Sandra D. Habicht

Untersuchungen zur antidiabetischen Wirkung von *Momordica charantia* - Extrakten

Anti-diabetic effects of *Momordica charantia* extracts

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. oec. troph.) im Fachbereich Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Untersuchungen zur antidiabetischen Wirkung von *Momordica charantia* – Extrakten

---

betreut durch
Prof. Dr. Michael B. Krawinkel und
Prof. Dr. Josef Pallauf

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. oec troph)
am Fachbereich Agrarwissenschaften,
Ökotrophologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sandra Daniela Habicht, geb. Klomann
geboren am 29.03.1981 in Essen

Gießen 2010

Disputation:	02.09.2011
Vorsitzender:	Prof. Dr. Adalbert Evers
Prüfer:	Prof. Dr. Michael Krawinkel Prof. Dr. Josef Pallauf Prof. Dr. Bernd Honermeier Prof. Dr. Clemens Kunz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abbildungsverzeichnis III
Tabellenverzeichnis V
Abkürzungsverzeichnis VIII

1 Einleitung 1
1.1 Diabetes mellitus 2
1.2 Molekulare Grundlagen zu Insulin und Insulinresistenz 3
1.3 Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B und Insulinresistenz 7
1.4 Adipozytokine und Insulinresistenz 11
1.5 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren und Insulinresistenz 16
1.6 Bittergurke (*Momordica charantia*) 19

2 Material und Methoden 22
2.1 Materialbezug 22
2.2 Herstellung der verschiedenen Fraktionen der Bittergurke 23
2.3 Ernährungsversuch mit db/db Mäusen 24
2.4 Messung der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B-Aktivität 26
2.5 Western Blot 28
2.6 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion 30
2.7 Expressionsanalyse mittels Microarray 35
2.8 Messung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen 35
2.9 Quantifizierung antidiabetischer Pflanzeninhaltsstoffe 36
2.10 Statistische Auswertung 37

3 Ergebnisse 39
3.1 Körpergewicht und Futteraufnahme 39
3.2 Blutglucosespiegel und Glycohämoglobin-Werte 40
3.3 Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B 41
3.4 Genexpression der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B 44
3.5 Expression der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B 47
3.6 Expression von Markergenen der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren 48

3.7 Differentielle Genexpression im Fettgewebe 53
3.8 Konzentration Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen 56
3.9 Korrelation verschiedener Parameter 57
3.10 Konzentration antidiabetischer Inhaltsstoffe in verschiedenen Sorten der Bittergurke 58

4 Diskussion 61
4.1 Gewichtsreduzierende Wirkung der Bittergurke 61
4.2 Hypoglykämische Wirkung der Bittergurke 63
4.3 Bittergurke und Insulinresistenz: Literaturübersicht 65
4.4 Regulation der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B 75
4.5 Aktivierung von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren 78
4.6 Regulation der Genexpression im Fettgewebe 86
4.7 Antioxidative Wirkung der Bittergurke 90
4.8 Wirksamkeit unterschiedlicher Fraktionen der Bittergurke 93
4.9 Konzentration antidiabetischer Inhaltsstoffe der Bittergurke 95
4.10 Weitere bioaktive Inhaltstoffe der Bittergurke 99
4.11 Dosierung der Bittergurke 101
4.12 Humanstudien und mögliche Toxizität 103
4.13 Schlussfolgerung 105

5 Zusammenfassung 107

6 Summary 109

7 Literatur 111

Anhang 120

Danksagung 127

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anstieg der weltweiten Diabetesprävalenz von 2000 bis 2030 in Millionen Patienten und prozentualer Anstieg der Prävalenz von 2000 bis 2030 (Hossain et al. 2007) 1

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Insulinsignaltransduktion (Cheng et al. 2002)..... 6

Abbildung 3: Dephosphorylierungsreaktion der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B nach Sivaramakrishnan et al. (2005)..... 8

Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B modifiziert nach Cheng et al. (2002) 9

Abbildung 5: Schematische Darstellung der PPAR-Aktivierung (Ahmed et al. 2007).....16

Abbildung 6: Reife Frucht von *Momordica charantia* 21

Abbildung 7: Herstellung der verschiedenen Fraktionen der Bittergurke (ganze Frucht, Lipidfraktion, Saponinfraktion und wasserlösliche Fraktion).....24

Abbildung 8: Mittlere Gewichtsentwicklung [MW±SD] wachsender männlicher db/db Mäuse in fünf Versuchswochen 39

Abbildung 9: Mittlere Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP 1B) [MW±SD] im Muskel der db/db Mäuse, die mit der Lipid- oder Saponinfraktion behandelt worden waren, mit und ohne Zusatz von 2 mM Dithiothreitol (DTT) jeweils prozentual zur Kontrolle.....43

Abbildung 10: Aufnahmen der Agarosegele nach Auftrennung der amplifizierten cDNA mit Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B-Primern jeweils mit Größenmarker (100 bp plus DNA Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) im UV-Imager.....45

Abbildung 11: Aufnahmen der Agarosegele nach Auftrennung der amplifizierten cDNA mit Primern für β Aktin (A) und Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (B) im UV-Imager. Von links nach rechts sind jeweils ein Größenmarker (100 bp plus DNA Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) sowie die Gruppenpools der Kontrollgruppe und der Gruppen, die mit der ganzen Frucht, der Lipidfraktion, der Saponinfraktion oder der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke behandelt worden waren, aufgetragen worden 46

Abbildung 12: Aufnahme der Western Blots nach Inkubation mit einem Antikörper gegen Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B. Abwechselnd sind nach einem Standard je acht Tiere der Kontrollgruppe (I) und der Gruppe, die mit der Lipidfraktion der Bittergurke behandelt worden war (III), aufgetragen worden 47

Abbildung 13: Aufnahmen der Adiponektin-Banden aus dem Fettgewebe. Im Agarosegel wurden jeweils ein Größenmarker (50 bp DNA Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und von links nach rechts ein Tier aus der Kontrollgruppe sowie der Gruppen, die mit der ganzen Frucht, der Lipidfraktion, der Saponinfraktion oder der wasserlöslichen Fraktion behandelt worden waren, aufgetragen. * Saponinfraktion fehlt 48

Abbildung 14: Aufnahmen der Resistin-Banden aus dem Fettgewebe. Im Agarosegel wurden jeweils ein Größenmarker (50 bp DNA Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und von links nach rechts ein Tier aus der Kontrollgruppe sowie der Gruppen, die mit der ganzen Frucht, der Lipidfraktion, der Saponinfraktion oder der wasserlöslichen Fraktion behandelt worden waren, aufgetragen. * Saponinfraktion fehlt 50

Abbildung 15: Aufnahmen der Acyl CoA Dehydrogenase-Banden der Leber. Im Agarosegel wurden jeweils ein Größenmarker (50 bp DNA Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und von links nach rechts ein Tier aus der Kontrollgruppe sowie der Gruppen, die mit der ganzen Frucht, der Lipidfraktion, der Saponinfraktion oder der wasserlöslichen Fraktion behandelt worden waren, aufgetragen. * Saponinfraktion fehlt 52

Abbildung 16: Konzentration Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBA-RS) im Fettgewebe....56

Abbildung 17: Konzentration Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBA-RS) im Muskel....57

Abbildung 18: Konzentrationen hämolytischer Saponine in der Trockenmasse (TM) von ganzen Früchten (Proben 1-6) bzw. im Fruchtfleisch grüner (Proben 7-11) oder weißer (Proben 12-14) Sorten der Bittergurke. Angaben als MW±SD 60

Abbildung 19: Expression von Transkriptionsfaktoren während der Adipozytendifferenzierung (Mori et al. 2005) 88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ätiologische Klassifikation des Diabetes mellitus (gemäß Alberti und Zimmet 1998) 2

Tabelle 2: Adipozytokine nach Keller (2006) 12

Tabelle 3: Trockenmasse (TM), Rohasche, Rohprotein und Rohfett der Diät für Mäuse im Vergleich zu den Empfehlungen nach NRC (1995) 25

Tabelle 4: Zusammensetzung des zweiphasigen Polyacrylamidgels 28

Tabelle 5: Zusammensetzung des Guanidinthiocyanat-Puffers zur RNA-Isolierung 30

Tabelle 6: Übersicht verwendeter vorwärts (fw) und rückwärts (rew) Primer-sequenzen mit jeweiliger Schmelztemperatur (Tm) und Annealingtemperatur (T_A) 34

Tabelle 7: Mittlere tägliche Futteraufnahme und Körpergewicht von männlichen db/db Mäusen nach fünfwöchiger Versuchsdauer 40

Tabelle 8: Nüchtern-Blutglucose vor (T_0) und zwei Wochen nach (T_2) Versuchsbeginn sowie HbA_{1C}-Werte nach Versuchsende bei db/db Mäusen 41

Tabelle 9: Aktivität [U/g Protein] der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B neutral (pH 7,2) mit oder ohne 2 mM Dithiothreitol (+DTT) in Muskel, Leber und Fettgewebe 42

Tabelle 10: Aktivität [U/g Protein] der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B im Muskel neutral (pH 7,2) oder sauer (pH 6,0) 44

Tabelle 11: Differentielle Genexpression der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B im Muskel. Bandenstärke [od/mm^2] in Relation zur β Aktin-Bande 44

Tabelle 12: Differentielle Genexpression der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B im Muskel der Gruppenpools 46

Tabelle 13: Expression der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B [od/mm^2] 48

Tabelle 14: Mittlere Expression von Adiponektin im Fettgewebe ohne β Aktin-Korrektur nach Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Microarray-Analyse in Relation zur Kontrolle [Log Ratio] 49

Tabelle 15: Genexpression von Adiponektin und β Aktin im Fettgewebe der behandelten Gruppen in Relation zur Kontrolle 49

Tabelle 16: Mittlere Resistin Expression im Fettgewebe ohne β Aktin Korrektur nach Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Microarray-Analyse in Relation zur Kontrolle [Log Ratio] 51

Tabelle 17: Genexpression von Resistin und β Aktin im Fettgewebe der behandelten Gruppen in Relation zur Kontrolle 51

Tabelle 18: Genexpression der Acyl CoA Dehydrogenase (DH) und von β Aktin im Fettgewebe der behandelten Gruppen in Relation zur Kontrolle 52

Tabelle 19: Signal- und Stoffwechselwege nach der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Datenbank im Fettgewebe der db/db Mäuse nach fünfwöchiger oralen Gabe von 150 mg/kg Körpergewicht der verschiedenen Fraktionen der Bittergurke (ganze Frucht, Lipidfraktion, Saponinfraktion, wasserlösliche Fraktion) im Vergleich zur Kontrollgruppe.....53

Tabelle 20: Differentielle Genexpression im Fettgewebe mittels Microarray-Analyse. Veränderung der Genexpression wird als logarithmiertes Verhältnis der Signalintensitäten (Log Ratio) von Kontrolle und jeweiliger Behandlung mit entsprechendem p-Wert angegeben 55

Tabelle 21: Korrelationen zwischen Körpergewicht oder HbA_{1C}-Werten und Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP 1B) oder Konzentrationen an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBA-RS) 58

Tabelle 22: Konzentrationen der Bittergurkenfraktionen sowie der 9c-, 11t-, 13t konjugierten Linolensäure (CLN), der konjugieren Linolsäure (CLA) und der hämolytischen Saponine in ganzen Früchten (Proben 1-6) bzw. im Fruchtfleisch (Proben 7-14) verschiedener Sorten der Bittergurke.....59

Tabelle 23: Übersicht der *in vivo* Studien zur Untersuchung der antidiabetischen Wirkung der Bittergurke (BG) bei Insulinresistenz.....72

Tabelle 24: Regulation von Genen, die mit Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) assoziiert sind, im Fettgewebe von db/db Mäusen nach Microarray-Analyse im Vergleich zu Daten aus der Literatur, nach denen die entsprechenden Gene durch die Bittergurke hoch (+) oder runter (-) reguliert wurden.....84

Tabelle 25: Saponingehalte verschiedener Nahrungspflanzen [% der TM] nach *Fenwick und Oakenfull (1983) und die der untersuchten Bittergurken-Proben 96

Tabelle 26: Fettsäurezusammensetzung des Bittergurken-Samens 98

Tabelle 27: Verschiedene Dosierungen der getrockneten Bittergurke (BG) in der Literatur und Übertragung dieser Dosen auf den Menschen mit 70 kg Körpergewicht (KG) 102

Anhangstabelle 1: Zusammensetzung der Diät für Mäuse nach NRC (1995) 120

Anhangstabelle 2: Wöchentliche und gesamte Futteraufnahme [g/d] 121

Anhangstabelle 3: Körpergewicht [g] vor Versuchsbeginn (T_0) sowie nach jeder Versuchswoche 122

Anhangstabelle 4: Blutzuckerspiegel [mg/dL] vor (T_0) und zwei Wochen nach Versuchsbeginn (T_2) sowie HbA_{1C}-Werte [%] 123

Anhangstabelle 5: Aktivität [U/g Protein] der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B nativ (pH 7,2), mit 2 mM Dithiothreitol (+DTT) oder sauer (pH 6,0) gemessen 124

Anhangstabelle 6: Differentielle Expression (in % zur Kontrolle) von Genen, die über Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren reguliert werden, mit oder ohne Korrektur um β Aktin 125

Anhangstabelle 7: Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen 126

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetyl CoA Carboxylase
AICAR	*aminoimidazole carboxamide ribonucleotide*
AKR1B7	Aldo-Ketoreduktase 1B7
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ASO	Antisense Oligonukleotid
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxylphosphat
cDNA	*complementary* DNA
CEBPD	*CCAAT/enhancer-binding protein* δ
CLA	konjugierte Linolsäure
CLN	konjugierter Linolensäure
Cys 215	Cystein-Rest 215
DEPC	Diethyldicarbonat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FABP	Fatty acid binding protein
FAS	fatty acid synthase
FFA	freie Fettsäuren
FS	Fettsäure
GATA	*GATA-binding protein*
GC	Gaschromatographie
GLUT	Glucosetransporter
GSEA	*Gene Set Enrichment Analysis*
GTT	Glucosetoleranztest
GU	Grundumsatz
HbA_{1C}	Glycohämoglobin
IL-6	Interleukin 6
IR	Insulinrezeptor
IRS	Insulinrezeptorsubstrat
KEGG	*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*
KG	Körpergewicht
LAR	*Leukocyte Antigen Related Phosphatase*
LCFA	langkettige Fettsäure
LPL	Lipoproteinlipase
mRNA	*messenger* RNA
MW	Mittelwert
NBT	Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid
od	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDK1	Phosphoinositoide-Dependent-Kinase 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase

PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPRE	*peroxisom proliferator response element*
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
SREBP	*Sterol regulatory element-binding protein*
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBA-RS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TBS	*Tris-buffered Saline*
TBST	TBS mit 0,05% (v/v) Tween
TG	Triglycerid
Tm	Schmelztemperatur
TM	Trockenmasse
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZD	Thiazolidindione
U	Enzymaktivität definiert als 1 µmol Substratumsatz pro Minute
UCP	Uncoupling Protein

1 Einleitung

Die Prävalenz von Adipositas und Diabetes mellitus nimmt weltweit zu. Die Zahl von 171 Millionen weltweit diagnostizierten Diabetikern im Jahr 2000 wird voraussichtlich bis zum Jahr 2030 auf 366 Millionen Patienten ansteigen **(Abbildung 1)**. Vor einigen Jahrzehnten betraf dies vor allem industrialisierte Länder und betrifft heute auch die Bevölkerung in Entwicklungsländern (Zimmet et al. 2001, Anonymus 2000, Hossain et al. 2007).

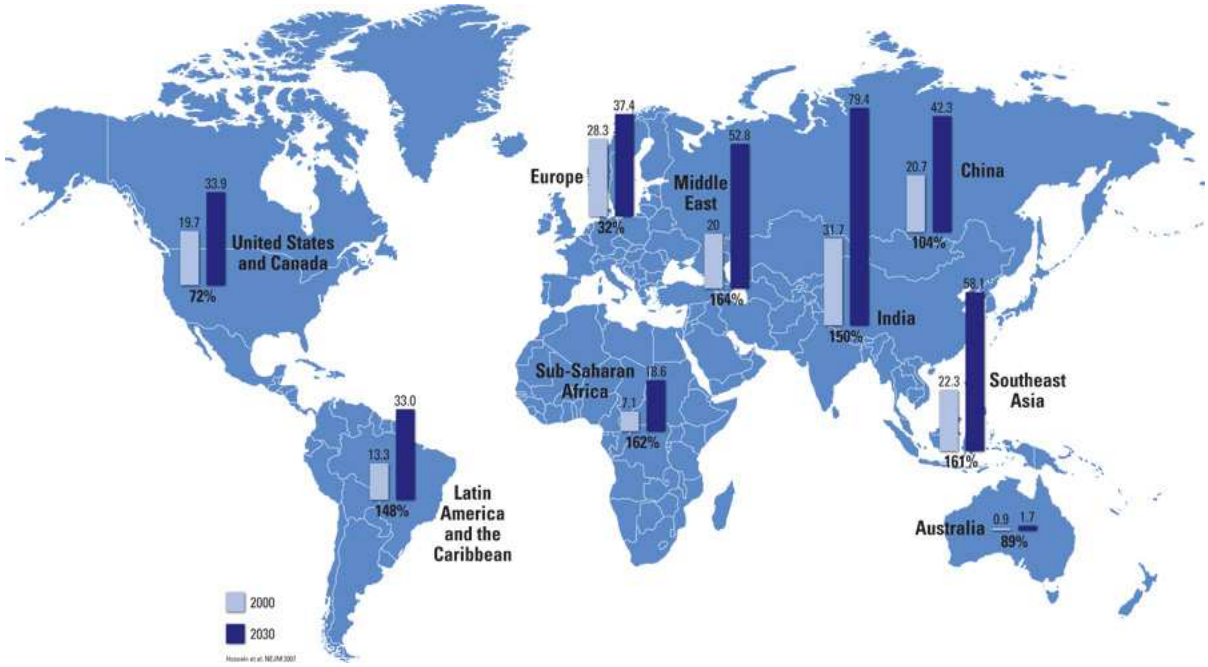


Abbildung 1: Anstieg der weltweiten Diabetesprävalenz von 2000 bis 2030 in Millionen Patienten und prozentualer Anstieg der Prävalenz von 2000 bis 2030 (Hossain et al. 2007)

Die Bevölkerung in Entwicklungsländern hat jedoch aus ökonomischen oder anderen Gründen häufig keinen Zugang zu einer adäquaten medizinischen Versorgung. Besonders in Entwicklungsländern kann die Lebenserwartung eines Diabetikers deshalb um die Hälfte reduziert sein (Ojewole et al. 2006). In diesen Ländern spielen aus diesem Grund die Ernährung und diätetische Maßnahmen eine entscheidende Rolle bei der Behandlung einer Insulinresistenz. Dazu gehört auch die traditionelle Medizin, welche intensiv pflanzliche Wirkstoffe nutzt und wozu unter anderem auch die Bittergurke gehört (Cummings et al. 2004).

1.1 Diabetes mellitus

Es gibt zwei Haupttypen und einige andere Diabetesformen, die zum Krankheitsbild des Diabetes mellitus zusammengefasst werden. In 5% der Fälle liegt ein Typ I Diabetes mit absolutem Insulinmangel vor, während ca. 90% aller Diabetiker von Typ II Diabetes betroffen sind, verbunden mit einem relativem Insulinmangel, einer Insulinresistenz (Zimmet et al. 2001). Weitere 5% der Diabetiker sind an anderen Formen des Diabetes mellitus erkrankt **(Tabelle 1)**.

Tabelle 1: Ätiologische Klassifikation des Diabetes mellitus (gemäß Alberti und Zimmet 1998)

1) Typ-1-Diabetes mellitus
a) Autoimmun
b) Idiopathisch
2) Typ-2-Diabetes mellitus
3) andere spezifische Diabetestypen
a) Genetischer Defekt der β-Zellfunktion (Maturity Diabetes of the Young (MODY)):
MODY 1: Defekt des Hepatocyte nuclear factor (HNF) 4α,
MODY 2: Glukokinasedefekt,
MODY 3: Defekt des HNF-1α,
MODY 4: Defekt des insulin promoter factor-1,
MODY 5: Defekt des HNF-1β, (mitochondrialer Diabetes, andere)
b) Genetischer Defekt in der Insulinwirkung
c) Erkrankungen des exokrinen Pankreas
d) Endokrinopathien
e) Medikamenten-induziert
f) Infektionen
g) Seltene Formen von immunogenem Diabetes
h) Andere genetische Syndrome, welche mit Diabetes assoziiert sind
4) Gestationsdiabetes

Diabetes mellitus ist eine chronische Störung des Glucosestoffwechsels. Alle Formen des Diabetes sind eng verbunden mit einem Risiko für Herzinfarkt, Angiopathien,

Neuropathien, Retinopathien, Nephropathien und Verdauungsstörungen. Diabetes führt so zu einem 25fach erhöhten Risiko für Erblindung, einem 20fach erhöhten Risiko für Nierenversagen, einem 20fach erhöhten Risiko für Amputationen und einem zwei- bis sechsfach höheren Risiko für koronare Herzerkrankungen (Zimmet et al. 2001, Wolff 1993, Deckert et al. 1978).

1.2 Molekulare Grundlagen zu Insulin und Insulinresistenz

Insulin ist ein Proteohormon, das in den β-Zellen des Pankreas synthetisiert und in diesen Zellen in Form von Granula gespeichert wird (Brodsky 2006). Insulin besteht aus zwei Ketten. Die biologisch aktive A-Kette setzt sich aus 21 Aminosäuren zusammen, während die B-Kette aus 30 Aminosäuren besteht. Die Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Insulin hat ein Molekulargewicht von 5786 Dalton.

Insulin bewirkt eine Reaktion, welche in erster Linie den Glucosetransport aus dem Blut in die Zellen des Skelettmuskels und des Fettgewebes ermöglicht (Saltiel 2001). Am Ende des Insulinsignalwegs steht eine durch den Glucosetransporter 4 (GLUT4) vermittelte Glucoseaufnahme in die Zelle. Insulin erhöht dosisabhängig die Kapazität des GLUT4 und induziert seine Translokation vom Zellinneren zur Membran. Durch erleichterte Diffusion kann Glucose dann aus dem Blut in die Zelle gelangen. Insulin wirkt deshalb blutzuckersenkend und ist an der Einstellung der normalen Blutglucosekonzentration in einem Bereich von 3,9 bis 5,8 mmol/L beteiligt (Keim et al. 2006). Die Translokation des GLUT4 zur Plasmamembran kann außerdem durch die Aktivierung der Adenosinmonophosphat-aktivierten Proteinkinase (AMPK) erreicht werden (Tan et al. 2008).

Insulin führt zu vermehrter Glykogensynthese, Proteinsynthese und Lipogenese sowie zu verminderter Glukoneogenese, Glykogenolyse und Lipolyse. Insulin wird deshalb als anaboles Hormon bezeichnet. Weitere Insulineffekte auf den Glucosemetabolismus sind eine abnehmende hepatische Glucoseproduktion und ein zunehmender peripherer Glucoseverbrauch (Saltiel 2001).

Insulinrezeptor

Fast alle Organe gehören zu den Zielorganen des Insulins und sind mit entsprechenden Rezeptoren ausgestattet. Der Insulinrezeptor (IR) gehört zu den

Typ-I-Rezeptoren. Charakteristisch für diesen Rezeptortyp ist die Signalübertragung über Anregung einer intrinsischen Enzymaktivität. Im Falle des IR wird eine interne Tyrosinkinase aktiviert.

Der IR ist aus zwei identischen α-Untereinheiten sowie aus zwei ebenfalls identischen β-Untereinheiten aufgebaut, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die α-Untereinheiten besitzen je eine Insulinbindungsstelle und sind an der Außenseite der Plasmamembran lokalisiert. Die β-Untereinheiten durchdringen die Phospholipiddoppelschicht und ragen in das Innere der Zelle hinein. Am cytosolischen Ende der β-Untereinheiten befindet sich je eine Tyrosinkinase-Domäne (Youngren 2007).

Insulinrezeptorsubstrat

Insulinrezeptorsubstrate (IRS) spielen eine bedeutende Rolle bei der Insulinsignalübertragung. Es werden die IRS 1 bis 4 unterschieden, die jeweils eine ähnliche Grundstruktur aufweisen.

IRS 1 und 2 sind in fast allen Geweben exprimiert und entscheidend an der insulinabhängigen Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) beteiligt, wobei IRS 1 vermutlich vor allem im Skelettmuskel bei der Insulinsignaltransduktion eine bedeutende Rolle spielt und IRS 2 in der Leber. Das Ausschalten von IRS 1 und 2 führt neben Störungen bei der Differenzierung und Proliferation verschiedener Organe und Gewebe zu Insulinresistenz und beeinträchtigter Glucosetoleranz (Sesti et al. 2001).

Das IRS 3 ist vorwiegend in Fettzellen lokalisiert und weniger in der Leber und anderen Geweben. Eine Expression von IRS 3 beim Menschen konnte noch nicht nachgewiesen werden, eine Bedeutung für Stoffwechselstörungen beim Menschen ist deshalb fragwürdig. Bei Mäusen verursacht das Ausschalten des IRS 3 kaum Abnormalitäten bezüglich des Wachstums und der Glucosehomöostase. Das IRS 3 kann jedoch bei fehlendem IRS 1 dessen Funktionen teilweise übernehmen und den Verlust ausgleichen (Laustsen et al. 2002).

Das IRS 4 wurde zunächst in menschlichen embryonalen Nierenzellen entdeckt, ist jedoch darüber hinaus auch in anderen Geweben exprimiert. Dazu gehören beim Menschen die Hypophyse, die Schilddrüse, die Eierstöcke, das Herz und die Fibroblasten. Das IRS 4 ist außerdem in einigen murinen Geweben exprimiert wie Skelettmuskel, Gehirn, Hypothalamus, Leber, Herz, Nieren sowie βTC-1 und βTC-7

Insulin produzierende Zellen. Die Expression des IRS 4 ist jedoch insgesamt verhältnismäßig gering. Das IRS 4 scheint über die Regulierung einzelner Signalwege an Prozessen der Zelldifferenzierung beteiligt zu sein. Was das Insulinsignal betrifft scheint das IRS 4 genauso wie das IRS 3 eher eine untergeordnete Rolle zu spielen (Sesti et al. 2001).

Insulinsignaltransduktion

Die Bindung von Insulin an die α-Untereinheiten des IR führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, was wiederum zu einer Autophosphorylierung von Tyrosinresten an den β-Untereinheiten des Rezeptors führt. Durch diese Autophosphorylierung kommt es zu einer weiteren Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Protein-Tyrosin-Kinase in der Kinasedomäne des Rezeptors aktiviert wird (Youngren 2007). Die Tyrosinphosphorylierung des IR setzt sich an IRS und weiteren Adapterproteinen, welche die biologischen Effekte des Insulins vermitteln, fort (Czech und Corvera 1999). Phosphotyrosinreste des IRS binden an und aktivieren dadurch die PI3K (Youngren 2007). Die PI3K und die Proteinkinase B (PKB) sind wichtige Proteine bei der Vermittlung des Insulinsignals (Avruch 1998). Die PI3K katalysiert die Umwandlung von Phosphatidylinositol zu Inositol-3,4-Bisphosphat und Inositol-3,4,5-Trisphosphat, welche wiederum die Phosphoinositoide-Dependent-Kinase 1 (PDK1) aktivieren. PDK 1 und 2 aktivieren die PKB durch Phosphorylierung je eines Serin- und Threoninrests (Gum et al. 2003b). Die Aktivierung der PKB resultiert in der Translokation GLUT4-haltiger Vesikel zur Plasmamembran **(Abbildung 2)**. In der Plasmamembran vermittelt der GLUT4 über erleichterte Diffusion den Transport von Glucose aus dem Blut in die Zelle. Weiterhin erhöht die PKB die Glykogensynthese durch Inhibierung der Glykogensynthasekinase 3 und die damit einhergehende Aktivierung der Glykogensynthase. Die Phosphorylierung und Aktivierung der PKB und der PI3K können weiterhin eine verminderte Transkription von glukoneogenetischen Enzymen und damit eine verminderte Glucoseproduktion in der Leber zur Folge haben (Gum et al. 2003b, Cross et al. 1995).

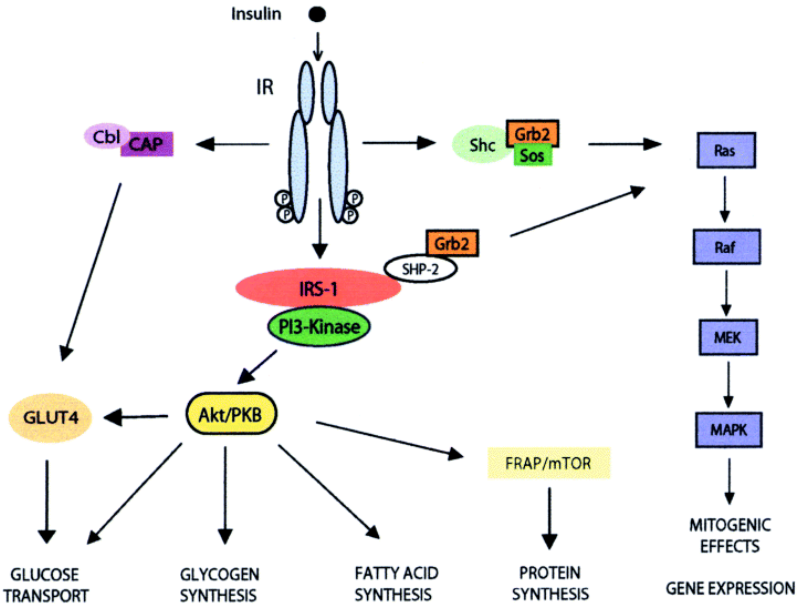


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Insulinsignaltransduktion (Cheng et al. 2002)

Insulinresistenz

Insulinsensitivität kann je nach Gewebe verschiedene Bedeutungen haben. Bei Skelettmuskulatur und Fettgewebe bezieht sich die Insulinsensitivität vor allem auf die insulinabhängige Glucoseaufnahme aus dem Blut in diese Zellen. Im Fall der Leber bezieht sich der Begriff Insulinsensitivität auf Prozesse der Glucoseproduktion und –freisetzung (Youngren 2007).

Insulinresistenz geht einher mit einer veränderten Regulierung des Insulinsignalweges, sodass die intrazelluläre Signaltransduktion nicht zustande kommt oder verringert ist (Saltiel 2001). Insulinresistenz äußert sich durch verminderten insulinabhängigen Glucosetransport bzw. –stoffwechsel in Geweben (Kahn und Flier 2000), die normalerweise insulinsensitiv sind, wie Leber, Fettgewebe und Skelettmuskulatur (Reaven 1988). Als Hauptursachen für Insulinresistenz gelten genetische Faktoren sowie ein ungünstiger Lebensstil (mangelnde Bewegung und Überernährung) und Übergewicht (McClung et al. 2004). Insulinresistenz führt zu einer chronischen hohen Glucosebelastung der Organe. Supraphysiologische Glucosekonzentrationen können über die nicht-enzymatische Oxidation von Glucose unter anderem durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu Retinopathien, Niereninsuffizienz, Neuropathien und makrovaskulären Erkrankungen sowie zu einer abnehmenden Funktion des Pankreas führen (Robertson 2004). Bei β-Zellversagen ist die Insulinsekretion durch das Pankreas vermindert und eine Insulinresistenz kann nicht mehr durch eine angepasste Insulinsekretion kompensiert

werden. Insulinresistenz und das gleichzeitige Versagen der β-Zellen werden als Typ II Diabetes beschrieben. Die Entwicklung von Typ II Diabetes ist jedoch genauso wie die Entwicklung von Übergewicht und Insulinresistenz von genetischen Faktoren und Lebensstilfaktoren abhängig. Insulinresistenz und Typ II Diabetes bilden zusammen mit anderen pathologischen Zuständen wie Adipositas, Hypertriglycerinämie und Hypertonie das heterogene Krankheitsbild des metabolischen Syndroms (Joost et al. 2000). Bislang gelten Diäten, Kalorienrestriktion und Bewegung als wichtigste Parameter zur Therapie und Prävention von Insulinresistenz und Typ II Diabetes.

1.3 Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B und Insulinresistenz

Mögliche physiologisch-biochemische Ursachen einer Insulinresistenz sind strukturelle oder funktionelle Defekte der IR, eine verminderte Expression von IR, ein verstärkter Abbau von Insulin oder eine erhöhte Expression bzw. Aktivität von Enzymen, welche der Insulinsignaltransduktionskaskade entgegen wirken, wie die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP).

Protein-Tyrosin-Phosphatasen: Allgemeines

Viele Proteine, die an der zellulären Signaltransduktion beteiligt sind, werden über die Phosphorylierung und Dephosphorylierung ihrer Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste reguliert. Vorraussetzung für die Kontrolle des Grades der Phosphorylierung dieser Aminosäurenreste ist das Vorhandensein und die Regulierung verschiedener Protein-Kinasen und -Phosphatasen. Protein-Kinasen katalysieren die Phosphorylierung der Aminosäurenreste, während die Protein-Phosphatasen diese dephosphorylieren (Sivaramakrishnan et al. 2005).

PTPs sind wichtige Enzyme bei der Kontrolle von Zellzyklen und Signaltransduktionsprozessen, indem sie gemeinsam mit Protein-Tyrosin-Kinasen den Level der Tyrosinphosphorylierung regulieren (Hecht und Zick 1992). Sie können sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf verschiedene zelluläre Signaltransduktions- und Stoffwechselwege haben (Walton und Dixon 1993).

Das menschliche Genom kodiert für 107 PTPs (Koren und Fantus 2007). PTPs sind Cystein-abhängige Enzyme, die durch ein PTP-Erkennungsmotiv, Cys-$(Xaa)_5$-Arg, im aktiven Zentrum definiert sind (Barford et al. 1998). Der Cysteinrest des aktiven

Zentrums katalysiert die Hydrolyse von Protein-Phosphotyrosinresten durch die Bildung eines Cysteinylphosphats (Goldstein 1995, **Abbildung 3**).

Achtunddreißig PTPs sind ausschließlich spezifisch für Phosphotyrosin (Alonso et al. 2004). Dabei werden 21 transmembrane Rezeptor-PTPs (RPTP-α, LAR (*Leukocyte Antigen Related Phosphatase*), LAR-PTP2, RPTP-δ, LCA(CD45), RPTP-κ und andere) von 17 intrazellulären Nicht-Rezeptor-PTPs (SH-PTP2, PTP-PEST, MKP-1, cdc25, PTP 1B und andere) unterschieden (Streuli et al. 1990, Goldstein 1995).

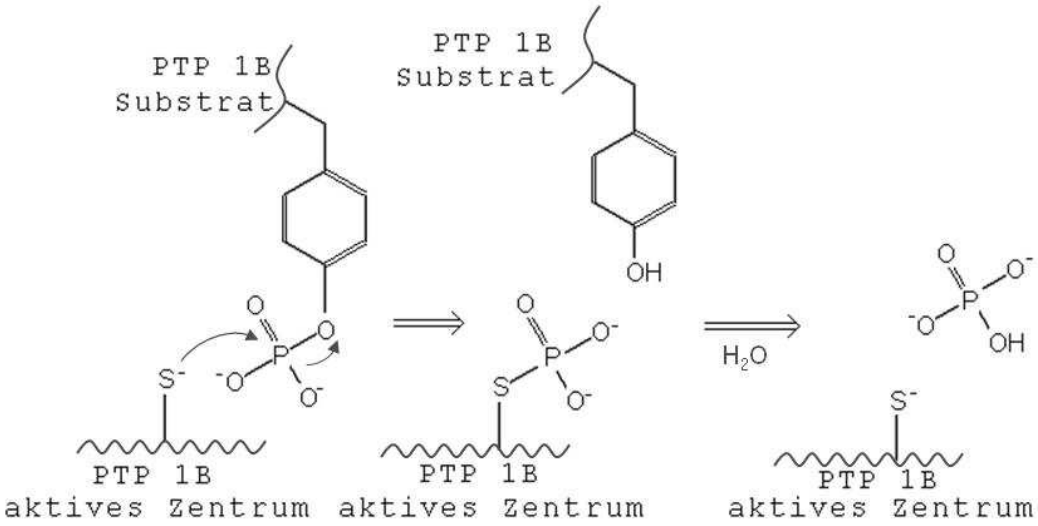


Abbildung 3: Dephosphorylierungsreaktion der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B nach Sivaramakrishnan et al. (2005)

Protein-Tyrosin-Phosphatasen als Gegenspieler des Insulinsignals

Isolierte IR behielten in *in vitro* Untersuchungen ihren autophosphorylierten Zustand bei, auch wenn das Insulin bereits von der Ligandenbindungsstelle entfernt wurde. Das heißt, dass IR nicht in der Lage sind, sich selbst zu dephosphorylieren. *In vivo* spielen deshalb zelluläre PTPs eine bedeutende Rolle bei der Regulierung der Insulinaktivität. Die PTPs katalysieren die schnelle Dephosphorylierung der Tyrosinreste des IR und seiner Signalmoleküle. Die Rezeptorkinase wird deaktiviert (**Abbildung 4**, Kahn et al. 1994, Haring et al. 1984). Die Phosphatasen dienen so der Vorbeugung einer exzessiven und insuffizienten Aktivierung des Insulinsignals und darauf folgender Prozesse (Clampit et al. 2003, Gum et al. 2003b).

Vor allem die LAR, die *Src-homlogy*-Phosphatase 2 und die PTP 1B sind PTPs, die in insulinsensitiven Geweben vorliegen und die reversible Tyrosinphosphorylierung des IR und der IRS regulieren (Goldstein 1995).

Physiologisch besteht ein Gleichgewicht zwischen Kinasen zur Signalweiterleitung und Phosphatasen, welche die Signalweiterleitung unterbrechen. Überaktivität und erhöhte Expression der PTPs ist jedoch ein möglicher Grund für die blockierte Signalübertragung, die zu Insulinresistenz führt.

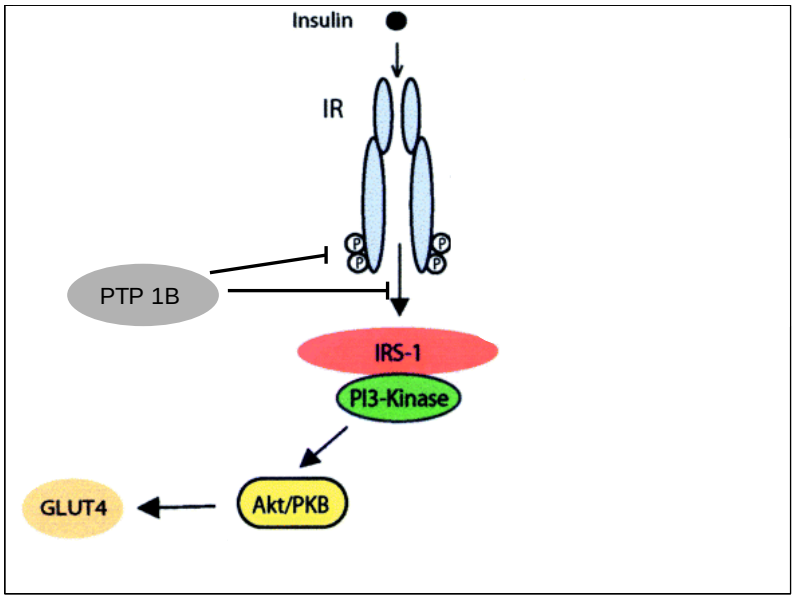


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Wirkungsweise der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B modifiziert nach Cheng et al. (2002)

Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B und Insulinresistenz

Die PTP 1B ist in vielen Geweben exprimiert. Sie ist mit ihrer katalytischen PTP-Domäne und dem C-terminalen Segment ein Enzym mit einem Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa (Frangioni et al. 1992). Das C-terminale Segment der PTP 1B ist hydrophob und richtet sich deshalb zur Membran des endoplasmatischen Retikulums aus (Tonks 2003). Als Antagonist des IR und der dort einsetzenden Signaltransduktion wirkt die PTP 1B dem Insulinsignal entgegen, indem sie sowohl den IR als auch die IRS dephosphoryliert (**Abbildung 4**, Calera et al. 2000).

Tatsächlich werden erhöhte PTP 1B-Level bzw. eine erhöhte Aktivität dieses Enzyms bei Typ II diabetischen Patienten (Clampit et al. 2003) sowie bei Adipositas beobachtet (Kahn und Flier 2000). Mohammad et al. (2002) zeigten, dass unbehandelte diabetische Ratten (*fatty Zucker rats*) eine 200% höhere PTP 1B-Aktivität im Skelettmuskel aufweisen als gesunde Artgenossen (Mohammad et al. 2002). Auch PTP 1B-Proteinlevel sind bei insulinresistenten übergewichtigen Patienten nachweislich erhöht (Ahmad et al. 1997).

Im Gegensatz dazu zeigten nicht-diabetische Mäuse ohne PTP 1B-Gen (PTP 1B -/- Mäuse) eine erhöhte Insulinsensitivität und selbst unter fettreicher Diät keine Gewichtszunahme (Elchebly et al. 1999). Sie zeigten dabei eine verringerte Fettzellmasse, jedoch keine verminderte Anzahl an Fettzellen (Klaman et al. 2000). Außerdem zeigten diese Mäuse einen erhöhten Grundumsatz (GU) ohne offensichtliche negative Auswirkungen (Elchebly et al. 1999).

Die Hemmung der PTP 1B oder die Reduzierung der PTP 1B-Proteinlevel sind daher mögliche Ziele für die Prävention und Behandlung von Insulinresistenz und Typ II Diabetes (Gum et al. 2003a). Stoffe, welche die Proteinexpression bzw. Aktivität der PTP 1B vermindern, gewinnen deshalb an Bedeutung.

