der Prädiabetiker mit Hilfe der Lipoproteinprofile und der kleinen Metaboliten.^{a, b, c, d}

	Regressions- koeffizient β_j	Standard- fehler	z-Wert	p-Wert	
BMI	0,1005	0,02751	3,655	0,0003	***
Alter	0,0266	0,01125	2,365	0,0180	*
Geschlecht	-0,6557	0,22605	-2,901	0,0037	**
L1	-146,168	103,624	-1,411	0,1584	
L2	131,77	0,36471	3,613	0,0003	***
L3	-0,7207	108,674	-0,663	0,5072	
L4	257,352	222,807	1,155	0,2481	
L5	-592,405	278,995	-2,123	0,0337	*
L6	278,895	396,490	0,703	0,4818	
L7	621,871	452,750	1,374	0,1696	
L8	-0,0339	346,508	-0,010	0,9922	
L9	-570,853	423,367	-1,348	0,1775	
L10	-170,660	442,111	-0,386	0,6995	
L11	1041,762	480,189	2,169	0,0300	*
L12	-454,724	213,614	-2,129	0,0333	*
L13	-216,985	122,166	-1,776	0,0757	.
Alpha D-Glucose	285,522	281,090	1,016	0,3097	
Alanin	-298,276	318,462	-0,937	0,3490	
Beta D-Glucose	-360,719	507,914	-0,710	0,4776	
Creatinine	-0,0174	0,10259	-0,169	0,8655	
Isoleucin	0,6203	0,52312	1,186	0,2358	
Laktat	-476,382	352,646	-1,351	0,1767	
Leucin	-0,0247	0,02429	-1,017	0,3093	
Valin	-0,0305	0,04005	-0,761	0,4464	

^a L1-L15: gewichtete Integrale der Gaußkurve der Lipoproteinsubklassen L1 bis L15.

^b ***: $p \leq 0,001$ // **: $0,001 < p \leq 0,01$ // *: $0,01 < p \leq 0,05$.

^c Regressionskoeffizient $\beta > 0$, so nimmt das Risiko an Prädiabetes zu erkranken mit der Variablen zu. Der Betrag von β gibt das Ausmaß der Veränderung an. β gibt den Anstieg pro Einheitsänderung an.

^d oGTT-Proben: Proben, die zwei Stunden nach der Glucose-Einnahme entnommen wurden.

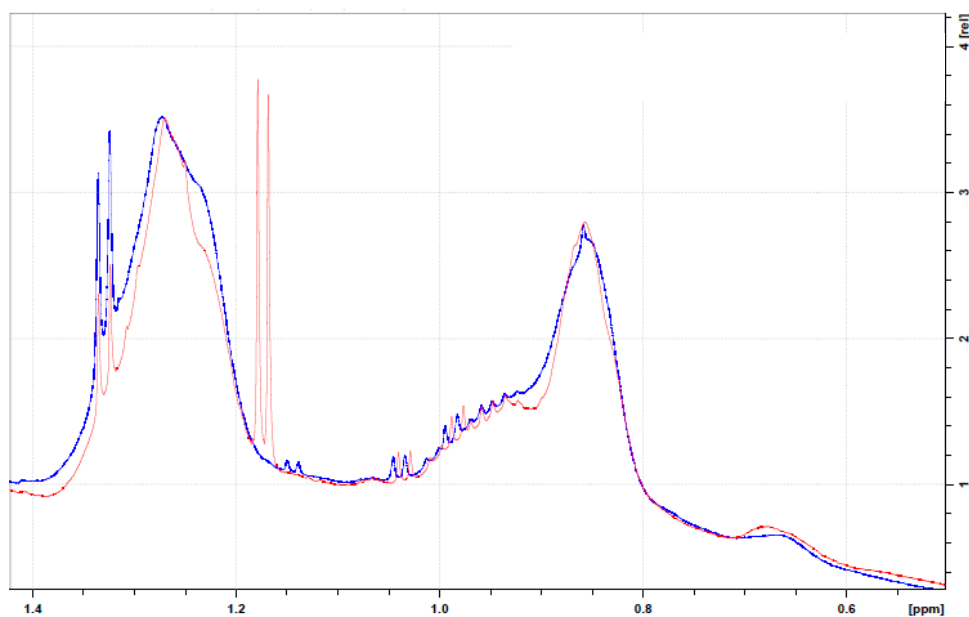


Bild 97: Spike-In-Experiment: 1D-¹H-Spektrum an Blutplasma (blaue Linie) und Serum mit zugegebenem Isopropanol (rote Linie).

In Bild 97 ist ein Spike-In-Experiment für Serum dargestellt.