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten den Einsatz von PTP 1B-Antisense Oligonukleotiden (ASO) bei ob/ob und db/db Mäusen. Dazu wurde ein ASO optimiert, welches selektiv die *messenger* RNA (mRNA) für PTP 1B bindet und somit die PTP 1B-Proteinexpression deutlich reduziert (Zinker et al. 2002). Die Behandlung von diabetischen ob/ob oder db/db Mäusen mit ASO führte zu einer signifikant verringerten PTP 1B-Proteinmenge in der Leber (Gum et al. 2003a) und im Fettgewebe, nicht aber im Skelettmuskel der Tiere (Zinker et al. 2002). Die Stimulierung mit Insulin führte in der Leber von ASO-behandelten diabetischen ob/ob Mäusen, bei denen der PTP 1B-Proteinlevel in der Leber um 60% reduziert war, zu einer drei- bis vierfach stärkeren Phosphorylierung des IR und seiner IRS 1 und 2 im Vergleich zu unbehandelten diabetischen ob/ob Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit von der Aktivierung des IRS 2 die Aktivität der PI3K um das Dreifache anstieg. Die Phosphorylierung der PKB stieg dabei um das Siebenfache an. Die Substrate der PKB, Glykogensynthasekinase 3α und 3β, wurden mehr als doppelt so stark phosphoryliert. Auch in peripheren Geweben konnte gezeigt werden, dass das Insulinsignal durch die Behandlung mit ASO verstärkt wurde. ASO-behandelte Tiere zeigten eine erhöhte Phosphorylierung der PKB im Muskel auch wenn dort Veränderungen im PTP 1B-Proteinlevel nicht messbar waren (Gum et al. 2003b).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass allein die Reduzierung der Expression bzw. Aktivität der PTP 1B ausreicht, insulinabhängige Signalwege zu verstärken und die Insulinsensitivität zu verbessern (Gum et al. 2003b, Zinker et al. 2002). Die Behandlung mit ASO verringerte Plasmaglucose- und Insulinspiegel und normalisierte die postprandiale Glucoseclearance und den Glycohämoglobin-Wert

(HbA_{1C}) (Gum et al. 2003a, Gum et al. 2003b, Zinker et al. 2002). Die Stärke der Abnahme korrelierte dabei positiv mit der Höhe der ASO-Gabe. Gleichzeitig erhöhte sich die Sensitivität für Glucose und Insulin bei entsprechenden Toleranztests. Weiterhin war in der Leber die Expression gluconeogenetischer Enzyme wie Phosphoenolpyruvat Carboxykinase und Fruktose-1,6-Bisphosphatase verringert (Zinker et al. 2002). Darüber hinaus konnten Rondinone et al. (2002) an diabetischen ob/ob Mäusen zeigen, dass verschiedene Gene des Fettstoffwechsels und der Lipogenese durch die Reduzierung der PTP 1B beeinflusst wurden. Die Behandlung mit ASO verursachte eine Downregulierung verschiedener lipogenetischer Gene. Hieraus resultierte eine verminderte Lipogenese und somit eine verminderte Entwicklung von Übergewicht bei den behandelten Tieren (Rondinone et al. 2002).

1.4 Adipozytokine und Insulinresistenz

Das weiße Fettgewebe ist nicht nur ein passives Speicherorgan, sondern besitzt außerdem wichtige endokrine Eigenschaften und setzt aktiv eine Reihe an hormonell wirksamen Proteinen frei. Diese Mediatoren machen die Kommunikation des Fettgewebes mit vielen anderen Organen und Geweben wie Leber, Skelettmuskulatur, Pankreas und Gehirn möglich (Staiger und Häring 2005).

Proteine, die aus dem Fettgewebe freigesetzt werden, wie Leptin, Adiponektin, Tumor Nekrose Faktor (TNF) α, *Plasminogen-activator inhibitor type 1*, Adipsin, Resistin (Tsuchida 2005) und Interleukin 6 (IL-6) (Staiger und Häring 2005) werden als Adipozytokine bezeichnet. Sie fungieren als Stoffwechselmodulatoren, als vasoaktive Stoffe, als Wachstumsfaktoren oder zeigen verschiedene andere Eigenschaften (Keller 2006, **Tabelle 2**). Im folgenden werden vor allem Adipozytokine mit Einfluss auf die Insulinresistenz näher erläutert.

Leptin und Adiponektin, unterstützen die Wirkung des Insulins und reduzieren die Level an Glucose und freien Fettsäuren (FFA) im Blut. Andere Adipozytokine, zum Beispiel TNFα und IL-6, zeigen hingegen eine ähnliche Wirkung wie Glukagon und Katecholamine und erhöhen Blutglucosespiegel und FFA-Level im Plasma (Staiger und Häring 2005). Diese Beispiele machen deutlich, dass die Insulinsensitivität des gesamten Körpers durch die Freisetzung verschiedener Faktoren aus dem weißen Fettgewebe beeinflusst werden kann und wird (Ohmura et al. 2007).

Tabelle 2: Adipozytokine nach Keller (2006)

	Adipozytokin	Funktion
Stoffwechsel-modulatoren	Leptin	Sättigungsgefühl
	Adiponektin	Insulinsensitivität
	Resistin	Insulinresistenz
	Lipoprotein Lipase	Lipolyse
	Apolipoprotein E	Lipidstoffwechsel
Cytokine	Tumor Nekrose Faktor α	Insulinsensitivität, Wirtsabwehr
	Interleukin 6	Insulinsensitivität, Inflammation
Vasoaktive Regulatoren	Angiotensinogen/Angiotensin II	Blutdruck
	Prostacyclin	Gerinnung, Gefäßwiderstand
Wachstums-faktoren	Insulin Growth Factor 1	Zellproliferation
	Somatostatin	Hemmung der Sekretion von Insulin und Wachstumshormonen
Andere	Adipsin	Komplementsystem
	Resistin-like molecule-α	Hemmung der Adipozytendifferenzierung

Adipozytokine, welche die Insulinsensitivität des Organismus erhöhen

Zu den Adipozytokinen, welche die Wirkung des Insulins unterstützen oder die Insulinsensitivität peripherer Organe erhöhen, gehören vor allem Adiponektin und Leptin (Ohmura et al. 2007). Aber auch Visfatin besitzt insulinomimetische Eigenschaften und erhöht in der Leber die Glucoseaufnahme aus dem Blut und vermindert die hepatische Glucoseproduktion (Zhou et al. 2007).

Adiponektin ist ein ausschließlich adipozytenspezifisches Protein (Roffey et al. 2007), welches in hohen Mengen (100- bis 1000-fach höher konzentriert als andere Hormone und Zytokine) im Blut zirkuliert. Adiponektin vermittelt seine Wirkung an Leber und Skelettmuskulatur über verschiedene Rezeptoren (Ohmura et al. 2007). Durch seine Bindung an Adiponektinrezeptoren 1 und 2 vermittelt Adiponektin die Phosphorylierung und Hemmung der Acetyl CoA Carboxylase (ACC), was zu einer verminderten Fettsäuresynthese führt. Außerdem fördert Adiponektin die Fettsäureoxidation und erhöht die Glucoseaufnahme in die Zelle, während die Glukoneogenese vermindert wird (Tsuchida et al. 2005). Plasmalevel von

Adiponektin sind nachweislich vermindert bei Übergewicht, Insulinresistenz, Hyperinsulinämie und koronaren Herzerkrankungen (Staiger und Häring 2005). Das heißt, Adiponektinspiegel und Fettgewebsmasse bzw. viszerale Fettzellmasse korrelieren negativ (Chan et al. 2005, Semple et al. 2006), während die Insulinsensitivität von Skelettmuskulatur und Leber direkt von Adiponektin abhängt (Ohmura et al. 2007, Semple et al. 2006). Verminderte Adiponektinlevel bei Übergewicht begünstigen langfristig über erhöhte Glucoselevel und erhöhte Level an FFA im Serum eine Insulinresistenz. Bei Übergewicht und Hyperinsulinämie kommt es zusätzlich zu verminderten Adiponektinspiegeln auch zu einer verminderten Expression von Adiponektinrezeptoren und dadurch insgesamt zu einer reduzierten Adiponektinbindung an den Rezeptor (Tsuchida et al. 2005).

Auch Leptin ist ein fettgewebsspezifisches Hormon. Seine Aufgabe ist vor allem die Reduzierung der Nahrungsaufnahme und die Regulierung der Energiebalance (Keller 2006). Zunächst scheint Leptin, weil es mit steigender Fettgewebsmasse vermehrt ausgeschüttet wird, der Entwicklung einer Insulinresistenz entgegen zu wirken. Chronisch hohe Leptinspiegel können jedoch zu einer Leptinresistenz führen, sodass periphere Gewebe nicht mehr auf dieses eigentlich günstige Hormon ansprechen und die negativen Effekte vermehrter Fettgewebsmasse überwiegen (Staiger und Häring 2005).

Adipozytokine, welche die Insulinsensitivität des Organismus vermindern

Wichtige Adipozytokine, die eine Insulinresistenz begünstigen und deshalb eine Schlüsselrolle bei der mit Übergewicht assoziierten Insulinresistenz spielen, sind unter anderem TNFα, IL-6 und Resistin (Ohmura et al. 2007).

TNFα ist ein multifunktionaler Signalstoff des Immunsystems. Neben seinen wichtigen Funktionen im Immunsystem fördert TNFα außerdem die Lipolyse in reifen Adipozyten und spielt eine entscheidende Rolle im Fettstoffwechsel und bei der Entwicklung einer Insulinresistenz. TNFα besitzt antiadipogene Eigenschaften und wirkt gezielt einer Differenzierung des Fettgewebes entgegen, was mit einer Down-Regulierung verschiedener fettgewebsspezifischer Proteine einhergeht. Betroffen sind davon unter anderem Proteine wie Lipoproteinlipase (LPL), *fatty acid binding protein* (FABP), *fatty acid synthetase*, ACC, Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase und GLUT4 (Hube und Hauner 1999). Übergewicht führt zu einer erhöhten Expression an TNFα. Die Menge an TNFα-mRNA korreliert dabei positiv mit dem

Körpergewicht (KG) und dem Grad der Adipositas (Staiger und Häring 2005), wobei subkutane Fettdepots eine höhere TNFα-mRNA-Expression zeigen als viszerale Fettdepots.

In erhöhter Konzentration, durch Übergewicht, nimmt TNFα direkt Einfluss auf die Insulinsignaltransduktion und behindert den Insulin-stimulierten Glucosetransport. TNFα ist deshalb entscheidend an der Entstehung der Übergewicht-vermittelten Insulinresistenz peripherer Organe beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass adipöse Mäuse mit fehlendem TNFα- oder TNFα Rezeptor-Gen vor der Entwicklung einer Insulinresistenz geschützt sind (Hube und Hauner 1999). Hube und Hauner (1999) formulierten die Hypothese, dass TNFα eine Insulinresistenz induziert, um dem Wachstum des Fettgewebes und einer unkontrollierten Fettakkumulation entgegen zu wirken. Verschiedene Möglichkeiten, wie TNFα die Insulinsignaltransduktion beeinträchtigt, werden diskutiert. Ein Ansatz stellt eine verminderte Expression an IRS 1 und GLUT4 zur Weiterleitung des Insulinsignals dar (Hube und Hauner 1999, Staiger und Häring 2005). Ein weiterer Ansatz ist eine TNFα-vermittelte Serin-Phosphorylierung des IRS 1, was zu einer gestörten Bindung des IRS 1 an den IR und somit auch zu einer verminderten Tyrosinphosphorylierung des IRS 1 führt (Staiger und Häring 2005). Weiterhin kommt es durch erhöhte Spiegel an TNFα zu einer erhöhten Expression der PTP 1B, welche die Weiterleitung des Insulinsignals unterbricht (Nieto-Vazquez et al. 2007). Die Autoren Nieto-Vazquez et al. (2007) untersuchten an normalen immortalisierten Muskelzellen der Maus im Vergleich zu solchen ohne PTP 1B-Gen die Auswirkungen einer TNFα-Gabe auf die Entwicklung einer Insulinresistenz. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der PTP 1B effektiv vor einer TNFα-induzierten Insulinresistenz schützt. Die Autoren vermuten deshalb, dass TNFα über eine erhöhte Expression und Aktivität der PTP 1B die Insulinsensitivität an Muskelzellen vermindert. *In vivo* Experimente konnten diese Ergebnisse bestätigen.

Außerdem scheinen TNFα, aber auch IL-6, die Expression von Adiponektin, welches die Insulinsensitivität verbessert, zu verringern. Auch IL-6 scheint deshalb eine entscheidende Rolle im Glucose- und Fettstoffwechsel zu spielen. Chronisch hohe Level an TNFα und IL-6 begünstigen jedoch nicht nur eine Insulinresistenz, sondern fördern auch unabhängig davon inflammatorische Prozesse, Atherosklerose und andere Komplikationen einer Insulinresistenz (Staiger und Häring 2005).

Ein weiteres pro-diabetisches Hormon ist das Resistin. Der Name Resistin steht für „*resistance to insulin*“. Expression und Sekretion von Resistin nehmen mit steigender Nahrungsaufnahme und Fettzellmasse zu. Dabei spielt es keine Rolle, ob das Übergewicht Diät-induziert ist oder durch bestimmt genetische Dispositionen hervorgerufen wird. Resistin wird vor allem im viszeralen Fettgewebe im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe vermehrt exprimiert. Während Anti-Resistin-Antikörper die Blutglucosespiegel und das Insulinsignal verbessern, scheint die Gabe von Resistin bei Wildtyp Mäusen eine Insulinresistenz hervorzurufen (Nerurkar et al. 2010). Obwohl Studien zu Resistin und seiner Wirkung bei der Entwicklung einer Insulinresistenz bei Mäusen vielversprechend scheinen, ist die Rolle von Resistin beim Menschen noch nicht hinreichend geklärt (Staiger und Häring 2005).

Abgesehen von ihren jeweiligen individuellen Wirkmechanismen bei der Beeinflussung der Insulinsensitivität peripherer Organe scheinen Adipozytokine auch über die Regulation des Fettsäurestoffwechsels an der Verknüpfung von Adipositas und Insulinresistenz beteiligt zu sein. Leptin fördert die Aufnahme von FFA in den Muskel und erhöht dort die Fettsäureoxidation und vermindert gleichzeitig die Fettsäuresynthese über die Hemmung der ACC (Staiger und Häring 2005). Auch Adiponektin vermindert die Plasmalevel von FFA über eine erhöhte Fettsäureoxidation im Muskel und hemmt gleichzeitig die Produktion von TNFα, welcher die Freisetzung von FFA aus den Adipozyten in den Blutkreislauf erhöht bzw. der Aufnahme von FFA aus dem Blut in den Adipozyten entgegenwirkt. Hohe Level an FFA im Plasma sind ein unabhängiger Risikofaktor bei der Entstehung einer Insulinresistenz. Eine chronische Belastung mit erhöhten FFA-Leveln begünstigt eine Insulinresistenz an Skelettmuskulatur und Leber (Ohmura et al. 2007). Infusionen mit FFA bei Menschen führten zu einer Hemmung der Insulinsignaltransduktion (Dresner et al. 1999).

1.5 Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren und Insulinresistenz

Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) gehören zur Gruppe der ligandenaktivierten, intrazellulären Rezeptoren. Drei Isotypen von PPARs sind bekannt. PPARα ist vor allem in Leber und braunem Fettgewebe und weniger in Herz, Nieren und Skelettmuskulatur exprimiert. PPARγ existiert in zwei unterschiedlichen Formen. Insgesamt ist der PPARγ vor allem im Fettgewebe exprimiert. Der PPARδ (bzw. PPARβ) ist in vielen Geweben exprimiert. Die größte Bedeutung hat er jedoch vor allem in Fettgewebe, Skelettmuskulatur, Herz und Haut. Die PPARδ-Expression ist nüchtern und nach dem Sport sowie bei Vorhandensein von Fettsäuren (FS) erhöht. Der PPARδ unterstützt PPARα-aktivierte Prozesse des Fettstoffwechsels (Jay und Ren 2007).

PPARs besitzen jeweils eine Liganden-Bindungs-Domäne und eine DNA-Bindungs-Domäne. Wenn ein Ligand an den jeweiligen PPAR bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung und Verlagerung des PPAR in den Zellkern. Dort dimerisiert der PPAR mit dem Retinoid-X-Rezeptor, ebenfalls ein ligandenaktivierter Rezeptor, und kann dann an spezifische DNA-Sequenzen von Zielgenen, den *peroxisom proliferator response elements* (PPRE), binden **(Abbildung 5)**.

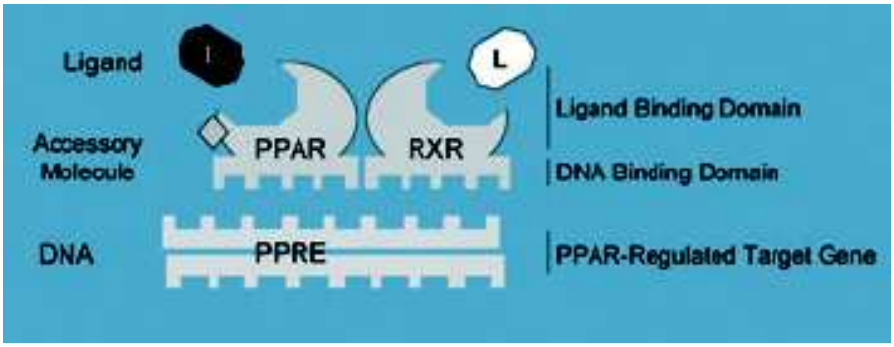


Abbildung 5: Schematische Darstellung der PPAR-Aktivierung (Ahmed et al. 2007)

Diese Bindung an das PPRE kann dann je nach Gen eine verstärkte oder verminderte Transkription des entsprechenden Zielgens verursachen (Tsuchida et al. 2005, Semple et al. 2006). Die Regulation der Transkription des Zielgens ist dabei stark abhängig vom jeweiligen Ligand, der an den PPAR bindet. Obwohl PPARs nach ihrer Fähigkeit benannt sind, die Proliferation von Peroxisomen in der Leber

von Mäusen nach Stimulierung mit Xenobiotika einzuleiten, ist heute bekannt, dass PPARs vor allem entscheidend an der Regulation des Fett- und Kohlenhydratstoffwechsels beteiligt sind (Semple et al. 2006).

PPARα

Der PPARα reguliert mehr als 80 bis 100 Gene und ist damit entscheidend an der Regulation verschiedener Stoffwechselwege beteiligt. Zu den Prozessen, die der PPARα reguliert, gehören vor allem Prozesse des Fettstoffwechsels wie die β-Oxidation und der Lipoproteinstoffwechsel sowie inflammatorische Prozesse (Ahmed et al. 2007). Studien an Mäusen mit fehlendem PPARα-Gen haben gezeigt, dass bei diesen Tieren die Aufnahme von FS in die Leber und deren Oxidation im Vergleich zu Artgenossen des Wildtyps beeinträchtigt waren. Dies ging einher mit einer verminderten Protein- und Genexpression von Enzymen, die an diesen Prozessen beteiligt sind, wie die Acyl CoA Dehydrogenase (Ahmed et al. 2007, Aoyama et al. 1998). Die Expression des PPARα ist nüchtern besonders hoch. Der PPARα vermittelt dann die FS-Aufnahme in die Leber und deren Oxidation zur Energiegewinnung und beugt gleichzeitig einer vermehrten Fettzellmasse vor. PPARα-Agonisten wie Fibrate werden deshalb als Arzneimittel bei der Behandlung von Hyperlipidämie und Hypercholesterinämie eingesetzt. Es gibt jedoch auch zahlreiche natürliche Liganden, die den PPARα aktivieren. Dazu gehören langkettige FS (LCFA) und mehrfach ungesättigte FS wie Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure sowie deren oxidierte Formen; außerdem verschiedene Eicosanoide und Leukotrien B4 (Ahmed et al. 2007). Glucose vermindert die Expression von PPARα, was mit einer verminderten Fettsäureoxidation und einer vermehrten Fettspeicherung einhergeht (Jay und Ren 2007).

PPARγ

Zu den natürlichen Liganden, die den PPARγ aktivieren, gehören verschiedene ungesättigte FS, oxidierte Fette, Eicosanoide sowie Prostaglandine. Die Empfindlichkeit gegenüber diesen verschiedenen Liganden zeigt, dass der PPARγ nicht bevorzugt auf einen spezifischen Liganden anspricht, sondern viel mehr als genetischer Sensor auf das Vorhandensein verschiedener FS und anderer Moleküle reagiert. Im Fettgewebe ist der PPARγ entscheidend an der Adipozytendifferenzierung und an der Adipogenese beteiligt, indem er unter anderem

über die Hochregulierung verschiedener Gene die Aufnahme von FS in die Adipozyten fördert. Die Expression von PPARγ nimmt postprandial zu (Semple et al. 2006). Mäuse mit heterozygot fehlendem PPARγ-Gen zeigen bei fettreicher Ernährung eine verminderte Gewichtszunahme, Fettgewebsmasse und Fettzellgröße sowie eine erhöhte Insulinsensitivität im Vergleich zu Artgenossen des Wildtyps. Diese Ergebnisse zeigen, dass der PPARγ unter fettreicher Ernährung eine Hypertrophie der Adipozyten sowie die Entstehung von Übergewicht und Insulinresistenz vermittelt (Tsuchida et al. 2005).

Zunächst scheint es deshalb widersprüchlich, dass Thiazolidindione (TZD), welche als effektive PPARγ-Agonisten fungieren, als Insulin-Sensitizer in der Behandlung Typ II diabetischer Patienten eingesetzt werden. Verschiedene Ansätze zur Klärung, wie PPARγ-Agonisten die Insulinsensitivität erhöhen, werden diskutiert. Die *„lipid steal"*-Hypothese geht davon aus, dass PPARγ-Agonisten die Aufnahme und Speicherung von FS in den Adipozyten fördern und somit die Einlagerung von FS in andere Gewebe wie Skelettmuskulatur und Leber reduzieren, sodass diese Gewebe ihre Insulinsensitivität behalten bzw. verbessern. Gleichzeitig werden Level an FFA im Serum reduziert (Semple et al. 2006, Ye et al. 2004). Ein weiterer Ansatz stellt ein verändertes Profil an Adipozytokinen, die das Fettgewebe sezerniert, nach PPARγ-Aktivierung dar. Zu den Genen, die über PPARγ reguliert werden gehören unter anderem Adiponektin, welches nach einer Behandlung mit TZD vermehrt ausgeschüttet wird, sowie TNFα und Resistin, deren Level nach einer Behandlung mit TZD vermindert sind (Semple et al. 2006, Staiger und Häring 2005, Hube und Hauner 1999). Zusätzlich scheint eine supraphysiologische Aktivierung des PPARγ durch TZD oder andere PPARγ-Agonisten die Differenzierung der Adipozyten zu stimulieren. Einer Diät-induzierten Adipozytenhypertrophie und der damit einher gehenden vermehrten Freisetzung von TNFα und FFA kann somit vorgebeugt werden (Tsuchida et al. 2005).

Die insulinsensitivierende Wirkung von TZD geht jedoch mit einer vermehrten Fettzellmasse und Gewichtszunahmen einher (Tsuchida et al. 2005). Andere Nebenwirkungen einer Behandlung mit TZD sind Ödeme, Anämien und Hypercholesterinämie. Deshalb gewinnen therapeutische Substanzen, welche sowohl als PPARγ- als auch als PPARα-Agonist fungieren, immer mehr an Bedeutung. Dual wirkende PPAR-Agonisten machen eine gleichzeitige und effektive

Behandlung von Insulinresistenz, Hyperlipidämie und abdominaler Adipositas möglich. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass Extrakte der Bittergurke sowohl PPARγ als auch PPARα aktivieren (Chao und Huang 2003).

1.6 Bittergurke (*Momordica charantia*)

Viele Pflanzen und pflanzliche Inhaltsstoffe werden in der traditionellen Medizin bei der Behandlung von Diabetes mellitus eingesetzt. Nur wenige dieser Pflanzen wurden jedoch bisher ausreichend wissenschaftlich untersucht und ihre antidiabetische Wirkung bei Labortieren oder Patienten bewiesen (Ojewole et al. 2006). *Momordica charantia* und ihrer Frucht, der Bittergurke, konnten hingegen in tierexperimentellen Untersuchungen sowohl bei Typ I als auch bei Typ II diabetischen Modelltieren eine blutzuckersenkende Wirkung nachgewiesen werden (Krawinkel und Keding 2006).

Momordica charantia ist eine tropische Kletterpflanze der Familie der Kürbisgewächse (*Cucurbitaceae*) mit grünen Blättern und gelben Blüten. *Momordica charantia* wird vor allem wegen ihrer essbaren Früchte in Afrika, Asien, Südamerika und der Karibik in großem Umfang angebaut (Basch et al. 2003). Je nach Sorte ist die Frucht weiß oder grün, unterschiedlich geformt und groß. Kleine Sorten werden 6 bis 10 cm lang, während andere Sorten über 30 cm lang sein können. Der essbare Teil der Frucht besteht aus einer dünnen warzigen Schale und einer schmalen Schicht Fruchtfleisch. In der Mitte der Frucht, von einem Mark umgeben, befinden sich die Samen. Die großen flachen Samen sind besonders bitter und werden deshalb häufig vor dem Verzehr entfernt. Insgesamt gehört die Frucht von *Momordica charantia* zu den bittersten Gemüsesorten überhaupt. Die Bitterkeit der Frucht nimmt mit der Reife zu. Während der Reifung färben sich das Fruchtfleisch und die weißen Samen langsam gelb bis orange bzw. rot. Die reife Frucht bekommt ein weiches Fruchtfleisch, welches sich dann nach außen stülpt und die Samen freilegt **(Abbildung 6)**.

Verzehrt wird die Frucht nur im grünen unreifen Zustand bis zur leicht gelblichen Verfärbung. Die unreife Frucht ist als preiswertes Gemüse in Süd- und Ostasien sowie in tropischen Gebieten Afrikas das ganze Jahr auf dem Markt verfügbar (Sekar et al. 2005, Njoroge und van Luijk 2004) und wird je nach Region unter anderem auch als Bittergurke, bittere Springgurke, Karela, *African cucumber*, *balsam apple*, *balsam*

pear, *balsamo*, *beta-momorcarin*, *bitter apple*, *bitter cucumber*, *bitter gourd* oder *carilla gourd* bezeichnet (Basch et al. 2003).

Die Bittergurke wird außerdem in der traditionellen Medizin in Asien, Afrika und Südamerika zur Behandlung verschiedener Erkrankungen wie Schuppenflechte, Unfruchtbarkeit, gastro-intestinale Krämpfe, Infektionen, Krebs sowie als Abortivum eingesetzt. Dazu werden vor allem Extrakte oder Pulver der Frucht und selten Tees aus den Stielen und Blättern der Pflanze verwendet (Basch et al. 2003). Einen besonderen Einsatz in der traditionellen Medizin findet die Bittergurke jedoch als blutzuckersenkendes Mittel bei der Behandlung und Prävention von Diabetes mellitus (Cummings et al. 2004, Singh et al. 2004).

Dabei werden verschiedene Mechanismen der blutzuckersenkenden Wirkung diskutiert. Extrakte der Bittergurke vermindern zum einen die intestinale Glucoseaufnahme (Singh et al. 2004, Mahomoodally et al. 2004). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Extrakte der Bittergurke sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Aktivität intestinaler Disaccharidasen hemmen, wodurch wiederum die intestinale Aufnahme von Monosacchariden herabgesetzt wird (Kumar Shetty et al. 2005, Oishi et al. 2007). Als weiterer Mechanismus der blutzuckersenkenden Wirkung der Bittergurke wird eine erhöhte Insulinsekretion beschrieben. Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass Extrakte der Bittergurke sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Insulinsekretion des Pankreas steigern und die Anzahl Insulin positiver Zellen erhöhen (Singh et al. 2004, Ahmed et al. 1998). Darüber hinaus scheinen die Bittergurke und ihre Extrakte die Insulinsensitivität an Muskel- und Fettzellen effektiv zu erhöhen (Yibchok-Anun et al. 2006, Roffey et al. 2007). Aufgrund der vielen unterschiedlichen Versuchsmodelle und getesteten Extrakte ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt, welche Substanzen oder Substanzgruppen hauptsächlich für die insulinsensitivierende Wirkung der Bittergurke verantwortlich sind und welcher biochemische Mechanismus dieser Wirkung zugrunde liegt.

Diese Arbeit zur „Untersuchung der antidiabetischen Wirkung von *Momordica charantia* – Extrakten“ hat deshalb das Ziel, die Wirkung unterschiedlicher Substanzgruppen der Bittergurke am Typ II diabetischen Modelltier zu testen und bezüglich Wirksamkeit und Wirkmechanismus miteinander zu vergleichen. Die Identifizierung der Substanzgruppe mit den stärksten blutzuckersenkenden Eigenschaften macht die Entwicklung eines Supplements zur Prävention und

Behandlung von Diabetes mellitus möglich. Besonders in Entwicklungsländern, wo Ernährung und diätetische Maßnahmen eine entscheidende Rolle bei der Behandlung von Diabetes mellitus darstellen, kann die Bittergurke als Supplement oder traditionelles Gemüse einen entscheidenden Beitrag bei der Prävention und Behandlung von Diabetes mellitus leisten.

Zur Aufklärung des biochemischen Mechanismus der insulinsensitivierenden Wirkung der Bittergurke wurden die Regulation der PTP 1B sowie eine mögliche Aktivierung von PPARα und γ durch die Behandlung mit der Bittergurke untersucht.

Abbildung 6: Reife Frucht von *Momordica charantia*

2 Material und Methoden

2.1 Materialbezug

Bittergurken (*Momordica charantia*)

Für den Ernährungsversuch mit db/db Mäusen wurden unreife Früchte einer Thailändischen Sorte der Bittergurke, welche von Chao and Huang (2003) als *green bitter gourd* bezeichnet wurde, verwendet. Die frischen Früchte stammten aus der Aufzucht der Firma Wong´s Asia-Latino in Frankfurt am Main, Deutschland.

Zur Quantifizierung bioaktiver Inhaltsstoffe in verschiedenen Sorten bzw. Proben der Bittergurke wurden fünf weitere Sorten der Firma Wong´s Asia-Latino in Frankfurt am Main bezogen. Zusammen mit der Sorte, die für den Tierversuch eingesetzt wurde, ergab das eine Anzahl von sechs Proben, die als ganze Frucht mit Samen untersucht wurden. Probe 5 entsprach dabei etwa der Sorte, die von Chao und Huang (2003) als *pearl bitter gourd* bezeichnet worden war. Die anderen fünf Proben entsprachen mit Unterschieden bezüglich Größe, Farbe und Form der Sorte, die von Chao und Huang (2003) als *green bitter gourd* beschrieben worden war.
Pulver vom Fruchtfleisch weiterer fünf grüner (Proben 7-11) bzw. drei weißer (Proben 12-14) Sorten der Bittergurke wurden vom *World Vegetable Center* (Taiwan) zur Verfügung gestellt. Proben 7-14 können folgendermaßen beschrieben werden: TOT4234 aus Bangladesh (7), NS1020 von *Namdhari seed* in Indien (8), TOT2533 aus Indien (9), *best* 165 F1 von *East-West seed company* in Thailand (10), Karela von einem traditionellen Markt in Taiwan (11), Yueh-Hua von *Know-you seed* in Taiwan (12), showy von *Know-you seed* in Taiwan (13) und *showy* von einem traditionellen Markt in Taiwan (14).

db/db Mäuse

Die db/db Maus ist eine natürliche Mutante der Black 6 Maus. Die Tiere besitzen einen Rezeptordefekt für das Fettgewebshormon Leptin. Aufgrund dieses Leptin-Rezeptordefektes werden die Tiere fettsüchtig und Typ II diabetisch. Die db/db Maus stellt ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung des Typ II Diabetes einhergehend mit Hyperglykämie und Insulinresistenz dar. Die db/db Maus wurde deshalb als Tiermodell zur Untersuchung der antidiabetischen Wirkungen der Bittergurke

gewählt. Die für den Ernährungsversuch eingesetzten 45 wachsenden abgesetzten männlichen db/db Mäuse (BKS. Cg-+Leprdb/+Leprdb/01aHsd) stammten von Harlan Winkelmann GmbH, Borchen, Deutschland.

2.2 Herstellung der verschiedenen Fraktionen der Bittergurke

Die Extraktion der Lipid-, der Saponin- und der wasserlöslichen Fraktion für den Ernährungsversuch mit db/db Mäusen erfolgte durch die Kombination der Methoden, die von Oishi et al. (2007) und Chao und Huang (2003) beschrieben wurden **(Abbildung 7)**.

Die frischen Früchte der Bittergurke wurden geschnitten, gefriergetrocknet (Gamma 1-20 von CHRIST, Osterode, Deutschland) und gemahlen. 200 g des so gewonnenen homogenen Pulvers wurden mit 3 L Ethylacetat versetzt und im Dunkeln für 2 Stunden auf dem Magnetrührer gerührt und anschließend filtriert. Mit Hilfe des Rotationsverdampfers (Laborota digital 4002 von Heidolph, Schwabach, Deutschland) wurde das Ethylacetat im Filtrat bei einer moderaten Temperatur von 33℃ verdampft. Der Rückstand, die Lipidfraktion, wurde in Trinkwasser aufgenommen und portionsweise bei –20℃ eingefroren.

Der nicht Ethylacetat-lösliche Filterrückstand wurde wiederum mit 3 L Methanol versetzt, das Gemisch im Dunklen für 2 Stunden auf dem Magnetrührer gerührt und anschließend filtriert. Das Filtrat wurde im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt und der trockene Rückstand in 250 mL destilliertem Wasser und 250 mL n-Butanol gelöst und die Phasentrennung abgewartet. Die Wasserphase wurde anschließend bei 40℃ eingedampft und der Rückstand, die wasserlösliche Fraktion, mit Trinkwasser verdünnt und portionsweise bei –20°C eingefroren. Die n-Butanolphase wurde ebenfalls bei 40℃ bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand, die sog. Saponinfraktion, mit Trinkwasser verdünnt und bei –20℃ eingefroren.

Alle Extrakte wurden so mit Trinkwasser verdünnt, dass jeweils eine Konzentration von 45 mg Extrakt pro mL Trinkwasser erreicht wurde. Entsprechend wurde zusätzlich eine Menge von 2,74 g gefriergetrockneter, gemahlener Bittergurke in 60,93 mL Trinkwasser gelöst. Bei der Lipidfraktion wurde vor der Portionierung und der Verwendung auf Homogenität des Gemisches geachtet.

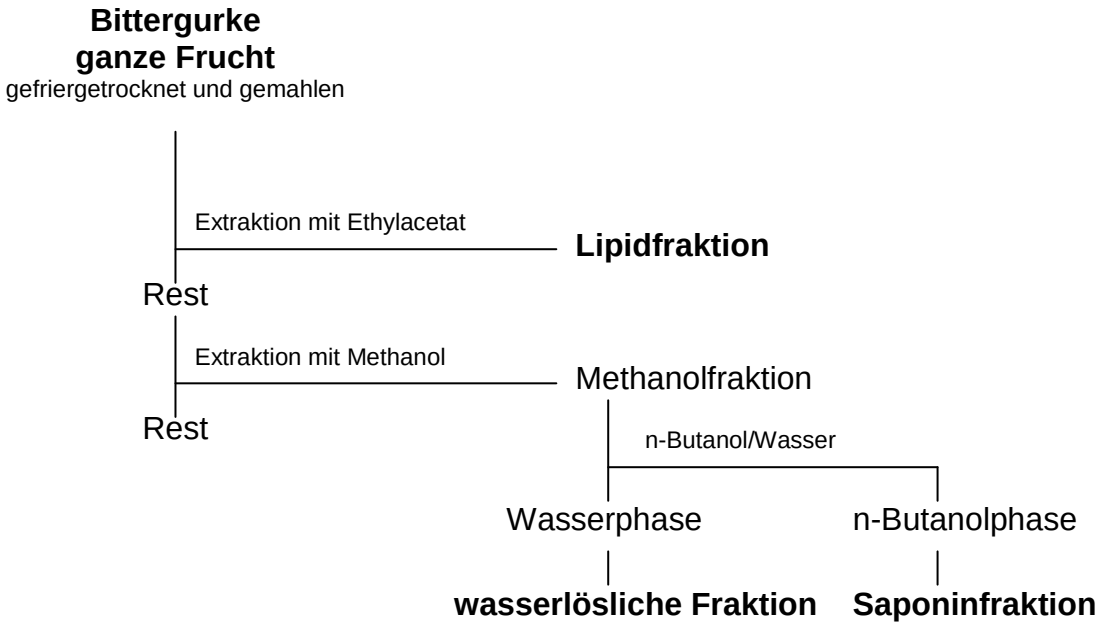


Abbildung 7: Herstellung der verschiedenen Fraktionen der Bittergurke (ganze Frucht, Lipidfraktion, Saponinfraktion und wasserlösliche Fraktion)

2.3 Ernährungsversuch mit db/db Mäusen

Für den Ernährungsversuch wurden die 45 wachsenden abgesetzten männlichen db/db Mäuse fünf Gruppen mit jeweils neun Tieren zugeordnet. Die Tiere wurden für den Versuchszeitraum von fünf Wochen einzeln in Kunststoffkäfigen mit Einstreu bei 22℃ und bei einem 12h:12h Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Die Mäuse hatten freien Zugang zum Futter **(Anhangstabelle 1)** mit allen Nährstoffen im Bereich der Empfehlungen nach NRC (1995) und zum Trinkwasser. Vor Versuchsbeginn wurden Trockenmasse (TM), Rohasche, Rohprotein und Rohfett des Futters bestimmt. Gehalte an Rohprotein und Rohfett entsprachen den Empfehlungen nach NRC (1995) **(Tabelle 3)**.

Den Mäusen wurde außerdem über den Versuchszeitraum von fünf Wochen eine tägliche Menge von 150 mg/kg KG der gesamten Frucht bzw. der Lipid-, der Saponin- oder der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke, in Trinkwasser gelöst, mit Schlundsonde verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt eine entsprechende Menge Trinkwasser mit Schlundsonde. Die Wahl der zu verabreichenden oralen Dosis von 150 mg Bittergurkenfraktion pro kg KG erfolgte nach Sathishsekar und Subramanian (2005).

Tabelle 3: Trockenmasse (TM), Rohasche, Rohprotein und Rohfett der Diät für Mäuse im Vergleich zu den Empfehlungen nach NRC (1995)

		analysiert	Empfehlung nach NRC (1995)
TM	[%]	84,93	-----
Rohasche	[%TM]	4,5	-----
Rohzucker	[%TM]	3,02	-----
Rohprotein	[g/kg TM]	199,0	200,0
Rohfett	[g/kg TM]	47,2	50,0

Zu Versuchsbeginn waren die mittleren Lebendmassen der Gruppen mit 29,2 ± 0,2 g annähernd gleich. Die Gewichtsentwicklung der Tiere sowie die Futteraufnahme wurden bis zum Versuchsende wöchentlich protokolliert.

Vor sowie zwei Wochen nach Versuchsbeginn wurden mittels Blutzuckermessgerät und entsprechender Sensoren (Ascensia® ELITE SENSOR von Bayer Health Care, Leverkusen, Deutschland) die Blutglucosespiegel nach jeweils sechsstündiger Nüchterung gemessen. Ein Tropfen Blut wurde dazu durch Punktion der Schwanzvene gewonnen.

Nach Ablauf des Versuchszeitraums wurden die Tiere mit CO_2 betäubt und anschließend dekapitiert. Mittels Keto-Diabur-Test 5000 Streifen (Roche, Schweiz) wurde der Urin auf Glucose und Ketonkörper untersucht und das Ergebnis protokolliert. Leber, Nieren, Skelettmuskel und Fettgewebe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur weiteren Analyse bei –80℃ gelagert.

Zur Blutentnahme wurden Ethylendiamintetraacetat- (EDTA-) Monovetten (KABAVETTE® von KABE Labortechnik GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland) verwendet. Im Blut wurde als Langzeitparameter für Blutglucosespiegel der HbA_{1C}-Wert bestimmt. Dazu wurden ein Test Kit (HA1C Kit) sowie ein Analyzer (Dimension® Xpand™) von Siemens Healthcare Diagnostics (Eschborn, Deutschland) verwendet.

Der Versuch wurde beim Regierungspräsidium Gießen unter dem Zeichen V 54 – 19 c 2/15 c GI 19/1 angezeigt. Gegen die Durchführung des Versuchs bestanden keine Bedenken seitens des Regierungspräsidiums.

2.4 Messung der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B-Aktivität

Probenvorbereitung

Leber, Muskel und Fettgewebe wurden jeweils zunächst 1:5 (w/w) in Puffer A (50 mmol/L 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, 50 mmol/L NaCl, 0,5 mmol/L EDTA, 0,1 mmol/L Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF); pH=7,2) eingewogen und das Gemisch jeweils mit einem Dispergiergerät (Miccra D-8 von Art-moderne Labortechnik, Müllheim-Hügelheim, Deutschland) homogenisiert und das Rohhomogenat in der Kühlzentrifuge (Labofuge 400R von Heraeus Instruments, Hanau, Germany) für 30 Minuten bei 13.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) und einer Temperatur von 2℃ zentrifugiert. Der zytosol ische Überstand wurde mit Puffer A zur enzymatischen Bestimmung je nach Proteingehalt und erwarteter PTP-Aktivität weiterverdünnt.

Um die Ergebnisse der enzymatischen Bestimmungen auf ein Gramm Protein zu beziehen, wurde der Proteingehalt der vorbereiteten Proben nach der Bradford-Methode bestimmt.

Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Der Farbstoff *Coomassie brilliant blue* G-250 beinhaltet die beiden unterschiedlichen Färbungen rot und blau. Der Farbstoff bindet an Proteinmoleküle, wodurch eine Umwandlung des roten Farbstoffs in den blauen erfolgt. Es kommt zu einer Änderung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 50 µL der verdünnten Probe mit 2,5 mL Bradfordreagenz (0,100 g *Coomassie brilliant blue*, 47,6 mL Ethanol, 100 mL 85%ige ortho-Phosphorsäure) versetzt. Nach 10 bis 20 Minuten wurde die Extinktion gegen den Blindwert (destilliertes Wasser + Bradfordreagenz) photometrisch (Cary 50 Bio von Varian, Darmstadt, Deutschland) bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration (mg/ml) wurde mittels linearer Regression über eine Eichkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen bestimmt. Die Eichreihe beinhaltete Verdünnungen aus reinem Rinderalbumin (Albumin Fraktion V von Roth, Karlsruhe, Deutschland). Die Stammlösung aus Rinderalbumin wurde so verdünnt, dass sich Eichpunkte in den Konzentrationen von 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 und 50 µg Protein/100 µL ergaben.

Messung der Enzymaktivität

Die Bestimmung der PTP 1B-Aktivität erfolgte nach einer Modifikation der von Zhu und Goldstein (2002) beschriebenen Methode.

10 µL der vorbereiteten Probe wurden mit 240 µL des Puffers A versetzt und für fünf Minuten inkubiert. Als Blindwert wurden 250 µL Puffer A verwendet.

Anschließend wurden 250 µL Puffer A mit einer Konzentration von 10 mmol/L des Substrates para-Nitrophenylphosphat (pNPP) zugegeben. Durch die PTP-Reaktion wird pNPP zu para-Nitrophenol dephosphoryliert. Diese Reaktion wurde je nach Gewebe nach 5, 20 bzw. 30 Minuten mit 500 µL einer 2,0 M NaOH-Lösung abgestoppt, da das pH Optimum der PTP im sauren pH Bereich liegt.

Im alkalischen Milieu reagiert das freigesetzte para-Nitrophenol zum para-Nitrophenolat-Anion, welches intensiv gelb gefärbt ist. Die Extinktion der Farbreaktion kann photometrisch (Cary 50 Bio von Varian, Darmstadt, Deutschland) bei 405 nm gemessen werden.

Analog wurde die Messung zusätzlich mit einem Zusatz von 2 mmol/L Dithiothreitol (DTT) zum Puffer A durchgeführt. Da die Hemmung der PTP 1B üblicherweise eine reversible Oxidation ist, kann diese durch das Reduktionsmittel DTT teilweise aufgehoben werden (Denu und Tanner 1998).

Als Annäherung an die maximale PTP 1B-Aktivität (Groen et al. 2005) und um semi-quantitativ Aussagen über die Expression der PTP 1B zu treffen, wurde die Messung darüber hinaus statt mit Puffer A mit einem sauren Puffer (50 mmol/L 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, 50 mmol/L NaCl, 0,5 mmol/L EDTA, 0,1 mmol/L PMSF; pH=6,0) durchgeführt.

Berechnet wurde die Enzymaktivität U (µmol Substratumsatz pro Minute) wie folgt:

$$\text{U/L Gewebe} = \frac{\text{Extinktion}_{405nm} \times V_G \times VF}{\varepsilon \times v \times d \times Z_F}$$

V_G = Gesamtvolumen in der Küvette (1 mL)
VF = Verdünnung des Gewebshomogenats **(Leber = 50; Muskel = 20; Fettgewebe = 5)**
ε = Phenylphosphat bei 405 nm = 0,0178 L/µmol x cm (Pot et al. 1991)
d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)
Z_F = Zeitfaktor **(Leber = 5 Minuten; Muskel = 20 Minuten; Fettgewebe = 30 Minuten)**
v = Volumen der Probe im Test (0,01 mL)

2.5 Western Blot

Der Skelettmuskel der Mäuse, die mit der Lipidfraktion der Bittergurke behandelt worden waren, sowie der Kontrollmäuse wurde jeweils 1:5 (w/w) mit einem Lysepuffer (50 mmol/L Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) -HCl, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L EDTA, 10 g/L Sodiumdeoxycholat, 1 g/L Natriumlaurylsulfat (SDS), 10 ml/L TritonX-100; pH=7,4) versetzt und mit einem Dispergiergerät (Miccra D-8 von Art-moderne Labortechnik, Müllheim-Hügelheim, Deutschland) homogenisiert. Anschließend wurde der Proteingehalt des Homogenats nach der Bradford-Methode **(2.4)** bestimmt.

Eine Menge von 40 µg Protein wurden mit dem selben Volumen Ladepuffer (50 mmol/L TRIS, 20% (w/v) Glycerin, 2% (w/v) SDS, 10 mmol/L PMSF (in 1 mL Isopropanol gelöst), 0,04% (w/v) Bromphenolblau; pH=7,4) versetzt, 10 Minuten bei 80℃ denaturiert und anschließend in einem zweiphasigen Polyacrylamidgel mit einer 6%igen (v/v) Sammelgelphase und einer 15%igen (v/v) Trenngelphase **(Tabelle 4)** zunächst für 15 Minuten bei 30 mA und danach für mindestens eine Stunde bei 70 mA in 1x Laufpuffer (25 mmol/L TRIS, 200 mmol/L Glycin, 100 mmol/L SDS; pH=8,3) aufgetrennt. Zusätzlich wurde ein Größenstandard (PageRuler^{TM} Plus Prestained Protein Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) im Gel aufgetrennt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des zweiphasigen Polyacrylamidgels

		Trenngel 15% (v/v)	Sammelgel 6% (v/v)
Wasser	**[mL]**	1,37	1,37
Trenngelpuffer[§]	**[mL]**	1,50	
Sammelgelpuffer[#]	**[mL]**		0,626
PAA[†] **(40%)**	**[mL]**	1,13	0,38
APS[‡] **(10%)**	**[mL]**	0,05	0,02
Temed	**[mL]**	0,01	0,01

[§] 1,5 mol/L TRIS, 0,85% (w/v) SDS; pH=8,8
[#] 0,5 mol/L TRIS, 0,85% (w/v) SDS; pH=6,8
[†] Polyacrylamid (PAA)
[‡] Ammoniumpersulfat (APS)

Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mittels *semi-dry blotting* Technik (25 Minuten, konstant 6 V, ca. 60 mA) auf eine Polyvinyldifluorid-Membran (BioTrace 0.45µl^{TM} von PALL, Dreieich, Deutschland) übertragen. Die Membran wurde anschließend über Nacht im Kühlschrank in TBST-Puffer (*Tris-buffered Saline* (TBS) mit 0,05% (v/v) Tween) mit 5% (w/v) Molkepulver geblockt. Die Membran wurde mit TBS-Puffer gewaschen und dann mit dem PTP 1B-Antikörper (Katalog Nummer 610139) von BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland), 1:2500 in TBS-Puffer verdünnt, für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen in TBST wurde der zweite, an eine alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)), ebenfalls 1:2500 in TBS-Puffer verdünnt, hinzugegeben und für eine weitere Stunde inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit TBST-Puffer und einmal mit TBS-Puffer gewaschen.

Zur Visualisierung der Proteine auf der Membran wurde die Membran mit 10 mL eines magnesiumhaltigen Reaktionspuffers mit 40 µL Nitro-Blue Tetrazoliumchlorid (NBT) –Lösung (7,5% NBT in 70% Dimethylformamid) und 35 µL 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxylphosphat (BCIP) –Lösung (5% BCIP in 70%igem Dimethylformamid) inkubiert.

Die alkalische Phosphatase des Sekundär-Antikörpers reagiert durch Katalyse der Magnesiumionen mit BCIP und hydrolysiert Indoxylphosphat zu Indoxyl und Phosphat. Das Indoxyl wird anschließend von NBT über Indigoweiß zum tiefblauen Farbstoff Indigo oxidiert. Durch die Reduktion von NBT entsteht zusätzlich ein blauer Di-Formazan-Farbstoff (Knecht und Dimond 1984).

Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Farbreaktion nach einigen Minuten mit Stopppuffer (20 mmol/L TRIS, 5 mmol/L EDTA; pH=8) gestoppt.

Die Bandenstärke der ~50 kDA PTP 1B-Banden wurde anschließend als optische Dichte (od) pro mm^2 mit der Software GenTools von Syngene (Cambridge, UK) bestimmt.

2.6 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Die Untersuchung der Genexpression mittels zweistufiger Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) umfasst die reverse Transkription der mRNA in *complementary* DNA (cDNA) (Schritt 1) und die anschließende genspezifische Amplifikation von Teilsequenzen der zu untersuchenden Gene (Schritt 2). Zunächst muss dazu die RNA aus den entsprechenden Geweben isoliert werden.

RNA-Isolierung

Die RNA-Präparation erfolgte mit einer miniaturisierten Variante der sauren Phenolchloroform-Guanidinthiocyanat-Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Dazu wurden 100 bis 150 mg des jeweiligen tiefgefrorenen Gewebes in ein 2 mL Cup eingewogen und mit 600 µL eines Guanidinthiocyanat-Puffers **(Tabelle 5)** versetzt und mit einem Ultrathurax (Miccra D-8 von Art-moderne Labortechnik, Müllheim-Hügelheim, Deutschland) homogenisiert.

Die Methode wurde zur Isolierung der RNA aus dem Fettgewebe leicht modifiziert. Ca. 400 mg Fettgewebe wurden eingewogen und mit 600 µL Guanidinthiocyanat-Puffer für 30 Minuten bei 37℃ im Heizblock (*digital heat block* von VWR, Darmstadt, Deutschland) unter mehrmaligem Vortexen lysiert. Anschließend wurde bei 2500facher relativer Zentrifugalbeschleunigung für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert (Micro 20 von Hettich, Tuttlingen, Deutschland) und die untere fettfreie Phase zur Isolierung der RNA weiter verwendet.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Guanidinthiocyanat-Puffers zur RNA-Isolierung

Substanz	Endkonzentration	Menge für 100 mL Puffer
Guanidinthiocyanat	4 mol/L	47,25 g
Tri-Natriumcitrat-2-hydrat	25 mmol/L	2,5 mL (1 M Stammlösung)
N-Lauroyl-Sarcosin	0,5% (w/v)	0,5 g
β-Mercaptoethanol	0,1 mol/L	720 µL (gesättigte Stammlösung)
DEPC[§]-behandeltes Wasser		100 mL

[§] Diethyldicarbonat (DEPC)

Anschließend wurden 60 µL 2 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,0), 600 µL gesättigte Phenol-Lösung und 225 µL Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (49:1) dazu gegeben und das Gemisch gründlich homogenisiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Gemisch für 40 Minuten in einer gekühlten Eppendorf-Cupzentrifuge (Labofuge 400R von Heraeus Instruments) bei 2℃ und 8.500 rpm zentrifugiert.

Die obere wässrige Guanidinthiocyanat-Phase enthält die gelöste RNA und wurde in ein neues 2 mL Cup überführt und zur RNA-Ausfällung mit 600 µL eiskaltem Isopropanol versetzt und über Nacht bei –20℃ einge froren. Die gefällte RNA wurde dann für 30 Minuten bei 2℃ und 13.000 rpm zu einem Pellet abzentrifugiert. Die überständige Isopropanol-Pufferphase wurde entfernt und das Pellet zweimal mit je 1 mL eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet für 30 Minuten in einer Vakuumzentrifuge (Radiant Cover RC110B; Savant) getrocknet und je nach Größe in 15 bis 30 µL mit Diethyldicarbonat (DEPC) behandeltem Wasser (0,1% (v/v) DEPC in bidestilliertem Wasser, autoklaviert) gelöst und bis zur weiteren Behandlung, mindestens aber für 30 Minuten, bei –80℃ eingefroren.

Die Überprüfung der Konzentration und Reinheit der gelösten RNA erfolgte photometrisch (Genesys 10 UV, Thermo, Dreieich, Deutschland), indem 2,5 µL der RNA-Lösung mit 1000 µL DEPC-Wasser verdünnt und die Extinktion jeweils bei 260 und bei 280 nm gegen den Blindwert (DEPC-Wasser) gemessen wurde. Die Reinheit der RNA wurde durch den Quotienten der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ermittelt, dieser sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen.

Die RNA-Konzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\mu g\ RNA/\mu L = \frac{Extinktion_{260nm} \times V \times \varepsilon}{1000}$$

V = Verdünnungsfaktor = 401
ε = Extinktionskoeffizient für RNA [µL/ng] = 40

Die Lösungen wurden anschließend auf eine einheitliche Konzentration eingestellt (Leber: 1,5 µg RNA/µL; Muskel: 1 µg RNA/µL; Fettgewebe: 1 µg RNA/µL). Zur weiteren Beurteilung der Qualität wurde die RNA anschließend gelelektrophoretisch in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt.

Hierzu wurden 1-5 µg RNA im Thermocycler (MyCycler™ von Bio-rad, München, Deutschland) für 10 Minuten bei 70°C mit 3,5 µL Formaldehyd, 10,0 µL Formamid und 2,0 µL TRIS-Acetat-EDTA (TAE) -Puffer (2 mol/L TRIS, 1 mol/L Natriumacetat, 50 mmol/L EDTA; pH=7,4) denaturiert und anschließend auf Eis abgeschreckt. Die RNA wurde mit 2 µL Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/mL) angefärbt, mit 4 µL Ladepuffer (50% (v/v) Glycerin, 50% (v/v) 50x TAE-Puffer, 0,25% (w/w) Bromphenolblau) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die RNA wurde dann für 60 Minuten bei 120 V aufgetrennt und in einem UV-Imager (GENE FLASH; Syngene, Cambridge, UK) visualisiert und fotografiert.

Reverse Transkription (Schritt 1)

Die RNA beinhaltet drei Fraktionen: 1. Ribosomale RNA, 2. Transfer RNA und 3. mRNA. Das Enzym Reverse Transkriptase nutzt die mRNA als Matrize und synthetisiert anhand dieser aus Desoxinukleotiden komplementäre DNA-Stränge. Bei der Methode der RT-PCR wird die Fähigkeit der Reverse Transkriptase, komplementär zur mRNA cDNA zu synthetisieren, ausgenutzt. Die cDNA dient anschließend dem quantitativen Nachweis spezifischer Gene mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese.

Für die Synthese der cDNA wurde ein Reaktionskit (Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, K 1621 von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet und gemäß der Herstellerangaben vorgegangen. Die so erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Analyse bei –20°C tiefgefroren.

Genspezifische Polymerase-Kettenreaktion (Schritt 2)

Als Standardbedingung wurden pro PCR-Reaktion folgende Mengen und Konzentrationen in einem Reaktionsansatz eingesetzt:

2,50 µL 10xPuffer (100 mmol/L TRIS-HCl, 500 mmol/L KCl, 0,8% (v/v) Nonident P40; pH=8,8) von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

2,00 µL $MgCl_2$ (25 mmol/L) von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

0,14 µL Taq-Polymerase (5 U/µL) von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

1,90 µL Desoxyribonukleosidtriphosphat-Mix (2 mM) von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

16,1 µL DEPC-Wasser

1,25 µL *forward* Primer von eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland)

1,25 µL *reverse* Primer von eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland)

+ cDNA: 1 µL (Leber bzw. Fettgewebe) oder 2 µL (Muskel)

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler (MyCycler™ von Bio-rad, München, Deutschland) nach folgendem Standard-PCR-Programm:

	Einleitende Denaturierung:	95℃	120 sec
1.	Denaturierung:	95℃	30 sec
2.	Primer Annealing:	variabel	35 sec
3.	Extension:	72℃	45 sec
	Letzte Extension:	72℃	120 sec

Schritt 1-3 wurde hierbei mit einer Zyklen-Anzahl von 30-37 wiederholt **(Tabelle 6)**.

Die Berechnung der Annealing-Temperatur erfolgte anhand der Schmelztemperaturen (Tm) der Primer mit folgender Formel:

[(Tm Primer 1 +Tm Primer 2)/2]-3

Es fand jeweils eine Amplifizierung des entsprechenden zu untersuchenden Gens und β Aktin mit genspezifischen Primern statt **(Tabelle 6)**. Die Primersequenzen

wurden mit Hilfe der Software *Primer 3* von Rozen und Skaletsky (1998) erstellt und zur Synthese bei eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) in Auftrag gegeben. Die dazu verwendeten mRNA-Sequenzen für Mäuse (*Mus musculus*) stammten aus der online Nukleotid-Datenbank vom *National Center for Biotechnology Information*.

Tabelle 6: Übersicht verwendeter vorwärts (fw) und rückwärts (rew) Primersequenzen mit jeweiliger Schmelztemperatur (Tm) und Annealingtemperatur (T_A)

Gen	Primersequenz	Tm [℃]	T_A [℃]	Amplifikat-länge	Gewebe	Zyklus-zahl
β Aktin	fw: TGT TAC CAA CTG GGA CGA CA rew: TCT CAG CTG TGG TGG TGA AG	57,3 59,4	55,3	392 bp	Leber Muskel Fettgewebe	30 37 36
Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B	fw: GAT GGA GAA GGA GTT CGA GGA G rew: CCA TCA GTA AGA GGC AGG TGT	62,1 59,8	57,5	701 bp	Muskel	37
Acyl CoA Dehydrogenase	fw: TCT TCG ACT GTT TGT GGC TCT rew: CTC AAT GCA CCA GCT ATC ACA	57,9 57,9	54,9	427 bp	Leber	30
Adiponektin	fw: CCA ATG TAC CCA TTC GCT TTA rew: TCG ACT GTT CCA TGA TTC TCC	55,9 57,9	53,9	407 bp	Fettgewebe	35
Resistin	fw: GAC TTC AAC TCC CTG TTT CCA rew: ATG TGT GCT TGT GTG TGG ATT	57,9 55,9	53,9	356 bp	Fettgewebe	30

Visualisierung der amplifizierten Sequenzen im Agarosegel

Zur Visualisierung der Sequenzen wurde ein 1,5%iges (w/v) 1xTAE-Agarosegel mit 12 µL Ethidiumbromidlösung (1 mg/mL) verwendet, worin die amplifizierte DNA und ein Größenmarker (GeneRuler^{TM} 100 bp Plus DNA Ladder bzw. GeneRuler^{TM} 50 bp DNA Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) nach Molekulargewicht aufgetrennt wurden. Je 6 µL der Amplifikate wurden dazu mit 2 µL Auftragspuffer (6x loading dye von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) versetzt.

Die Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte für 30 Minuten bei 80 V. Die DNA-Fragmente wurden anschließend unter einem UV-Imager (GENE FLASH; Syngene, Cambridge, UK) visualisiert, fotografiert und die od der Amplifikatbanden vermessen (GenTools von Syngene Cambridge, UK). Die od wurde jeweils in Relation zur Bande des β Aktin-Gens angegeben.

2.7 Expressionsanalyse mittels Microarray

Für die Expressionsanalyse mittels Microarray wurde isolierte RNA **(2.6)** aus dem Fettgewebe der Mäuse jeweils so gepoolt, dass je 0,5 µg RNA von zwei Mäusen aus derselben Gruppe einen Pool bildeten. Aus jeder Gruppe wurde jeweils Tier 3 bei dieser Methode nicht verwendet, so dass je vier Pools mit 1 µg RNA von insgesamt fünf Gruppen untersucht wurden.

Die RNA wurde mittels *one-color labeling kit* (Quick Amp Labeling kit von Agilent, Böblingen, Deutschland) nach entsprechendem Protokoll amplifiziert und mit Cyanin 3 markiert. Die gelabelte Antisense-RNA wurde entsprechend der Herstellerangaben über Nacht auf 4x44K Mikroarrays mit 60mer Oligonukleotid-Sonden (Mouse Whole Genome 4x44K; Agilent, Böblingen, Deutschland) hybridisiert. Anschließend wurden die Arrays gewaschen und getrocknet.

Die getrockneten Arrays wurden zur Auswertung gescannt (GenePix 4100A Scanner; Axon Instruments, Downingtown (PA), USA). Die Auswertung erfolgte mit GenePix Pro 5.0 von Axon Instruments (Downingtown (PA), USA). Die analysierten Werte für alle Spots wurden als GenePix results-Dateien gespeichert und anschließend mittels R (R Development Core Team 2008) und limma (Smyth 2005) von BioConductor (Gentleman et al. 2004) ausgewertet. Die Spots wurden für weitere Analysen nach Intensität, Homogenität und Sättigung gewichtet. Vor der Mittelwertbildung wurden die Daten mittels LOESS (*locally weighted scatter plot smooth*) normalisiert (Smyth und Speed 2003). Zur Bestimmung der differentiellen Expression der Gene wurde eine moderate t-Statistik durchgeführt (Smyth 2004). Listen mit Kandidatengenen wurden unter Berücksichtigung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% gebildet. Pathway-Analysen wurden mittels geneSetTest-Funktion von limma (Smyth 2005) für Pathways mit mindestens drei auf dem Array gespotteten Genen durchgeführt. P-Werte wurden nach der Methode von Benjamini-Hochberg für multiple Testverfahren korrigiert.

2.8 Messung von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen

Die Konzentration von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBA-RS) in Geweben und Organen ist ein Marker für oxidativen Stress und bei Diabetes häufig erhöht. Produkte der Lipidperoxidation und –degradation wie Malondialdehyd reagieren mit 2-Thiobarbitursäure zu einem roten Trimethin-Farbstoff und können

anschließend photometrisch quantifiziert werden. Das Prinzip der Messung beruht auf den Methoden von Khoschsorur et al. (2000) bzw. Wong et al. (1987).
Alle Gewebeproben aus Muskel, Leber und Fett wurden im Verhältnis 1:5 (w/v) mit Puffer A **(2.4)** versetzt und dispergiert. 50 µL der vorbereiteten Proben wurden dann mit 750 µL einer 0,44 M H_3PO_4-Lösung, 450 µL bidestilliertem Wasser und 250 µL einer 0,6%igen (w/v) Thiobarbitursäure-Lösung bei 100℃ für 60 Minuten in einem Heizblock (*digital heat block* von VWR, Darmstadt, Deutschland) erhitzt und sofort auf Eis kühl gestellt. Anschließend wurden 1,5 mL methanolische NaOH-Lösung (9 mL 1 M NaOH-Lösung, ad 100 mL Methanol) zugegeben, geschüttelt und für 10 Minuten bei 4000 rpm und 4℃ zentrifugiert (Labofuge 400R von Heraeus Instruments, Hanau, Germany). Der Überstand wurde zur photometrischen Messung bei 532 nm (Cary 50 Bio von Varian, Darmstadt, Deutschland) verwendet und die Konzentration von TBA-RS mittels Eichkurve ermittelt. Die Eichkurve deckt einen Konzentrationsbereich von 0,602 bis 12,037 µM Tetraethoxypropane ab.

2.9 Quantifizierung antidiabetischer Pflanzeninhaltsstoffe

Die Quantifizierung der Saponin-, der Lipidfraktion sowie der wasserlöslichen Fraktion in verschiedenen Sorten und Proben der Bittergurke **(2.1)** erfolgte nach der in Kapitel **2.2** beschriebenen Extraktionsmethode. Zusätzlich wurde jeweils in der Lipidfraktion die Konzentration von konjugierter Linolsäure (CLA) bzw. 9c-, 11t-, 13t konjugierter Linolensäure (CLN) bestimmt und in der Saponinfraktion die Konzentration hämolytischer Saponine.

Fettsäuren

Für die Fettsäureanalytik mittels Gaschromatographie (GC) mit Massenspektrometrie-Kopplung wurden Methylester von cis/trans-Isomeren der CLA von Sigma (Steinheim, Deutschland) als Standard eingesetzt sowie ein unmethylierter 9c-, 11t-, 13t CLN-Standard von Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH (Eching, Deutschland). Die FS der verschiedenen Sorten der Bittergurke sowie der unmethylierte CLN-Standard wurden nach der Methode von Suzuki et al. (2001) methyliert. Anschließend wurden jeweils 2,0 µL Proben- bzw. Standardlösung in eine Agilent 6890N GC (Agilent, Böblingen, Deutschland) injiziert. Es wurde 1 mL Helium pro Minute als Trägergas verwendet, was einer Laufgeschwindigkeit von 26 cm/s

entspricht. Verwendet wurde eine *Free-Fatty-Acid-Phase* Kapillarsäule (DB-FFAP von Agilent, Böblingen, Deutschland) mit einer Länge von 60 m und einem Temperaturgradienten von 80–245°C. Im Anschluss erfolgten eine Ionenstoß-Ionisation und eine Detektion am Quadrupoldetektor. Als Spektrenbibliothek wurde die *National Institute of Standards and Technology*-Datenbank verwendet.

Saponine

Die Bestimmung der Saponine in unterschiedlichen Sorten der Bittergurke erfolgte nach der Methode von Mackie et al. (1977) unter Ausnutzung der hämolytischen Wirkung von Saponinen. Die Saponinfraktion wurde jeweils zu einer Konzentration zwischen 10 und 20 mg/mL in destilliertem Wasser gelöst. 100 µL der so gelösten Saponinfraktion wurden dann mit 1 mL Schafsblut (mit EDTA-Monovetten frisch entnommen und 1:10 mit 0,9% (w/v) NaCl-Lösung verdünnt) versetzt. Die Hämolyse erfolgte im Heizblock (*digital heat block* von VWR, Darmstadt, Deutschland) für 30 Minuten bei 30°C. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 3000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und die Hämoglobinmenge im Überstand mittels Photometer (Cary 50 Bio von Varian, Darmstadt, Deutschland) bei 545 nm gemessen.

Als Referenz diente eine Eichkurve mit Saponinlösungen (Saponin depur von Roth, Karlsruhe, Deutschland) in unterschiedlichen Konzentrationen (0; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 2,0; 2,25; 2,5; 2,75 und 3,0 mg/mL).

Da die Saponine unter Ausnutzung ihrer hämolytischen Eigenschaften quantifiziert wurden, wird die Sponinkonzentration im Folgenden als Konzentration hämolytischer Saponine angegeben und definiert.

2.10 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten aus dem Tierversuch wurde SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) Version 14.0 für Windows (SPSS Inc., Chicago, IL) verwendet.

Zur Klärung, ob die Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten signifikant sind, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Voraussetzung hierfür sind Unabhängigkeit, Normalverteilung sowie Varianzhomogenität. Die Unabhängigkeit war durch das

Versuchsmodell und die zufällige Einteilung der Tiere bereits gegeben. Zur Prüfung der Normalverteilung wurden der Kolmogorov-Smirnov-Test und der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Die Varianzhomogenität wurde mit dem Levene-Test ermittelt. Hierfür wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt.

Bei nicht vorhandener Varianzhomogenität wurde der Games-Howell-Test verwendet, bei vorhandener Varianzhomogenität zum Testen von Gruppen-unterschieden der Dunnet T-Test (2-seitig) und zum Testen von Unterschieden zwischen mehr als zwei Zeitpunkten der Tukey-HSD-Test. Bei fehlender Normalverteilung wurden nicht-parametrische Tests verwendet und dies kenntlich gemacht. Teilweise wurden Unterschiede zum vorherigen Zeitraum bzw. Gruppenunterschiede mittels T-Test für gepaarte bzw. für ungepaarte Stichproben ermittelt. In diesen Fällen wird diese Information im Ergebnisteil gegeben.

Zur Prüfung der Korrelation verschiedener Parameter wurde bei normalverteilten Daten nach Pearson bzw. bei nicht normalverteilten Daten nach Spearman getestet.

Ergebnisse wurden als Mittelwerte (MW) mit ihren dazugehörigen Standard-abweichungen (SD) angegeben.

Die statistische Auswertung der Daten zur Quantifizierung bioaktiver Inhaltsstoffe in verschiedenen Bittergurken-Proben erfolgte bei Normalverteilung und Varianzhomogenität mit einem zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben ebenfalls mit SPSS Version 14.0 für Windows und einem festgelegten Signifikanzniveau von 5%.

3 Ergebnisse

3.1 Körpergewicht und Futteraufnahme

Zu Versuchsbeginn waren die mittleren Lebendmassen der fünf Gruppen (jeweils n=9) mit 29,2 ± 0,2 g annähernd gleich. Bei allen Gruppen zeigte sich im Verlauf des fünfwöchigen Versuchs eine signifikante Gewichtszunahme (p<0,00001). Dabei waren die wöchentlichen Gewichtszunahmen bis zur vierten Versuchswoche ebenfalls signifikant (p<0,00001), jedoch nicht in der letzten Versuchswoche **(Anhangstabelle 3)**. Die Kontrollgruppe zeigte im Vergleich aller Gruppen bereits nach der ersten Versuchswoche die stärkste mittlere Gewichtszunahme **(Abbildung 8)**. Im zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben waren die Kontrolltiere nach fünf Wochen im Vergleich zu allen behandelten Gruppen signifikant (p<0,0001) schwerer. Die Mäuse, welche die gesamte Frucht (p=0,005), die Lipidfraktion (p=0,007), die Saponinfraktion (p=0,007) oder die wasserlösliche Fraktion (p=0,05) der Bittergurke bekommen hatten, waren zu Versuchsende signifikant leichter im Vergleich zur Kontrollgruppe **(Tabelle 7)**.

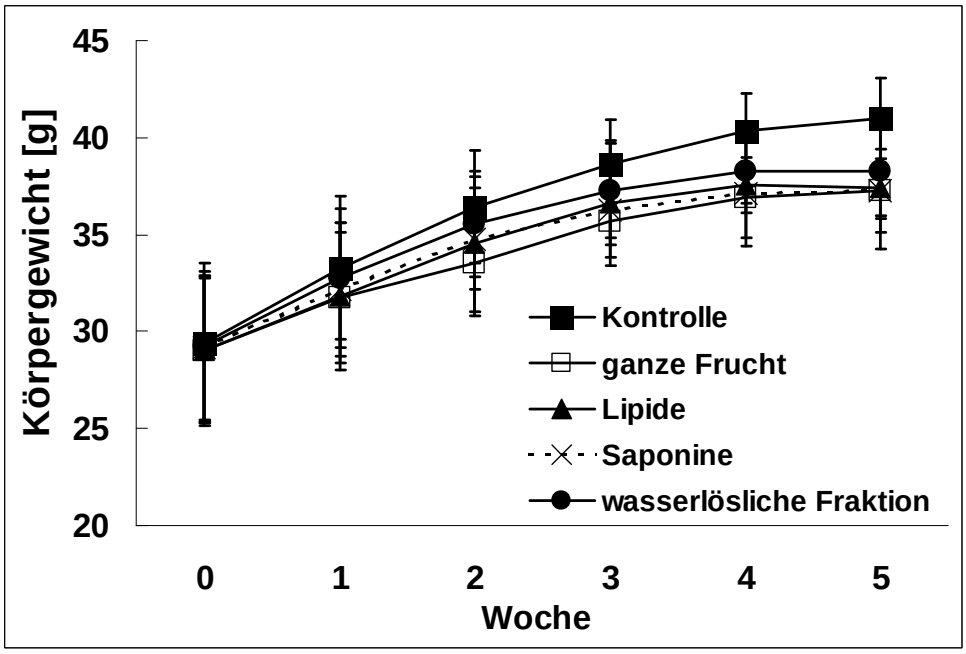


Abbildung 8: Mittlere Gewichtsentwicklung [MW±SD] wachsender männlicher db/db Mäuse in fünf Versuchswochen

Die Kontrolle der wöchentlichen Futteraufnahme **(Anhangstabelle 2)** und der Vergleich der gesamten Futteraufnahme in den fünf Versuchswochen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen **(Tabelle 7)**.

Tabelle 7: Mittlere tägliche Futteraufnahme und Körpergewicht von männlichen db/db Mäusen nach fünfwöchiger Versuchsdauer

	Kontrolle		ganze Frucht		Lipidfraktion		Saponinfraktion		wasserlösliche Fraktion	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Futteraufnahme [g/d]	17,0	2,3	18,0	2,7	16,9	1,8	16,7	4,1	17,5	3,7
Körpergewicht [g]	41,0	2,1	37,3***	2,1	37,4***	3,1	37,3***	1,4	38,3**	2,3

* $p \leq 0{,}1$, ** $p \leq 0{,}05$, *** $p \leq 0{,}01$

3.2 Blutglucosespiegel und Glycohämoglobin-Werte

Die Messungen der Blutglucosespiegel vor (T_0) und zwei Wochen nach Versuchsbeginn (T_2) zeigten im zweiseitigen T-Test für gepaarte Stichproben einen deutlichen Anstieg ($p<0{,}0001$) der Nüchtern-Blutglucosekonzentrationen bei allen Gruppen **(Anhangstabelle 4)**. Es gab jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor und zwei Wochen nach Versuchsbeginn **(Tabelle 8)** bezüglich der Nüchtern-Blutglucosespiegel **(Anhangstabelle 4)**.

Die Messung der HbA_{1C}-Werte nach der fünften Versuchswoche ergaben für alle behandelten Gruppen zusammen im zweiseitigen T-Test für unabhängige Stichproben signifikant ($p=0{,}02$) geringere HbA_{1C}-Werte im Vergleich zur Kontrolle. Die Tiere, welche die Lipidfraktion der Bittergurke bekommen hatten, zeigten die niedrigsten HbA_{1C}-Werte im Vergleich zur Kontrolle ($p=0{,}075$). Die Gruppenunterschiede der einzelnen Gruppen waren beim HbA_{1C}-Wert nicht signifikant **(Tabelle 8)**.

Die Bestimmung von Glucose und Ketonkörpern im Urin zu Versuchsende ergab für alle Mäuse einen negativen Nachweis für Ketonkörper, jedoch ebenfalls für alle Mäuse mit mindestens 278 mg/dL einen stark positiven Nachweis für Glucose im Urin, was der maximal messbaren Konzentration mit den verwendeten Teststäbchen entspricht.

Tabelle 8: Nüchtern-Blutglucose vor (T_0) und zwei Wochen nach (T_2) Versuchsbeginn sowie HbA_{1C}-Werte nach Versuchsende bei db/db Mäusen

	Kontrolle		ganze Frucht		Lipidfraktion		Saponinfraktion		Wasserlösliche Fraktion	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Blutglucose T_0	151,8	88,5	158,8	80,1	130,9	57,2	133,1	68,7	176,9	127,9
Blutglucose T_2	216,9	94,9	231,8	78,7	182,3	47,3	213,4	71,9	220,8	62,7
HbA_{1C} [%]	9,3	0,9	8,5	0,9	8,0*	0,9	8,4	1,4	8,3	1,4

* p=0,075

3.3 Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B

Wegen der unterschiedlichen Expression der PTP 1B und der unterschiedlichen Proteingehalte von Muskel, Leber und Fettgewebe war die Höhe der nativen PTP 1B-Aktivität [U/g Protein] in diesen Geweben unterschiedlich hoch. Am höchsten war sie im Fettgewebe, am niedrigsten im Muskel **(Tabelle 9)**.

Es fällt auf, dass die PTP 1B in der Leber unter neutralen Bedingungen bei allen Tieren im Mittel eine durch DTT reversible Hemmung von 22% aufwies, im Fettgewebe betrug die mittlere reversible Hemmung 13,69%, während die reversible Hemmung im Muskel mit 6,14% vergleichsweise gering war.

Die Messungen der PTP 1B-Aktivität in den Lebern und im Fettgewebe der Tiere ergaben weder mit noch ohne Zusatz von DTT einen Unterschied zwischen den Gruppen. Die Messung der PTP 1B-Aktivität im Muskelzytosol ergab jedoch signifikant (p=0,05) geringere Aktivitäten bei den Mäusen, die mit der Saponinfraktion der Bittergurke behandelt worden waren. Die Lipidfraktion führte ebenfalls zu einer tendenziell (p=0,07) geringeren PTP 1B-Aktivität als bei der Kontrollgruppe **(Tabelle 9)**. Insgesamt zeigte die Kontrollgruppe die höchste mittlere PTP 1B-Aktivität im Muskel im Vergleich aller Gruppen, dies war jedoch für die wasserlösliche Fraktion und die ganze Frucht nicht signifikant.

Tabelle 9: Aktivität [U/g Protein] der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B neutral (pH 7,2) mit oder ohne 2 mM Dithiothreitol (+DTT) in Muskel, Leber und Fettgewebe

	Kontrolle		ganze Frucht		Lipidfraktion		Saponin-fraktion		wasserlösliche Fraktion	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Muskel										
Neutral	2,22	0,48	1,94	0,58	1,71*	0,17	1,67**	0,49	1,94	0,46
Reduziert (2 mM DTT)	2,12	0,36	2,12	0,43	1,78	0,21	2,17	0,34	1,92	0,43
reversible Hemmung[§]	-0,11	0,32	0,18	0,63	0,07	0,24	0,50	0,49	-0,02	0,38
Leber										
Neutral	8,22	1,46	8,19	0,65	8,02	0,99	8,32	0,77	7,62	0,94
Reduziert (2 mM DTT)	10,24	1,89	10,16	1,76	9,99	0,85	10,78	0,97	10,61	1,02
reversible Hemmung[§]	2,03	1,09	1,97	1,47	1,97	1,19	2,47	1,25	2,99	1,18
Fettgewebe										
Neutral	10,17	1,78	10,28	1,85	9,57	0,91	10,60	1,36	9,57	1,67
Reduziert (2 mM DTT)	11,04	2,86	11,99	2,53	11,23	1,93	12,50	2,10	11,39	0,93
reversible Hemmung[§]	0,87	1,89	1,70	1,84	1,66	1,77	1,90	1,24	1,82	2,49

[§] Die Hemmung wurde berechnet als die Differenz der Aktivitäten mit und ohne DTT
* $p \leq 0,1$, ** $p \leq 0,05$

DTT ist ein Reduktionsmittel und hebt die Hemmung der PTP 1B auf, die üblicherweise durch eine reversible Oxidation des Enzyms zustande kommt (Denu und Tanner 1998). DTT konnte die Hemmung der PTP 1B bei den Saponin-behandelten Mäusen signifikant (p=0,022) aufheben. Die Aktivität der PTP 1B war bei den mit der Saponinfraktion behandelten Mäusen nach dem Zusatz von DTT auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Bei den mit der Lipidfraktion behandelten Mäusen hatte DTT jedoch keinen Einfluss auf die Aktivität der PTP 1B **(Abbildung 8)**.

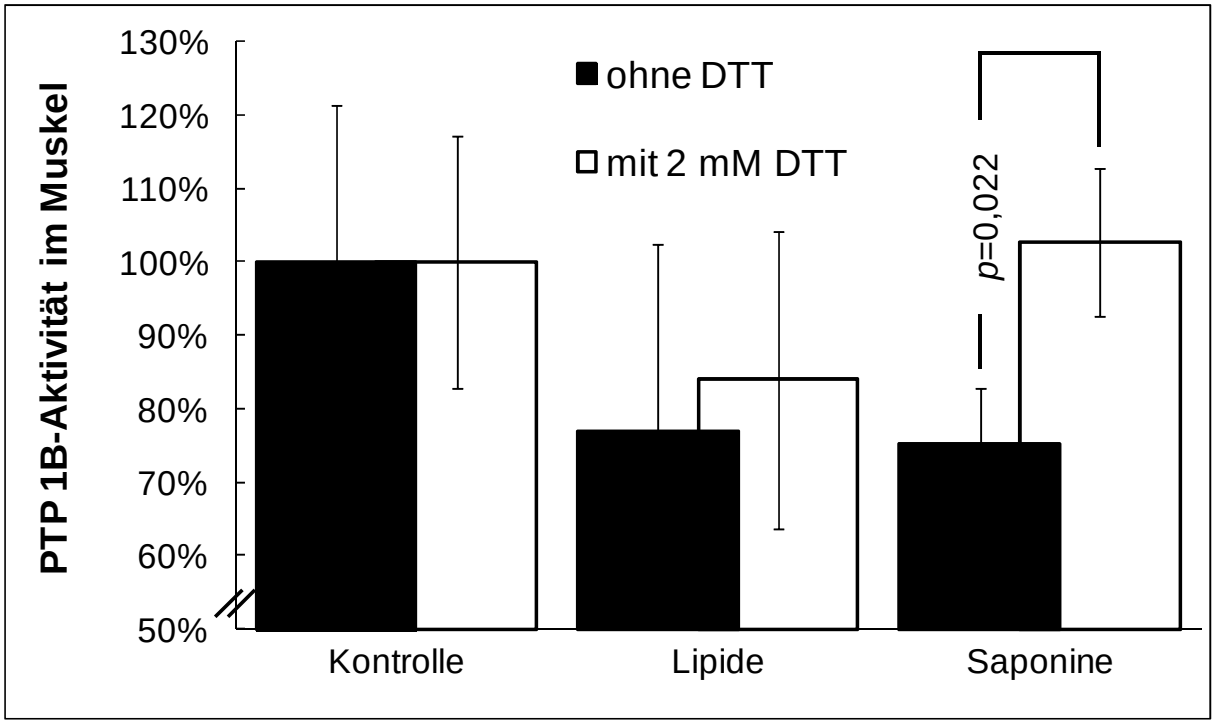


Abbildung 9: Mittlere Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP 1B) [MW±SD] im Muskel der db/db Mäuse, die mit der Lipid- oder Saponinfraktion behandelt worden waren, mit und ohne Zusatz von 2 mM Dithiothreitol (DTT) jeweils prozentual zur Kontrolle

Die erste Vermutung war deshalb, dass die Lipidfraktion möglicherweise die Expression der PTP 1B vermindert. Eine Messung der PTP 1B-Aktivität im sauren pH Bereich von 6,0 kann erste Hinweise auf Expressionsunterschiede liefern. Bei einem pH Wert von 6,0 hat die PTP 1B beinahe ihre maximale Aktivität erreicht. Die Messung der PTP 1B-Aktivität im Muskel der db/db Mäuse bei einem pH Wert von 6,0 ergab mit im Mittel 6,31 U/g Protein eine deutlich höhere Aktivität als im neutralen pH Bereich von 7,2 mit einer Aktivität von nur 1,90 U/g Protein **(Anhangstabelle 5)**. Weiterhin fällt auf, dass im sauren pH Bereich die Aktivität der PTP 1B im Vergleich aller Gruppen bei der Kontrolle am niedrigsten war. Am höchsten war sie bei der Saponinfraktion und der ganzen Frucht. Die Differenz der Aktivitäten im neutralen und sauren pH Bereich war bei den Mäusen, die mit der Saponinfraktion behandelt worden waren, am höchsten im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (p=0,037).

Bei den Mäusen, die mit der Lipidfraktion behandelt worden waren, konnte die Vermutung einer verminderten PTP 1B-Aktivität im sauren pH Bereich nicht bestätigt werden. Im Vergleich zur Kontrolle war die Aktivität in dieser Gruppe sogar eher erhöht. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant **(Tabelle 10)**.

Tabelle 10: Aktivität [U/g Protein] der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B im Muskel neutral (pH 7,2) oder sauer (pH 6,0)

	Kontrolle		ganze Frucht		Lipidfraktion		Saponinfraktion		wasserlösliche Fraktion	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Neutral	2,22	0,48	1,94	0,58	1,71*	0,17	1,67**	0,49	1,94	0,46
Sauer	5,65	1,43	6,99**	1,26	6,07	0,53	6,83*	0,64	6,09	0,71
Hemmung[§]	3,43	1,35	5,04	1,39	4,36	0,53	5,16**	0,71	4,15	0,36

[§] Die Hemmung wurde berechnet als die Differenz der Aktivitäten im sauren und neutralen pH Bereich

* $p \leq 0,1$, ** $p \leq 0,05$

Zur weiteren Untersuchung der Expression auf Gen- und Proteinebene wurden eine RT-PCR sowie eine Western Blot-Analyse durchgeführt.

3.4 Genexpression der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B

Um zu untersuchen, ob der geringen Aktivität der PTP 1B unter reduzierenden Bedingungen **(3.3)** eine geringere Expression dieses Enzyms zugrunde liegt, wurde zunächst die Genexpression der PTP 1B im Muskel dieser Tiere im Vergleich zur Kontrolle mittels RT-PCR analysiert. Dazu wurde die cDNA der Mäuse mit Primern für PTP 1B bzw. für β Aktin amplifiziert, im Agarosegel aufgetrennt und die Bandenstärke gemessen. Entgegen der Erwartungen, ergab die Auswertung der optischen Dichte der Banden für die Mäuse, die mit der Lipidfraktion der Bittergurke behandelt worden waren, eine fast 16% höhere Genexpression im Vergleich zur Kontrolle **(Tabelle 11)**. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Tabelle 11: Differentielle Genexpression der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B im Muskel. Bandenstärke [od/mm^2] in Relation zur β Aktin-Bande

Tier	1	2	3	4	5	6	7	8	9	**MW**	**SD**
Kontrolle	7,06	2,97	1,36	1,38	1,90	3,22	1,33	2,22	2,90	**2,70**	**1,79**
Lipidfraktion	5,31	1,08	2,95	1,42	4,41	1,02	5,83	4,16	2,04	**3,14**	**1,86**

Die Genexpression der PTP 1B schwankte innerhalb der Gruppen stark. Nicht nur bei der Kontrolle und der Gruppe, die mit der Lipidfraktion der Bittergurke behandelt worden war, sondern auch bei den anderen Gruppen. Die geringsten Schwankungen zeigte die Gruppe, die mit der Saponinfraktion der Bittergurke behandelt worden war **(Abbildung 10)**.

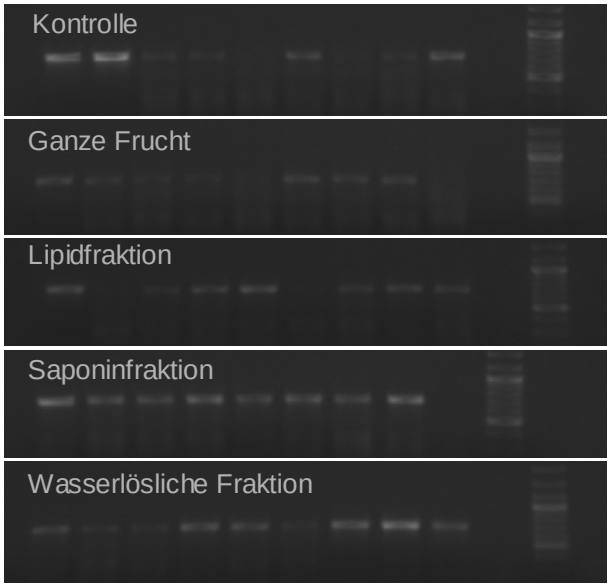
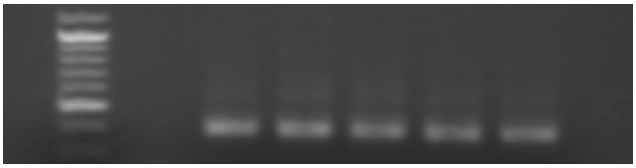


Abbildung 10: Aufnahmen der Agarosegele nach Auftrennung der amplifizierten cDNA mit Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B-Primern jeweils mit Größenmarker (100 bp plus DNA Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) im UV-Imager

Die RT-PCR der Gruppenpools **(Abbildung 11)** bestätigte die Ergebnisse aus der RT-PCR mit den Einzeltieren. Die Genexpression der PTP 1B war bei den Lipid-behandelten Mäusen gegenüber der Kontrolle leicht erhöht. Eine erhöhte Genexpression der PTP 1B zeigten außerdem die Mäuse, welche die gesamte Frucht oder die Saponinfraktion der Bittergurke bekommen hatten **(Tabelle 12)**.

A)



B)

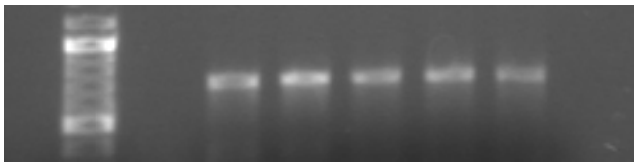


Abbildung 11: Aufnahmen der Agarosegele nach Auftrennung der amplifizierten cDNA mit Primern für β Aktin (A) und Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (B) im UV-Imager. Von links nach rechts sind jeweils ein Größenmarker (100 bp plus DNA Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) sowie die Gruppenpools der Kontrollgruppe und der Gruppen, die mit der ganzen Frucht, der Lipidfraktion, der Saponinfraktion oder der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke behandelt worden waren, aufgetragen worden

Die Messung und Auswertung der optischen Dichte der in **Abbildung 11** gezeigten Banden sind in **Tabelle 12** dargestellt. Zur Beurteilung der differentiellen Regulation wurden die Werte prozentual im Vergleich zur Kontrolle berechnet.

Die Ergebnisse zur Genexpression entsprechen ziemlich gut den Aktivitäten der PTP 1B bei einem pH Wert von 6,0. Die Gruppen, die mit der ganzen Frucht bzw. mit der Saponinfraktion der Bittergurke behandelt worden waren, zeigten die stärkste Genexpression, obwohl deren native Aktivität im Vergleich zur Kontrolle eher vermindert war **(Tabelle 10)**.

Tabelle 12: Differentielle Genexpression der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B im Muskel der Gruppenpools

	Kontrolle	ganze Frucht	Lipidfraktion	Saponin-fraktion	wasserlösl. Fraktion
β Aktin [od/mm^2]	79100,87	79351,26	74377,05	73422,45	70952,04
PTP 1B [od/mm^2]	96073,97	121590,99	102327,01	113537,87	93844,51
PTP 1B-Expression [%] nach β Aktin-Korrektur	100,00	126,18	113,31	127,35	99,98

3.5 Expression der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B

Weiterhin wurde bei den Mäusen, welche mit der Lipidfraktion der Bittergurke behandelt worden waren, die Regulation der PTP 1B auf Proteinebene im Vergleich zur Kontrolle mittels Western Blot analysiert. Es wurde jeweils abwechselnd das Protein aus dem Skelettmuskel von acht Mäusen der Kontrollgruppe bzw. der Gruppe, die mit der Lipidfraktion der Bittergurke behandelt worden war, auf das Gel aufgetragen **(Abbildung 12)**.

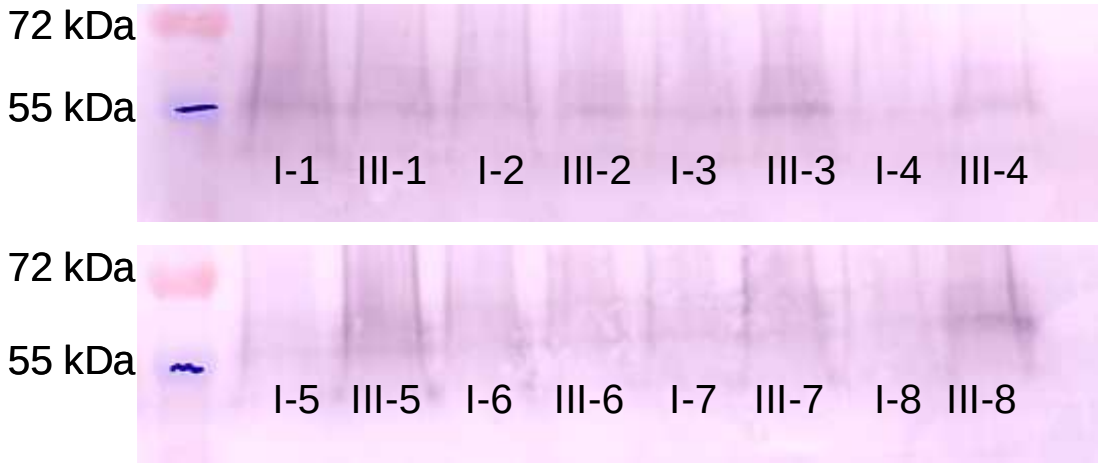


Abbildung 12: Aufnahme der Western Blots nach Inkubation mit einem Antikörper gegen Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B. Abwechselnd sind nach einem Standard je acht Tiere der Kontrollgruppe (I) und der Gruppe, die mit der Lipidfraktion der Bittergurke behandelt worden war (III), aufgetragen worden

Die Aufnahmen der Western Blots **(Abbildung 12)** und die Auswertung der Banden **(Tabelle 13)** zeigen, dass die Expression der PTP 1B im Muskel der Mäuse, die mit Bittergurken-Lipiden behandelt worden waren, im Mittel um 40% gegenüber der Kontrolle erhöht war. Dieser Unterschied war nach zweiseitigem T-Test für unabhängige Stichproben nicht signifikant (p=0,099). Die Western Blots bestätigen ebenfalls die Ergebnisse der Messung der PTP 1B-Aktivität im sauren pH Bereich. Die Aktivität der PTP 1B hat bei einem pH Wert von 6,0 annähernd ihr Maximum erreicht und spiegelt die Expression des Enzyms wider. Die Aktivität der PTP 1B war im sauren pH Bereich ebenfalls bei den Mäusen, welche die Lipidfraktion der Bittergurke bekommen hatten, im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Dies war ebenfalls nicht signifikant **(3.3)**.

Tabelle 13: Expression der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B [od/mm^2]

Tier	1	2	3	4	5	6	7	8	**MW**	**SD**
Kontrolle	4971	2496	3080	2676	2410	2936	2418	1394	**2798**	**1014**
Lipidfraktion	3869	2794	4955	4102	3768	2163	2822	6778	**3906**	**1457**

3.6 Expression von Markergenen der Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren

Genexpression von Adiponektin im Fettgewebe

Zur Untersuchung der PPARγ-Aktivierung wurde die differentielle Expression von Adiponektin im Fettgewebe der Mäuse mittels RT-PCR bestimmt. Eine Aktivierung von PPARγ führt zu einer vermehrten Expression von Adiponektin im Fettgewebe. Bei allen Mäusen war eine deutliche Adiponektin Bande zu erkennen. Die Schwankungen der Adiponektin-Genexpression war anders als die der PTP 1B-Genexpression sehr gering **(Abbildung 13)**.

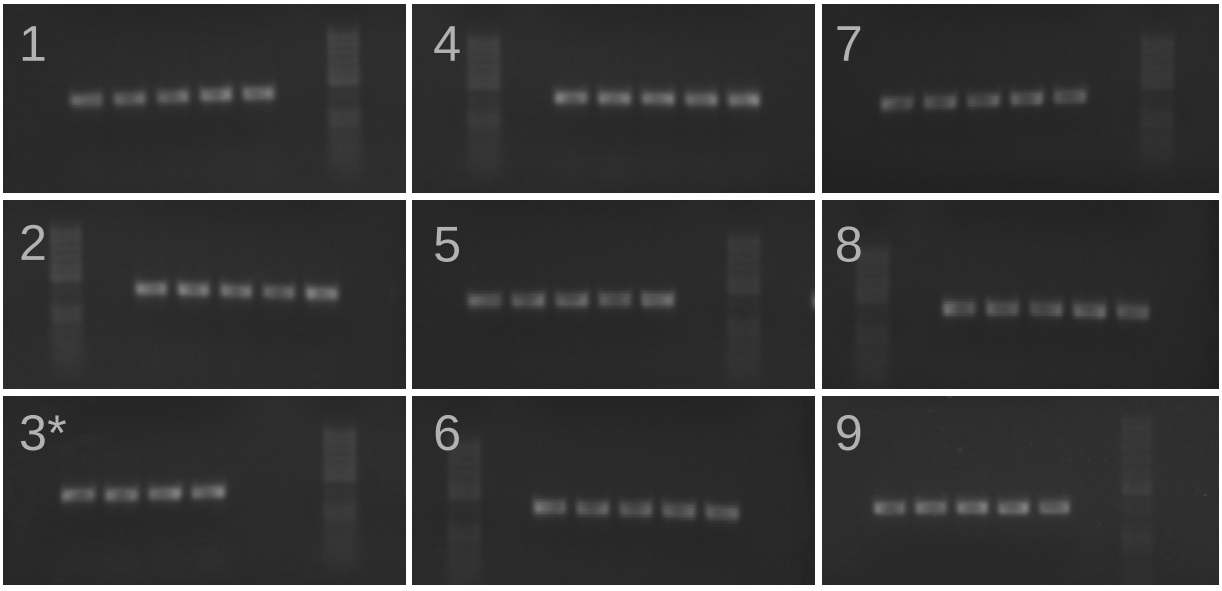


Abbildung 13: Aufnahmen der Adiponektin-Banden aus dem Fettgewebe. Im Agarosegel wurden jeweils ein Größenmarker (50 bp DNA Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und von links nach rechts ein Tier aus der Kontrollgruppe sowie der Gruppen, die mit der ganzen Frucht, der Lipidfraktion, der Saponinfraktion oder der wasserlöslichen Fraktion behandelt worden waren, aufgetragen. * Saponinfraktion fehlt

Nebeneinander wurden jeweils ein Tier aus jeder Gruppe im Gel aufgetrennt und die Bandenstärken für Adiponektin und β Aktin der behandelten Tiere prozentual zur

Bandenstärke des Kontrolltiers dargestellt. Zur Vergleichbarkeit mit den Daten aus der Microarray-Analyse wurden die Expressionsunterschiede ebenfalls als Log Ratio (Ln (Behandlung/Kontrolle)) berechnet. Ohne Korrektur durch die β Aktin-Expression war kein Unterschied zwischen den Gruppen zu beobachten. Dieses Ergebnis konnte durch die Microarray-Ergebnisse zur Adiponektin-Expression (NM_009605) bestätigt werden **(Tabelle 14)**.

Tabelle 14: Mittlere Expression von Adiponektin im Fettgewebe ohne β Aktin-Korrektur nach Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Microarray-Analyse in Relation zur Kontrolle [Log Ratio]

	Kontrolle	ganze Frucht	Lipidfraktion	Saponin-fraktion	wasserlösliche Fraktion
RT-PCR	---	-0,0002	0,0023	0,0114	0,0445
Microarray	---	-0,0145	-0,0927	-0,0051	-0,0916

Zur Korrektur durch die β Aktin-Expression wurde jeweils die relative Bandenstärke der Adiponektin-Bande durch die der β Aktin-Bande geteilt **(Anhangstabelle 6)**. Nach Korrektur mit der β Aktin-Expression zeigte die Gruppe, die mit der Lipidfraktion behandelt worden war, die höchste Adiponektin-Expression. Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (p=0,15). Auch die Gruppen, die mit der Saponinfraktion oder der wasserlöslichen Fraktion behandelt worden waren, zeigten eine leicht, aber nicht signifikant erhöhte Adiponektin-Expression gegenüber der Kontrolle **(Tabelle 15)**.

Tabelle 15: Genexpression von Adiponektin und β Aktin im Fettgewebe der behandelten Gruppen in Relation zur Kontrolle

		Kontrolle	ganze Frucht	Lipidfraktion	Saponin-fraktion	wasserlösliche Fraktion
β Aktin [%]	MW	100,00	102,46	93,97	86,33	103,32
	SD	0,00	15,61	22,15	17,41	22,05
Adiponektin ohne β Aktin-Korrektur [%]	MW	100,00	99,98	100,23	101,15	104,55
	SD	0,00	8,68	12,72	16,85	12,77
Adiponektin mit β Aktin-Korrektur [%]	MW	100,00	99,28	111,75	119,66	104,32
	SD	0,00	14,94	27,72	23,87	20,89
Adiponektin mit β Aktin-Korrektur [Log Ratio]	MW	---	-0,0072	0,1111	0,1795	0,0423

Genexpression von Resistin im Fettgewebe

Auch Resistin wird durch PPARγ reguliert und dient als Marker für die Aktivierung von PPARγ. Durch eine Aktivierung von PPARγ wird die Resistin-Genexpression vermindert. Das Resistin-Gen war bei allen Mäusen im Fettgewebe exprimiert, allerdings mit leichten Schwankungen in der Bandenstärke **(Abbildung 14)**.

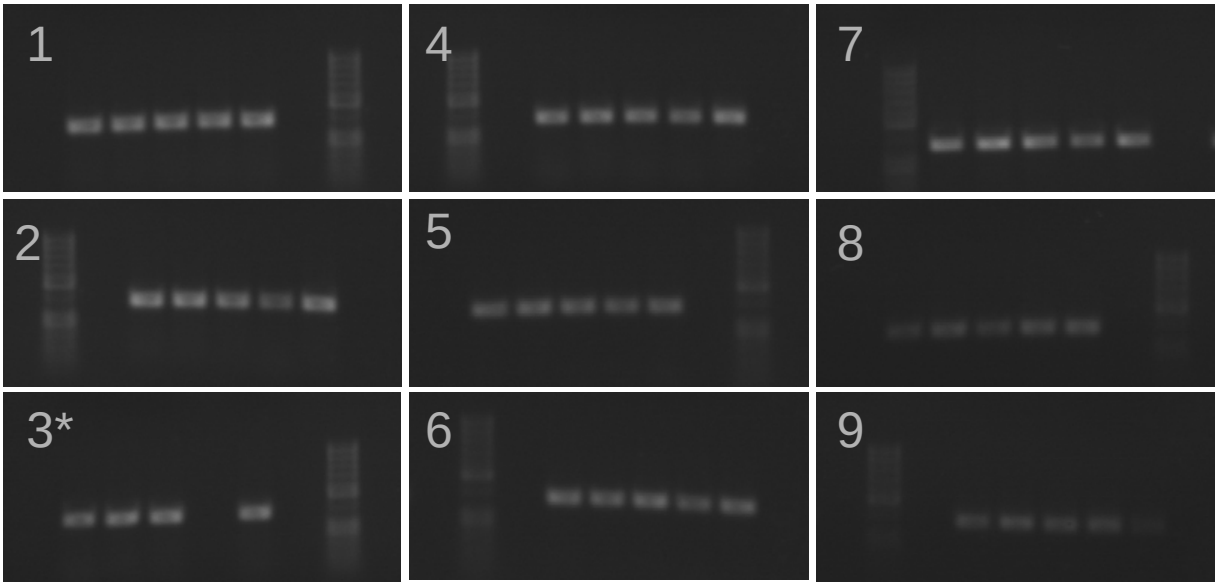


Abbildung 14: Aufnahmen der Resistin-Banden aus dem Fettgewebe. Im Agarosegel wurden jeweils ein Größenmarker (50 bp DNA Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und von links nach rechts ein Tier aus der Kontrollgruppe sowie der Gruppen, die mit der ganzen Frucht, der Lipidfraktion, der Saponinfraktion oder der wasserlöslichen Fraktion behandelt worden waren, aufgetragen. * Saponinfraktion fehlt

Die Auswertung erfolgte anlog zur Auswertung der Adiponektin-Expression. Nach RT-PCR sind ohne β Aktin-Korrektur kaum Gruppenunterschiede bezüglich der Resistin-Expression zu erkennen. Die höchste mittlere Resistin-Expression zeigte nach der RT-PCR die Gruppe, die mit der ganzen Frucht der Bittergurke behandelt worden war. Dies war jedoch nicht signifikant **(Anhangstabelle 6)**. Im Gegensatz dazu zeigten die Microarray-Ergebnisse die höchste Expression von Resistin (NM_022984) bei der Kontrollgruppe und die niedrigste bei der Gruppe, welche die wasserlösliche Fraktion der Bittergurke bekommen hatte. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Für das Resistin-Gen sind auf den Microarrays jeweils zwei Sonden gespottet, weshalb dafür jeweils zwei Werte vorliegen **(Tabelle 16)**.

Tabelle 16: Mittlere Expression von Resistin im Fettgewebe ohne β Aktin-Korrektur nach Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und Microarray-Analyse in Relation zur Kontrolle [Log Ratio]

	Kontrolle	ganze Frucht	Lipidfraktion	Saponin-fraktion	wasserlösliche Fraktion
RT-PCR	---	0,1349	0,0083	-0,0428	0,0678
Microarray					
A_52_P55972	---	-0,0528	-0,0947	-0,2414	-0,4735*
A_51_P233597	---	-0,1233	-0,2663	-0,2727	-0,6440**

* p=0,0728, ** p=0,0504

Nach der β Aktin-Korrektur sind die Resistin-Expressionen aller behandelten Gruppen leicht, aber nicht signifikant, gegenüber der Kontrolle erhöht. Eine signifikante Regulation von Resistin auf der Genexpressionsebene konnte mittels RT-PCR nicht nachgewiesen werden **(Tabelle 17)**.

Tabelle 17: Genexpression von Resistin und β Aktin im Fettgewebe der behandelten Gruppen in Relation zur Kontrolle

		Kontrolle	ganze Frucht	Lipidfraktion	Saponin-fraktion	wasserlösliche Fraktion
β Aktin [%]	MW	100,00	102,46	93,97	86,33	103,32
	SD	0,00	15,61	22,15	17,41	22,05
Resistin ohne β Aktin-Korrektur [%]	MW	100,00	114,44	100,83	95,81	107,01
	SD	0,00	23,85	22,87	44,38	43,93
Resistin mit β Aktin-Korrektur [%]	MW	100,00	113,17	113,48	114,60	106,50
	SD	0,00	23,68	46,38	60,78	56,46
Resistin mit β Aktin-Korrektur [Log Ratio]	MW	---	0,1237	0,1265	0,1363	0,0630

Genexpression der Acyl CoA Dehydrogenase in der Leber

Als Marker für die Aktivierung von PPARα wurde die Expression der Acyl CoA Dehydrogenase in den Lebern der db/db Mäuse mit RT-PCR untersucht. Eine Aktivierung von PPARα führt zu einer erhöhten Genexpression der Acyl CoA Dehydrogenase in der Leber. Die Acyl CoA Dehydrogenase war bei allen Mäusen in der Leber exprimiert. Die Stärke der Expression war jedoch sehr schwankend **(Abbildung 15)**.

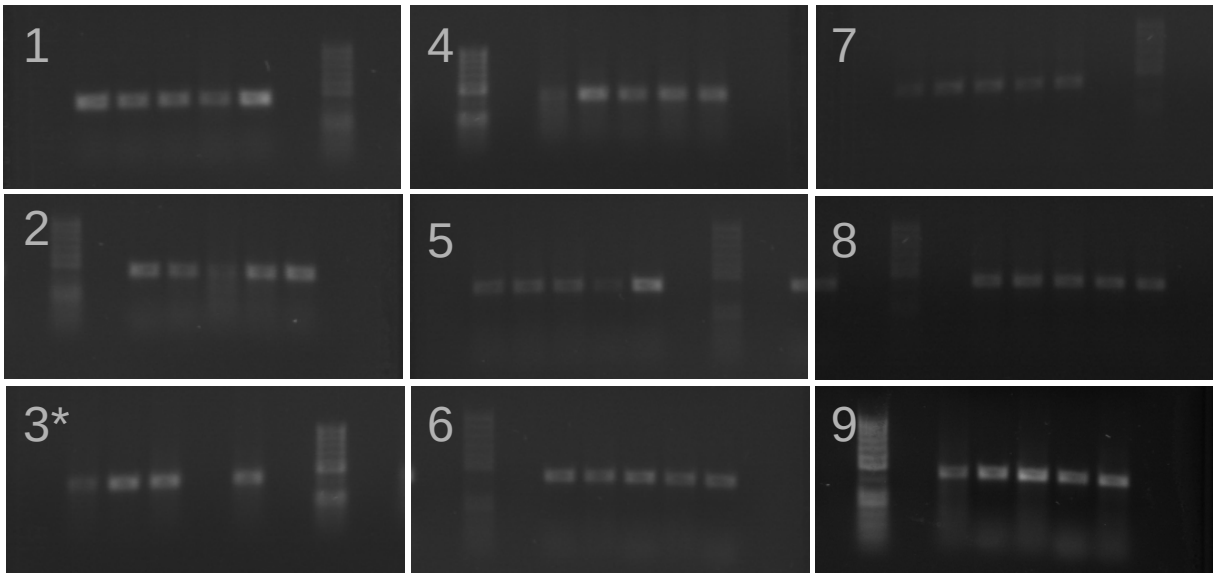


Abbildung 15: Aufnahmen der Acyl CoA Dehydrogenase-Banden der Leber. Im Agarosegel wurden jeweils ein Größenmarker (50 bp DNA Ladder von Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) und von links nach rechts ein Tier aus der Kontrollgruppe sowie der Gruppen, die mit der ganzen Frucht, der Lipidfraktion, der Saponinfraktion oder der wasserlöslichen Fraktion behandelt worden waren, aufgetragen. * Saponinfraktion fehlt

Auch die Auswertung der Genexpression der Acyl CoA Dehydrogenase erfolgte anlog zur Auswertung der Adiponektin-Expression. Die Expression der Acyl CoA Dehydrogenase war im Mittel bei allen behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht. Die Unterschiede waren nicht signifikant **(Tabelle 18)**.

Tabelle 18: Genexpression der Acyl CoA Dehydrogenase (DH) und von β Aktin im Fettgewebe der behandelten Gruppen in Relation zur Kontrolle

		Kontrolle	ganze Frucht	Lipidfraktion	Saponin-fraktion	wasserlösliche Fraktion
β Aktin [%]	MW	100,00	154,36	155,11	124,71	168,85
	SD	0,00	101,40	98,37	80,56	79,56
Acyl Co A DH ohne β Aktin-Korrektur [%]	MW	100,00	156,61	145,38	112,20	168,55
	SD	0,00	91,43	81,36	59,37	71,31
Acyl Co A DH mit β Aktin-Korrektur [%]	MW	100,00	122,71	106,12	107,07	110,58
	SD	0,00	69,21	59,58	62,80	41,66
Acyl Co A DH mit β Aktin-Korrektur [Log Ratio]	MW	---	0,2047	0,0594	0,0683	0,1006

Die Ergebnisse der Microarray-Analyse zeigen im Fettgewebe ebenfalls keine Regulation der Acyl CoA Dehydrogenase (NM_017366) nach einer Behandlung mit der Bittergurke im Vergleich zur Kontrolle (Daten nicht gezeigt).

3.7 Differentielle Genexpression im Fettgewebe

Pathway-Analysen

Die Microarray-Analyse erfolgte mit isolierter RNA aus dem Fettgewebe der Mäuse. Die Streuung innerhalb der Gruppen war sehr hoch, was die Auswertung der Daten erschwerte. Deshalb wurde zusätzlich eine so genannte *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) durchgeführt. Dadurch kann nicht nur die Regulation von einzelnen Genen untersucht werden, sondern auch die ganzer Stoffwechselwege. Zur Auswertung wurde eine GSEA auf der Basis der Log Ratios der Expressionen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass unter anderem das Insulinsignal, der Stärke- und Sukrosestoffwechsel sowie das Signal von PPARs durch die Behandlungen mit der Bittergurke signifikant im Vergleich zur Kontrolle reguliert wurden **(Tabelle 19)**.

Tabelle 19: Signal- und Stoffwechselwege nach der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Datenbank und deren Regulation im Fettgewebe der db/db Mäuse nach fünfwöchiger oralen Gabe von 150 mg/kg Körpergewicht der verschiedenen Fraktionen der Bittergurke (ganze Frucht, Lipidfraktion, Saponinfraktion, wasserlösliche Fraktion) im Vergleich zur Kontrollgruppe

		p-Werte			
KEGG Pathway	Zahl der Gene	Ganze Frucht	Lipid-fraktion	Saponin-fraktion	Wasserlösliche Fraktion
Adipocytokine signaling pathway	69	0,0024	<0,0001	0,0263	0,0004
Citrate cycle (TCA cycle)	25	ns	ns	0,0485	<0,0001
Fatty acid biosynthesis	6	ns	0,0042	ns	ns
Fatty acid metabolism	43	0,0016	ns	ns	0,0004
Glycerolipid metabolism	39	0,0011	0,0549	0,0123	0,0134
Glycolysis/Gluconeogenesis	52	<0,0001	0,0306	0,0001	<0,0001
Inositol phosphate metabolism	48	0,0039	ns	ns	0,0401
Insulin signaling pathway	133	0,0003	0,0013	0,0075	<0,0001
Linoleic acid metabolism	39	<0,0001	<0,0001	0,0094	0,0040
MAPK[#] signaling pathway	253	0,0316	0,0543	0,0040	0,0002
Oxidative phosphorylation	114	<0,0001	ns	ns	<0,0001
Pentose phosphate pathway	24	0,0034	0,0193	0,0033	0,0002
PPAR signaling pathway	71	0,0074	0,0009	0,0083	<0,0001
Pyruvate metabolism	40	0,0012	0,0013	0,0194	0,0013
Starch and sucrose metabolism	50	0,0011	0,0060	0,0028	0,0005

ns = nicht signifikant
[#] MAPK = Mitogen assoziierte Protein Kinase

Das Insulinsignal beinhaltete nach der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) Datenbank 265 Gensonden, von denen 144 durch mindestens eine Bittergurken-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle stärker (Log Ratio > 0,3) oder schwächer (Log Ratio < 0,3) exprimiert waren. Da teilweise mehrere Sonden für ein Gen gespottet waren, bedeutete dies 109 regulierte Gene von insgesamt 133 Genen des Insulinsignals. Nach der Behandlung mit der ganzen Frucht der Bittergurke waren im Vergleich zu den anderen Behandlungen die wenigsten Gene des Insulinsignals und nach Behandlung mit der wasserlöslichen Fraktion die meisten reguliert, nämlich 14 bzw. 100 Gene. Nach Behandlung mit der Lipidfraktion waren 51 Gene und nach Behandlung mit der Saponinfraktion 35 Gene reguliert. Dies war jedoch für die einzelnen Gene nicht immer signifikant. In der Gruppe, die mit der ganzen Frucht der Bittergurke behandelt worden war, war von den insgesamt 14 regulierten Genen (Log Ratio > |0,3|) nur ein Gen signifikant (p<0,05) reguliert. Bei den Lipid-behandelten Mäusen sowie bei den Saponin-behandelten Mäusen waren jeweils 5 Gene mit einem Log Ratio > |0,3| signifikant (p<0,05) reguliert; nach Behandlung mit der wasserlöslichen Fraktion immerhin 64 Gene. Es fällt auf, dass nur drei Gene (PI3K, Glucose-6-Phosphatase, *calmodulin-like* 3) nicht bei allen Gruppen in die selbe Richtung reguliert (Log Ratio > |0,3|) waren.

Differentielle Genexpression einzelner Gene

Die Auswertung der Microarray-Daten ergab einige wenige regulierte Gene mit einem Log Ratio > |2|. Diejenigen Gene, die zusätzlich durch mindestens eine Bittergurken-Behandlung signifikant (p≤0,05) reguliert waren, sind in **Tabelle 20** dargestellt.

Von diesen sieben Genen sind jedoch nicht alle für das Fettgewebe relevant. Die Gene zu Lipocalin 5 sowie dem *cystatin-related epididymal spermatogenic protein* sind vor allem in den männlichen Geschlechtsorganen von Bedeutung. Das Enzym Glycin N-methyltransferase ist vor allem in der Leber exprimiert, sowie in Pankreas und Prostata (Luka et al. 2009). Zu einer Bedeutung der Glycin N-methyltransferase im Fettgewebe finden sich jedoch keine Hinweise.

Die vier weiteren regulierten Gene, *GATA-binding protein* (GATA) 2 und 3, Aldo-Ketoreduktase 1B7 (AKR1B7) sowie das *CCAAT/enhancer-binding protein* δ (CEBPD), spielen hingegen eine wichtige Rolle bei der Adipozytendifferenzierung und –reifung.

Tabelle 20: Differentielle Genexpression im Fettgewebe mittels Microarray-Analyse. Veränderung der Genexpression wird als logarithmiertes Verhältnis der Signalintensitäten (Log Ratio) von Kontrolle und jeweiliger Behandlung mit entsprechendem p-Wert angegeben

	ganze Frucht		Lipidfraktion		Saponinfraktion		wasserlösliche Fraktion	
Symbol	Log Ratio	p-Wert	Log Ratio	p-Wert	Log Ratio	p-Wert	Log Ratio	p-Wert
GATA[1] 3	0,285	ns	0,986	ns	1,940	0,023	3,237	0,001
GATA[1] 2	-0,110	ns	0,380	ns	0,356	ns	1,016	0,030
	-0,249	ns	0,153	ns	0,064	ns	0,4083	ns
AKR1B7[2]	-1,976	ns	0,662	ns	2,433	ns	6,135	0,039
CEBPD[3]	0,245	ns	0,223	ns	0,516	0,056	1,052	0,001
LCN5[4]	2,303	ns	4,021	0,034	0,5428	ns	2,538	ns
CST8[5]	-2,181	ns	-2,352	0,051	-2,693	0,0286	-2,313	0,054
GNMT[6]	-1,905	ns	-2,749	0,048	-0,665	ns	-2,634	ns

[1] *GATA-binding protein*
[2] Aldo-Ketoreduktase 1B7
[3] *CCAAT/enhancer-binding protein* δ
[4] Lipocalin 5
[5] *cystatin-related epididymal spermatogenic protein*
[6] Glycine N-methyltransferase (Gnmt)

3.8 Konzentration Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen

Die Konzentration von TBA-RS ist ein Marker für oxidativen Stress, der häufig bei Diabetes erhöht ist. Im Fettgewebe der db/db Mäuse konnten die Saponinfraktion und die Lipidfraktion der Bittergurke die Konzentration von TBA-RS um mehr als 40% gegenüber der Kontrollgruppe reduzieren **(Abbildung 16)**.

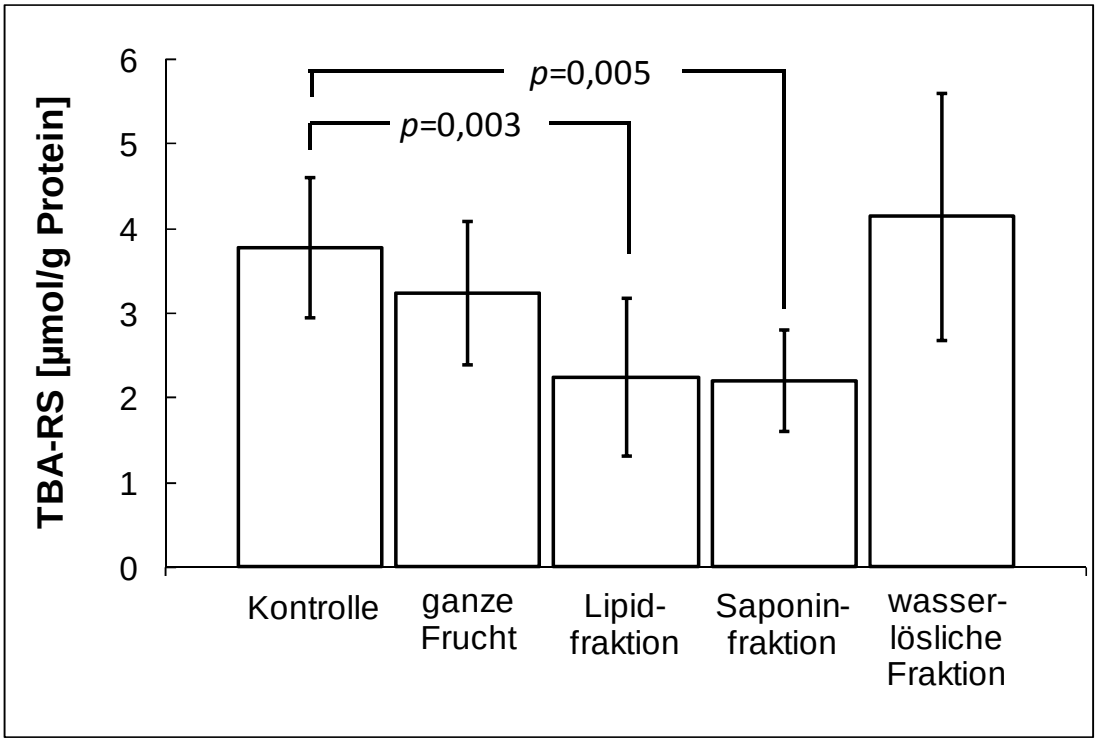


Abbildung 16: Konzentration Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBA-RS) im Fettgewebe

Auf die Konzentration von TBA-RS im Muskelzytosol hatten die Saponin- und die Lipidfraktion jedoch keinen Einfluss. Allerdings konnte hier die wasserlösliche Fraktion die Konzentration von TBA-RS signifikant (p=0,001) um 65% im Vergleich zur Kontrolle senken **(Abbildung 17)**.

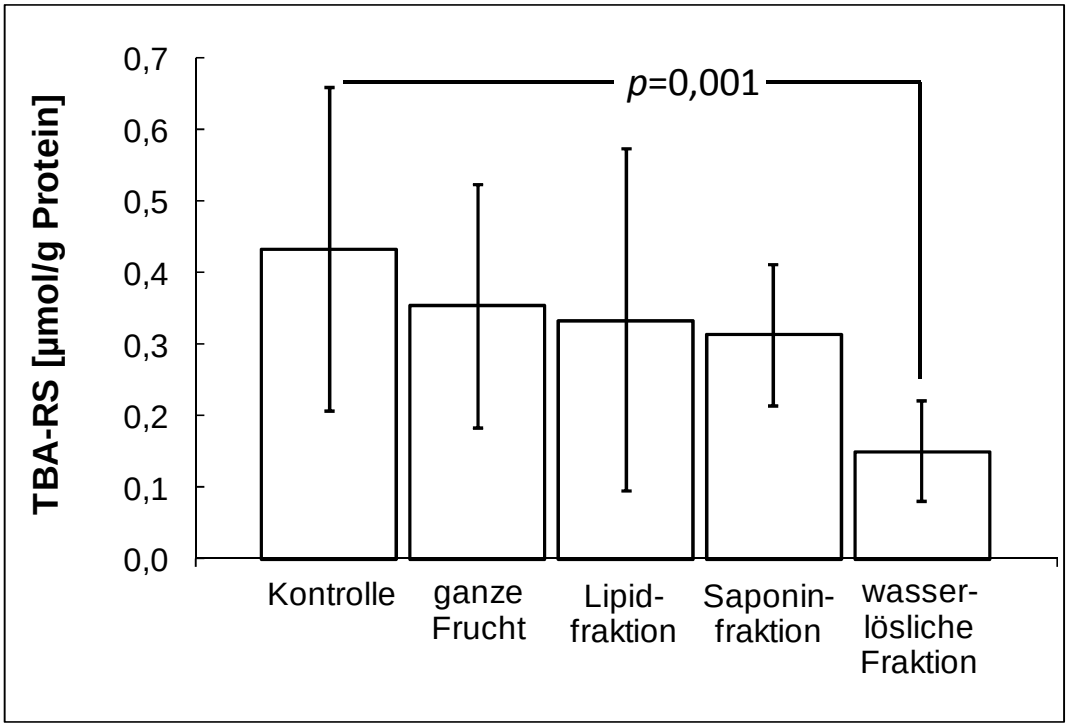


Abbildung 17: Konzentration Thiobarbitursäure-reaktiver Substanzen (TBA-RS) im Muskel

In der Leber hatte die Behandlung mit Bittergurke keinen Einfluss auf die TBA-RS-Konzentration **(Anhangstabelle 7)**.

3.9 Korrelation verschiedener Parameter

Um zu prüfen, wie die einzelnen Parameter miteinander korrelieren und ob die Parameter PTP 1B-Aktivität oder TBA-RS in erster Linie von der Bittergurke oder von KG bzw. HbA_{1C}-Werten beeinflusst wurden, wurde die Korrelation dieser Daten untersucht.

Es zeigte sich keine Korrelation zwischen KG und HbA_{1C}-Werten, was auf eine antidiabetische Wirkung der Bittergurke schließen lässt, welche unabhängig vom geringeren KG ist. Zwischen KG und PTP 1B-Aktivität im Muskel der Tieren zeigte sich zwar eine positive, jedoch nicht signifikante Korrelation. Entsprechend scheint auch die Hemmung der PTP 1B durch die Behandlung mit Lipiden bzw. Saponinen der Bittergurke unabhängig vom reduzierten KG zu sein. Da die PTP 1B-Aktivität im Skelettmuskel mit dem HbA_{1C}-Wert ebenfalls positiv, aber nicht signifikant korreliert, ist davon auszugehen, dass an der antidiabetischen Wirkung der Bittergurke weitere Mechanismen beteiligt sind.