Bild 98 zeigt diffusionsgewichtete Messungen im Rahmen der Hochdruckmessungen an Serum bei einer Temperatur von $T = 313$ K.

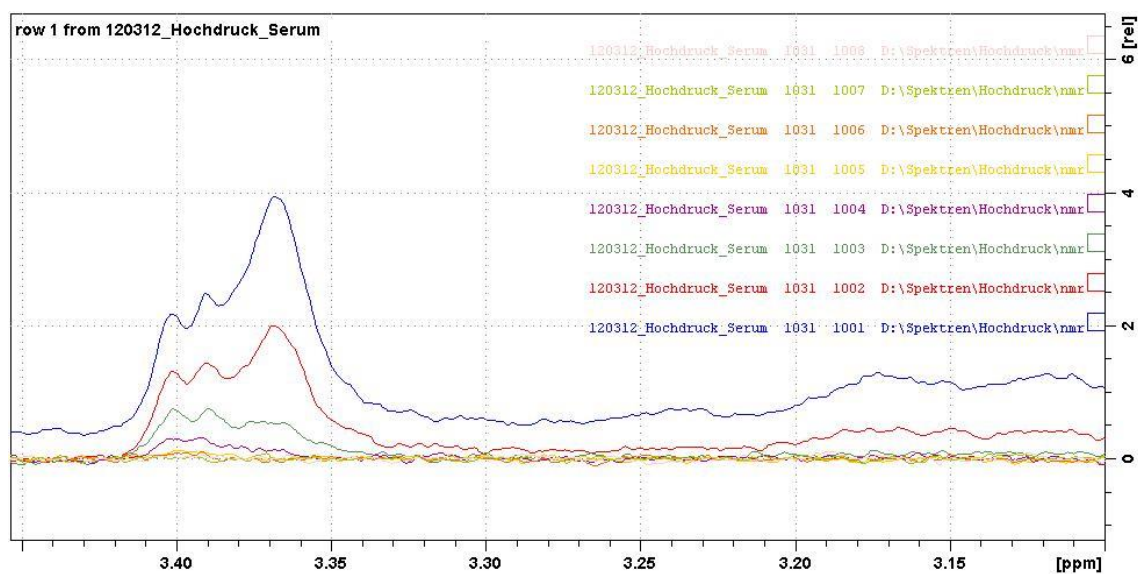


Bild 98: Diffusionsgewichtete 1D-¹H-NMR-Spektren an Serum bei einer Temperatur von $T=313$ K. Die Spektren wurden an einem 800 MHz-NMR-Spektrometer aufgenommen.

Im Folgenden ist ein Abkürzungsverzeichnis zu finden:

Abkürzung	Bedeutung
ADPKD	autosomal-dominante polyzystische Nierenkrankung
ANOVA	Analysis of variance
BRK	Bayerische Rote Kreuz
BSD	Blutspendedienst
CAD	coronary artery disease,
CV	Herz-Kreislauf-Erkrankungen (engl.: cardiovascular disease, kurz:
DSS	2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FFA	Freie Fettsäuren
HDL	High density lipoprotein
HPLC	High performance liquid chromatography
IDL	Intermediate density lipoprotein
IFG	und eine abnorme Nüchtern-glucose (engl.: Impaired Fasting Glucose,
IGT	gestörte Glucosetoleranz (engl.: Impaired Glucose Tolerance)
LB	Engl. Line broadening, Linienverbreiterung
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acetyltransferase
LDL	Low density lipoprotein
LPL	Lipoproteinlipase
KG	Kopfgruppe
MS	Massenspektrometrie
NMR	engl. Nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz
NPG	Nüchternplasmagluose
oGTT	Oraler Glucosetoleranztest
QQ	Quantile-Quantile
TG	Triacylglycerid
TSP	3-Trimethylsilylpropionat