Auch für die Konzentration von TBA-RS und den HbA_{1C}-Werten bzw. dem KG der Mäuse konnte kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden, sodass die Bittergurke eine antioxidative Wirkung unabhängig vom Blutglukosespiegel oder vom KG hat **(Tabelle 21)**.

Tabelle 21: Korrelationen zwischen Körpergewicht oder HbA_{1C}-Werten und Aktivität der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP 1B) oder Konzentrationen an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBA-RS)

	Körpergewicht		HbA_{1C}	
	r	p-Wert	r	p-Wert
HbA_{1C}	0,025	0,874	1	---
Native PTP 1B-Aktivität im Muskel	0,260	0,088	0,155	0,315
TBA-RS im Fettgewebe	0,165	0,284	0,098	0,529
TBA-RS im Muskel	-0,183	0,240	0,220	0,156

r = Korrelationskoeffizient

3.10 Konzentration antidiabetischer Inhaltsstoffe in verschiedenen Sorten der Bittergurke

In den Früchten mit Samen (Proben 1-6) konnten in der TM mittlere Konzentrationen von 5,05% Lipidfraktion, 3,68% Saponinfraktion sowie 19,95% wasserlösliche Fraktion bestimmt werden. Im Fruchtfleisch allein (Proben 7-14) lag die mittlere Konzentration der Lipidfraktion hingegen nur bei 0,91%, die der Saponinfraktion bei 3,97% und die der wasserlöslichen Fraktion bei 16,90% **(Tabelle 22)**.

Die mittlere Konzentration der Saponinfraktion unterschied sich zwischen der ganzen Frucht und dem Fruchtfleisch kaum, während die Konzentrationen der Lipidfraktion und der wasserlöslichen Fraktion jeweils im Fruchtfleisch geringer waren. Dieser Unterschied war jedoch nur für die Lipidfraktion signifikant ($p \leq 0{,}0001$).

Die mittlere Konzentration an hämolytischen Saponinen lag in der TM der ganzen Früchte bei 0,40% (0,27% bis 0,66%) und im Fruchtfleisch bei 0,52% (0,22% bis

0,79%). Die Konzentration hämolytischer Saponine lag in der Saponinfraktion im Mittel bei 11,77% **(Tabelle 22)**.

Tabelle 22: Konzentrationen der Bittergurkenfraktionen sowie der 9c-, 11t-, 13t konjugierten Linolensäure (CLN), der konjugieren Linolsäure (CLA) und der hämolytischen Saponine in ganzen Früchten (Proben 1-6) bzw. im Fruchtfleisch (Proben 7-14) verschiedener Sorten der Bittergurke

	Proben-nummer	Lipid-fraktion¶	CLA†	CLN†	Saponin-fraktion¶	Saponine‡	Saponine¶	Wasserl. Fraktion¶
Ganze Frucht	1	6,40	0,00	4,75	3,22	13,21	0,43	17,63
	2	5,35	0,23	22,94	3,02	11,98	0,36	19,51
	3	5,79	0,16	22,00	5,16	12,86	0,66	24,24
	4	3,98	0,50	32,58	2,9	9,21	0,27	21,64
	5	2,97	0,22	9,29	3,61	8,77	0,32	16,98
	6	5,84	0,38	65,89	4,13	8,53	0,35	19,72
	MW	**5,05**	**0,25**	**26,24**	**3,68**	**10,76**	**0,40**	**19,95**
	SD	**1,31**	**0,17**	**21,87**	**0,85**	**2,15**	**0,14**	**2,67**
Frucht-fleisch	7	2,04	1,42	33,18	4,78	16,27	0,78	11,89
	8	0,79	1,36	33,13	5,34	14,87	0,79	17,55
	9	0,57	0,63	21,21	4,99	13,64	0,68	16,32
	10	0,24	0,42	13,13	3,75	14,38	0,54	18,46
	11	1,64	1,44	34,20	3,34	16,98	0,57	14,39
	12	0,63	1,03	27,47	3,22	9,39	0,30	15,41
	13	0,73	1,74	34,90	3,10	7,09	0,22	21,52
	14	0,65	1,16	19,44	3,20	7,54	0,24	19,37
	MW	**0,91****	**1,15***	**27,08**	**3,97**	**12,52**	**0,52**	**16,86**
	SD	**0,61**	**0,44**	**8,22**	**0,92**	**3,93**	**0,23**	**3,03**

¶ Angaben in % der Trockenmasse
† Angaben in % der Lipidfraktion
‡ Angaben in % der Saponinfraktion
* $p \leq 0{,}001$, ** $p \leq 0{,}0001$

Es konnte gezeigt werden, dass das Fruchtfleisch der weißen (Proben 12-14) Bittergurken-Sorten mit 0,25% einen geringeren Saponingehalt aufwies als das der grünen Sorten (Proben 7-11) mit 0,68% **(Abbildung 18)**. Auch die Konzentration der Saponinfraktion war im Fruchtfleisch der weißen Sorten (Proben 12-14) mit 3,17% geringer als im Fruchtfleisch der grünen Sorten (Proben 7-11) mit 4,43%. Da alle Sorten, von denen die ganze Frucht untersucht worden war, grüne Sorten waren, wurden die Saponinkonzentrationen aus den ganzen Früchten zusätzlich mit den Saponinkonzentrationen im Fruchtfleisch der grünen Sorten verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die Saponinkonzentration in der ganzen Frucht (Proben 1-6) signifikant (p=0,01) geringer war als im Fruchtfleisch der grünen Sorten (Proben 7-11) **(Abbildung 18)**.

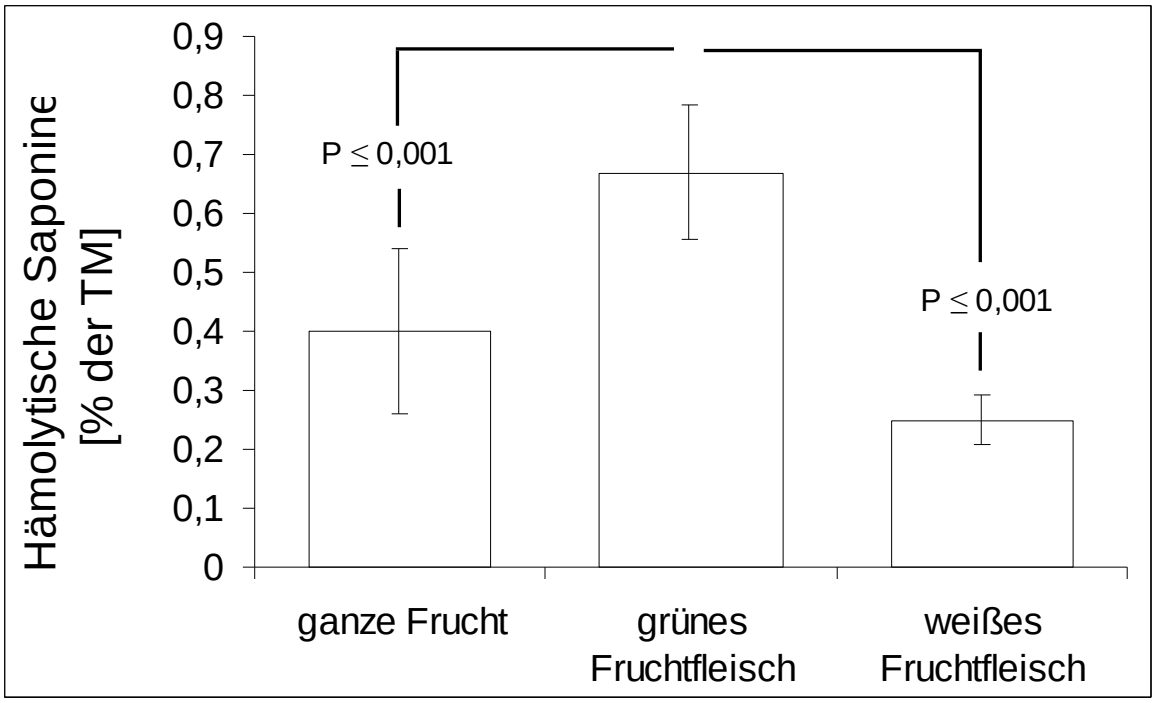


Abbildung 18: Konzentrationen hämolytischer Saponine in der Trockenmasse (TM) von ganzen Früchten (Proben 1-6) bzw. im Fruchtfleisch grüner (Proben 7-11) oder weißer (Proben 12-14) Sorten der Bittergurke. Angaben als MW±SD

Die Lipidfraktion der Bittergurke ist reich an 9c-, 11t-, 13t CLN. Diese FS konnte in allen untersuchten Proben nachgewiesen werden. Allerdings schwankte der relative Gehalt an 9c-, 11t-, 13t CLN in der Lipidfraktion mit 4,4% bis 65% stark zwischen den untersuchten Früchten (Proben 1-6). Im Fruchtfleisch (Proben 7-14) war die Konzentration der Lipidfraktion geringer als in der gesamten Frucht (Proben 1-6), allerdings war der mittlere relative Gehalt an 9c-, 11t-, 13t CLN in der Lipidfraktion annähernd gleich. Die Varianz war im Fruchtfleisch geringer und reichte von 13,1% bis zu 34,9% 9c-, 11t-, 13t CLN in der Lipidfraktion **(Tabelle 22)**.

Der mittlere relative Gehalt an CLA in der Lipidfraktion war im Fruchtfleisch (Proben 7-14) mit 1,1% signifikant höher ($p \leq 0{,}001$) als in der gesamten Frucht (Proben 1-6) mit 0,2%. Im Vergleich zur 9c-, 11t-, 13t CLN war der Gehalt an CLA in der Lipidfraktion sehr gering **(Tabelle 22)**.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte zum einen die antidiabetische Wirkung der Bittergurke im Tierversuch mit insulinresistenten db/db Mäusen belegt und zum anderen sollten Ansätze zum biochemischen Wirkmechanismus gefunden werden. Weiterhin war von Interesse, welche Inhaltsstoffe der Bittergurke für diese Wirkung verantwortlich sind. Da in der Literatur zahlreiche verschiedene Methoden beschrieben sind, mögliche antidiabetische Inhaltsstoffe aus der Bittergurke zu isolieren und auf ihre Wirkung zu untersuchen (Cheng et al. 2008, Miura et al. 2004, Roffey et al. 2007), sind die Ergebnisse dieser Studien kaum vergleichbar und es konnte bislang nicht geklärt werden, welche Substanzgruppe die stärkste Wirkung zeigt. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Wirksamkeit verschiedener Fraktionen der Bittergurke miteinander verglichen. Die Extraktion der Lipid-, Saponin- und wasserlöslichen Fraktionen erfolgte dazu jeweils aus einer Probe, sodass sich die Fraktionen in ihren Inhaltsstoffen nicht überschnitten. Den db/db Mäusen wurde täglich eine Menge von 150 mg/kg KG der ganzen Frucht, der Lipid-, Saponin oder der wasserlöslichen Fraktion im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle verabreicht.

4.1 Gewichtsreduzierende Wirkung der Bittergurke

Alle Mäuse zeigten auch mit Bittergurken-Behandlung in den ersten vier Versuchswochen eine starke wöchentliche Gewichtszunahme, sodass alle Mäuse bis zum Versuchsende nach fünf Wochen übergewichtig waren. Greer et al. (2006) konnten mit 10 Wochen alten db/db Mäusen (n=41) zeigen, dass deren KG mit 49±0,4 g signifikant höher war als das von gesunden Kontrollmäusen (n=38) mit 24±0,4 g und sprach bei den db/db Mäusen von adipös.

Zwar lag das mittlere Gewicht der Mäuse in der vorliegenden Studie mit 38,3±2,6 g unter dem der db/db Mäuse von Greer et al. (2006), jedoch ebenfalls deutlich über dem Gewicht gesunder Mäuse. Die Kontrollgruppe zeigte nach Versuchsende mit 41,0±2,1 g das höchste mittlere Gewicht im Vergleich aller Gruppen, während die Mäuse, welche die gesamte Frucht (p=0,005), die Lipidfraktion (p=0,007), die Saponinfraktion (p=0,007) oder die wasserlösliche Fraktion (p=0,05) der Bittergurke bekommen hatten, zu Versuchsende signifikant leichter waren. Bei der Futteraufnahme konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt

werden. Da Übergewicht einen starken Risikofaktor für Insulinresistenz und Typ II Diabetes darstellt, ist die Reduzierung einer exzessiven Gewichtszunahme durch die Behandlung mit der Bittergurke und ihrer Extrakte ein erster Ansatz zur Erklärung der positiven Wirkung der Bittergurke bei Typ II Diabetes. Allerdings war in diesem Versuch mit db/db Mäusen keine signifikante Korrelation von KG und HbA_{1C}-Werten zu beobachten **(3.9)**.

Andere Arbeitsgruppen konnten ebenfalls einen positiven Effekt der Bittergurke auf das KG belegen. Die Autoren Nerurkar et al. (2008) zeigten, dass ein Zusatz von 1,5% eines Bittergurken-Safts zu einer fettreichen Diät bei C57BL/6 Mäusen die Entwicklung von Übergewicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit fettreicher Diät ohne Bittergurken-Zusatz minderte. Weiterhin untersuchten die Autoren Huang et al. (2008) die Wirkung einer Zugabe von 5% gefriergetrockneter Bittergurke zu einer fettreichen Diät bei Wistar Ratten. Die Bittergurke reduzierte den Anteil großer Adipozyten (>180 µm) sowie die Masse des viszeralen (retroperitonealen und epididymalen) Fettdepots auf das Niveau von fettarm ernährten Ratten.

Chan et al. (2005) untersuchten normale männliche Sprague-Dawley Ratten mit einer *high fat diet* mit oder ohne Zusatz von 0,75%, 1% oder 1,25% eines Bittergurken-Pulvers. Der Bittergurken-Zusatz führte bei den Ratten zu einer signifikant (p<0,05) geringeren Gewichtszunahme und zu einem geringeren Gehalt an Triglyceriden (TG) in Leber und Muskel. Erklärungsansätze für die gewichtsreduzierende Wirkung der Bittergurke werden unter anderem in einer Erhöhung des GU und der ß-Oxidationsrate gesehen (Tan et al. 2008, Chan et al. 2005). Die untersuchten Fraktionen vermitteln ihre gewichtsreduzierende Wirkung möglicherweise durch unterschiedliche Mechanismen. Ein Lipidextrakt der Bittergurke aktivierte *in vitro* effektiv PPARα und γ (Chao und Huang 2003), was die gewichtsreduzierende Wirkung der Lipidfraktion erklären kann. Da die Saponinfraktion durch eine Hemmung intestinaler Disaccharidasen und Lipasen die postprandiale Absorption von Monosacchariden und Fetten hemmt (Oishi et al. 2007), stellt dies eine Erklärung für das geringere KG nach einer Behandlung mit dieser Fraktion bei den db/db Mäusen dar. Für die gewichtsreduzierende Wirkung der wasserlöslichen Fraktion liefern die Ergebnisse der Microarray-Analyse weitere Erklärungsansätze **(3.7)**. Die wasserlösliche Fraktion erhöhte im Fettgewebe der db/db Mäuse die Expression von Markergenen für unreife Adipozyten, GATA 2 und 3, Akr1b7 sowie Cebpd.

Insgesamt bestätigen die Daten aus der Literatur und die Ergebnisse aus dem Versuch mit db/db Mäusen, dass die Bittergurke eine gewichtsreduzierende Wirkung besitzt, auch wenn die db/db Mäuse trotz Bittergurken-Behandlung Übergewicht entwickelten und der Mechanismus nicht vollständig aufgeklärt werden konnte.

4.2 Hypoglykämische Wirkung der Bittergurke

Die Messungen der Blutglucosespiegel vor und zwei Wochen nach Versuchsbeginn zeigten einen deutlichen Anstieg der Nüchtern-Blutglucosekonzentrationen bei allen Gruppen **(Anhangstabelle 4)**. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht beobachtet werden. Auffällig war jedoch, dass die mittleren Blutglucosespiegel der db/db Mäuse schon vor Versuchsbeginn mit 150±86 mg/dL deutlich höher waren als bei gesunden Mäusen mit 95±5 mg/dL (Greer et al. 2006). Nach zwei Wochen waren die Nüchtern-Blutglucosespiegel noch einmal deutlich angestiegen und lagen bei 213±71 mg/dL. Demnach zeigten alle Mäuse bereits zu Beginn des Versuchs erhöhte Blutglucosespiegel.

Die Bestimmung von Glucose und Ketonkörpern im Urin der Mäuse nach Versuchsende lassen ebenfalls eindeutig auf eine Insulinresistenz bei allen Mäusen schließen, weil bei allen Mäusen eine Glucosekonzentration von mindestens 278 mg/dL gemessen werden konnte. Da dies die maximal messbare Konzentration mit den verwendeten Teststäbchen war, war eine genauere Untersuchung möglicher Gruppenunterschiede nicht möglich.

Die Tatsache, dass bei allen Tieren der Nachweis von Ketonkörpern im Urin negativ war, lässt darauf schließen, dass bei den Mäusen eine Insulinresistenz, aber kein absoluter Insulinmangel vorlag.

Im Gegensatz zu den Nüchtern-Blutglucosespiegeln nach zwei Wochen bzw. zur Glucosekonzentration im Urin, zeigte die Behandlung mit der Bittergurke eine signifikante Wirkung auf die HbA_{1C}-Werte als Langzeitparameter für Blutglucosespiegel. Erythrozyten der Maus haben eine Lebensdauer von ca. 22 Tagen (Wilmanns et al. 1969), sodass die HbA_{1C}-Werte die Höhe der Blutglucosespiegel in diesem Zeitraum widerspiegeln.

Die Behandlung mit der Bittergurke reduzierte die HbA_{1C}-Werte der db/db Mäuse signifikant beim Vergleich aller behandelten Gruppen mit der Kontrolle. Die Autoren Greer et al. (2006) veröffentlichten Daten über 10 Wochen alte db/db Mäuse, bei

denen nicht nur Blutglucosespiegel erhöht waren, sondern auch die Insulinspiegel im Vergleich zu gleichaltrigen gesunden Mäusen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die db/db Mäuse an Insulinresistenz litten. Die db/db Mäuse von Greer et al. (2006) zeigten mittlere HbA_{1C}-Werte von 9,2%, während gesunde Mäuse mittlere HbA_{1C}-Werte von 4,5% aufweisen.

Die neun Wochen alten db/db Mäuse der Kontrollgruppe aus dem Ernährungsversuch der vorliegenden Arbeit hatten einen mittleren HbA_{1C}-Wert von 9,3%, welcher durchaus mit dem der insulinresistenten db/db Mäuse aus der Studie von Greer et al. (2006) vergleichbar ist. Für eine Insulinresistenz der db/db Mäuse der vorliegenden Arbeit sprechen weiterhin die hohen Blutglucosespiegel bei fehlenden Ketonkörpern im Urin der Mäuse. Reduzierte HbA_{1C}-Level durch die Behandlung mit der Bittergurke lassen also auf eine verbesserte Insulinsensitivität durch die Behandlung mit der Bittergurke schließen. Da keine signifikante Korrelation zwischen KG und HbA_{1C}-Werten nachgewiesen werden konnte **(Tabelle 21)**, ist die Verbesserung der HbA_{1C}-Werte und damit der Insulinsensitivität nicht allein auf das verringerte Köpergewicht der Mäuse zurück zu führen. Die Bittergurke besitzt also unabhängig von ihrer Wirkung auf das KG bei insulinresistenten db/db Mäusen eine insulinsensitivierende Wirkung. Die Ergebnisse zur insulinsensitivierenden Wirkung der Bittergurke bestätigen Ergebnisse von Miura et al. (2001). Diese Autoren untersuchten die tägliche Gabe von 100 mg/kg KG eines wasserlöslichen Extraktes der Bittergurke bei KKAy Mäusen. Im Insulinsensitivitätstest zeigten die mit Bittergurke behandelten Mäuse signifikant (p<0,01) geringere Blutglucosespiegel 30 und 60 Minuten nach subkutaner Verabreichung von 0,5 U Insulin pro kg KG. Auch Vikrant et al. (2001) konnten in einem Versuch mit Ratten mit Fruktose-induzierter Hyperinsulinämie und Hyperglykämie zeigen, dass ein Wasserextrakt der Bittergurke bei diesen Ratten die Blutglucose- und Insulinspiegel senkte. Dieser Effekt konnte jedoch nur in einer sehr hohen Dosis von 400 mg dieses Extraktes pro Tag beobachtet werden, während 100 und 200 mg keinen signifikanten Effekt hatten. Ein Ethanolextrakt der Bittergurke zeigte ebenfalls keine Wirkung. Insgesamt belegen die Daten von Vikrant et al. (2001), dass wasserlösliche Inhaltsstoffe der Bittergurke eine Insulinresistenz vermindern können.

Die stärkste Wirkung auf die HbA_{1C}-Werte zeigten die db/db Mäuse, welche mit der Lipidfraktion der Bittergurke behandelt worden waren. Trotzdem hatten alle Mäuse, auch die mit Bittergurke behandelten, erhöhte HbA_{1C}-Werte und litten an

Insulinresistenz. Die Behandlung mit der Bittergurke oder ihren Extrakten konnte in diesem Versuch bei db/db Mäusen die Entwicklung einer Insulinresistenz nicht verhindern, sondern nur abmildern.

4.3 Bittergurke und Insulinresistenz: Literaturübersicht

***in vitro* Untersuchungen**

Auch in der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise darauf, dass die Bittergurke die Insulinsensitivität peripherer Organe erhöht und an diesen Geweben die Glucoseaufnahme verstärkt.

Die Autoren Yibchok-Anun et al. (2006) untersuchten die Wirkung eines Proteinextraktes aus dem Fruchtfleisch einer thailändischen Sorte der Bittergurke auf die Glucoseaufnahme von Adipozyten (3T3-L1) und Myozyten (C_2C_{12}), indem sie diese Zellen mit 10 µg Extrakt pro mL Medium inkubierten. Das Proteinextrakt der Bittergurke erhöhte an diesen Zellen die Glucoseaufnahme sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Insulin (10 nM). Die Glucoseaufnahme in diese Zellen war dabei umso stärker, desto länger die Zellen mit dem Extrakt inkubiert wurden. Die Autoren vermuten, dass eine Protein-Komponente der Bittergurke mit Insulin-ähnlicher Wirkung für die blutzuckersenkende Wirkung der Bittergurke verantwortlich ist. Auch die Autoren Singh et al. (2004) untersuchten die Auswirkungen der Bittergurke auf die Glucoseaufnahme von kultivierten L6-Muskelzellen. Ein Bittergurken-Saft erhöhte bei einer Konzentration von 5 µg Bittergurken-Saft pro mL Medium die Glucoseaufnahme in diese Zellen signifikant (p<0,05) gegenüber der Kontrolle, während er in den Konzentrationen 50, 100 und 200 µg/mL die Glucoseaufnahme in diese Zellen dosisabhängig hemmte. Die Glucoseaufnahme wurde außerdem durch den Zusatz von 100 nM Wortmannin, ein potenter PI3K Hemmer, signifikant (p<0,05) gehemmt. Diese Hemmung konnte weder durch den Zusatz von 5 µg Bittergurken-Saft pro mL noch durch 100 nM Insulin aufgehoben werden (Singh et al. 2004). Die Autoren Cummings et al. (2004) untersuchten ebenfalls den Einfluss der Bittergurke auf die Glucoseaufnahme von kultivierten L6 Muskelzellen. Diese Autoren untersuchten dabei jeweils den Saft der Bittergurke und einen Chloroform-löslichen Auszug aus diesem Saft. Die Zellen wurden dazu für eine, drei oder sechs Stunden mit einem Medium mit 100 nM Insulin oder mit 1, 5 oder 10 µg/mL der jeweiligen

Bittergurken-Zubereitung inkubiert. Sowohl 100 nM Insulin als auch die Bittergurke in den verschiedenen Konzentrationen erhöhten nach sechsstündiger Inkubation die Glucoseaufnahme in die Muskelzellen signifikant (p<0,01) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Konzentration von 5 µg/mL der Bittergurken-Zubereitungen die Glucoseaufnahme in die Zelle am stärksten förderte und die Höhe der Glucoseaufnahme mit der Inkubationszeit positiv korrelierte. Der Zusatz von Wortmannin zum Medium hemmte auch in dieser Arbeit signifikant (p<0,05) die Glucoseaufnahme der Muskelzellen mit oder ohne 100 nM Insulin oder 10 µg/mL der jeweiligen Bittergurken-Zubereitung. Die Autoren weisen auf eine insulinomimetische Wirkung der Bittergurke hin und vermuten, dass die Bittergurke einen vergleichbaren Signalweg wie Insulin nutzt.

Weitere Ergebnisse zur Glucoseaufnahme peripherer Gewebe erzielten die Autoren Roffey et al. (2007), welche die Wirkung der Bittergurke auf die Glucoseaufnahme von kultivierten Adipozyten untersuchten. Es konnte gezeigt werden, dass der wasserlösliche Extrakt der Bittergurke ohne den Zusatz von Insulin keinen Einfluss auf die Glucoseaufnahme in diese Zellen hatte, während der Ethanol-Extrakt ohne den Zusatz von Insulin die Glucoseaufnahme dosisabhängig hemmte. Bei einem Zusatz von 0,5 nM Insulin verstärkte vor allem der wasserlösliche Extrakt der Bittergurke die insulinabhängige Glucoseaufnahme in die Adipozyten. Die insulinabhängige Glucoseaufnahme war dabei am stärksten bei der niedrigsten Konzentration der Bittergurke von 0,2 mg/mL. Bei hohen Konzentrationen von Insulin (50 nM) hemmte der Zusatz der Bittergurke die insulinabhängige Glucoseaufnahme in die Zellen wiederum dosisabhängig. Die hemmende Wirkung von Wortmannin auf die insulinabhängige Glucoseaufnahme konnte durch den Zusatz von 0,2 mg/mL des wasserlöslichen Bittergurken-Extraktes nicht aufgehoben werden. Diese Autoren gehen im Gegensatz von den Autoren Singh et al. (2004) und Cummings et al. (2004) davon aus, dass die Bittergurke die Wirkung geringer Insulinmengen an insulinsensitiven Geweben erhöht, jedoch keine insulinomimetischen Eigenschaften besitzt. Die Bittergurke scheint insgesamt nur in geringen Mengen eine insulinsensitivierende Wirkung zu zeigen (Roffey et al. 2007).

Auch Cheng et al. (2008) konnten belegen, dass es *in vitro* Höchstmengen für die antidiabetische Wirkung bei der Behandlung mit Bittergurken-Extrakten gibt. Diese Autoren untersuchten die Wirkung von Methanolextrakten der Frucht, des Samens und der Stiele der Bittergurke (50 µg/mL Medium) an TNFα-induzierten

insulinresistenten FL83B Leberzellen der Maus. Dazu wurde die Glucoseaufnahme in insulinsensitive Zellen mit und ohne Insulinstimulierung sowie in insulinresistente Zellen nach Insulinstimulierung mit oder ohne Bittergurken-Behandlung gemessen. Die Bestimmung der Glucoseaufnahme der Zellen erfolgte 0, 1, 2, 3, 4 und 5 h nach Insulinstimulation (100 nM). Alle Extrakte sowie Troglitazon (22 µg/mL Medium) erhöhten die Glucoseaufnahme der Zellen signifikant (p<0,05) im Vergleich zu den insulinresistenten unbehandelten Zellen. Das Methanolextrakt des Stiels war weniger wirksam bei einer Konzentration von 10 µg/mL als bei 100 µg/mL, während es sich bei der Hexanphase aus dem Methanolextrakt genau anders herum verhielt, was auf eine Höchstgrenze für die effektive Dosis bei der Hexanphase schließen lässt. Hohe Dosen (100 µg/mL) der Butanol- bzw. Ethylacetatphasen aus dem Methanolextrakt zeigten sogar einen negativen Effekt bei der Glucoseaufnahme der Zellen, während sie bei geringen Dosen (10 µg/mL) keinen Effekt hatten. Ähnliche Ergebnisse wurden in TNFα-induzierten insulinresistenten C2C12 Muskelzellen der Maus erzielt. Die Behandlung der insulinresistenten Zellen mit isolierten Triterpenen aus der Hexanphase des Methanolextraktes aus den Stielen der Bittergurke führte ebenfalls zu einer signifikant erhöhten Glucoseaufnahme im Vergleich zu unbehandelten insulinresistenten Zellen. Die Autoren konnten mittels Western Blot zeigen, dass die erhöhte Glucoseaufnahme mit einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung des IRS 1 einherging. Gleichzeitig wurde eine verstärkte Aktivierung der AMPK, gemessen als Phosphorylierung des Threoninrests 172 an den α-Untereinheiten, festgestellt. Die Autoren vermuten eine AMPK-Aktivierung als Mechanismus für die erhöhte Glucoseaufnahme der Zellen, einhergehend mit einer Phosphorylierung des IRS 1.

Die Autoren Tan et al. (2008) untersuchten die Wirkung isolierter Substanzen der Bittergurke auf die Translokation des GLUT4 und die Aktivierung der AMPK in L6 Muskel- und 3T3L1 Fettzellen. Der Zusatz von 10 µM der isolierten Substanzen zum Medium erhöhte ohne Insulingabe die Translokation des GLUT4 in die Plasmamembran um das Drei- bis Vierfache im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Insulin bzw. AICAR (*aminoimidazole carboxamide ribonucleotide*), ein Agonist der AMPK, erhöhten die GLUT4-Level in der Plasmamembran jeweils um das Vier- bzw. Fünffache. Diese Wirkung der Bittergurken-Substanzen konnte nicht durch Wortmannin aufgehoben werden, was für eine Aktivierung der AMPK und gegen einen insulinomimetischen Effekt spricht. Dies konnte durch eine Untersuchung der AMPK-Aktivierung, gemessen als Phosphorylierung des Threoninrests 172, bestätigt

werden. Dieses Ergebnis sichert außerdem die oben beschriebenen Ergebnisse von Cheng et al. (2008).

***in vivo* Untersuchungen (Tabelle 23)**

Tan et al. (2008) konnten die Ergebnisse zur erhöhten Glucoseaufnahme peripherer Organe im *in vivo* Versuchsmodell bestätigen. Diese Autoren untersuchten die Wirkung einer intraperitonealen Gabe der aus der Bittergurke isolierten Substanzen Momordicosid S (100 mg/kg KG) und T (10 mg/kg KG) an gesunden Mäusen auf ihre akute hypoglykämische Wirkung. Die Momordicoside S und T erhöhten bei diesen Mäusen die Glucoseclearance nach einem intraperitonealen Glucosetoleranztest (GTT) sogar noch stärker als nach intraperitonealer Gabe von AICAR (500 mg/kg KG) oder Metformin (200 mg/kg KG). Momordicosid S erhöhte außerdem den GU und die ß-Oxidationsrate der Mäuse. Momordicosid T verbesserte die Glucosetoleranz ebenfalls bei *high fat diet*-induzierten insulinresistenten Mäusen. Fernandes et al. (2007) untersuchten die Glucoseaufnahme der Leber sowie vom Muskelgewebe des Zwerchfells Alloxan-induzierter diabetischer Wistar Ratten, denen zuvor über einen Versuchszeitraum von 30 Tagen täglich eine orale Dosis von 150 bzw. 300 mg/kg KG eines Ethanol-Extraktes (ohne Ethylacetat-lösliche Fraktion) der Bittergurke oder 4 mg Glibenclamid pro kg KG verabreicht worden war. Im Vergleich zu einer diabetischen und einer gesunden Kontrollgruppe wurde bei diesen Ratten die Glucoseaufnahme aus einer Perfusionslösung mit einer Glucosekonzentration von 400 mg/dL in das Muskelgewebe gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass der Bittergurken-Extrakt signifikant (p<0,001) die Glucoseaufnahme in das Muskelgewebe des Zwerchfells erhöhte. Die Tiere, die täglich 300 mg/kg KG des Extraktes bekommen hatten, zeigten eine stärkere Glucoseaufnahme in das Muskelgewebe als die Tiere, denen nur 150 mg/kg KG des Extraktes verabreicht worden war. Die Stärke der Glucoseaufnahme nach einer Gabe von 300 mg/kg KG des Extraktes war vergleichbar mit der Wirkung von Glibenclamid. Die Autoren liefern jedoch keine Erklärung für die erhöhte Glucoseaufnahme in das Muskelgewebe des Zwerchfells nach einer Behandlung mit dem Bittergurken-Extrakt. Da die Perfusionslösung nur Glucose und kein Insulin enthielt, scheint die Glucoseaufnahme unabhängig von Insulin zu erfolgen.

Miura et al. (2001) waren eine der ersten Arbeitsgruppen, welche die antidiabetische Wirkung der Bittergurke am Typ II diabetischen Tiermodell überprüfte und Hinweise

zur Aufklärung des biochemischen Mechanismus der gesteigerten Glucoseaufnahme peripherer Organe im *in vivo* Modell lieferten. Männlichen KKAy Mäusen wurde dazu über einen Versuchszeitraum von drei Wochen eine tägliche Menge von 100 mg/kg KG eines wasserlöslichen Extraktes der Bittergurke verabreicht. Die Bittergurke führte bei diesen Tieren zu signifikant (p<0,01) geringeren Blutglucose- und Insulinspiegeln sowie zu einer verbesserten Glucosetoleranz. Weiterhin zeigten die Bittergurken-behandelten Tiere im Insulinsensitivitätstest signifikant (p<0,01) geringere Blutglucosespiegel 30 und 60 Minuten nach subkutaner Verabreichung von 0,5 U Insulin pro kg KG. Zur Aufklärung des Mechanismus der insulinsensitivierenden Wirkung der Bittergurke wurden anschließend am Muskelgewebe der Tiere die GLUT4-Proteinlevel in der Plasmamembran mittels Western Blot bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass in der Muskulatur von Bittergurken-behandelten Tieren der Anteil an GLUT4 in der Plasmamembran um 144% höher war als bei den Kontrolltieren. In einem Folgeversuch (Miura et al. 2004) untersuchten diese Autoren die Wirkung einer täglichen oralen Gabe von 20 mg eines wasserlöslichen Bittergurken-Extraktes pro kg KG mit oder ohne körperlicher Aktivität am Typ II diabetischen Tiermodell, der KKAy Maus. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Bittergurke in Kombination mit regelmäßiger körperlicher Aktivität Blutglucose- und Plasmainsulinspiegel signifikant (p<0,01) senkt und die Glucosetoleranz signifikant (p<0,05) verbessert. Obwohl die Bittergurke jeweils allein einen größeren Effekt zeigte als körperliche Aktivität allein, konnte der Effekt der Bittergurke durch körperliche Aktivität verstärkt werden.

Eine gesteigerte GLUT4-Proteinexpression in der Plasmamembran ist das Resultat einer verstärkten Insulinsignaltransduktion ausgehend vom IR. Um den Mechanismus, durch welchen die Bittergurke die Insulinsensitivität erhöht, weiter aufzuklären, untersuchten die Autoren Nerurkar et al. (2008) die Wirkung eines Bittergurken-Safts aus unreifen, grünen Früchten ohne Samen auf den Insulinsignalweg in den Lebern weiblicher vier bis sechs Wochen alter C57BL/6 Mäuse. Die Mäuse bekamen über einen Versuchszeitraum von 16 Wochen entweder eine Kontrolldiät (4,8 kJ% Fett), eine fettreiche Diät (58,0 kJ% Fett) oder eine fettreiche Diät mit einem Zusatz von 1,5% (w/w) gefriergetrocknetem Bittergurken-Saft. Nach 14 Wochen und zwölfstündiger Nüchterung wurde ein Insulin- oder ein GTT mit einer intraperitonealen Injektion von 0,5 U Insulin pro kg KG oder 1,5 mg Glucose pro g KG durchgeführt. Messungen der Blutglucosespiegel 0, 30, 60 und

120 Minuten nach Injektion zeigten eine signifikant (p<0,05) verminderte Glucose- und Insulintoleranz bei den Tieren mit fettreicher Ernährung im Vergleich zur Kontrolldiät, was durch den Zusatz des Bittergurken-Safts verbessert werden konnte. Nach Versuchsende waren die Tiere der Kontrollgruppe signifikant (p<0,05) leichter als die Tiere mit fettreicher Diät, wobei der Bittergurken-Zusatz zu einer signifikant (p<0,05) geringeren Gewichtszunahme führte. Weiterhin führte die fettreiche Diät zu signifikant (p<0,05) höheren Glucose-, TG- und Gesamtcholesterinwerten, zu erhöhten apoB-100 und apoB-48-Leveln im Plasma sowie zu einem erhöhten Leberfettgehalt, was jeweils durch den Zusatz der Bittergurke auf die Werte der Kontrollgruppe normalisiert werden konnte. Erklärt werden konnten diese Ergebnisse durch weitere Untersuchungen der intrazellulären Insulinsignaltransduktion in den Lebern dieser Tiere. Es konnte gezeigt werden, dass die fettreiche Diät zu einer erhöhten Insulinresistenz in der Leber mit geringerer Tyrosinphosphorylierung an den β-Untereinheiten des IR und an IRS 1 führte, was durch den Zusatz der Bittergurke verhindert werden konnte.

Ähnliche Ergebnisse zum Effekt der Bittergurke auf die Insulinsignaltransduktion lieferten die Autoren Sridhar et al. (2008). Je acht männliche Wistar Ratten bekamen entweder für 10 Wochen eine normale oder eine fettreiche Diät (59% der Gesamtenergie aus Fett) bzw. eine fettreiche Diät mit täglicher oralen Gabe von 10 mL Bittergurken-Saft ohne Samen pro kg KG in den letzten beiden Versuchswochen. Zu Beginn sowie nach der achten und zehnten Versuchswoche wurden jeweils ein intraperitonealer Glucose- und Insulintoleranztest durchgeführt. Die Tiere wurden dazu über Nacht genüchtert und bekamen eine Menge von 2,0 g Glucose pro kg KG intraperitoneal verabreicht bzw. nach sechsstündiger Nüchterung 2 U Insulin pro kg KG gespritzt. Es konnte gezeigt werden, dass die fettreiche Diät die Glucosetoleranz und die Insulinsensitivität verschlechterte. Die Gabe der Bittergurke konnte jedoch sowohl die Glucosetoleranz als auch die Insulinsensitivität signifikant (p<0,05) verbessern. Außerdem waren nach Versuchsende epididymales Fett, Plasmainsulin, Plasmatriglyceride und Gesamtcholesterin nach Bittergurken-Gabe signifikant (p<0,05) geringer im Vergleich zu den Tieren mit fettreicher Diät ohne Bittergurken-Gabe. Bei einem Teil der Tiere wurde weiterhin eine Insulinstimulierung durchgeführt. Den Tieren wurde intraperitoneal eine Menge von 15 U Insulin gespritzt und 30 Minuten später zur weiteren Untersuchung der Wadenmuskel entnommen. Mittels Western Blot wurden die Tyrosinphosphorylierung sowie die Expression von

IR und IRS 1 aller Tiere im Muskel bestimmt. Zwischen den Gruppen war kein Unterschied bezüglich der Expression von IR und IRS 1 sowie der Insulin-stimulierten Tyrosinphosphorylierung des IR zu beobachten. Allerdings zeigten die Tiere nach fettreicher Ernährung ohne Bittergurken-Gabe eine signifikant (p<0,001) geringere Insulin-stimulierte Tyrosinphosphorylierung des IRS 1 als die Kontrolltiere und die Bittergurken-behandelten Tiere (Sridhar et al. 2008).

Eine mögliche Ursache für die beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeitsgruppen, wie eine erhöhte Insulin-stimulierte Tyrosinphosphorylierung des IR und der IRS 1 und 2 (Nerurkar et al. 2008, Sridhar et al. 2008) sowie eine verstärkte Interaktion der IRS 1 und 2 mit PI3K (Nerurkar et al. 2008) bis hin zur vermehrten GLUT4-Proteinexpression in der Plasmamembran (Miura et al. 2001), stellt eine verminderte PTP 1B-Aktivität dar. Welchen Einfluss die Bittgurke auf die Regulation der PTP 1B hat, sollte deshalb in dieser Arbeit untersucht und diskutiert werden **(4.4)**.