VLDL

Very low density lipoprotein

Literaturverzeichnis

- [1] J. K. Nicholson, J. C. Lindon, "Metabonomics," *Nature*, vol. 455, pp. 1054-1056, Oktober 2008.
- [2] J. C. Lindon und J. K. Nicholson, "Spectroscopic and statistical techniques for information recovery in metabonomics and metabolomics," *Annual review of analytical biochemistry*, vol. 1, pp. 45-69, 2008.
- [3] B. Daviss, "Growing Pains for Metabolomics," *The scientist*, vol. 19, no. 8, pp. 25-28, April 2005.
- [4] D. I. Hoult, S. J. W. Busby, D. G. Gadian, G. K. Radda, R. E. Richards, P. J. Seeley, "Observation of tissue metabolites using ³¹P nuclear magnetic resonance," *Nature*, vol. 252, no. 5481, pp. 285-287, 1974.
- [5] P. Linsel-Nitschke, H. Jansen, Z. Aherrarhou, S. Belz, B. Mayer, W. Lieb, F. Huber, W. Kremer, H. R. Kalbitzer, J. Erdmann, H. Schunkert, "Macrophage cholesterol efflux correlates with lipoprotein subclass distribution and risk of obstructive coronary artery disease in patients undergoing coronary angiography," *Lipids Health Dis.*, vol. 8, no. 14, p. 14, April 2009.
- [6] M. Klein, Analysis of metabolic disorders of dairy cows employing multidimensional and multinuclear NMR spectroscopy, 2011, Dissertation.
- [7] J. Wang, A. Stancaková, P. Soininen, A. J. Kangas, J. Paananen, J. Kuusisto, M. Ala-Korpela, M. Laakso, "Lipoprotein subclass profiles in individuals with varying degrees of glucose tolerance: a population-based study of 9399 Finnish men," *Journal of Internal Medicine*, vol. 272, no. 6, pp. 562-572, 2012.
- [8] P. E. H. Schwarz, J. Li, M. Reimann, A. E. Schutte, A. Bergmann, M. Hanefeld, S. R. Bornstein, J. Schulze, J. Tuomilehto, J. Lindström, "The Finnish Diabetes Risk Score Is Associated with Insulin Resistance and Progression towards Type 2 Diabetes," *U Clin Endocrinol Metab*, vol. 94, no. 3, pp. 920-926, 2009.

- [9] T. J. Wang, M. G. Larson, R. S. Vasan, S. Cheng, E. P. Rhee, E. McCabe, G. D. Lewis, C. S. Fox, P. F. Jacques, C. Fernandez, C. J. O'Donnell, S. A Carr, V. K. Mootha, J. C. Florez, A. Souza, O. Melander, C. B. Clish, R. E. Gerszten, "Metabolite profiles and the risk of developing diabetes," *Nature Medicine*, vol. 17, no. 4, pp. 448-453, 2011.
- [10] International Diabetes Federation IDF. (2012) Diabetes at a glance, 2012 - Europe.
- [11] W. Kremer, H. R. Kalbitzer, "Hochdruck-NMR-Spektroskopie an Proteinen," *Biospektrum*, vol. 9, no. 2, pp. 142-145, 2003.
- [12] K. Akasaka, "Probing Conformational Fluctuation of Proteins by Pressure Perturbation," *Chem. Rev.*, vol. 106, pp. 1814-1835, 2006.
- [13] W. Kremer, N. Kachel, K. Kuwata, K. Akasaka, H. R. Kalbitzer, "Species-specific differences in the intermediate states of human and syrian hamster prion protein detected by high pressure NMR spectroscopy," *Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 31, pp. 22689-22698, 2007.
- [14] O. Beckonert, H. C. Keun, T. M. D. Ebbels, J. Bundy, E. Holmes, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, "Metabolic Profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts," *Nature Protocols*, vol. 2, no. 11, pp. 2692-2703, 2007.
- [15] W. Gronwald, Metabolomics in diagnosis and health screening, Vorlesung.
- [16] J. C. Lindon, E. Holmes, J. K. Nicholson, "Metabonomics: System biology in pharmaceutical research and development," *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, vol. 6, no. 3, 2004.
- [17] D. Baumstark, NMR-Spektroskopie an Lipoproteinen und Lipoproteinsubklassen, 2011, Dissertation.
- [18] Deutsche Diabetesstiftung - Findrisk-Fragebogen. [Online]. http://diabetesstiftung.de/fileadmin/dds_user/dokumente/DDS_Findrisk_deutsch.pdf
- [19] (2013) World Health Organisation. [Online]. <http://www.who.int/en/>
- [20] C. R. Kahn, A. R. Saltiel, "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism," *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 799-806, Dezember 2001.
- [21] K. Meßlinger, Blut und Immunsystem, 2011, http://www.physiologie1.uni-erlangen.de/Unterricht/Script_zur_Vorlesung/Zellphysiol/Blut-Immunsystem_SS2011.pdf.
- [22] (2009) Spomedial - Sportmedizin interaktiv lernen - Blutplasma. [Online].