Tabelle 23: Übersicht der *in vivo* Studien zur Untersuchung der antidiabetischen Wirkung der Bittergurke (BG) bei Insulinresistenz

Autor	Versuchs-/ Tiermodell	Dosis/Fraktion	Dauer	Parameter	Ergebnisse
Chan et al. 2005	Sechs Wochen alte männliche Sprague-Dawley Ratten mit *high fat* oder *low fat diet* mit oder ohne BG-Zusatz	BG-Saft gefriergetrocknet und gemahlen zu 0,75% 1% oder 1,25% dem Futter beigemischt	42 oder 49 Tage	-Bestimmung von Körpergewicht (KG), Körperfettverteilung, Futteraufnahme, Blutglucose- und Insulinspiegeln	-BG vermindert Energieeffizienz und Blutglucose- und Insulinspiegel sowie viszerales Fett und Fettgehalt von Leber und Muskel
				-Messung der Aktivität von Enzymen der β-Oxidation	-BG erhöht Aktivität von Enzymen der β-Oxidation
				-Adiponektinkonzentration im Serum	-BG normalisiert Adiponektinspiegel bei Übergewicht
				-PPARγ-Aktivierung	-BG erhöht Gen- und Proteinexpression von PPARγ Coaktivator-1α
Huang et al. 2008	Sechs Wochen alte männliche Wistar Ratten mit *high fat diet* mit oder ohne BG bzw. Pioglitazon im Vergleich zu Tieren mit *low fat diet*	BG-Pulver mit Samen zu 5% der Diät beigemischt	63 Tage	-Bestimmung von KG und Parametern der Adipozytenhypertrophie	-BG wirkt Adipozytenhypertrophie entgegen
				-Messung der Insulinspiegel und oGTT	-BG senkt Insulinspiegel und verbessert Glucosetoleranz vergleichbar mit Pioglitazon
				-Expression von lipogenen Genen im Fettgewebe	-BG vermindert Expression von lipogenen Genen
Miura et al. «2001	Ausgewachsene männliche ddY und KKAy Mäuse	Orale Gabe von 100 mg/kg KG eines wasserlöslichen gefriergetrockneten Extrakts	21 Tage	-oGTT und Insulinsensitivitätstest mit Messung der Blutglucosespiegel vor sowie 30/60 und 120 Minuten nach der Gabe von 2 g /kg KG Glucose	-BG erhöht signifikant (p<0,01) Insulinsensitivität und verbessert Glucosetoleranz
				-GLUT4-Expression in der Plasmamembran des Muskelgewebes	-BG erhöht GLUT4-Proteinlevel in der Plasmamembran um 144% (p<0,01)

[§] Insulinrezeptor
[¶] Insulinrezeptorsubstrat
[†] Lipoproteinlipase

Fortsetzung von Tabelle 23: Übersicht der *in vivo* Studien zur Untersuchung der antidiabetischen Wirkung der Bittergurke (BG) bei Insulinresistenz

Autor	Versuchs-/ Tiermodell	Dosis/Fraktion	Dauer	Parameter	Ergebnisse
Miura et al. 2004	Acht Wochen alte KKAy Mäuse (Kontrolle, BG, Exercise, BG + Exercise; n=5-6)	Tägliche orale Gabe von 20 mg/kg KG eines wasserlöslichen Extraktes; 30 Minuten nach BG-Gabe Bewegung im motorisiertem Laufrad für 120 Minuten	35 Tage	-oGTT mit Messung der Blutglucose-spiegel vor sowie 30/60 und 120 Minuten nach der Gabe von 2 g /kg KG Glucose -Plasmainsulin- und Blutglucosespiegel	-BG in Kombination mit körperlicher Aktivität verbessert Glucosetoleranz sowie Insulin- und Blutglucosespiegel signifikant. BG ist effektiver als körperliche Aktivität allein
Nerurkar et al. 2008	Vier bis sechs Wochen alte weibliche C57BL/6 Mäuse mit *high fat diet* mit (n=8) oder ohne (n=7) BG im Vergleich zu Tieren mit normaler Diät (n=7)	1,5% (w/w) getrockneter BG-Saft aus samenlosen Früchten im Futter	112 Tage	-Glucose- und Insulintoleranztest nach 14 Wochen -Messung von Triglyceriden, Cholesterin, apoB-48 und apoB-100 im Plasma sowie von Triglyceriden in der Leber -Bestimmung der Tyrosin-phosphorylierung des IR[§] und der IRS[¶] 1 und 2 in der Leber	-BG verbessert Glucosetoleranz und Insulinsensitivität -BG reduziert Plasmalipide, apoB-48 und –100-Level sowie Triglyceridgehalt in der Leber -BG erhöht Tyrosin-phosphorylierung an IR[§] und IRS[¶] 1 und 2 ohne Expressions-steigerung von IR[§] und IRS[¶] 1 und 2
Shih et al. 2008	Fünf Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse mit *high fat diet* mit BG-Extrakt, Rosiglitazon oder ohne Behandlung im Vergleich zu Mäusen mit normaler Diät (je Gruppe n=9)	Tägliche orale Gabe von Extrakt P (0,5 oder 1 g/kg KG) oder Extrakt G (0,2 oder 1 g /kg KG) aus der BG	28 Tage	-Bestimmung von KG, Plasmalipiden, Plasmainsulin- und Blutglucosespiegeln sowie HbA_{1C}-Werten -Differentielle Genexpression von PPARγ, Leptin, Resistin und LPL[†] im Fettgewebe bzw. PPARα in der Leber	-BG vermindert KG-Zunahme, Plasma-insulin- und Blut-glucosespiegel sowie HbA_{1C}-Werte und verbessert Plasmalipide -BG vermindert mRNA-Expression von Leptin und Resistin und erhöht die Expression von PPARγ und α. Die Expression der LPL[†] wird durch Extrakt G erhöht

[§] Insulinrezeptor
[¶] Insulinrezeptorsubstrat
[†] Lipoproteinlipase

Fortsetzung von Tabelle 23: Übersicht der *in vivo* Studien zur Untersuchung der antidiabetischen Wirkung der Bittergurke (BG) bei Insulinresistenz

Autor	Versuchs-/ Tiermodell	Dosis/Fraktion	Dauer	Parameter	Ergebnisse
Sridhar et al. 2008	Männliche Wistar Ratten unter fettreicher Diät mit oder ohne Gabe eines BG-Safts im Vergleich zur Kontrolle mit normaler Diät	Tägliche orale Gabe eines BG-Safts ohne Samen (10 mL/kg KG) für 2 Wochen nach achtwöchiger Vorlaufzeit mit entsprechender Diät	14 Tage	-Intraperitonealer Glucose- und Insulintoleranztest -Nach Nüchterung über Nacht Messung von Glucose/Insulin/ Lipiden im Plasma -Teilweise Insulin-stimulierung 30 Minuten vor dem Schlachten	-BG erhöht Glucose-toleranz und Insulinsensitivität -BG reduziert Plasmainsulinspiegel und –Lipide sowie epidydimales Fett -BG verstärkt Insulin-stimulierte Tyrosin-phosphorylierung des IRS[¶] 1 im Muskel
Tan et al. 2008	Männliche gesunde und *high fat diet*-induzierte insulinresistente Mäuse	Intraperitoneale Gabe von Momordicosid 5 (100 mg/kg) oder 6 (10 mg/kg)	Eine Dosis (akut)	-Intraperitonealer Glucosetoleranztest -Bestimmung des Grundumsatzes und der ß-Oxidationsrate	-Erhöhte Glucosetoleranz - Grundumsatz und ß-Oxidationsrate nach Gabe von Momordicosid 5 erhöht
Vikrant et al. 2001	Wistar Ratten mit 66% Fruktose in der Diät	Orale Gabe von 100, 200 oder 400 mg/Tag eines Wasser- bzw. Ethanol-extraktes aus der Frucht der BG	15 Tage	-Bestimmung von KG -Messung von Plasmaglucose- und Insulinspiegeln	-BG zeigt keinen Effekt auf KG -400 mg des Wasserextraktes vermindern Blutglucose- und Insulinspiegel signifikant

[§] Insulinrezeptor
[¶] Insulinrezeptorsubstrat
[†] Lipoproteinlipase

4.4 Regulation der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B

Die Behandlung mit der Saponin- bzw. der Lipidfraktion der Bittergurke führte zu einer geringeren nativen PTP 1B-Aktivität im Muskel der db/db Mäuse im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Ergebnis liefert einen Erklärungsansatz für den antidiabetischen Effekt der Bittergurke. Eine verringerte PTP 1B-Aktivität ist direkt mit einer verbesserten Insulinsensitivität assoziiert. Der Insulinsignalweg und schließlich die Glucoseaufnahme aus dem Blut in die Zellen insulinsensitiver Gewebe mittels GLUT4 werden durch die Hemmung der PTP 1B verstärkt (Nieto-Vazquez et al. 2007, Müller et al. 2009). Die Reduzierung der nativen PTP 1B-Aktivität bei db/db Mäusen erklärt nicht nur die verbesserte Insulinsensitivität dieser Mäuse, sondern liefert vielmehr Erklärungsansätze für zahlreiche Studien und Daten in der aktuellen Literatur zur Untersuchung der antidiabetischen Wirkung der Bittergurke **(4.3)**. In diesen Studien führte die Zugabe von Wortmannin, einem spezifischen Hemmer der PI3K, zum Medium zu einer Hemmung der Glucoseaufnahme mit oder ohne Bittergurken-Behandlung (Singh et al. 2004, Cummings et al. 2004, Roffey et al. 2007). Die Bittergurke führte dabei nicht nur im Vergleich zur fettreichen Ernährung, sondern auch im Vergleich zur Kontrolle zu einer gesteigerten Tyrosin-phosphorylierung an IR und IRS 1 und 2. Der Zusatz der Bittergurke konnte die Interaktion von IRS 1 und 2 mit der PI3K bis über den Level der Kontrolltiere hinaus steigern. Die Expression von IR sowie IRS 1 und 2 unterschied sich nicht zwischen den Gruppen (Nerurkar et al. 2008). Diese Ergebnisse lassen auf einen Einfluss der Bittergurke auf das Insulinsignal schließen. Diese Wirkung scheint vor der Aktivierung der PI3K zu erfolgen, möglicherweise auf der Ebene der PTP 1B-Regulation.

Die Saponinfraktion zeigte den stärksten Einfluss auf die PTP 1B-Aktivität im Muskel der db/db Mäuse. Saponine sind wasserlöslich und in relativ hohen Konzentrationen in der Bittergurke vorhanden **(4.9)**. Manche Autoren (Miura et al. 2001, Roffey et al. 2007) verwendeten in ihren Studien wasserlösliche Extrakte, welche vermutlich Saponine enthielten. Eine verbesserte Insulinsensitivität durch die Behandlung mit diesen Extrakten ist möglicherweise zumindest teilweise auf die Wirkung der Saponine zurück zu führen – und auf die Hemmung der PTP 1B durch die Saponine. Diese Wirkung ist vermutlich auch bei Saponinen anderer Nahrungsquellen zu finden. Samane et al. (2006) konnten zeigen, dass die Saponinfraktion aus *Argania*

spinosa ebenfalls das Insulinsignal verstärkt, und zwar über eine insulinabhängige Aktivierung der PKB in Hepatoma Zellen (Samane et al. 2006). Möglicherweise liegt die Erklärung dafür ebenfalls bei einer Hemmung der PTP 1B.

Im Fall der Saponinfraktion aus der Bittergurke war die Hemmung der PTP 1B reversibel durch das Reduktionsmittel DTT. Eine Hemmung der PTP 1B durch Oxidation des Cystein-Rests 215 (Cys 215) am aktiven Zentrum des Enzyms zur Sulfensäure ist deshalb wahrscheinlich. Der Cys 215 hat einen besonders niedrigen pK_a von 5,6, wodurch die nukleophilen Eigenschaften des Enzyms verstärkt werden. Der niedrige pK_a ist jedoch auch dafür verantwortlich, dass das Enzym besonders anfällig für die Oxidation und Hemmung durch ROS, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), ist (Denu und Tanner 1998). Der Cysteinrest wird dabei reversibel zur Sulfensäure oxidiert. Durch die Oxidation verliert der Cysteinrest seine nukleophilen Eigenschaften, was letztlich die Ursache für die Hemmung der PTP ist (Tonks 2003). Die Aktivität des Enzyms kann durch den Zusatz von DTT wieder hergestellt werden, indem DTT die Sulfensäure reduziert (Denu und Tanner 1998).

Obwohl die Saponinfraktion die Aktivität der PTP 1B im neutralen pH Bereich signifikant im Vergleich zur Kontrolle hemmte, waren sowohl die PTP 1B-Aktivität im sauren pH Bereich als auch die Genexpression der PTP 1B bei den Saponin-behandelten Mäusen gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Hemmung der PTP 1B durch Bittergurken-Saponine scheint also zu einer Hochregulierung der Expression des Enzyms bereits auf Genebene zu führen. Entscheidend für die Insulinsensitivität eines Gewebes ist jedoch die native Aktivität. Diese war nach einer Behandlung mit der Saponinfraktion vermindert und stellt eine mögliche antidiabetische Wirkung dieser Fraktion dar.

Auch die Lipidfraktion der Bittergurke senkte tendenziell (p=0,07) die Aktivität der PTP 1B im Muskelzytosol der db/db Mäuse im Vergleich zur Kontrolle. Im Gegensatz zur Saponinfraktion führte die Lipidfraktion zu einer Hemmung, die nicht reversibel durch den Zusatz von DTT war. Die erste Vermutung, dass die Lipidfraktion die PTP 1B-Expression entweder auf Gen- oder auf Proteinebene reduziert, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Eine Messung der Aktivität im sauren Reaktionspuffer (pH=6,0) konnte auch bei den Mäusen, die mit der Lipidfraktion der Bittergurke behandelt worden waren, die Aktivität der PTP 1B im Muskel steigern. Im sauren pH Bereich war die PTP 1B-Aktivität der Lipidfraktion-behandelten Gruppe um 9% gegenüber der Kontrolle erhöht (p=0,062). Bei einem pH Wert von 6,0 hat die PTP

1B ca. 90% ihrer maximalen Aktivität erreicht und ist kaum anfällig für eine Hemmung durch Oxidation (Groen et al. 2005). Davon ausgehend, dass die Messung der PTP 1B-Aktivität im sauren pH Bereich ein Marker für die Expression des Enzyms darstellt, bestätigt dieses Resultat die Ergebnisse der Western Blots. Auch die Western Blots zeigten eine tendenziell (p=0,099) erhöhte Expression der PTP 1B im Muskel der Lipid-behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrolle. Auf der Genebene zeigte sich bei dieser Gruppe nur eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der Expression der PTP 1B im Vergleich zur Kontrolle.

Der Mechanismus, durch welchen die Bittergurken-Lipide die PTP 1B hemmen, konnte nicht geklärt werden. Eine Erklärung ist, dass Bittergurken-Lipide die PTP 1B irreversibel hemmen. Der Cys 215 am aktiven Zentrum der PTP 1B kann nicht nur reversibel zur Sulfensäure, sondern auch irreversibel zur Sulfinsäure oder zur Sulfonsäure oxidiert werden, was eine irreversible Hemmung bedeutet (Salmeen et al. 2003, Denu und Tanner 1998). Eine irreversible Hemmung könnte auch die leicht erhöhte PTP 1B-Expression im Muskel bei diesen Mäusen erklären.

Auffällig ist außerdem, dass alle Bittergurken-behandelten Gruppen im Mittel eine höhere PTP 1B-Aktivität im sauren pH Bereich aufweisen im Vergleich zur Kontrolle. Dieser Unterschied ist jedoch nur für die Behandlung mit der ganzen Frucht signifikant. Die erhöhte Expression könnte dabei eine Reaktion auf die Hemmung des Enzyms sein, auch wenn diese nicht bei allen Gruppen signifikant war.

Da es keine signifikante Korrelation zwischen nativer PTP 1B-Aktivität und dem KG nach fünfwöchigem Versuch gab **(Tabelle 21)**, ist der Einfluss der Bittergurke auf die PTP 1B unabhängig vom KG der Mäuse.

Auch wenn sich der Mechanismus der Hemmung der PTP 1B durch die Bittergurke mit den Ergebnissen dieser Arbeit nicht aufklären lässt, ist es ein wichtiges Ergebnis, dass Bittergurken-Saponine bzw. –Lipide die PTP 1B zu regulieren scheinen. Die Autoren Delibegovic et al. (2007) konnten belegen, dass ein kompletter oder 50%iger muskelspezifischer Knock-out der PTP 1B bei Mäusen unter *high fat diet* (55% (w/w) Fett) oder normaler Diät zu verminderten Blutglucose- und Insulinspiegeln sowie zu einer verbesserten Glucoseclearance und Insulinsensitivität führt, ohne Einfluss auf das KG der Mäuse. Diese Autoren zeigten, dass verminderte PTP 1B-Level im Skelettmuskel zu einer verbesserten Insulinsensitivität des gesamten Körpers führen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Korrelation zwischen PTP 1B-Aktivität und HbA_{1C}-Werten festgestellt werden. Vermutlich sind auch noch andere

biochemische Mechanismen an der antidiabetischen Wirkung der Bittergurke beteiligt.

4.5 Aktivierung von Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren

Hinweise zur Aktivierung von PPARs als Erklärung für die insulinsensitivierende und gewichtsreduzierende Wirkung der Bittergurke lieferten unter anderem die Autoren Chan et al. (2005). Diese Autoren untersuchten die Wirkung eines gefriergetrockneten Bittergurken-Safts an normalen männlichen Sprague-Dawley Ratten, welche über den Versuchszeitraum von 6 oder 7 Wochen eine *high fat* (30 g Fett/100g) oder *low fat diet* (7g Fett/100g) jeweils mit oder ohne Zusatz von 0,75%, 1% oder 1,25% des Bittergurken-Pulvers verabreicht bekamen. Der Bittergurken-Zusatz führte bei den Tieren mit *high fat diet* signifikant (p<0,05) zu einer geringeren Gewichtszunahme und zu einem geringeren TG-Gehalt in Leber und Muskel bei gleicher Energieaufnahme. Diese verminderte Energieeffizienz durch die Gabe der Bittergurke ging einher mit signifikant (p<0,05) verminderten Blutglucose- und Insulinspiegeln. Untersuchungen zur Aktivität von Enzymen der β-Oxidation an Leber und Muskulatur zeigten, dass die Bittergurke die Aktivitäten von Carnitin-Palmitoyltransferase I (transportiert LCFA in die Mitochondrienmatrix zur β-Oxidation) und Acyl CoA Dehydrogenase signifikant (p<0,05) erhöhte, was die geringeren TG-Gehalte in diesen Organen erklärt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Zusatz der Bittergurke bei fettreicher Ernährung und Übergewicht die Adiponektinlevel im Serum normalisierte. Die Beeinflussung von Enzymen der β-Oxidation und der Adiponektinspiegel deutet auf eine Aktivierung von PPARs durch die Bittergurke hin. In diesem Zusammenhang untersuchten die Autoren die mRNA-Expression von PPARγ Coaktivator-1α, dessen Expression durch den Zusatz der Bittergurke erhöht wurde. Die Expression von PPARγ Coaktivator-1α korrelierte dabei positiv mit der Expression von Uncoupling Protein (UCP) 1 und 3.

Roffey et al. (2007) untersuchten außerdem im *in vitro* Modell die Wirkung von 0,2 mg/mL eines wasserlöslichen Extraktes der Bittergurke in An- und Abwesenheit von 0,5 nM Insulin sowie von 0,5 nM Insulin allein auf die Adiponektin-Ausschüttung kultivierter 3T3-L1 Adipozyten. Die Bittergurke erhöhte in diesem Versuch besonders

in Anwesenheit von Insulin die Sekretion von Adiponektin signifikant (p<0,05), während Insulin allein die Adiponektin-Sekretion nicht signifikant beeinflusste.

Konkrete Untersuchungen zur PPAR-Aktivierung durch die Bittergurke hatten bereits die Autoren Chao und Huang (2003) durchgeführt. Diese Autoren untersuchten in ihrer Arbeitsgruppe die Wirkung Ethylacetat-löslicher Substanzen verschiedener Pflanzenteile und Sorten der Bittergurke. Im *in vitro* Modell konnte nachgewiesen werden, dass Extrakte der Bittergurke mit unpolaren Lösungsmitteln wie Ethylacetat oder n-Hexan sowohl PPARα als auch PPARγ aktivieren. Die Aktivierung der PPARs im Transaktivierungs-Assay war dabei vergleichbar mit einer Aktivierung durch die etablierten PPARα- bzw. PPARγ-Agonisten Wy-14643 und BRL-49653. Die stärkste Wirkung in Bezug auf die PPAR-Aktivierung zeigten Extrakte der gesamten Frucht im Vergleich zu Extrakten des Samens oder des Fruchtfleisches allein. Bezüglich der Sorte konnten für die Sorten *wild bittergourd* und *green bittergourd* die stärksten Wirkungen nachgewiesen werden, während die Sorten *white bittergourd* und *pearl bittergourd* etwas schlechter bewertet wurden hinsichtlich ihrer PPAR-aktivierenden Eigenschaften. Zusätzlich wurden isolierte Leberkarzinomzellen (H4IIEC3) mit einem Ethylacetat-Extrakt der gesamten Frucht der *wild bittergourd* inkubiert und die Wirkung des Extraktes auf die Aktivität der Acyl CoA Oxidase sowie auf die mRNA-Expression von Acyl CoA Oxidase und FABP untersucht. Die mRNA-Expression der Acyl CoA Oxidase und des FABP, beides Gene, die über PPARα reguliert werden, konnten durch die Inkubation mit dem Extrakt der Bittergurke erhöht werden. Weiterhin erhöhte der Extrakt in diesen Zellen die Aktivität der Acyl CoA Oxidase (Chao und Huang 2003). Im Anschluss an diese Untersuchungen identifizierten Chuang et al. (2006) aus der selben Arbeitsgruppe 9c-,11t-,13t CLN als diejenige Substanz, die im Ethylacetat-Extrakt der Bittergurke entscheidend an der Aktivierung von PPARα und PPARγ beteiligt ist.

Ausgehend von dem Potenzial der Bittergurke, PPARα und γ zu aktivieren untersuchten die Autoren Huang et al. (2008) die Wirkung der Bittergurke auf Parameter der Glucosetoleranz und des Fettstoffwechsels in zwei unabhängigen *in vivo* Experimenten mit männlichen sechs Wochen alten Wistar Ratten. Die Autoren verwendeten dazu gefriergetrocknete und gemahlene Früchte der Sorte *wild bittergourd*. Das Pulver wurde zu 5% einer fettreichen Diät mit 30% Fett beigemischt. Zum Vergleich dienten eine fettarme Diät mit 5% Fett sowie eine fettreiche Diät mit oder ohne Zusatz von 0,01% Pioglitazon.

Sowohl der Zusatz der Bittergurke als auch der Zusatz von Pioglitazon reduzierten unter fettreicher Ernährung die Plasmainsulinspiegel und verbesserten die Glucosetoleranz signifikant (p<0,05). Blutglucosespiegel konnten signifikant (p<0,05) auf das Niveau der Gruppe mit fettarmer Ernährung gesenkt werden.

Die Bittergurke zeigte jedoch im Vergleich zum Pioglitazon nicht die typischen Nebenwirkungen von TZD, wie gesteigertes KG und vermehrte inguinale Fettgewebsmasse. Darüber hinaus senkte die Bittergurke signifikant (p<0,05) den TG-Gehalt, den Anteil großer Adipozyten (>180 µm) sowie die Masse des viszeralen Fettdepots auf das Niveau der fettarm ernährten Tiere. Weiterhin untersuchten die Autoren die Wirkung der Bittergurke als Zusatz zu einer fettreichen Ernährung auf die Expression lipogener Gene im Vergleich zu einer fettreichen und einer fettarmen Ernährung ohne Bittergurken-Zusatz. Dabei war die Expression der *fatty acid synthase* (FAS) nach Bittergurken-Gabe signifikant (p<0,05) niedriger als nach fettreicher Ernährung ohne Bittergurken-Zusatz. Der Zusatz des Bittergurken-Pulvers reduzierte weiterhin die Expression von ACC, der LPL und des Adipozyten Proteins 2 (aP2; synonym zu FABP) signifikant (p<0,05) gegenüber den fettreichen und fettarmen Diäten ohne Bittergurke.

Im Gegensatz dazu erreichten die Autoren Nerurkar et al. (2008) bei Mäusen mit fettreicher Diät (58,0 kJ% Fett) nach 16 Wochen in der Leber eine erhöhte Expression von PPARα im Vergleich zu Kontrolltieren mit normaler Diät (4,8 kJ% Fett). Die Zugabe eines getrockneten Bittergurken-Safts zur fettreichen Diät (1,5% (w/w)) reduzierte die Expression von PPARα auf den Level der Kontrolltiere. Dieses Ergebnis widerspricht den Ergebnissen von Chao und Huang (2003), allerdings gehen diese Autoren von einer PPARα-Aktivierung aus (Nerurkar et al. 2008).

Um ebenfalls die Aktivierung von PPARα und γ bei den db/db Mäusen zu untersuchen wurden mittels RT-PCR im Fettgewebe die Expression von Adiponektin und Resistin sowie in den Lebern die Expression der Acyl CoA Dehydrogenase differentiell untersucht.

Der PPARγ ist vor allem im Fettgewebe exprimiert (Jay und Ren 2007) und erhöht bei seiner Aktivierung die Genexpression von Adiponektin, während die Expression von Resistin vermindert wird (Semple et al. 2006, Staiger und Häring 2005, Hube und Hauner 1999).

Genexpression von Adiponektin im Fettgewebe

Adiponektin ist ein adipozytenspezifisches Protein und korreliert negativ mit der Fettgewebsmasse bzw. viszeraler Fettzellmasse (Chan et al. 2005, Semple et al. 2006). Insulinsensitivität von Skelettmuskulatur und Leber werden durch Adiponektin verbessert (Ohmura et al. 2007, Semple et al. 2006). Verminderte Adiponektinlevel im Serum bei Übergewicht begünstigen langfristig über erhöhte Level von Glucose und FFA im Serum eine Insulinresistenz. Obwohl in der Literatur zahlreiche Belege zu finden sind, dass die Bittergurke einen Einfluss auf die Adiponektinkonzentration im Serum und die Ausschüttung aus dem Fettgewebe hat (Chan et al. 2005, Roffey et al. 2007), konnte im Ernährungsversuch mit db/db Mäusen keine Regulation von Adiponektin auf Genexpressionsebene bestätig werden. Es zeigte sich zwar nach Behandlung mit der Bittergurke oder ihren Fraktionen eine leicht erhöhte Adiponektin-Expression im Fettgewebe im Vergleich zur Kontrolle, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die Gruppe, die mit der Lipidfraktion behandelt worden war, zeigte nach RT-PCR die höchste Adiponektin-Expression. Auch mittels Microarray-Analyse konnte keine Regulation von Adiponektin auf Genebene nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Regulation von Adiponektin durch die Bittergurke erst bei höheren Dosen nachweisbar. Im Versuch von Chan et al. (2005) war die Dosierung bezogen auf das KG zweieinhalb- bis vierfach höher verglichen zur Dosierung im Ernährungsversuch mit db/db Mäusen.

Genexpression von Resistin im Fettgewebe

Eine verminderte Genexpression von Resistin im Fettgewebe stellt ebenfalls einen Marker für eine Aktivierung von PPARγ dar. Nerurkar et al. (2010) konnten an humanen Präadipozyten und Shih et al. (2008) bei Mäusen mit *high fat diet* zeigen, dass ein Bittergurken-Saft bzw. Extrakte der Bittergurke die mRNA-Expression von Resistin jeweils verminderten.

In humanen Präadipozyten war diese Wirkung jedoch erst ab einer Konzentration von 2% des Bittergurken-Safts im Medium nachweisbar und nicht bei Konzentrationen von 0,5 oder 1%. Der Bittergurken-Saft aus Früchten ohne Samen enthält möglicherweise Substanzen, die in der wasserlöslichen Fraktion zu finden sind. Im Ernährungsversuch mit db/db Mäusen zeigen die Microarray-Ergebnisse die höchste Expression von Resistin bei der Kontrollgruppe und die niedrigste bei der Gruppe, welche die wasserlösliche Fraktion der Bittergurke bekommen hatte. Im

Vergleich zur Kontrolle war die Expression von Resistin bei den Mäusen, die mit der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke behandelt worden waren, signifikant geringer. Dieses Ergebnis bestätig die Ergebnisse von Nerurkar et al. (2010) und Shih et al. (2008), konnte aber durch die Ergebnisse aus der RT-PCR nicht verifiziert werden. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen keine Regulation von Resistin auf Genexpressionsebene. Zur Auswertung der Genexpression werden bei den Microarrays Expressionen einzelner Gene nicht im Vergleich zu einem Referenzgen wie β Aktin angegeben, sondern im Vergleich zur Gesamtexpression aller Gene, weshalb die Daten nicht vollständig vergleichbar sind. Beim Vergleich der Sequenzen fiel außerdem auf, dass die untersuchten Sequenzen sich nicht vollständig entsprechen. Bei den Microarrays handelt es sich um die mRNA-Sequenz von *Mus musculus resistin (Retn)* mit der Accession NM_022984, während bei der RT-PCR die Sequenz von *Mus musculus resistin mRNA (complete cds)* mit der Accession AF323080 untersucht wurde. Die Tatsache, dass unterschiedliche Sequenzen untersucht wurden, kann eine Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse darstellen.

Eine verminderte Expression von Resistin durch die Bittergurke würde einen positiven Effekt auf die Insulinresistenz bedeuten, weil Resistin eine Insulinresistenz begünstigt, während reduzierte Resistinlevel die Blutglucosespiegel und das Insulinsignal verbessern. Resistin-Plasmalevel korrelieren dabei positiv mit der mRNA-Expression von Resistin im Fettgewebe (Nerurkar et al. 2010). Nerurkar et al. (2010) gehen weiterhin davon aus, dass eine verminderte Expression von Resistin einen Marker für eine verminderte Adipozytendifferenzierung darstellen könnte.

Weitere Markergene

In der Literatur finden sich Hinweise auf verschiedene weitere Gene, die mit der Aktivierung von PPARs assoziiert sind und deren Genexpression durch eine Behandlung mit der Bittergurke beeinflusst wurden. Die umfangreiche Genexpressions-Analyse mittels Microarray machte es möglich, diese Daten aus der Literatur anhand von Daten aus dem Ernährungsversuch mit db/db Mäusen zu überprüfen.

Die Daten aus der Microarray-Analyse zeigen, dass nur sieben Gene, von insgesamt dreizehn, die in der Literatur beschrieben werden, im Ernährungsversuch mit db/db Mäusen durch eine Behandlung mit der Bittergurke signifikant reguliert wurden. Im

Fall von PPARγ konnte eine Behandlung mit der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke die Expression im Fettgewebe vermindern, was den Ergebnissen von Nerurkar et al. (2010) entspricht. Diese Autoren verwendeten einen Saft aus Früchten ohne Samen. Die wirksamen Komponenten scheinen deshalb möglicherweise denen der wasserlöslichen Fraktion zu entsprechen. Weiterhin verminderte die wasserlösliche Fraktion die Expression des FABP, der FAS und der LPL sowie die Expression von Resistin und Leptin im Fettgewebe der db/db Mäuse. Dieses Ergebnis bestätigt Daten von Huang et al. (2008) und Shih et al. (2008), die ebenfalls eine verminderte Expression dieser Gene nach einer Behandlung mit der Bittergurke bei Ratten bzw. Mäusen mit *high fat diet* nachweisen konnten. Die LPL wurde außerdem durch die Lipidfraktion und die Saponinfraktion im Fettgewebe von db/db Mäusen im Vergleich zur Kontrolle vermindert exprimiert sowie das FABP durch die Lipidfraktion.

Bezüglich der Regulation von UCP 3 widersprechen die Daten aus dem Versuch mit db/db Mäusen teilweise den Ergebnissen von Chan et al. (2005). Während die Behandlung mit der Lipidfraktion oder der wasserlöslichen Fraktion die Expression des UCP 3 im Fettgewebe von db/db Mäusen verminderte, zeigte eine Behandlung mit der Bittergurke eine erhöhte Expression dieses Gens bei Ratten mit *high fat diet* (Chan et al. 2005).

Tabelle 24: Regulation von Genen, die mit Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) assoziiert sind, im Fettgewebe von db/db Mäusen nach Microarray-Analyse im Vergleich zu Daten aus der Literatur, nach denen die entsprechenden Gene durch die Bittergurke hoch (+) oder runter (-) reguliert wurden

Gen	Ganze Frucht	Lipid-fraktion	Saponin-fraktion	Wasserl. Fraktion	Literatur	
PPARγ	-0,0189^{ns}	-0,0951^{ns}	-0,0946^{ns}	-0,3415**	Nerurkar et al. (2010)	-
PPARα	-0,1850^{ns}	-0,2707^{ns}	-0,1117^{ns}	-0,3929^{ns}	Nerurkar et al. (2008)[1]	-
PPARγ Coactivator-1a	0,0678^{ns}	-0,0398^{ns}	0,2135^{ns}	-0,2172^{ns}	Chan et al. (2005)	+
Uncoupling Protein 1	0,0554^{ns}	0,02008^{ns}	0,07189^{ns}	0,09167^{ns}	Chan et al. (2005)	+
Uncoupling Protein 3	-0,1956^{ns}	-0,42**	-0,2386^{ns}	-0,4575**	Chan et al. (2005)	+
Fatty acid binding protein[2, 3]	-0,0039^{ns}	-0,1258^{ns}	0,0040^{ns}	-0,0801^{ns}	Huang et al. (2008)	-
	0,0086^{ns}	-0,0753^{ns}	0,0099^{ns}	-0,0524^{ns}		
	-0,0063^{ns}	-0,5148*	-0,1821^{ns}	-0,5187*		
Fatty acid synthase[2]	-0,4942^{ns}	-0,5836^{ns}	-0,6338^{ns}	-1,311***	Huang et al. (2008)	-
	-0,0782^{ns}	-0,0647^{ns}	-0,0738^{ns}	-0,0576^{ns}		
Acetyl CoA Carboxylase[2]	-0,1333^{ns}	-0,2416^{ns}	-0,2000^{ns}	-0,2196^{ns}	Huang et al. (2008)	-
	-0,1498^{ns}	-0,1254^{ns}	-0,0033^{ns}	-0,0224^{ns}		
Lipoproteinlipase[2]	-0,2574^{ns}	-0,56*	-0,5803*	-1,137***	Huang et al. (2008)	-
	0,03647^{ns}	0,0087^{ns}	-0,0126^{ns}	-0,0167^{ns}		
Perilipin	0,1444^{ns}	0,02048^{ns}	-0,0524^{ns}	0,2150^{ns}	Nerurkar et al. (2010)	-
Sterol regulatory element-binding protein	-0,0730^{ns}	0,1789^{ns}	-0,0830^{ns}	-0,0592^{ns}	Nerurkar et al. (2010)	-
Resistin[2]	-0,0528^{ns}	-0,0947^{ns}	-0,2414^{ns}	-0,4735*	Shih et al. (2008)	-
	-0,1233^{ns}	-0,2663^{ns}	-0,2727^{ns}	-0,6440**		
Leptin	0,2360^{ns}	-0,2898^{ns}	-0,4292^{ns}	-1,073***	Shih et al. (2008)	-

[1] Proteinexpression in der Leber
[2] mehrere Sonden auf dem Array
[3] In Huang et al. (2008) als Adipozyten Protein 2 bezeichnet
* $p \leq 0,1$, ** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,01$

Auch wenn *in vitro* Daten von Chao und Huang (2003) eine Aktivierung von PPARs durch die Bittergurke belegen konnten, scheinen viele Daten aus der Literatur (Huang et al. 2008, Nerurkar et al. 2010) und dem Versuch mit db/db Mäusen eher auf eine Wirkung der Bittergurke auf die Adipozytenhypertrophie oder –differenzierung zu deuten. Der Unterschied dieser Untersuchungen liegt möglicherweise darin, dass Chao und Huang (2003) die Aktivierung von PPARs in Leberzellen untersuchten, während die anderen Daten vorwiegend aus dem Fettgewebe stammten.

Die Aktivierung von PPARα wurde deshalb ebenfalls in den Lebern der db/db Mäuse nach Behandlung mit der Bittergurke untersucht.

Genexpression der Acyl CoA Dehydrogenase in der Leber

Die Genexpression der Acyl CoA Dehydrogenase in der Leber stellt einen Marker für die Aktivierung von PPARα dar. *In vitro* aktivierten Bittergurken-Extrakte mit unpolaren Lösungsmitteln den PPARα im Transaktivierungs-Assay vergleichbar mit einer Aktivierung durch den etablierten PPARα-Agonisten Wy-14643. Zusätzlich erhöhten die Extrakte in isolierten Leberkarzinomzellen (H4IIEC3) die Aktivität der Acyl CoA Oxidase sowie die mRNA-Expression von Acyl CoA Oxidase und FABP (Chao und Huang 2003). Im Ernährungsversuch mit db/db Mäusen konnte dieses Ergebnis nicht eindeutig bestätigt werden. Zwar zeigten alle behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrolle eine leicht erhöhte Expression der Acyl CoA Dehydrogenase in der Leber, diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Obwohl *in vitro* vor allem Extrakte mit unpolaren Lösungsmitteln wirksam waren (Chao und Huang 2003), zeigte die Lipidfraktion im Versuch mit db/db Mäusen im Vergleich aller Behandlungsgruppen die geringste Wirkung auf die Expression der Acyl CoA Dehydrogenase.

Aufgrund der starken Schwankungen bei der Genexpression der Acyl CoA Dehydrogenase in den Lebern der db/db Mäuse können weitere Untersuchungen mit einer höheren Gabe der Bittergurke und einer höheren Anzahl an Versuchstieren möglicherweise genaure Daten zur Aktivierung des PPARα liefern.

Zu den Prozessen, die der PPARα reguliert, gehören vor allem Prozesse des Fettstoffwechsels wie die β-Oxidation, deren Schlüsselenzym die Acyl CoA Dehydrogenase ist. Da in der Literatur verschiedene Hinweise zu finden sind, dass eine Behandlung mit der Bittergurke günstig auf das Plasmalipidprofil wirkt (Nerurkar et al. 2008, Sridhar et al. 2008), kommt eine Aktivierung von PPARα als Mechanismus in Frage.

Möglicher Zusammenhang zwischen PTP 1B und PPARs

Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen PTP 1B-Expression und PPAR-Aktivierung lieferten unter anderem die Autoren Wu et al. (2005). Diese Autoren untersuchten die Auswirkung einer Behandlung mit Rosiglitazon, einem Arzneistoff der Gruppe der TZD, auf die Regulation der PTP 1B an je 24 männlichen acht Wochen alten normalen sowie *high fat diet* und STZ-induzierten Typ II diabetischen Sprague-Dawley Ratten. Je zwölf stoffwechselgesunde und diabetische

Tiere bekamen über den Versuchszeitraum von zwei Wochen eine tägliche orale Dosis von 10 µmol Rosiglitazon pro kg KG verabreicht.

Insulinsensitivitätstests mit Kontrolle der Blutglucosespiegel vor bzw. 10, 20, 30 und 60 Minuten nach einer intravenösen Gabe von 2 U Insulin pro kg KG ergaben eine signifikant (p<0,05) um 39% erhöhte Insulinsensitivität bei den diabetischen Tieren nach Rosiglitazon-Behandlung im Vergleich zu den unbehandelten diabetischen Tieren. Gleichzeitig wurden andere Parameter wie Blutglucosespiegel und KG bei diesen Tieren durch Rosiglitazon verbessert. Untersuchungen am Muskelgewebe der Tiere zeigten eine signifikant (p<0,05) erhöhte insulinabhängige Glucoseaufnahme in diese Zellen nach einer Behandlung mit Rosiglitazon. Gleichzeitig reduzierte Rosiglitazon im Muskel die PTP 1B-Proteinexpression um 34% und die PTP 1B-Aktivität um 30% im Vergleich zu den unbehandelten diabetischen Tieren. Weiterhin war im Muskel die Insulin-stimulierte Tyrosinphosphorylierung am IR und am IRS 1 durch die Behandlung mit Rosiglitazon bei den diabetischen Tieren erhöht, ohne Einfluss auf die Expression von IR und IRS 1. Im Gegensatz zum Muskel zeigte eine Behandlung mit Rosiglitazon jedoch keinen Einfluss auf die Insulinsensitivität und die Glykogensyntheserate sowie auf die PTP 1B-Expression oder -Aktivität der Leber (Wu et al. 2005).

Weiterhin kann die PTP 1B möglicherweise durch eine erhöhte Aktivierung von PPARα gehemmt werden. Durch die erhöhte Expression und Aktivität der Acyl CoA Oxidase nach PPARα-Aktivierung kommt es zu einer vermehrten FS-Oxidation und erhöhten Spiegeln an H_2O_2 in der Leber, was wiederum zu einer Hemmung der PTP 1B führen kann. Genaure Untersuchungen zum Zusammenhang von PTP 1B und der Aktivierung von PPARs sind noch nötig.

4.6 Regulation der Genexpression im Fettgewebe

Pathway-Analysen

Die Behandlung mit den unterschiedlichen Extrakten der Bittergurke bzw. mit dem Fruchtpulver führte im Fettgewebe der db/db Mäuse zu einer signifikanten Regulierung des Insulinsignals auf der Genexpressionsebene. Da die HbA_{1C}-Werte der Mäuse auf eine erhöhte Insulinsensitivität durch die Behandlung mit der Bittergurke hinweisen und die regulierten Gene des Insulinsignals weitestgehend

durch alle Behandlungen in die selbe Richtung reguliert wurden, scheint eine Verbesserung des Insulinsignals durch die Bittergurke auf dieser Ebene wahrscheinlich. Bei alleiniger Betrachtung der Pathwayanalyse ist jedoch trotz Vergleichen mit Datenbanken eine genaue Aussage, ob das Insulinsignal durch diese Regulation verstärkt oder abgeschwächt wird bzw. darüber, ob der Effekt der Bittergurke sich positiv auf die Insulinresistenz auswirkt oder nicht, nicht möglich.
Das gleiche gilt für die weiteren signifikant regulierten KEGG Pathways, wie der *PPAR signaling pathway*, der *adipocytokine pathway*, der *fatty acid metabolism* oder der *starch and sucrose metabolism*. Diese Pathways sind jedoch relevant bei der Identifizierung des biochemischen Mechanismus, der einer verbesserten Insulinsensitivität und einer verminderten Gewichtszunahme nach einer Behandlung mit der Bittergurke zugrunde liegt. Die Ergebnisse der Pathwayanalyse stellen deshalb eine interessante Grundlage zur Entwicklung weiterer Forschungsansätze dar. Zusätzlich zur Pathwayanalyse auf der Genexpressionsebene müssen weitere Untersuchungen dieser Signalwege auf Protein- und Aktivierungsebene durchgeführt werden.