- http://vmrz0100.vm.ruhr-uni-bochum.de/spomedial/content/e866/e2442/e4446/e4534/index_ger.html
- [23] Timo Freyer. DocCheck Flexikon. [Online]. <http://flexikon.doccheck.com/de/Blutplasma>
- [24] Drk-Blutspende. [Online]. <http://www.drk-blutspende.de/bildung-und-wissen/wissen/blutplasma.php>
- [25] G. Aumüller, G. Aust, A. Doll, J. Engele, J. Kirsch, S. Mense, L. J. Wurzinger, *Duale Reihe Anatomie*, 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2010.
- [26] J. S. Schwegler, R. Lucius, *Der Mensch - Anatomie und Physiologie*, 5th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2011.
- [27] R. F. Schmidt, F. Lang, G. Thews, *Physiologie des Menschen.*, 29th ed. Berlin: Springer, 2004.
- [28] Pädagogische Hochschule St. Gallen. [Online]. <http://www.biofachforum.ch/BIOPIC/humloes/pichumbioblut9.html>
- [29] Wikipedia - Fettsäuren. [Online]. <http://de.wikipedia.org/wiki/Fettsaeuren>
- [30] G. Löffler, "Lipide," in *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 7th ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2007, ch. 6.
- [31] Andreas Klatt, Lipidstoffwechsel und Arteriosklerose, Vorlesung.
- [32] Fettsäuren und Lipide. [Online]. <http://www.sara-n.de/wp-content/uploads/2010/07/Lipide.pdf>
- [33] Lipoproteins. [Online]. <http://www.scientificpsychic.com/health/lipoproteins-LDL-HDL.html>
- [34] Wikipedia - Lipoproteine. [Online]. <http://de.wikipedia.org/wiki/Lipoproteine>
- [35] Endokrinologie: Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel. [Online]. <http://www.megru.uzh.ch/j3/module/endokrinologie/endo.php?uniId=E810000&di=20>
- [36] L. S. Kumpula, J. M. Kumpula, M. Taskinen, M. Jauhiainen, K. Kaski, M. Ala-Korpela, "Reconsideration of hydrophobic lipid distributions in lipoprotein particles," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 155, no. 1, pp. 57–62, 2008.
- [37] T. Hevonoja, M. O. Pentikainen, M. T. Hyvönen, P. T. Kovanen, and M. Ala-Korpela, "Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: Basis for understanding molecular changes in modified LDL," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1488, no. 3, pp. 189-210, 2000.

- [38] M. Dietel, N. Suttorp, M. Zeitz, M. Möckel, *Harrisons Innere Medizin*, 18th ed. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH.
- [39] J. D. Otvos, "Method and apparatus for measuring classes and subclasses of lipoproteins," Patent US 5343389 A, August 30, 1994.
- [40] J. D. Otvos, "Methods, systems, and computer program products for analyzing and presenting NMR lipoprotein-based risk assessment results," Patent US6576471, Juni 10, 2003.
- [41] J. D. Otvos, "Methods for providing personalized lipoprotein-based risk assessments," Patent US6653140 B2, November 25, 2003.
- [42] J. D. Otvos, "Lipoprotein insulin resistance indexes and related methods, systems and computer programs for generating same," Patent US8386187, Februar 26, 2013.
- [43] M. Ala-Korpela, A. Korhonen, J. Keisala, S. Horkko, P. Korpi, L. P. Ingman, J. Jokisaari, M. J. Savolainen, Y. A. Kesäniemi, "1H NMR-based absolute quantitation of human lipoproteins and their lipid contents directly from plasma," *J Lipid Res*, vol. 35, no. 12, pp. 2292-2304, 1994.
- [44] F. Huber, H. R. Kalbitzer, W. Kremer, "Verfahren zur Bestimmung von Lipoproteinen in Körperflüssigkeiten und Messanordnung dafür," Patent DE 10 2004 026 903 B4, Mai 18, 2006.
- [45] Numares Group GmbH.
- [46] A. K. Petersen et al., "Genetic associations with lipoprotein subfractions provide information on their biological nature," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, no. 6, pp. 1433-1443, 2012.
- [47] R. Mallol, M. A. Rodriguez, J. Brezmes, L. Masana, X. Correig, "Human serum/plasma lipoprotein analysis by NMR: Application to the study of diabetic dyslipidemia," *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, vol. 70, pp. 1-24, 2013.
- [48] R. H. Barton, D. Waterman, F. W. Bonner, E. Holmes, R. Clarke, Procardis Consortium, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, "The influence of EDTA and citrate anticoagulant addition to human plasma on information recovery from NMR-based metabolic profiling studies," *Mol Biosyst.*, vol. 6, no. 1, pp. 215-224, 2010.
- [49] C. Zheng, S. Zhang, S. Ragg, D. I. Raftery, O. Vitek, "Identification and Quantification of Metabolites in 1H NMR Spectra by Bayesian Model Selection," *Bioinformatics*, vol. 27, no. 12, pp. 1637-1644, 2011.
- [50] F. Huber, H. R. Kalbitzer, W. Kremer, "Process for the determination of

- lipoproteins in body fluids," Patent US7927878, April 19, 2011.
- [51] F. Huber, H. R. Kalbitzer W. Kremer, "Process for the determination of lipoproteins in body fluids," AU2005250571, 2011.
- [52] E. J. Jeyarajah, D. W. Bennett J. D. Otvos, "Quantification of plasma lipoproteins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy," *Clin Chem*, vol. 37, no. 3, pp. 377-386, 1991.
- [53] B. Kaess, M. Fischer, A. Baessler, K. Stark, F. Huber, W. Kremer, H. R. Kalbitzer, H. Schunkert, G. Riegger, C. Hengstenberg, "The lipoprotein subfraction profile: heritability and identification of quantitative trait loci," *Journal of Lipid Research*, vol. 49, no. 4, pp. 715-723, April 2008.
- [54] M. Rizzo, K. Berneis, "Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment," *Q J Med.*, vol. 99, no. 1, pp. 1-14, 2006.
- [55] W. Kremer, "High-Pressure NMR studies in Proteins," *Annual Reports on NMR spectroscopy*, vol. 57, pp. 177-200, 2006.
- [56] K. Heremans, L. Smeller, "Protein structure and dynamics at high pressure," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, vol. 1386, no. 2, pp. 353-370, 1998.
- [57] R. Hartl, Berechnung der NMR-Struktur der PPAR γ -LBD und Hochdruck-NMR-Messungen an HPr I14A, 2008, Dissertation.
- [58] C. E. Munte, M. Beck Erlach, W. Kremer, J. Koehler, H. R. Kalbitzer, "Distinct Conformational States of the Alzheimer b-Amyloid Peptide Can Be Detected by High-Pressure NMR Spectroscopy.," *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 52, pp. 8943 – 8947, 2013.
- [59] J. Koehler, M. B. Erlach, E. Crusca , W. Kremer, C. E. Munte, H. R. Kalbitzer, "Pressure Dependence of ^{15}N Chemical Shifts in Model Peptides Ac-Gly-Gly-X-Ala-NH $_2$," *Materials*, vol. 5, no. 10, pp. 1774-1786, 2012.
- [60] M. B. Erlach, C. E. Munte, W. Kremer, R. Hartl, D. Rochelt, Di. Niesner, H. R. Kalbitzer, "Ceramic cells for high pressure NMR spectroscopy of proteins," *Journal of Magnetic Resonance*, vol. 204, no. 2, pp. 196-199, Februar 2010.
- [61] R. Bender, S. Lange, A. Ziegler, "Wichtige Signifikanztests," *Dtsch. Med. Wochenschr.*, vol. 132, pp. 24-25, 2007.
- [62] S. Mostböck, Einführung in Statistik, 2011, Vorlesung.
- [63] J. Siegemund. (2003) Universität Bonn, Hauptkomponentenanalyse. [Online]. <http://www-mmdb.iai.uni-bonn.de/lehre/proprak0304/siegemund.pdf>
- [64] J. Rahmenführer. (2008) Multivariate Verfahren, TU Dortmund. [Online].

http://www.statistik.tu-dortmund.de/fileadmin/user_upload/Lehrstuehle/Genetik/MV0809/Vorlesung2_0081013_2x.pdf

- [65] (2006) Leibniz-Institut für Neurologie Magdeburg. [Online]. ftp://ftp.ifn-magdeburg.de/pub/MBLehre/sv06_130509-ftp.pdf
- [66] M. Kutschmann. Forschung Deutsche Rentenversicherung, BQS Düsseldorf. [Online]. <http://forschung.deutsche-rentenversicherung.de/ForschPortalWeb/ressource?key=Kutschmann-S3-Di-1300-03.pdf>
- [67] C. Dytham, *Choosing and using statistics: A biologist's guide*, 3rd ed., 2011.
- [68] R. Bender, A. Ziegler, S. Lange, "Logistische Regression," *Dtsch. Med. Wochenschr.*, vol. 132, pp. 33-35, 2007.
- [69] T. Schäfer, N. Jungbauer, S. Klewe, D. Kämpfer. (2010) TU Chemnitz, Logistische Regression und Diskriminanzanalyse. [Online]. <http://www.tu-chemnitz.de/hsw/psychologie/professuren/method/homepages/ts/methodenlehre/LogReg.pdf>
- [70] (2011, Dezember) Wikipedia - Univariat. [Online]. <http://de.wikipedia.org/wiki/Univariat>
- [71] (2012, Dezember) Wikipedia - Multivariate Verfahren. [Online]. http://de.wikipedia.org/wiki/Multivariate_Verfahren
- [72] D. W. Hosmer, S. Lemeshow, *Applied Logistic Regression*, 2nd ed., Wiley, Ed. New York, 2000.
- [73] S. De Sanctis, W. M. Malloni, W. Kremer, E. W. Lang, H. R. Kalbitzer, "Independent component analysis (ICA) and singular spectrum analysis (SSA) for solvent artifact suppression in one-dimensional NMR spectroscopy: a comparative analysis.," *Trends Appl. Spectr.*, vol. 9, pp. 1-15, 2012.
- [74] M. Althaus, *Entwicklung und Optimierung von Pulssequenzen und Rekonstruktionsalgorithmen zur ¹H-NMR-spektroskopischen Bildgebung mit reduzierter Mindestmesszeit.*: Cuvillier, E, 2004.
- [75] J. K. Nicholson, P. J. D. Foxall, M. Spraul, R. D. Farrant, J. C. Lindon, "750 MHz ¹H and ¹H-¹³C NMR spectroscopy of human blood plasma," *Anal. Chem.*, vol. 67, no. 5, pp. 793-811, 1995.
- [76] P. Sander, , pers. Gespräch.
- [77] Q. Cui. (2006) Madison Metabolomics Consortium Database (MMCD). <http://mmcd.nmrfam.wisc.edu/>.