Differentielle Genexpression einzelner Gene

Abgesehen von den signifikant regulierten KEGG Pathways zeigten sich nach der Genexpressionsanalyse mittels Microarray einige stark und signifikant regulierte Gene, die eine bedeutende Rolle im Fettgewebe spielen. Es handelt sich um die Gene zu GATA 2 und 3, der AKR1B7 und des CEBPD.
GATA 2 und 3 sind Transkriptionsfaktoren, die ausschließlich an bestimmte DNA-Sequenzen, nämlich (A/T)GATA(A/G), binden. Die mRNA-Expression von GATA 2 und 3 ist in Präadipozyten im Vergleich zu differenzierten Adipozyten erhöht. Außerdem konnte gezeigt werden, dass diese Transkriptionsfaktoren durch Unterdrücken der Expression und Aktivierung von PPARγ einer Adipozytendifferenzierung entgegen wirken. Im Vergleich zu gesunden Wildtyp Mäusen ist die Expression in ob/ob, db/db, tub/tub und KKAy Mäusen sowie bei Diät-induziertem Übergewicht herunter reguliert (Tong et al. 2000, Moraes et al. 2003). Nach allen Behandlungen mit der Bittergurke, besonders mit der wasserlöslichen Fraktion, war die Genexpression von GATA 3 im Fettgewebe der db/db Mäuse im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die Regulation von GATA 2 war durch die Behandlungen mit der Bittergurke und den Fraktionen der Bittergurke weniger stark.

Die wasserlösliche Fraktion der Bittergurke erhöhte die Expression von GATA 2 jedoch ebenfalls signifikant. Gleichzeitig zeigte die wasserlösliche Fraktion eine starke Wirkung auf die Expression der AKR1B7. Die Genexpression dieses Enzyms war in dieser Gruppe ebenfalls signifikant erhöht. Die AKR1B7 ist vorwiegend an der Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-abhängigen Reduzierung von Aldehyden und Ketonkörpern zum korrespondierendem Alkohol beteiligt. Außerdem ist die AKR1B7 bekannt für ihre schützende Wirkung vor oxidativem Stress und Folgeerkrankungen bei Diabetes. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die AKR1B7-Genexpression im Fettgewebe bei Übergewicht und unter fettreicher Ernährung vermindert ist (Tirard et al. 2007). Die erhöhte Expression der AKR1B7 spricht deshalb ebenfalls für eine verminderte Adipozytendifferenzierung nach einer Behandlung mit der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke.

Neben GATA 2 und 3 sowie AKR1B7 ist auch das CEBPD ein Markergen für Präadipozyten. Eine erhöhte Expression von CEBPD deutet ebenfalls auf einen geringeren Reife- und Differenzierungsgrad der Adipozyten hin **(Abbildung 19)**. Der Transkriptionsfaktor CEBPD war nach einer Behandlung mit der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle stärker exprimiert.

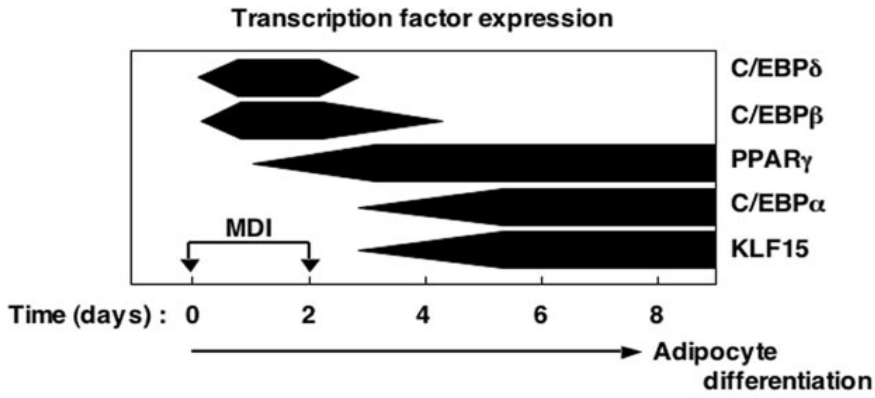


Abbildung 19: Expression von Transkriptionsfaktoren während der Adipozytendifferenzierung (Mori et al. 2005)

Wie **Tabelle 24** zeigt, war die Expression von PPARγ im Fettgewebe durch die Behandlung mit der Bittergurke bei den db/db Mäusen im Vergleich zur Kontrolle eher vermindert. Dies war jedoch nur für die wasserlösliche Fraktion signifikant. Eine verminderte Expression von PPARγ deutet ebenfalls auf eine verminderte Adipozytenreifung hin **(Abbildung 19)**. Insgesamt belegen die Ergebnisse der Microarray-Analyse eine hemmende Wirkung der Bittergurke, besonders der

wasserlöslichen Fraktion, auf die Adipozytendifferenzierung und –reifung. Dies stellt einen möglichen Erklärungsansatz für das signifikant geringere KG der Mäuse, die mit der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke behandelt worden waren, dar. Die Behandlung mit der Saponinfraktion der Bittergurke führte ebenfalls zu einer erhöhten Genexpression von GATA 3 und CEBPD. Tendenziell waren die beschriebenen Markergene für Präadipozyten auch in dieser Gruppe verstärk exprimiert.

Daten aus der Literatur (Huang et al. 2008, Nerurkar et al. 2010) bestätigen die Vermutung, dass die Bittergurke einer Adipozytendifferenzierung und -reifung entgegen wirkt. *In vitro* konnten Nerurkar et al. (2010) diese Wirkung mit einem Bittergurken-Saft aus Früchten ohne Samen an humanen Präadipozyten belegen. Die Zellen wurden dazu in einem Differenzierungsmedium für 14 Tage mit einem Zusatz von 0,5, 1 oder 2% Bittergurken-Saft zum Medium behandelt. Durch die Behandlung wurde dosisabhängig der Gehalt an Lipiden und TG vermindert sowie die mRNA-Expression von PPARγ und *sterol regulatory element-binding protein 1c* (SREBP-1c) (Nerurkar et al. 2010). Im Ernährungsversuch mit db/db Mäusen konnte jedoch anhand der Microarray-Daten keine Regulation von SREBP-1c im Fettgewebe durch die Bittergurke auf Genexpressionsebene festgestellt werden **(Tabelle 24)**.

Eine Regulation von Markergenen für unreife Adipozyten zeigte sich vor allem bei den Mäusen, die mit der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke behandelt worden waren, während die Saponin- und Lipidfraktionen eher eine hemmende Wirkung auf die PTP 1B im Muskelzytosol der Mäuse hatten. Ein Zusammenhang zwischen den Parametern PTP 1B und Fettstoffwechsel ist trotzdem denkbar.

Rondinone et al. (2002) konnten an diabetischen ob/ob Mäusen zeigen, dass verschiedene Gene des Fettstoffwechsels und der Lipogenese durch die PTP 1B beeinflusst wurden. Die Behandlung mit ASO zur Unterdrückung der PTP 1B-Expression verursachte eine Downregulierung verschiedener lipogener Gene. Hieraus resultierte eine verminderte Lipogenese und somit eine verminderte Entwicklung von Übergewicht bei den behandelten Tieren. Unter anderen handelte es sich dabei um die Gene SREBP1, FAS, LPL, PPARγ, die im Fettgewebe herunter reguliert wurden (Rondinone et al. 2002). Auch die Bittergurke scheint eine Wirkung auf diese Gene zu haben. Die Untersuchungen von Nerurkar et al. (2010) zeigten eine verminderte Expression von SREBP1 sowie des PPARγ nach Behandlung mit

der Bittergurke. Huang et al. (2008) konnten eine reduzierte Genexpression der FAS und der LPL belegen. Die wasserlösliche Fraktion der Bittergurke reduzierte im Ernährungsversuch mit db/db Mäusen ebenfalls die Genexpression von PPARγ, FAS und LPL. Die Saponin- und die Lipidfraktionen reduzierten die Genexpression der LPL.

Die Ergebnisse von Rondinone et al. (2002) machen außerdem den starken Zusammenhang zwischen reduzierter Gewichtszunahme bei einem Mausmodell mit genetisch bedingtem Übergewicht und einer reduzierten Genexpression dieser Gene deutlich. Die Microarray-Daten sind deshalb ein wichtiger Erklärungsansatz für das signifikant geringere KG der db/db Mäuse, die mit der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke behandelt worden waren.

Beim Menschen ist die Entwicklung von Diabetes mellitus Typ II stark mit vermehrtem viszeralen Fettgewebe assoziiert. Die Reduzierung viszeraler Fettdepots ist deshalb eine mögliche Ursache für die verbesserte Insulinsensitivität durch die Bittergurke. Außerdem sind kleine unreife Adipozyten insulinsensitiver und sezernieren weniger TNFα und andere ungünstige Adipozytokine als große Adipozyten (Tsuchida et al. 2005).

4.7 Antioxidative Wirkung der Bittergurke

Bei Diabetes kommt es verstärkt zu oxidativem Stress und Lipidperoxidation, was die typischen Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus bedingt (Dhar et al. 2006a). Als Marker für oxidativen Stress und Lipidperoxidation wurde die Konzentration von TBA-RS in Leber, Muskel und Fettgewebe der Mäuse bestimmt. Die Lipid- und die Saponinfraktionen der Bittergurke reduzierten die Konzentration an TBA-RS im Fettgewebe der db/db Mäuse signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Die Konzentration der TBA-RS war im Fettgewebe bezogen auf den Proteingehalt zehnmal höher im Vergleich zum Skelettmuskel, was am geringen Proteingehalt des Fettgewebes liegt. Bezogen auf das Gewebe waren die Konzentrationen von Fettgewebe, Leber und Muskel vergleichbar. Die Wirkung der Bittergurke auf die Konzentration an TBA-RS im Fettgewebe war unabhängig von verminderten Blutglucosespiegeln. Zwischen der TBA-RS-Konzentration im Fettgewebe und den HbA_{1C}-Werten konnte keine signifikante Korrelation beobachtet werden.

Die Lipidfraktion der Bittergurke enthält hohe Konzentrationen an 9c-,11t-,13t CLN (**4.9**, Suzuki et al. 2001), was möglicherweise für die Wirkung dieser Fraktion auf die Konzentration von TBA-RS verantwortlich ist. *In vitro* zeigte die Zugabe von 0,05% dieser FS aus dem Samen der Bittergurke einen effektiven Schutz vor Lipidperoxidation, gemessen als Konzentration an TBA-RS, im Plasma, in LDL und VLDL Partikeln sowie in Erythrocytenmembranen von diabetischen und gesunden Patienten. Der Schutz vor Lipidperoxidation konnte in dieser Studie durch eine Erhöhung der 9c-,11t-,13t CLN Konzentration auf 0,1% sogar noch gesteigert werden (Dhar et al. 2006b). *In vivo* zeigte eine Gabe von 0,5% 9c-,11t-,13t CLN aus der Bittergurke im Fettanteil der Diät (20% Fett) bei Alloxan-diabetischen Ratten eine Verminderung der Lipidperoxidation in LDL Partikeln und in der Erythrozytenmembran (Dhar et al. 2006a). In dieser Studie von Dhar et al. (2006a) wurde die Wirkung von 9c-,11t-,13t CLN aus der Bittergurke bei Alloxan-diabetischen Ratten im Vergleich zu einer diabetischen und einer nicht diabetischen Kontrolle untersucht. Diese Autoren bestimmten ebenfalls die Konzentration an TBA-RS in den Lebern der Ratten. Die Höhe der Konzentration von TBA-RS in der Leber war bei Dhar et al. (2006a) im Mittel mit 18,3 nmol/g Leber höher als bei den db/db Mäusen dieser Studie mit 12,3 nmol/g Leber, was jedoch immer noch deutlich höher ist als bei der nicht diabetischen Kontrolle von Dhar et al. (2006a) mit 5,7 nmol/g Leber. Die Studie von Dhar et al. (2006a) zeigt eine signifikant erhöhte Konzentration von TBA-RS bei diabetischen Ratten im Vergleich zu gesunden. Die Behandlung mit 9c-,11t-,13t CLN hatte jedoch keinen Einfluss auf die Konzentration der TBA-RS in den Lebern, was den Ergebnissen bei db/db Mäusen nach Behandlung mit der Lipidfraktion oder den anderen Fraktionen der Bittergurke entspricht. Allerdings verstärkte die 9c-,11t-,13t CLN (0,25%) die Wirkung von 0,15% α-Tocopherol in der Diät bei der Reduzierung der Konzentration von TBA-RS in der Leber (Dhar et al. 2006a).

Auch für Saponine sind in der Literatur Belege für ihre antioxidative Wirkung zu finden. Nach einer Inkubation von isolierten Mikrosomen aus der Leber von hypertensiven Ratten für 15 Minuten mit Saponinen aus *Astragalus corniculatus* konnten diese die Konzentration von TBA-RS in den Mikrosomen um 40% senken. Bei einer Induzierung von oxidativem Stress durch Fe^{2+} oder Tetrachlormethan reduzierte die Inkubation mit Saponinen die Konzentration von TBA-RS um 25 bzw. 35% gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Simeonova et al. 2010). *In vivo* konnte

die achtwöchige orale Gabe von 6 oder 12 mg/kg KG eines Saponins aus *Astragalus membranaceus (Fisch.) Bunge* bei männlichen STZ-induzierten diabetischen Ratten die antioxidative Kapazität im Serum, gemessen als Katalase Aktivität und *total antioxidative capability*, effektiv verbessern (Yin et al. 2004).

Weiterhin zeigten Sathishsekar und Subramanian (2005) an STZ-diabetischen und normalen Wistar Ratten, dass eine tägliche orale Dosis von 150 mg/kg KG eines wässrigen Extraktes aus Bittergurken-Samen zu einer signifikant (p<0,05) geringeren Belastung durch oxidativen Stress in Plasma und Pankreasgewebe, gemessen als TBA-RS, führte. Diese Studie belegt, dass wasserlösliche Substanzen aus der Bittergurke *in vivo* effektiv vor Lipidperoxidation schützen. Diese Wirkung kann ebenfalls von Saponinen und/oder von Substanzen der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke ausgehen.

Die wasserlösliche Fraktion der Bittergurke reduzierte als einzige Fraktion die TBA-RS-Konzentration im Skelettmuskel der db/db Mäuse um 65% im Vergleich zur Kontrolle. Auch im Muskel konnte keine Korrelation zwischen HbA_{1C}-Werten und der TBA-RS-Konzentration beobachtet werden, was auf einen Schutz von Lipidperoxidation im Muskel durch die wasserlösliche Fraktion unabhängig von ihrer Wirkung auf die Blutglucosespiegel schließen lässt. Da die Bittergurke reich an Vitamin C ist (Njoroge und van Luijk 2004), könnte dies eine Erklärung für den Schutz vor Lipidperoxidation im Skelettmuskel durch die wasserlösliche Fraktion der Bittergurke sein.

Insgesamt belegen die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Studien (Dhar et al. 2006a, Sathishsekar und Subramanian 2005), dass eine Behandlung mit der Bittergurke über ihre diskutierte antidiabetische Wirkung hinaus, effektiv einer Lipidperoxidation und oxidativem Stress und somit entsprechenden Folgeerkrankungen von Diabetes vorbeugen kann.

Für einen hohen Gehalt an Antioxidanzien in der Bittergurke sprechen außerdem Ergebnisse von *in vitro* Untersuchungen, die zeigen, dass es eine Höchstgrenze für die insulinsensitivierende Wirkung der Bittergurke gibt (Cheng et al. 2008, Singh et al. 2004, Roffey et al. 2007). Eine erhöhte Gabe von Antioxidanzien und die damit verbundene Abnahme von H_2O_2 in den Zellen kann eine Insulinresistenz verstärken. Weil H_2O_2 an der Regulation und Hemmung der PTP 1B beteiligt ist, nimmt bei einer Elimination von H_2O_2 die Hemmung der PTP 1B ab und der Glucosetransport in die Zellen wird gehemmt (Müller et al. 2009). McClung et al. (2004) konnten zeigen, dass

eine erhöhte Expression der Glutathionperoxidase 1 in Mäusen über reduzierte H_2O_2-Level zu erhöhtem KG und zu einer verminderten Insulinsensitivität führte. Deshalb ist zwar eine ausreichende Versorgung mit Antioxidanzien bei Diabetes zur Prävention von entsprechenden Folgeerkrankungen wichtig, eine erhöhte Gabe von Antioxidanzien kann aber in Bezug auf eine Insulinresistenz auch negative Folgen haben.

4.8 Wirksamkeit unterschiedlicher Fraktionen der Bittergurke

Auch wenn im Ernährungsversuch mit db/db Mäusen keine der durchgeführten Behandlungen die Entwicklung einer Insulinresistenz verhinderte und die Parameter wie KG, Blutglucosespiegel, HbA_{1C}-Wert oder Glucosekonzentration im Urin normalisieren konnte, zeigten die Saponin- und die Lipidfraktionen eine stärkere Wirkung auf das KG und die Aktivität der PTP 1B im Muskel der Mäuse als die wasserlösliche Fraktion. Weiterhin konnten die Saponin- und die Lipidfraktionen effektiv die Lipidperoxidation im Fettgewebe reduzieren. Die Lipidfraktion war außerdem am effektivsten bei der Senkung der HbA_{1C}-Werte als Langzeitparameter für Blutglucosespiegel.

Auch Oishi et al. (2007) verglichen die Wirkung der Saponinfraktion mit der der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke auf die Hemmung intestinaler Disaccharidasen und der Pankreaslipase. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem die Saponinfraktion der Bittergurke dosisabhängig sowohl intestinale Disaccharidasen als auch die Pankreaslipase hemmte. Diese hemmende Wirkung der Bittergurken-Saponine führt zu einer verminderten Resorption von Fett und Monosacchariden im Darm (Oishi et al. 2007, Mahomoodally et al. 2004). Diese Wirkung der Saponinfraktion erklärt teilweise die verminderte Gewichtszunahme bei den db/db Mäusen, die mit der Saponinfraktion behandelt worden waren. Die positiven Wirkungen der Saponine sind jedoch nicht auf Saponine der Bittergurke beschränkt. Auch Saponine anderer Pflanzen zeigen antidiabetische Eigenschaften (Francis et al. 2002, Samane et al. 2006).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen, welche die Wirksamkeit der Bittergurken-Saponine belegen, konnten die Autoren Ali et al. (1993) diese Wirkung in ihrem Versuchsmodell nicht nachweisen. Im Vergleich von Methanolextrakten und saponinfreien Methanolextrakten aus einem Bittergurken-Saft bzw. der gesamten

Pflanze konnte nur für die saponinfreien Methanolextrakte nach akuter oraler Gabe eine Wirkung auf die Nüchtern-Blutglucosespiegel gesunder Ratten gezeigt werden. Da die Wirkung der Saponinfraktion nach den Ergebnissen des Ernährungsversuchs mit db/db Mäusen und anderer Studien vorwiegend auf die Hemmung der Glucoseaufnahme aus dem Darm (Oishi et al. 2007) oder auf die Verbesserung der Insulinsensitivität peripherer Organe zurückzuführen ist (Samane et al. 2006), widerspricht die Studie von Ali et al. (1993) diesen Ergebnissen nicht.

Zur Untersuchung der Lipidfraktion gibt es in der Literatur keine Daten zur Verbesserung der Insulinsensitivität aus *in vivo* Modellen. *In vitro* konnte allerdings gezeigt werden, dass Ethylacetat-lösliche Substanzen verschiedener Pflanzenteile und Sorten der Bittergurke sowohl PPARα als auch PPARγ aktivieren. Die Aktivierung der PPARs war vergleichbar mit einer Aktivierung durch die etablierten PPARα- bzw. PPARγ-Agonisten Wy-14643 und BRL-49653. Die stärkste Wirkung in Bezug auf die PPAR-Aktivierung zeigten Extrakte der gesamten Frucht im Vergleich zu Extrakten des Samens oder des Fruchtfleischs allein (Chao und Huang 2003). Im Anschluss an diese Untersuchungen identifizierten Chuang et al. (2006) aus der selben Arbeitsgruppe 9c-,11t-,13t-CLA als diejenige Substanz, die im Ethylacetat Extrakt der Bittergurke entscheidend an der Aktivierung von PPARα und PPARγ beteiligt ist. Im Ernährungsversuch mit db/db Mäusen konnte die Aktivierung der PPARs jedoch nicht nachgewiesen werden.

Neben Lipid- und Saponinfraktionen konnte auch die wasserlösliche Fraktion die exzessive Gewichtszunahme der db/db Mäuse gegenüber der Kontrolle signifikant vermindern. Ergebnisse der Microarray-Analyse liefern Hinweise auf den biochemischen Mechanismus dieser Wirkung. Die wasserlösliche Fraktion konnte außerdem die Konzentration an TBA-RS im Muskel der Mäuse reduzieren. Darüber hinaus reduzierte die wasserlösliche Fraktion ebenfalls HbA_{1C}-Werte und die PTP 1B-Aktivität im Muskel. Diese Ergebnisse waren zwar nicht signifikant, sind aber möglicherweise mit dem signifikant geringeren KG dieser Tiere im Vergleich zur Kotrolle zu begründen.

Zwar zeigen die Ergebnisse aus der Literatur und die aus dem Versuch mit db/db Mäusen, dass die Lipidfraktion und die Saponinfraktion die stärksten Wirkungen haben. Weil die Konzentration der wasserlöslichen Fraktion in der Bittergurke mit 19,95% jedoch höher ist als die der Saponinfraktion (3,68%) oder der Lipidfraktion

(5,05%), ist der Anteil der wasserlöslichen Fraktion an der Wirkung der ganzen Frucht nicht zu unterschätzen.

4.9 Konzentration antidiabetischer Inhaltsstoffe der Bittergurke

Daten aus der Literatur (Chao und Huang 2003, Oishi et al. 2007) und die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Lipid- und die Saponinfraktion eine stärkere Wirkung auf HbA_{1C}-Werte und KG zeigen als die wasserlösliche Fraktion oder die ganze Frucht. Deshalb wurden die Lipid- und die Saponinfraktionen in verschiedenen Sorten der Bittergurke quantifiziert und in diesen Fraktionen jeweils die Konzentrationen an CLA und 9c-, 11t-, 13t CLN bzw. an Saponinen bestimmt.

Die Quantifizierung von Saponinen, konjugierten FS sowie der Lipid- und Saponinfraktionen in verschiedenen Sorten der Bittergurke kann dabei helfen, Sorten zu identifizieren, die besonders effektiv in der Prävention und Behandlung von Diabetes sind und somit bevorzugt verwendet und angebaut werden sollten. Da die wasserlösliche Fraktion ebenfalls eine Wirkung auf das KG der db/db Mäuse hatte und zur Vervollständigung der Daten wurde die Konzentration der wasserlöslichen Fraktion ebenfalls in verschiedenen Sorten der Bittergurke ermittelt.

Zur Extraktion dieser Fraktionen wurden die Methoden von Oishi et al. (2007) und Chao und Huang (2003) miteinander kombiniert. Die Arbeitsgruppe Oishi et al. (2007) beschrieb ein Verfahren zur Extraktion der Saponinfraktion und der wasserlöslichen Fraktion und extrahierten ein *Momordica charantia* Pulver zunächst mit Methanol und verwarfen den Rest. Aus dem Methanolextrakt wurden fettlösliche Substanzen mit Ethylacetat entfernt und verworfen, während die wasserlöslichen Substanzen mittels Butanol und Wasser in die Saponinfraktion und die wasserlösliche Fraktion unterteilt wurden.

Um ebenfalls die vollständige Lipidfraktion aus der Bittergurke zu gewinnen, wurde diese Methode verändert, sodass die Lipidfraktion im ersten Schritt wie in Chao und Huang (2003) beschrieben mittels Ethylacetat extrahiert wurde.

Eine Extraktionsmethode wie diese macht es möglich, verschiedene relevante Fraktionen aus der Bittergurke oder anderen Pflanzen zu extrahieren. Die Fraktionen können aus einer Probe gewonnen werden. Die Inhaltsstoffe der unterschiedlichen Fraktionen überschneiden sich dabei nicht. Der Vergleich von Ergebnissen

unterschiedlicher Studien bezüglich der Quantifizierung bioaktiver Inhaltsstoffe oder Fraktionen sowie die Wirkung dieser Fraktionen könnte so vereinfacht werden.

Die Autoren Oishi et al. (2007) konnten eine Konzentration von 1,3% Saponinfraktion in der TM eines *Momordica charantia* Pulvers nachweisen mit 15,4% Saponinen in der Saponinfraktion. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine höhere Konzentration der Saponinfraktion in verschiedenen Sorten der Bittergurke (Proben 1-6) mit im Mittel 3,68% und einer Konzentration an hämolytischen Saponinen von 11,77% in der Saponinfraktion.

Als mögliche Erklärung für diese Unterschiede kommen Unterschiede in der Extraktionsmethode oder Unterschiede bezüglich der untersuchten Sorte oder Pflanzenteile in Frage. Oishi et al. (2007) machten keine Angaben zum untersuchten Pflanzenmaterial und bezeichnete dieses als *Momordica charantia powder*. Die Ergebnisse liegen jedoch in der selben Größenordnung und zeigen, dass die Bittergurke ein saponinreiches Gemüse ist. Zum Beispiel Charantin ist ein bekanntes Saponin in der Bittergurke mit den Aglykonen beta-Sitosterol und Stigmasterol (Dans et al. 2007, Harinantenaina et al. 2006). Die untersuchten Bittergurkenfrüchte (Proben 1-6) hatten eine mittlere Konzentration an hämolytischen Saponinen von 0,40% in der TM und das Fruchtfleisch (Proben 7-14) von 0,52%.

Auch wenn die Daten aufgrund von Unterschieden bezüglich der Analysen nicht direkt übertragbar sind, scheinen grüne Bittergurken-Sorten mit 0,40±0,14% hämolytischen Saponinen in der ganzen Frucht (Proben 1-6) und mit 0,67±0,12% im Fruchtfleisch (Proben 7-11) in ihrem Saponingehalt vergleichbar zu anderen saponinreichen, essbaren Pflanzen zu sein **(Tabelle 25)**.

Tabelle 25: Saponingehalte verschiedener Nahrungspflanzen [% der TM] nach *Fenwick und Oakenfull (1983) und die der untersuchten Bittergurken-Proben

Nahrungspflanze	Saponingehalt [% in der TM]
Luzerne-Keimlinge	0,87*
Fruchtfleisch grüner Bittergurken (Proben 7-11)	**0,54-0,79**
Grüne Bittergurke (Proben 1-6)	**0,27-0,66**
Mangold	0,58*
Kichererbse	0,56*
Linsen	0,37-0,46*
Sojabohne	0,43*
Fruchtfleisch weißer Bittergurken (Proben 12-14)	**0,22-0,3**
Spargel	0,15*

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das Fruchtfleisch weißer Bittergurken (Proben 12-14) mit 0,22-0,30% eine geringere Konzentration an hämolytischen Saponinen besitzt als das von grünen Bittergurken (Proben 7-11) mit 0,54-0,79%. Eine geringere Saponinkonzentration in weißen Sorten der Bittergurke bedeutet möglicherweise auch eine geringere antidiabetische Wirkung dieser Sorten im Vergleich zu grünen Bittergurken. Diese Vermutung sollte in entsprechenden *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zum Vergleich der Wirksamkeit von grünen und weißen Bittergurken überprüft werden.

Neben ihrem hohen Gehalt an Saponinen ist die Bittergurke abgesehen vom Granatapfel die einzige essbare Frucht, die konjugierte C18-FS enthält (Suzuki et al. 2001). Die ganzen Früchte mit Samen (Proben 1-6) zeigen eine Konzentration der Lipidfraktion von 2,97 bis 6,40% in der TM. Chuang et al. (2006) konnten einen Lipidgehalt von 3,7% nachweisen.

In den ganzen Früchten (Proben 1-6) konnte eine signifikant höhere Konzentration der Lipidfraktion im Vergleich zum Fruchtfleisch (Proben 7-14) allein nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis belegt, dass in der Bittergurke das Öl vor allem im Samen und nicht im Fruchtfleisch zu finden ist. Dieses Ergebnis wird unter anderem durch Daten von Suzuki et al. (2001) gestützt. Diese Arbeitsgruppe konnte abhängig von der Reife bis zu 41% Gesamtfett in frischen, nicht getrockneten, Samen der Bittergurke nachweisen, während das Fruchtfleisch nur 0,2% Gesamtfett in der Frischmasse enthielt.

Die Konzentration an CLA war mit 0,25% in der Lipidfraktion sehr gering in den Früchten mit Samen (Proben 1-6), aber mit 1,15% signifikant höher im Fruchtfleisch (Proben 7-14) der Bittergurke **(Tabelle 22)**. Diese FS scheint daher eher im Fruchtfleisch zu finden zu sein als in den Samen der Bittergurke. Daten aus der Literatur kommen zu dem selben Ergebnis. Suzuki et al. (2004) konnte CLA im Samen der Bittergurke nicht nachweisen. Die Samen der Bittergurke sind jedoch sehr reich an 9c-, 11t-, 13t CLN (Dhar et al. 2006b, Suzuki et al. 2004). Diese FS machte bis zu 65,89% in der Lipidfraktion verschiedener Sorten der Bittergurke aus. Allerdings war die Konzentration an 9c-, 11t-, 13t CLN bei den untersuchten Früchten sehr unterschiedlich. Die mittlere Konzentration lag bei 26,24% in der Lipidfraktion. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Ergebnissen von Chuang et al. (2006). Diese Autoren konnten 17,2 bis 27,6% an 9c-, 11t-, 13t CLN im Öl der Samen verschiedener Früchte nachweisen. Für die wilde Sorte der Bittergurke konnten die

Autoren Chuang et al. (2006) eine Konzentration von 7,1 g 9c-, 11t-, 13t CLN pro kg getrockneter Frucht und 0,42 g/kg in der frischen Frucht nachweisen.

Die Autoren Chuang et al. (2006) konnten im Fruchtfleisch nur eine Konzentration von 7,6% 9c-, 11t-, 13t CLN im Öl nachweisen. Das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Fruchtfleisch (Proben 7-14) zeigte höhere Konzentrationen von 13,13 bis 34,9% 9c-, 11t-, 13t CLN in der Lipidfraktion. In jedem Fall sind jedoch die Samen der Bittergurke aufgrund ihrer höheren Konzentration an Gesamtfett die Hauptquelle für 9c-, 11t-, 13t CLN und nicht das Fruchtfleisch.

Daten aus der Literatur zur Konzentration von 9c-, 11t-, 13t CLN im Öl des Bittergurken-Samens reichen von 28,7% (Chuang et al. 2006) bis zu 57,7% (Dhar et al. 2006b) oder 61,6% (Suzuki et al. 2004) **(Tabelle 26)**. Die Konzentration an dieser FS schwankt entsprechend stark zwischen verschiedenen Früchten der Bittergurke. Möglicherweise ist das auf unterschiedliche Reifegrade der Früchte zurück zu führen. Die untersuchten Proben 1, 2 und 6 waren phänotypisch sehr ähnlich, zeigten jedoch große Unterschiede in ihrer Konzentration an 9c-, 11t-, 13t CLN **(Tabelle 22)**. Außerdem ist es bekannt, dass die Konzentration des Gesamtfettes und der Gehalt an CLN mit dem Reifegrad zunehmen. Deshalb ist vermutlich der Gesamtfettgehalt und die Konzentration an 9c-, 11t-, 13t CLN sowie das gesamte Fettsäureprofil der Bittergurke stärker vom Reifegrad der Frucht abhängig als von der Sorte. Der Ölgehalt nimmt dabei mit der Reife zu (Suzuki et al. 2001). In der Zukunft sollte diese Vermutung in entsprechenden Untersuchungen überprüft werden. Aufgrund der vielversprechenden biologischen Wirkung der Lipidfraktion der Bittergurke und ihrer hohen Konzentration im Samen der Frucht, sollte bei der Verarbeitung und beim Verzehr der Bittergurke der Samen nicht entfernt werden.

Tabelle 26: Fettsäurezusammensetzung des Bittergurken-Samens

Fettsäure	**%(w/w)** nach Suzuki et al. (2004)	**%(w/w)** nach Dhar et al. (2006b)
16:0	**1,4**	**1,4**
18:0	**25,7**	**31,5**
18:1	**6,1**	**6,2**
18:2	**4,4**	**3,2**
18:3 CLN*	**61,6**	**57,7**

* CLN = konjugierte Linolensäure

Neben der Saponin- und der Lipidfraktion konnten in den Früchten der Bittergurke im Mittel 19,95% der wasserlöslichen Fraktion in der TM nachgewiesen werden und im Fruchtfleisch 16,86%. Das ist etwas mehr als Oishi et al. (2007) mit 12,75% nachweisen konnten.

4.10 Weitere bioaktive Inhaltstoffe der Bittergurke

Insgesamt ist die Frucht der Bittergurke sehr nährstoffreich. 100 g der frischen Frucht beinhalten 94,0 g Wasser, 17 kcal, 0,2 g Fett, 3,7 g Kohlenhydrate, 2,8 g Rohfaser und 1 g Protein (Njoroge und van Luijk 2004) mit einem hohen Anteil an essentiellen Aminosäuren mit Ausnahme von Lysin, Cystein und Methionin (Yuwai et al. 1991). Die Bittergurke enthält weiterhin 19 mg Kalzium, 17 mg Magnesium, 31 mg Phosphor, 0,4 mg Eisen, 0,8 mg Zink, 380 IU Vitamin A, 0,04 mg Thiamin, 0,04 mg Riboflavin, 0,4 mg Niacin, 72 µg Folsäure und 84 mg Vitamin C (Njoroge und van Luijk 2004). Im Bittergurken-Saft finden sich außerdem 48 mg Carotinoide pro 100 g TM (Nerurkar et al. 2008).

Darüber hinaus ist die gesamte Pflanze reich an bioaktiven Inhaltsstoffen. Momordicin I und II sind antimikrobiell und Momordin I zeigt antikanzerogene Wirkungen, MAP30 antivirale, Acylglucosylsterol antimutagene und Chitinase bakteriostatische Eigenschaften (Njoroge und van Luijk 2004). Als Bitterstoffe konnten die Momordicoside K und L sowie Momordicin I und II identifiziert werden (Harinantenaina et al. 2006).

Besonders bekannt ist die Bittergurke jedoch für ein Rinderinsulin-ähnliches Protein, welches zunächst als p-Insulin und später als Polypeptid-p bezeichnet wurde und sowohl bei Typ I als auch bei Typ II diabetischen Patienten blutglucosesenkend wirkt (Khanna et al. 1981). Aber auch andere Substanzgruppen und bioaktive Inhaltsstoffe von *Momordica charantia* werden in der Literatur als blutglucosesenkend und antidiabetisch diskutiert. Dazu gehören Glycoside wie das Momordin und Alkaloide wie das Momordicin. Aber auch Saponine wie zum Beispiel das Charantin (Harinantenaina et al. 2006) besitzen antidiabetische Eigenschaften und sind in großen Mengen in der Bittergurke enthalten (Oishi et al. 2007). Die Charantin-Konzentration der Bittergurke liegt bei 0,01% (Raman und Lau 1996). Charantin ist ein Steroidsaponin mit beta-Sitosterol und Stigmasterol als Aglykone. Ihnen allein wird keine hypoglykämische Wirkung zugesprochen (Harinantenaina et al. 2006).

Sitosterol verminderte jedoch in einer Humanstudie die Cholesterinspiegel im Blut (Fernandez und Vega-López 2005).

Durch den hohen Rohfaser-Gehalt der Bittergurke kommt es zu einer verzögerten Kohlenhydratverdauung und –Absorption, wodurch es postprandial zu einem vermindertem Blutglucoseanstieg kommt (Uebanso et al. 2007). Darüber hinaus konnten bereits einzelne Substanzen aus einem Ether-Extrakt der Bittergurke isoliert werden und ihre antidiabetischen Eigenschaften an männlichen Alloxan-induzierten diabetischen ddY Mäusen nachgewiesen werden. Den Tieren wurde dazu nach 18 stündiger Nüchterung eine Menge von 400 mg der jeweiligen Substanz pro kg KG oral verabreicht. Die Substanzen, die als 3β,7β,25–trihydroxycurcubita-5,23(E)-dien-19-al und 5β,15–epoxy-3β,25–dihydroxycurcubita-6,23(E)-dien identifiziert werden konnten, zeigten signifikant blutglucosesenkende Eigenschaften im Vergleich zur Kontrolle (Harinantenaina et al. 2006).

In vitro Untersuchungen von Cheng et al. (2008) ergaben, dass die wirksamen Substanzen des Methanolextraktes vom Stiel der Bittergurke ausschließlich in der Hexanphase zu finden sind. Aus der Hexanphase wurden 22 Fraktionen isoliert und auf ihre antidiabetische Wirkung an insulinresistenten FL83B Zellen untersucht. Als isolierte Substanzen konnten die Triterpene (23E)-cucurbita-5,23,25-triene-3β,7β-diol, 3β,25-dihydroxy-7β-methoxycucurbita-5,23E-dien und 3β,7β,25-trihydroxycucurbita-5,23(E)-dien-19-al identifiziert werden. Diese Substanzen erhöhten die Glucoseaufnahme in insulinresistente Leber- und Muskelzellen dosisabhängig (p<0,05). Die stärkste Wirkung lag bei 5, 10 oder 25 µg/mL im Vergleich zu 1 µg/mL. 3β,7β,25-trihydroxycucurbita-5,23(E)-dien-19-al stellte sich als die selbe Verbindung heraus, die zuvor von Harinantenaina et al. (2006) aus der Frucht isoliert werden und deren antidiabetische Wirkung bestätigt werden konnte. Andere bekannte Triterpene der Bittergurke sind Momordicosid A und B (Tan et al. 2008).

Aufgrund der vielen unterschiedlichen Hinweise in der Literatur ist es wahrscheinlich, dass an der hypoglykämischen Wirkung der Bittergurke verschiedene bioaktive Komponenten beteiligt sind und dass deshalb auch der hypoglykämische Effekt nicht nur durch einen Mechanismus vermittelt wird.

4.11 Dosierung der Bittergurke

Die Wahl der sehr moderaten Dosis von 150 mg/kg KG in dieser Studie erfolgte nach Sathishsekar und Subramanian (2005). Besonders für die ganze Frucht war diese Dosis sehr gering verglichen mit Dosierungen anderer Arbeitsgruppen, die bis zu 10% (w/w) Bittergurke der Versuchsdiät beimischten (Kumar Shetty et al. 2005). Das bedeutet in der Studie von Kumar Shetty et al. (2005) unter Berücksichtigung der mittleren Futteraufnahme und des mittleren KG umgerechnet eine tägliche Dosis von ca. 5000 mg/kg KG. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Bittergurke als ganze Frucht in höherer Dosierung eine stärkere Wirkung zeigen würde als im vorliegenden Ernährungsversuch mit db/db Mäusen. Auch zur Untersuchung des Wirkmechanismus der Bittergurke sind vermutlich besonders bei der ganzen Frucht höhere Dosierungen der Bittergurke im Tierversuch besser geeignet.

Allerdings ist es wichtig, die Dosierung von isolierten Fraktionen wie die Lipid-, Saponin- und wasserlösliche Fraktion nicht zu hoch zu wählen. Bei isolierten Fraktionen scheint es eine Grenze zu geben, nach welcher die Wirkung nicht mehr weiter zunimmt bzw. sogar wieder abnimmt (Cheng et al. 2008). Bei hohen Insulinkonzentrationen von 50 oder 100 nmol/L, zeigten ein Bittergurken-Saft bzw. Wasser- oder Chloroformextrakte der Bittergurke *in vitro* nur in geringen Konzentrationen von 10 µL pro mL Medium eine insulinsensitivierende Wirkung und hemmten die Aufnahme von Glucose in L6-Myozyten oder 3T3-L1 Adipozyten ab Konzentrationen über 50 µg/mL Medium dosisabhängig (Cummings et al. 2004, Singh et al. 2004, Roffey et al. 2007). Zum Vergleich der Wirksamkeit verschiedener Fraktionen der Bittergurke war die gering gewählte Dosis außerdem hilfreich, um Unterschiede zwischen den Gruppen ausmachen zu können.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit oder aus Daten in der Literatur eine optimale Dosis der Bittergurke abzuleiten oder auf den Menschen zu übertragen, erscheint schwierig, da Versuchsdesigns sehr unterschiedlich sind **(Tabelle 27)**. Teilweise werden Dosierungen auf das KG der Versuchstiere bezogen (Sridhar et al. 2008), in anderen Studien werden die Bittergurke oder ihre Extrakte der Diät beigemischt (Kumar Shetty et al. 2005, Huang et al. 2008).

Tabelle 27: Verschiedene Dosierungen der getrockneten Bittergurke (BG) in der Literatur und Übertragung dieser Dosen auf den Menschen mit 70 kg Körpergewicht (KG)

Autor	Dosis getrocknete BG [% der Diät]	Dosis getrocknete BG [mg/kg KG]	Übertrag auf den Menschen [g/d]
Chan et al. 2005	0,75/1/1,25	375/500/625*	26,25/35/43,75
Huang et al. 2008	5	2500*	175
Kumar Shetty et al. 2005	10	5000*	350
Nerurkar et al. 2008	1,5	ca. 1300*	ca. 90
Ernährungsversuch mit db/db Mäusen	0,03*	150	10,5

* Werte berechnet

Bezogen auf das KG wurden von den Autoren teilweise viel zu hohe Dosierungen gewählt **(Tabelle 27)**, welche nicht auf den Menschen übertragbar sind. Eine übliche Dosierung für den Menschen ist eine Menge von 50 mL Bittergurken-Saft, der ein- bis zweimal täglich getrunken wird (Raman und Lau 1996). Da aus 8000 g frischer Früchte mit einer TM von 6% (Njoroge und van Luijk 2004) ca. 3500 mL Saft gewonnen werden können (Nerurkar et al. 2010) entsprechen 50 mL eines Bittergurken-Safts einer Menge von 114 g frischer Früchte bzw. 7 g getrockneter Bittergurke. Alle Studien, die ein Typ II diabetisches Tiermodell untersuchten, haben höhere Dosierungen bezogen auf das KG gewählt **(Tabelle 27)**. Die Studie von Sridhar et al. (2008) untersuchte die Wirkung von 10 mL Bittergurken-Saft pro kg KG an Ratten mit *high fat diet*. Auch diese Dosierung ist für den Menschen nicht realistisch und viel zu hoch gewählt.