- [78] Wikipedia. [Online]. www.wikipedia.de
- [79] R. Bender S. Lange, "Was ist der p-Wert?," *Deutsches Med Wochenschr*, vol. 7, pp. e15-e16, 2007.
- [80] C. Moler. Mathworks. [Online]. <http://www.mathworks.com/moler/leastsquares.pdf>
- [81] G. P. Baxter, C.C. Wallace, "Changes in volume upon solution in water of the halogen salts of the alkali metals. II.," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 38, no. 1, pp. 70–105., 1916.
- [82] C. M. Radding, D. Steinberg, "Studies on the synthesis and secretion of serum lipoproteins by rat liver slices," *J. Clin. Invest.*, vol. 39, no. 10, pp. 1560-1569, 1960.
- [83] W. Kremer, H. R. Kalbitzer, "Physiological conditions and practicality for protein nuclear magnetic resonance spectroscopy: experimental methodologies and theoretical background," *Methods in enzymology*, vol. 339, pp. 3-19, 2001.
- [84] H. Yamada, "Pressure-resisting glass cell for high pressure, high resolution NMR measurement," *Review of Scientific Instruments*, vol. 45, no. 5, pp. 640–642, 1974.
- [85] D. Baumstark, Absolute lipid quantification in high and low density lipoproteins by means of ¹H-NMR spectroscopy using internal standards, in Bearbeitung.
- [86] Bruker BioSpin GmbH, Topspin: Processing commands and parameters, 2007.
- [87] C. Chen, R. Fine F. Millero, "The equation of state of pure water determined from sound speeds," *J. Chem. Phys.*, vol. 66, no. 2142, 1977.
- [88] G. S. Kell, "Density, thermal expansivity, and compressibility of liquid water from 0°C to 150°C: Correlations and tables for atmospheric pressure and saturation reviewed and expressed on 1968 temperature scale," *J. Chem. Eng. Data*, vol. 20, no. 1, pp. 97–105, 1975.
- [89] American Diabetes Association, "Executive Summary: Standards of Medical Care in Diabetes—2010," *Diabetes Care*, vol. 33, no. 1, pp. 4-10, Januar 2010.
- [90] H. C. Murphy, M. Ala-Korpela, J. J. White, A. Raoof, J. D. Bell, M. L. Barnard, S. P. Burns, R. A. Iles, "Evidence for distinct behaviour of phosphatidylcholine and sphingomyelin at the low density lipoprotein surface," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 234, no. 3, pp. 733-737, 1997.
- [91] H. C. Murphy, A. Raoof, J. J. White, M. Ala-Korpela, J. D. Bell, M. L. Barnard, R. A. Iles, "Phospholipid headgroup mobility in low density lipoproteins,"

- Biochem. Soc. Trans.*, vol. 25, no. 1, p. 22, 1997.
- [92] G. Assmann H. Schriewer, "Biochemie der High Density Lipoproteine," *Klinische Wochenschrift*, vol. 58, pp. 749-756, 1980.
- [93] M. P. Stern, M. Rosenthal, S. M. Haffner, H. P. Hazuda, L. J. Franco, "Sex difference in the effects of sociocultural status on diabetes and cardiovascular risk factors in Mexican Americans: the San Antonio Heart Study," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 120, no. 6, pp. 834-851, 1984.
- [94] S. M. Haffner, "Epidemiology of Type 2 Diabetes: Risk Factors," *Diabetes Care*, vol. 21, no. 3, pp. C3-C6, Dezember 1998.
- [95] M. Liu, H. Tang, J. K. Nicholson J. C. Lindon, "Use of ^1H NMR-determined diffusion coefficients to characterize lipoprotein fractions in human blood plasma," *Magn. Reson. Chem.*, no. 40, pp. 83-88, 2002.
- [96] J. D. Otvos, E. J. Jeyarajah, D. W. Bennett, "Quantification of Plasma Lipoproteins by Protein Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy," *Clin. Chem.*, vol. 37, no. 3, pp. 377-386, 1991.
- [97] P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman, G. Fuchs, W. Gerok, *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*, 15th ed. Stuttgart, Deutschland: Thieme, 2005.
- [98] G. Fuchs, H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*, 8th ed. Stuttgart: Thieme, 2006.
- [99] G. D. Reaven, C. Hollenbeck, C.-Y. Jeng, M. S. Wu, Y.-D. Chen, "Measurement of Plasma Glucose, Free Fatty Acid, Lactate and Insulin for 24 h in patients with NIDDM," *Diabetes Journal*, vol. 37, no. 8, pp. 1020-1024, 1988.
- [100] L. -O. Ohlson, B. Larsson, P. Björntorp, H. Eriksson, K. Svärdsudd, L. Welin, G. Tibblin, L. Wilhelmsen, "Risk factors for Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. Thirteen and one-half years of follow-up of the participants in a study of Swedish men born in 1913," *Diabetologia*, vol. 31, no. 11, pp. 798-805, 1988.
- [101] G. P. Püschel, T. Kietzmann, D. Doenecke, H. Kühn, W. Höhne, B. Christ, J. Koolman, *Taschenlehrbuch Biochemie*, 1st ed. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag KG, 2011.
- [102] B. V. Howard, "Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus," *Journal of Lipid Research*, vol. 28, pp. 613-628, 1987.
- [103] B. V. Howard, W. J. Howard, "Dyslipidemia in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus," *Endocrine Reviews*, vol. 15, no. 3, pp. 263-274, Juni 1994.
- [104] M. J. Albrink, "Dietary and drug treatment of hyperlipidemia in diabetes,"

- Diabetes*, vol. 23, no. 1, pp. 913-918, 1974.
- [105] Y. Maruhama, R. Abe, F. Okuguchi, A. Ohneda, "Dietary intake and hyperlipidemia in controlled diabetic outpatients," *Diabetes*, vol. 26, no. 2, pp. 94-99, 1977.
- [106] B. V. Howard, P. J. Savage, L. J. Bennion, P. H. Bennett, "Lipoprotein composition in diabetes mellitus," *Atherosclerosis*, vol. 30, no. 2, pp. 153-162, 1978.
- [107] R. Paisey, R. S. Elkeles, J. Hambley, P. Magill, "The effects of chlorpropamide and insulin on serum lipids, lipoproteins and fractional triglyceride removal," *Diabetologia*, vol. 15, no. 2, pp. 81-85, 1978.
- [108] A. H. Kissebah, S. Alfarsi, D. J. Evans, P. W. Adams, "Integrated regulation of very low density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B kinetics in non-insulin dependent diabetes mellitus," *Diabetes*, vol. 31, no. 3, pp. 217-225, 1982.
- [109] E. L. Bierman, A. P. Amaral, B. H. Belknap, "Hyperlipidemia and diabetes mellitus," *Diabetes*, vol. 15, no. 9, pp. 675-679, 1966.
- [110] W.T. Garvey, S. Kwon, D. Zheng, S. Shaughnessy, P. Wallace, A. Hutto, K. Pugh, A.J. Jenkins, R.L. Klein, Y.L. Liao, "Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance," *Diabetes*, vol. 52, no. 2, pp. 453-462, 2003.
- [111] A. Festa, K. Williams, A.J.G. Hanley, J.D. Otvos, D.C. Goff, L.E. Wagenknecht, S.M. Haffner, "Nuclear magnetic resonance lipoprotein abnormalities in prediabetic subjects in the insulin resistance atherosclerosis study," *Circulation*, vol. 111, no. 25, pp. 3465-3472, 2005.
- [112] A.M. Hodge, A.J. Jenkins, D.R. English, K. O'Dea, G.G. Giles, "NMR-determined lipoprotein subclass profile predicts type 2 diabetes," *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 83, no. 1, pp. 132-139, 2009.
- [113] E. A. Nikkilä, M. Kekki, "Plasma triglyceride transport kinetics in diabetes mellitus," *Metabolism*, vol. 22, no. 1, pp. 1-22, 1973.
- [114] J. J. Abrams, H. Ginsberg, S. M. Grundy, "Metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in nonketotic diabetes mellitus," *Diabetes*, vol. 31, no. 10, pp. 903-910, 1982.
- [115] H. Ginsberg, S. M. Grundy, "Very low density lipoprotein metabolism in nonketotic diabetes mellitus: effect of dietary restriction," *Diabetologia*, vol. 23, no. 5, pp. 421-425, 1982.
- [116] F. L. Dunn, P. Raskin, D. W. Bilheimer, S. M. Grundy, "The effect of diabetic

control on very low-density lipoprotein-triglyceride metabolism in patients with type II diabetes mellitus and marked hypertriglyceridemia," *Metabolism*, vol. 33, no. 2, pp. 117-123, 1984.

- [117] H. Schatz, *Diabetologie kompakt: Grundlagen und Praxis*, 4th ed.: Thieme, 2006.
- [118] C. Y. Lee, A. Lesimple, M. Denis, J. Vincent, A. Larsen, O. Mamer, L. Krimbou, J. Genest, M. Marcil, "Increased sphingomyelin content impairs HDL biogenesis and maturation in human Niemann-Pick disease type B.," *Journal of Lipid Research*, vol. 47, 2006.
- [119] Deutsche Diabetesstiftung. (2011/2012) Zahlen und Fakten im Überblick.
- [120] (2012, September) Wikipedia - Logistische Regression. [Online]. http://de.wikipedia.org/wiki/Logistische_Regression
- [121] (2012, Mai) Cardiologydoc's Blog. [Online]. <http://cardiologydoc.wordpress.com/2012/05/27/understanding-the-cholesterol-skeptic/>
- [122] BRUKER, AMIX-Viewer & AMIX Software Manual, 2006.
- [123] J. D. Otvos, E. J. Jeyarajah, Dennis W. Bennett, Ronald M. Krauss, "Development of a Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Method for Determining Plasma Lipoprotein Concentrations and Subspecies Distributions from a Single, Rapid Measurement," *CLIN. CHEM.*, vol. 38, no. 9, pp. 1632-1638, 1992.
- [124] D. Gorges, *Lebensstilmodifikation zur Prävention des Typ-2-Diabetes*, 2010, Dissertation.
- [125] W. Kerner, J. Brückel, B. O. Böhm. (2004, Oktober) Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Evidenzbasierte Leitlinie DDG. [Online]. <http://web4health.info/de/aux/057-002.pdf>
- [126] H. R. Kalbitzer, I. C. Rosnizeck, C. E. Munte, S. P. Narayanan, V. Kropf, M. Spörner, "Intrinsic Allosteric Inhibition of Signalling Proteins by Targeted Rare Interaction States Detected by High Pressure NMR Spectroscopy," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 52, no. 52, pp. 4242-4246, Dezember 2013.
- [127] R. A. Gatenby, R. J. Gillies, "Why do cancers have high aerobic glycolysis?," *Nature Reviews Cancer*, vol. 4, no. 11, pp. 891-899, November 2004.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich auf die eine oder andere Weise während meiner Promotion unterstützt haben:

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die sehr interessante Themenstellung und die sehr gute Betreuung während meiner Doktorarbeit.

Großer Dank gilt ebenso Prof. Dr. Werner Kremer, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Meinem Mentor Prof. Dr. Hengstenberg für Betreuung während meiner Arbeit.

Dr. Fritz Huber, Dr. Renate Kirchhöfer, Thomas Müller und allen Mitarbeitern der Firma numares für die Unterstützung während der Messungen und dafür, dass sie mich in ihrer Firma herzlich willkommen hießen.

Daniela Baumstark, die stets ein offenes Ohr für Fragen hatte und mir die Probenherstellung der Lipoproteine im Labor lernte.

Bei Markus und Jörg, die mich sowohl bei den Hochdruck-Messungen als auch bei der Auswertung unterstützten.

Allen Lehrstuhlangehörigen für das angenehme und kollegiale Arbeitsklima während meiner Doktorarbeit, besonders meinen Bürokollegen, Bärbel, Nina, Silvia und Wilhelm, und Paul für die Hilfe bei Messproblemen und bei der Programmierung mit Matlab.

Beim technischen Personal des Lehrstuhls für jegliche Unterstützung im Labor und an den Spektrometern.

Ein großes Dankeschön an Frau Kulbartz für ihre freundliche Art und ihre Hilfe bei verwaltungstechnischen Fragen.

Meinen Eltern und Großeltern, die mir mein Studium ermöglichten und mir immer eine große Unterstützung sind.

Meinem Mann Michael für die Liebe und seine Unterstützung in allen Lebenslagen.