Bezogen auf den prozentualen Anteil der Bittergurke in der Diät sind übertragen auf den Menschen Mengen von 10% (Kumar Shetty et al. 2005) nicht möglich, 5% (Huang et al. 2008) aber realistischer. Nerurkar et al. (2008) untersuchten einen Zusatz von 1,5% eines Bittergurkenpulvers zur Diät, was für den Menschen gut umzusetzen wäre und bei einer Nahrungsaufnahme von 0,5 bis 1 kg TM einer Menge von 50 bis 100 mL Saft entspricht. Die Wirksamkeit der Bittergurke war bei dieser Dosierung gegeben (Nerurkar et al. 2008, Chan et al. 2005). Bezogen auf den Anteil der Gesamtnahrungsaufnahme war die Dosierung der Bittergurke im Ernährungsversuch mit db/db Mäusen sehr gering gewählt, zumal die db/db Mäuse eine hohe tägliche Futteraufnahme hatten. Die Mäuse, die mit der ganzen Frucht der Bittergurke behandelt worden waren hatten eine durchschnittliche Futteraufnahme von 18 g (entspricht in der TM 15,3 g Futter) pro Tag und eine durchschnittliche

Gabe der Bittergurke von 0,005 g, was einem prozentualen Anteil von 0,03% der Diät entspricht. Übertragen auf den Menschen bei einer täglichen Nahrungsaufnahme von 0,5 bis 1 kg TM sind das nur 0,15 bis 0,30 g Bittergurken-Pulver pro Tag, was ungefähr einer gepressten Tablette entsprechen würde. Auch die zwei- bis dreifache Menge wäre einfach beim Menschen anzuwenden. Daten in der Literatur zur Gabe der Bittergurke in diesen Dosierungen als Tablette sind jedoch nicht sehr vielversprechend. Dans et al. (2007) konnten mit einer täglichen Gabe von 3 g Charantia®, ein Bittergurken-Extrakt in Kapselform, bei 40 erwachsenen Typ II Diabetikern über einen Versuchszeitraum von drei Monaten keine Verbesserung der Parameter HbA_{1C}-Wert, Nüchtern-Blutglucosespiegel, Gesamtcholesterinspiegel und Body-Mass-Index erzielen.

Möglicherweise stellt die metabolische Lebendmasse ein besseres Bezugssystem zur Übertragung der wirksamen Dosis vom Maus- oder Rattenmodell auf den Menschen dar als nur die Lebendmasse oder der prozentuale Anteil an der Gesamtdiät. In der Zukunft sollte die optimale Dosis der Bittergurke im Tierversuch unter Betrachtung einer realistischen Dosis für den Menschen definiert werden.

Da die db/db Maus ein genetisches Modell mit ausgeprägter Insulinresistenz und Übergewicht ist, sind Mausmodelle mit Diät-induzierter Insulinresistenz eventuell besser geeignet, die Wirkung moderater Bittergurke-Dosierungen zu testen und zu optimieren.

4.12 Humanstudien und mögliche Toxizität

In der Literatur sind kaum Humanstudien zur Wirksamkeit der Bittergurke zu finden und nur wenige Studien liefern signifikante Ergebnisse. In den meisten Fällen wurden die verfügbaren Studien zur Wirkung der Bittergurke bei Typ I und Typ II diabetischen Patienten mit sehr geringen Patientenzahlen durchgeführt, waren nicht verblindet oder gar nicht Placebo-kontrolliert. Trotzdem gibt es einige Studien, die eine signifikante Wirkung der Bittergurke belegen konnten. In einer Studie von Khanna et al. (1981) verminderte die subkutane Gabe von Polypeptid-p die Nüchtern-Blutglucosespiegel signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle sowohl bei fünf Typ I als auch bei sechs Typ II diabetischen Patienten.

Tongia et al. (2004) untersuchten die orale Gabe eines Methanolextraktes der Bittergurke an 15 Typ II diabetischen Patienten in Kombination mit den

Medikamenten Metformin (2 x 0,5g/Tag) oder Glibenklamid (2 x 0,5g/Tag) oder beiden (je 2 x 0,5g/Tag). Die Patienten bekamen dabei für eine Woche zunächst nur die medikamentöse Behandlung und in einer weiteren Woche eine um 50% reduzierte Menge der Medikamente mit einer zusätzlichen Gabe von zweimal 200 mg des Bittergurken-Extraktes pro Tag. Die signifikante Verbesserung der postprandialen und Nüchtern-Blutglucosespiegel durch die medikamentöse Behandlung konnte durch die Kombination mit dem Bittergurken-Extrakt noch einmal signifikant gesteigert werden (Tongia et al. 2004). Da in dieser Studie ein *cross-over* Design oder eine *wash-out* Phase fehlen, sind die Ergebnisse dieser Studie nicht ausreichend, um die Wirkung der Bittergurke mit Sicherheit belegen zu können. Auch Kochhar und Nagi (2005) führten eine Studie mit 60 Typ II diabetischen Patienten durch und untersuchten die Wirkung von Kapseln oder Keksen, die ein Gemisch aus Pulvern der Bittergurke, der Samen von *Trigonella foenum graecum* und der Samen von *Euglina jambolana* enthielten. Während die Kapseln das unbehandelte Pulver enthielten, war das Pulver in die Kekse eingebacken und sollte gekochtem Pflanzenmaterial entsprechen. Für 45 Tage nahmen die Patienten eine tägliche Menge von 1 g des Pulvers ein und anschließend für weitere 45 Tage eine tägliche Menge von 2 g. Die Behandlungen verbesserten postprandiale und Nüchtern-Blutglucosespiegel und verminderten die Anzahl an Patienten mit Glucosurie dosisabhängig. Außerdem konnte die Gabe von Medikamenten durch die Supplementation vermindert werden. Von anfänglich 49 Patienten nahmen nach den ersten 45 Tagen nur noch 40 Patienten orale Antidiabetika ein und nach 90 Tagen nur noch 20 Patienten. Obwohl diese Studie interessante Ergebnisse liefert, ist der dosisabhängige Effekt nicht ausreichend belegt, weil auch in dieser Studie kein *cross-over* Design verwendet wurde oder eine *wash out* Phase integriert wurde. Weiterhin bleibt in dieser Studie ungeklärt, welchen Anteil welche Pflanze an der Wirkung der Kapseln oder Kekse hatte. Obwohl sowohl das rohe als auch das gekochte Pflanzenmaterial wirksam waren, schien das rohe Pflanzenmaterial die stärkere Wirkung bezogen auf alle untersuchten Parameter zu haben (Kochhar und Nagi 2005). Insgesamt belegt diese Studie die Wirksamkeit von pflanzlichen Supplementen bei der Behandlung von Typ II diabetischen Patienten. Ein wichtiger Vorteil von pflanzlichem Material und Komponenten der traditionellen Medizin bei der Behandlung von Patienten ist, dass diese auch in der Vergangenheit schon verwendet wurden, um Krankheiten beim Menschen zu heilen. Diese Wirkstoffe,

deren Effektivität in Tier- und Zellstudien belegt werden können, sind deshalb vielversprechend bezüglich ihrer Wirksamkeit beim Menschen. Es ist außerdem davon auszugehen, dass die Verträglichkeit gegeben und das Risiko gering ist (Tan et al. 2008).

Trotzdem zeigen einzelne Untersuchungen in der Literatur auch für die Bittergurke toxische und unerwünschte Wirkungen. In humanen Präadipozyten zeigten Konzentrationen ab 5% eines Bittergurken-Safts zum Medium cytotoxische Wirkungen gemessen als Laktatdehydrogenase-Ausschüttung und zelluläre Adenosintriphosphat-Konzentration, während Konzentrationen von 0,5, 1 oder 2% keinen Einfluss auf diese Parameter hatten (Nerurkar et al. 2010). *In vivo* führte die orale Gabe eines Bittergurken-Safts in verschiedenen Tierversuchen in sehr hohen Dosen (≥6 mL/kg KG) innerhalb weniger Stunden sogar zum Tod. In Tierversuchen zeigten sich weiterhin eine verminderte Fertilität und eine fruchtschädigende Wirkung durch die Behandlung mit der Bittergurke, der Konsum der Bittergurke während der Schwangerschaft ist deshalb nicht zu empfehlen (Raman und Lau 1996).

In Humanstudien werden teilweise Bauchschmerzen und Diarrhöen beschrieben und bei Personen mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase Mangel kann der Verzehr von Bittergurken-Samen zu Favismus führen. Die größte Gefahr stellt eine Hypoglykämie nach der Einnahme von Produkten der Bittergurke dar (Dans et al. 2007, Basch et al. 2003).

4.13 Schlussfolgerung

Der Ernährungsversuch mit db/db Mäusen belegt die Wirkung der Bittergurke bei insulinresistenten db/db Mäusen bezüglich einer Verminderung von Übergewicht, erhöhten HbA_{1C}-Werten und Lipidperoxidation. Diese Studie und ihre Ergebnisse machen jedoch auch deutlich, dass nicht nur eine wirksame Fraktion, sondern viele verschiedene bioaktive Substanzen in der Bittergurke zu finden sind, die ihre positiven Effekte durch unterschiedliche biochemische Mechanismen vermitteln. Dies erklärt auch die zahlreichen unterschiedlichen Versuchsmodelle und Ergebnisse, die in der Literatur (Miura et al. 2004, Tan et a. 2008, Yibchok-Anun et al. 2006) über die antidiabetische Wirkung der Bittergurke zu finden sind. Trotzdem scheinen Substanzen der Lipidfraktion und Saponinfraktion besonders wirksam zu sein. Die Saponin- und die Lipidfraktionen waren effektiver bei der Verminderung von KG und

PTP 1B-Aktivität im Muskel der Mäuse als die wasserlösliche Fraktion. Die Lipidfraktion senkte außerdem die HbA_{1C}-Werte als Langzeitparameter für Blutglucosespiegel am stärksten.

Die Identifizierung von Früchten mit hohen Gehalten an Saponinen und der 9c-, 11t-, 13t CLN erscheint deshalb wichtig, um die Bittergurke besonders effektiv zur Behandlung und Prävention von Diabetes mellitus einzusetzen. Besonders in Entwicklungsländern, stellt die Bittergurke eine günstige Möglichkeit für betroffene Patienten dar. Die Bittergurke ist ein preiswertes Gemüse und das ganze Jahr auf lokalen Märkten in Südostasien oder in tropischen Gebieten Afrikas verfügbar (Sekar et al. 2005, Sridhar et al. 2008).

Ein weiterer positiver Effekt der Bittergurke ist ihre umfassende Wirkung. Typ II Diabetes ist häufig verbunden mit anderen Störungen wie Hypertonie, abdominale Adipositas, Dyslipidämie, was zum metabolischen Syndrom zusammengefasst wird. Bei der Therapie ist es deshalb wichtig, nicht nur die Hyperglykämie, sondern gleichzeitig auch die anderen Risikofaktoren für koronare Herzerkrankungen zu behandeln (Zimmet et al. 2001). Die Bittergurke hat abgesehen von ihrer positiven Wirkung auf Übergewicht und Insulinresistenz auch hypotonische Eigenschaften (Singh et al. 2004) und verbessert postprandiale TG-Level (Oishi et al. 2007), Plasmalipide (Sridhar et al. 2008, Nerurkar et al. 2008) sowie ApoB 48 und 100-Level (Nerurkar et al. 2008). Zusätzlich schützt die Bittergurke durch ihre antioxidative Wirkung vor Lipidperoxidation im Plasma (Sathishsekar und Subramanian 2005) und in Geweben.

In der richtigen Dosis scheint die ganze Frucht besonders empfehlenswert, weil in allen Fraktionen bioaktive Inhaltsstoffe enthalten sind und ihre positive Wirkung durch unterschiedliche Wirkmechanismen vermittelt wird. Extrakte der Saponin- oder Lipidfraktion können jedoch in geringen Dosierungen beispielsweise als Kapsel eine stärkere Wirkung haben als ein Bittergurken-Pulver.

5 Zusammenfassung

Momordica charantia und ihrer Frucht, der Bittergurke, konnten in tierexperimentellen Untersuchungen sowohl bei Typ I als auch bei Typ II diabetischen Modelltieren eine blutzuckersenkende Wirkung nachgewiesen werden. Aufgrund der vielen unterschiedlichen Versuchsmodelle und getesteten Extrakte ist jedoch nicht hinreichend geklärt, welche Substanzen oder Substanzgruppen hauptsächlich für die insulinsensitivierende Wirkung der Bittergurke verantwortlich sind und welcher biochemische Mechanismus dieser Wirkung zugrunde liegt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Wirkung unterschiedlicher Substanzgruppen der Bittergurke am Typ II diabetischen Modelltier zu testen und bezüglich Wirksamkeit und Wirkmechanismus miteinander zu vergleichen.

Aus frischen Früchten einer thailändischen Sorte der Bittergurke wurden die Lipid-, die Saponin- sowie die wasserlösliche Fraktion extrahiert und an 45 (5 Gruppen á 9 Mäusen) wachsenden, abgesetzten, männlichen db/db Mäusen in einem fünfwöchigen Versuch getestet. Den Mäusen wurden täglich 150 mg pro kg KG der gesamten Frucht bzw. der Lipid-, der Saponin- oder der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke, in Trinkwasser gelöst, mit Schlundsonde verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt eine entsprechende Menge Trinkwasser. Die Tiere hatten freien Zugang zum Futter mit allen Nährstoffen im Bereich der Empfehlungen und zum Trinkwasser.

Zu Versuchsbeginn waren die mittleren Lebendmassen der fünf Gruppen mit 29,2±0,2 g annähernd gleich. Nach Versuchsende waren die Mäuse, welche die gesamte Frucht (p=0,005), die Lipidfraktion (p=0,007), die Saponinfraktion (p=0,007) oder die wasserlösliche Fraktion (p=0,05) der Bittergurke bekommen hatten, jedoch signifikant leichter im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Nüchtern-Blutglucosespiegel ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor und zwei Wochen nach Versuchsbeginn. Der HbA_{1C}-Wert lag nach Versuchsende hingegen bei allen behandelten Gruppen unter dem der Kontrolle. Den niedrigsten HbA_{1C}-Wert hatten die Mäuse, welche die Lipidfraktion der Bittergurke bekommen hatten (p=0,075).

Die Messung der PTP 1B-Aktivität im Muskelzytosol ergab geringere Aktivitäten bei den Mäusen, die mit der Saponinfraktion (p=0,05) bzw. der Lipidfraktion (p=0,07) der Bittergurke behandelt worden waren. DTT konnte die Hemmung der PTP 1B bei den mit Saponinen behandelten Mäusen aufheben. Bei den mit Lipiden behandelten

Mäusen hatte DTT keinen Einfluss auf die Aktivität der PTP 1B. Eine verminderte Expression der PTP 1B war bei diesen Mäusen weder auf Gen- noch auf Proteinebene zu beobachten.

Hinweise aus der Literatur zur Aktivierung von PPARs durch die Bittergurke konnten nicht bestätigt werden. Microarray-Daten ergaben im Fettgewebe erhöhte Expressionen von Markergenen für Präadipozyten, GATA 2 und 3, AKR1B7 sowie CEPBD, durch die Gabe der wasserlöslichen Fraktion. Dieses Ergebnis erklärt das signifikant geringere KG der db/db Mäuse, die mit der wasserlöslichen Fraktion der Bittergurke behandelt worden waren. Die Microarray-Daten aus dem Fettgewebe zeigen weiterhin eine signifikante Regulierung des Insulinsignals auf der Genexpressionsebene nach den verschiedenen Behandlungen mit der Bittergurke.

Als Marker für oxidativen Stress reduzierten die Lipid- und die Saponinfraktionen der Bittergurke die Konzentration an TBA-RS im Fettgewebe der db/db Mäuse. Die wasserlösliche Fraktion der Bittergurke reduzierte als einzige Fraktion die TBA-RS-Konzentration im Skelettmuskel.

Da in allen Fraktionen bioaktive Inhaltsstoffe enthalten sind und ihre positiven Wirkungen durch unterschiedliche Wirkmechanismen vermittelt werden, ist die Verwendung der ganzen Frucht bei der Behandlung einer Insulinresistenz empfehlenswert. Früchte die reich an Saponinen und konjugierten FS sind, sind nach den Ergebnissen dieser Arbeit besonders günstig. Die Saponinkonzentration scheint im Fruchtfleisch weißer Früchte der Bittergurke im Vergleich zu dem von grünen gering zu sein. Ob weiße Früchte dadurch weniger zur Behandlung und Prävention von Diabetes und Insulinresistenz geeignet sind, muss noch überprüft werden. Die Konzentration an 9c,-11t,-13t CLN schwankt stark zwischen den untersuchten Früchten. Möglicherweise spielt der Reifegrad der Frucht eine größere Rolle als die untersuchte Sorte.

Besonders in Entwicklungsländern stellt die Bittergurke eine günstige Behandlungsmöglichkeit für betroffene Patienten dar. Humanstudien zur Überprüfung der Wirkung und Dosierung sind dazu in der Zukunft nötig.

6 Summary

Momordica charantia and its fruit, the bitter gourd, showed hypoglycaemic effects in several studies with type I as well as type II diabetic animal models. As study designs differ and are difficult to compare, it has not been clarified yet, which substances are most effective. Additionally, the mechanism of the hypoglycaemic effect of the bitter gourd is not fully understood. Thus, the aim of this thesis was to test the effect of different substance groups extracted from bitter gourd fruits in a type II diabetic animal model and, further, to compare the effects and biochemical mechanisms of these substance groups.

Fresh fruits of a Thai variety of the bitter gourd were used to extract the lipid, the saponin, and the hydrophilic fractions. Forty-five male, weaned, four weeks old db/db mice were assigned to five groups of nine. The mice were given sterile tap water as a control, a whole fruit powder, the lipid fraction, the saponin fraction, or the hydrophilic fraction of the bitter gourd at a daily oral dosage of 150 mg per kg body weight via stomach feeding for five weeks respectively. The mice had free access to the diet with all nutrients at the level of the recommendations and to drinking water.

At the beginning of the study, the mean body weight of the mice (29.2±0.2 g) did not differ within the five groups. After five weeks, body weight was significantly lower when mice were given the whole fruit (p=0.005), the lipid fraction (p=0.007), the saponin fraction (p=0.007), or the hydrophilic fraction (p=0.05) compared to the control group. Fasting blood glucose levels did not differ within the groups before or two weeks after the beginning of the trial. However, after five weeks glycated haemoglobin levels were the highest in the control mice compared to all four bitter gourd treated groups. Glycated haemoglobin levels were the lowest in the lipid treated mice (p=0.075).

PTP 1B activity was lower in mice treated with the saponin fraction (p=0.05) or the lipid fraction (p=0.07) of the bitter gourd compared to control mice. The reducing agent dtt reversed the inhibition of PTP 1B in the skeletal muscle of the saponin treated mice, but not in the lipid treated mice. A reduced PTP 1B expression was, however, found neither on gene nor on protein level.

Results from the current literature describing an activation of PPARs via bitter gourd could not be approved. Microarray data from adipose tissue showed an increased expression of preadipocyte marker genes, GATA 2 and 3, AKR1B7 as well as

CEPBD, in mice treated with the hydrophilic fraction. This result might explain the significantly lower body weight of mice treated with the hydrophilic fraction of the bitter gourd. Microarray data further showed a significant regulation of the insulin signalling pathway on gene expression level after bitter gourd treatment.

In addition, lipid and saponin fractions reduced oxidative stress measured as TBA-RS concentration in the adipose tissue of db/db mice. The hydrophilic fraction decreased TBA-RS concentrations in the skeletal muscle.

As there are bioactive substances present in all fractions with positive effects and different biochemical mechanisms, consumption of the whole fruit might be the best opportunity for the treatment of insulin resistance. Considering the results of this thesis, fruits that are rich in saponins and conjugated fatty acids are preferable. Saponin concentration seems to be lower in the flesh of white bitter gourd fruits compared to green ones. However, the assumption that white fruits are less effective in the treatment and prevention of diabetes and insulin resistance needs further investigations. Concentration of 9c,-11t,-13t CLN varied strongly within the fruits investigated. It is likely that maturation of the fruit is more important than the variety regarding total lipid concentration and fatty acid profile.

The bitter gourd demonstrates a very good opportunity to treat type II diabetes mellitus in developing countries. In the future, human studies are necessary to prove the effectiveness in human and to identify the optimal dosage.

7 Literatur

Ahmad, F., Azevedo, JL., Cortright, R., Dohm, GL., Goldstein, BJ.: Alterations in skeletal muscle protein-tyrosine phosphatase activity and expression in insulin-resistant human obesity and diabetes. J Clin Invest 100(2). 449-458. 1997

Ahmed, I., Adeghate, E., Sharma, AK., Pallot, DJ., Singh, J.: Effects of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. Diabetes Res Clin Pract 40(1). 145–151. 1998

Ahmed, W., Ziouzenkova, O., Brown, J., Devchand, P., Francis, S., Kadakia, M., Kanda, T., Orasanu, G., Sharlach, M., Zandbergen, F., Plutzky, J.: PPARs and their metabolic modulation: new mechanisms for transcriptional regulation? J Intern Med 262(2). 184-198. 2007

Alberti, KG., Zimmet, PZ.: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med 15(7). 539-553. 1998

Ali, L., Khan, AK., Mamun, MI., Mosihuzzaman, M., Nahar, N., Nur-e-Alam, M., Rokeya, B.: Studies on hypoglycemic effects of fruit pulp, seed, and whole plant of *Momordica charantia* on normal and diabetic model rats. Plant Med 59(5). 408-412. 1993

Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Ostermann, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., Mustelin, T.: Protein tyrosine phosphatases in the human genome. Cell 117(6). 699-711. 2004

Anonymus: Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser 894. 1-253. 2000

Aoyama, T., Peters, JM., Iritani, N., Nakajima, T., Furihata, K., Hashimoto, T., Gonzalez, FJ.: Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). J Biol Chem 273(10). 5678-5684. 1998

Avruch, J.: Insulin signal transduction through protein kinase cascades. Mol Cell Biochem 182. 31-48. 1998

Barford, D., Das, AK., Egloff, MP.: The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. Annu Rev Biophys Biomol Struct 27. 133-164. 1998

Basch, E., Gabardi, S., Ulbricht, C.: Bitter melon (*Mormordica charantia*): a review of efficacy and safety. Am J Health Syst Pharm 60(4). 356-359. 2003

Bradford, MM.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72. 248-254. 1976

Brodsky, IG.: Hormones and growth factors (636-654) In: Shils, ME., Shike, M., Ross, AC., Caballero, B., Cousins, RJ. (Hrsg): Modern nutrition in health and disease. 10. Auflage. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2006

Calera, MR., Vallega, G., Pilch, PF.: Dynamics of protein-tyrosine phosphatases in rat adipocytes. J Biol Chem 275(9). 6308-6312. 2000

Chan, LL., Chen, Q., Go, AG., Lam, EK., Li, ET.: Reduced adiposity in bitter melon (*Momordica charantia*)-fed rats is associated with increased lipid oxidative enzyme activities and uncoupling protein expression. J Nutr 135(11). 2517-2523. 2005

Chao, CY., Huang, CJ.: Bitter gourd (*Momordica charantia*) extract activates peroxisome proliferator-activated receptors and upregulates the expression of the acyl CoA oxidase gene in H4IIEC3 hepatoma cells. J Biomed Sci 10(6). 782-791. 2003

Cheng, A., Dubé, N., Gu, F., Tremblay, ML.: Coordinated action of protein tyrosine phosphatases in insulin signal transduction. Eur J Biochem 269(4). 1050-1059. 2002

Cheng, HL., Huang, HK., Chang, CI., Tsai, CP., Chou, CH.: A cell-based screening identifies compounds from the stem of *Momordica charantia* that overcome insulin resistance and activate AMP-activated protein kinase. J Agric Food Chem 56(16). 6835-6843. 2008

Chomczynski, P., Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162(1). 156–159. 1987

Chuang, CY., Hsu, C., Chao, CY., Wein, YS., Kuo, YH., Huang, CJ.: Fractionation and identification of 9c, 11t, 13t-conjugated linolenic acid as an activator of PPARalpha in bitter gourd (*Momordica charantia L.*). J Biomed Sci 13(6). 763-772. 2006

Clampit, JE., Meuth, JL., Smith, HT., Reilly, RM., Jirousek, MR., Trevillyan, JM., Rondinone, CM.: Reduction of protein-tyrosine phosphatase-1B increases insulin signaling in FAO hepatoma cells. Biochem Biophys Res Commun 300(2). 261-267. 2003

Cross, DA., Alessi, DR., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, BA.: Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. Nature 378(6559). 785-789. 1995

Cummings, E., Hundal, HS., Wackerhage, H., Hope, M., Belle, M., Adeghate, E., Singh, J.: *Momordica charantia* fruit juice stimulates glucose and amino acid uptakes in L6 myotubes. Mol Cell Biochem 261. 99-104. 2004

Czech, MP., Corvera, S.: Signaling mechanisms that regulate glucose transport. J Biol Chem 274(4). 1865-1868. 1999

Dans, AM., Villarruz, MV., Jimeno, CA., Javelosa, MA., Chua, J., Bautista, R., Velez, GG.: The effect of *Momordica charantia* capsule preparation on glycemic control in type 2 diabetes mellitus needs further studies. J Clin Epidemiol 60(6). 554-559. 2007

Deckert, T., Poulsen, JE., Larsen, M.: Prognosis of diabetics with diabetes onset before the age of thirty-one. I. Survival, causes of death, and complications. Diabetologia 14(6). 363-370. 1978

Delibegovic, M., Bence, KK., Mody, N., Hong, EG., Ko, HJ., Kim, JK., Kahn, BB., Neel, BG.: Improved glucose homeostasis in mice with muscle-specific deletion of protein-tyrosine phosphatase 1B. Mol Cell Biol 27(21). 7727-7734. 2007

Denu, JM., Tanner, KG.: Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. Biochemistry 37(16). 5633-5642. 1998

Dhar, P., Bhattacharyya, D., Bhattacharyya, DK., Ghosh, S.: Dietary comparison of conjugated linolenic acid (9 cis, 11 trans, 13 trans) and alpha-tocopherol effects on blood lipids and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetes mellitus in rats. Lipids 41(1). 49-54. 2006a

Dhar, P., Chattopadhyay, K., Bhattacharyya, D., Roychoudhury, A., Biswas, A., Ghosh, S.: Antioxidative effect of conjugated linolenic acid in diabetic and non-diabetic blood: an *in vitro* study. J Oleo Sci 56(1). 19-24. 2006b

Dresner, A., Laurent, D., Marcucci, M., Griffin, ME., Dufour, S., Cline, GW., Slezak, LA., Andersen, DK., Hundal, RS., Rothman, DL., Petersen, KF., Shulman, GI.: Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. J Clin Invest 103(2). 253–259. 1999

Elchebly, M., Payette, P., Michaliszyn, E., Cromlish, W., Collins, S., Loy, AL., Normandin, D., Cheng, A., Himms-Hagen, J., Chan, CC., Ramachandran, C., Gresser, MJ., Tremblay, ML., Kennedy, BP.: Increased insulin sensitivity and obesity restistance in mice lacking the protein tyrosine phosphatase-1B gene. Science 283(5407). 1544-1548. 1999

Fenwick, DE., Oakenfull, D.: Saponin content of food plants and some prepared foods. J Sci Food Agric 34(2). 186-191. 1983

Fernandes, NP., Lagishetty, CV., Panda, VS., Naik, SR.: An experimental evaluation of the antidiabetic and antlipidemic properties of a standardized *Momordica charantia* fruit extract. BMC Complement Altern Med 7(29). doi: 10.1186/1472-6882-7-29. 2007

Fernandez, ML., Vega-López, S.: Efficacy and safety of sitosterol in the management of blood cholesterol levels. Cardiovasc Drug Rev 23(1). 57-70. 2005

Francis, G., Kerem, Z., Makkar, HP., Becker, K.: The biological action of saponins in animal systems: a review. Br J Nutr 88(6). 587-605. 2002

Frangioni, JV., Beahm, PH., Shifrin, V., Jost, CA., Neel, BG.: The nontransmembrane tyrosine phosphatase PTP-1B localizes to the endoplasmatic reticulum via its 3 amino acid C-terminal sequence. Cell 68(3). 545-560. 1992

Gentleman, RC., Carey, VJ., Bates, DM., Bolstad, B., Dettling, M., Dudoit, S., Ellis, B., Gautier, L., Ge, Y., Gentry, J., Hornik, K., Hothorn, T., Huber, W., Iacus, S., Irizarry, R., Leisch, F., Li, C., Maechler, M., Rossini, AJ., Sawitzki, G., Smith, C., Smyth, G., Tierney, L., Yang, JY., Zhang, J.: Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biol. 5(10). doi: 10.1186/gb-2004-5-10-r80. 2004

Goldstein, BJ.: Phosphoprotein phosphatases 1: tyrosine phosphatases. Protein Profile 2(13). 1425-1585. 1995

Greer, JJ., Ware, DP., Lefer, DJ.: Myocardial infarction and heart failure in the db/db diabetic mouse. Am J Physiol Heart Circ Physiol 290(1). 146-153. 2006

Groen, A., Lemeer, S., van der Wijk, T., Overvoorde, J., Heck, AJ., Ostman, A., Barford, D., Slijper, M., den Hertog, J.: Differential oxidation of protein-tyrosine phosphatases. J Biol Chem 280(11). 10298-10304. 2005

Gum, RJ., Gaede, LL., Heindel, MA., Waring, JF., Trevillyan, JM., Zinker, BA., Stark, ME., Wilcox, D., Jirousek, MR., Rondinone, CM., Ulrich, RG.: Antisense protein tyrosine phosphatase 1B reverses activation of p38 mitogen-activated protein kinase in liver of ob/ob mice. Mol Endocrinol 17(6). 1131-1143. 2003a

Gum, RJ., Gaede, LL., Koterski, SL., Heindel, M., Clampit, JE., Zinker, BA., Trevillyan, JM., Ulrich, RG., Jirousek, MR., Rondinone, CM.: Reduction of protein tyrosine phosphatase 1B increases insulin-dependent signaling in ob/ob mice. Diabetes 52(1). 21-28. 2003b

Harinantenaina, L., Tanaka, M., Takaoka, S., Oda, M., Mogami, O., Uchida, M., Asakawa, Y.: *Momordica charantia* constituents and antidiabetic screening of the isolated major compounds. Chem Pharm Bull (Tokyo) 54(7). 1017-1021. 2006

Haring, HU., Kasuga, M., White, MF., Crettaz, M., Kahn, CR.: Phosphorylation and dephosphorylation of the insulin rezeptor: evidence against an intrinsic phosphatase activity. Biochemistry 23(14). 3298-3306. 1984

Hecht, D., Zick, Y.: Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H_2O_2 and vanadate *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun 188(2). 773-779. 1992

Hossain, P., Kawar, B., El Nahas, M.: Obesity and diabetes in the developing world – a growing challenge. N Engl J Med 356(3). 213-215. 2007

Huang, HL., Hong, YW., Wong, YH., Chen, YN., Chyuan, JH., Huang, CJ., Chao, PM.: Bitter melon (*Momordica charantia L.*) inhibits adipocyte hypertrophy and down regulates lipogenic gene expression in adipose tissue of diet-induced obese rats. Br J Nutr 99(2). 230-239. 2008

Hube, F., Hauner, H.: The role of TNF-alpha in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? Horm Metab Res 31(12). 626-631. 1999

Jay, MA., Ren, J.: Peroxisome proliferator-activated recepor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. Current Diabets Reviews 3. 33-39. 2007

Joost, HG., Giesen, K., Kluge, R., Ortlepp, J., Plum, L.: Insulinresistenz und metabolisches Syndrom. Z Kardiol 89. 377-382. 2000

Kahn, BB., Flier, JS.: Obesity and insulin resistance. J Clin Invest 106(4). 473-481. 2000

Kahn, CR.: Banting lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. Diabetes 43(8). 1066-1084. 1994

Keim, NL., Levin, RJ., Havel, PJ.: Carbohydrates (62-82) In: Shils, ME., Shike, M., Ross, AC., Caballero, B., Cousins, RJ. (Hrsg): Modern nutrition in health and disease. 10. Auflage. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 2006

Keller, U.: From obesity to diabetes. Int J Vitam Nutr Res 76(4). 172-177. 2006

Khanna, P., Jain, SC., Panagariya, A., Dixit, VP.: Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. J Nat Prod 44(6). 648-655. 1981

Khoschsorur, GA., Winklhofer-Roob, BM., Rabl, H., Auer, TH., Peng, Z., Schaur, RJ.: Evaluation of a sensitive HPLC method for the determination of malondialdehyde, and application of the method to different biological materials. Chromatographia 52(3-4). 181-184. 2000

Klaman, LD., Boss, O., Peroni, OD., Kim, JK., Martino, JL., Zabolotny, JM., Moghal, N., Lubkin, M., Kim, YB., Sharpe, AH., Stricker-Krongrad, A., Shulman, GI., Neel, BG., Kahn, BB.: Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific insulin sensitivity in protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient mice. Mol Cell Biol 20(15). 5479-5489. 2000

Knecht, DA., Dimond, RL.: Visualization of antigenic proteins on western blots. Anal Biochem 136(1). 180-184. 1984

Kochhar, A., Nagi, M.: Effect of supplementation of traditional medicinal plants on blood glucose in non-insulin-dependent diabetics: a pilot study. J Med Food 8(4). 545-549. 2005

Koren, S., Fantus, IG.: Inhibition of the protein tyrosine phosphatase PTP1B: potential therapy for obesity, insulin resistance and type-2 diabetes mellitus. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 21(4). 621-640. 2007

Krawinkel, MB., Keding, GB.: Bitter gourd (*Momordica charantia*): a dietary approach to hyperglycemia. Nutr Rev 64(7). 331-337. 2006

Kumar Shetty, A., Suresh Kumar, G., Veerayya Salimath, P.: Bitter gourd (*Momordica charantia*) modulates activities of intestinal and renal disaccharidases in streptozotocin-induced diabetic rats. Mol Nutr Food Res 49(8). 791–796. 2005

Laustsen, PG., Michael, MD., Crute, BE., Cohen, SE., Ueki, K., Kulkarni, RN., Keller, SR., Lienhard, GE., Kahn, CR.: Lipoastrophic diabetes in irs1(-/-)/irs3(-/-) double knockout mice. Genes Dev 16(24). 3213-3222. 2002

Luka, Z., Mudd, SH., Wagner, C.: Glycine N-methyltransferase and regulation of S-adenosylmethionine levels. J Biol Chem 284(34). 22507-22511. 2009

Mackie, AM., Singh, HT., Owen, JM.: Studies on the distribution, biosynthesis and function of steroidal saponins in echinoderms. Comp Biochem Physiol B 56(1). 9-14. 1977

Mahomoodally, MF., Fakim, AG., Subratty, AH.: *Momordica charantia* extracts inhibit uptake of monosaccharide and amino acid across rat everted gut sacs *in-vitro*. Biol Pharm Bull 27(2). 216-218. 2004

McClung, JP., Roneker, CA., Mu, W., Lisk, DJ., Langlais, P., Liu, F., Lei, XG.: Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. Proc Natl Acad Sci U S A 101(24). 8852-8857. 2004

Miura, T., Itoh, C., Iwamoto, N., Kato, M., Kawai, M., Park, SR., Suzuki, I.: Hypoglycemic activity of the fruit of the *Momordica charantia* in type 2 diabetic mice. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 47(5). 340–344. 2001

Miura, T., Itoh, Y., Iwamoto, N., Kato, M., Ishida, T.: Suppressive activity of the fruit of *Momordica charantia* with exercise on blood glucose in type 2 diabetic mice. Biol Pharm Bull 27(2). 248-250. 2004

Mohammad, A., Wang, J., McNeill, JH.: Bis(maltolato)oxovanadium(IV) inhibits the activity of PTP1B in Zucker rat skeletal muscle *in vivo*. Mol Cell Biochem 229. 125-128. 2002

Moraes, RC., Blondet, A., Birkenkamp-Demtroeder, K., Tirard, J., Orntoft, TF., Gertler, A., Durand, P., Naville, D., Bégeot, M.: Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. Endocrinology 144(11). 4773–4782. 2003

Mori, T., Sakaue, H., Iguchi, H., Gomi, H., Okada, Y., Takashima, Y., Nakamura, K., Nakamura, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Kadowaki, T., Matsuki, Y., Ogawa, W., Hiramatsu, R., Kasuga, M.: Role of krüppel-like factor 15 (KLF15) in transcriptional regulation of adipogenesis. J Biol Chem 280(13). 12867-12875. 2005

Müller, AS., Bosse, AC., Most, E., Klomann, SD., Schneider, S., Pallauf, J.: Regulation of the insulin antagonistic protein tyrosine phosphatase 1B by dietary Se studied in growing rats. J Nutr Biochem 20(4). 235-247. 2009

Nerurkar, PV., Lee, YK., Motosue, M., Adeli, K., Nerurkar, VR.: *Momordica charantia* (bitter melon) reduces plasma apolipoprotein B-100 and inrcreases hepatic insulin receptor substrate and phosphoinositide-3 kinase interactions. Br J Nutr 100(4). 751-759. 2008

Nerurkar, PV., Lee, YK., Nerurkar, VR.: *Momordica charantia* (bitter melon) inhibits primary human adipocyte differentiation by modulating adipogenic genes. BMC Complement Altern Med 10(34). doi: 10.1186/1472-6882-10-34. 2010

Nieto-Vazquez, I., Fernández-Veledo, S., de Alvaro, C., Rondinone, CM., Valverde, AM., Lorenzo, M.: Protein-tyrosine phosphatase 1B-deficient myocytes show increased insulin sensitivity and protection against tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance. Diabetes 56(2). 404-413. 2007

Njoroge, GN., van Luijk, MN.: *Momordica charantia L.* [Internet] Record from Protabase. Grubben, GJ., Denton, OA. (Hrsg): PROTA (Plant resources of tropical africa / Ressources végétales de l'Afrique tropicale). Wageningen, Netherlands. http://database.prota.org/search.htm. Accessed 13 December 2010. 2004

NRC (National Research Council): Nutrient requirements of laboratory animals. 4. überarbeitete Auflage. National Academy Press. Washington D. C. 1995

Ohmura, E., Hosaka, D., Yazawa, M., Tsuchida, A., Tokunaga, M., Ishida, H., Minagawa, S., Matsuda, A., Imai, Y., Kawazu, S., Sato, T.: Association of free fatty acids (FFA) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and insulin-resistant metabolic disorder. Horm Metab Res 39(3). 212-217. 2007

Oishi, Y., Sakamoto, T., Udagawa, H., Taniguchi, H., Kobayashi-Hattori, K., Ozawa, Y., Takita, T.: Inhibition of increases in blood glucose and serum neutral fat by *Momordica charantia* saponin fraction. Biosci Biotechnol Biochem 71(3). 735-740. 2007

Ojewole, JA., Adewole, SO., Olayiwola, G.: Hpoglycaemic and hypotensive effects of *Momordica charantia Linn* (*Cucurbitaceae*) whole-plant aqueous extract in rats. Cardiovasc J S Afr 17(5). 227-232. 2006

Pot, DA., Woodford, TA., Remboutsika, E., Haun, RS., Dixon, JE.: Cloning, bacterial expression, purification, and characterization of the cytoplasmic domain of rat LAR, a receptor-like protein tyrosine phosphatase. J Biol Chem 266(29). 19688–19696. 1991

R Development Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL http://www.R-project.org. 2008

Raman, A., Lau, C.: Anti-diabetic properties and phytochemistry. *Momordica charantia L.* (*Cucurbitaceae*). Phytomedicine 2. 349-362. 1996

Reaven, GM.: Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. Diabetes 37(12). 1595-1607. 1988

Robertson, RP.: Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. J Biol Chem 279(41). 42351-42354. 2004

Roffey, BW., Atwal, AS., Johns, T., Kubow, S.: Water extracts from *Momordica charantia* increase glucose uptake and adiponectin secretion in 3T3-L1 adipose cells. J Ethnopharmacol 112(1). 77-84. 2007

Rondinone, CM., Trevillyan, JM., Clampit, J., Gum, RJ., Berg, C., Kroeger, P., Frost, L., Zinker, BA., Reilly, R., Ulrich, R., Butler, M., Monia, BP., Jirousek, MR., Waring, JF.: Protein tyrosine phosphatase 1B reduction regulates adiposity and expression of genes involved in lipogenesis. Diabetes 51(8). 2405-2411. 2002

Rozen, S., Skaletsky, HJ.: Primer3. http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm. Accessed 13 December 2010. 1998

Salmeen, A., Andersen, JN., Myers, MP., Meng, TC., Hinks, JA., Tonks, NK., Barford, D.: Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenyl-amide intermediate. Nature 423(6941). 769-773. 2003

Saltiel, AR.: New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. Cell 104(4). 517-529. 2001

Samane, S., Noël, J., Charrouf, Z., Amarouch, H., Haddad, PS.: Insulin-sensitizing and anti-proliferative effects of *Argania spinosa* seed extracts. Evid Based Complement Alternat Med 3(3). 317-327. 2006

Sathishsekar, D., Subramanian, S.: Beneficial effects of *Momordica charantia* seeds in the treatment of STZ-induced diabetes in experimental rats. Biol Pharm Bull 28(6). 978-983. 2005

Sekar, DS., Sivagnanam, K., Subramanian, S.: Antidiabetic activity of *Momordica charantia* seeds on streptozotocin induced diabetic rats. Pharmazie 60(5). 383-387. 2005

Semple, RK., Chatterjee, VK., O´Rahilly, S.: PPARγ and human metabolic disease. J Clin Invest 116(3). 581-589. 2006

Sesti, G., Federici, M., Hribal, ML., Lauro, D., Sbraccia, P., Lauro, R.: Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. FASEB J 15(12). 2099-2111. 2001

Shih, CC., Lin, CH., Lin, WL.: Effects of *Momordica charantia* on insulin resistance and visceral obesity in mice on high fat diet. Diabetes Res Clin Pract 81(2). 134-143. 2008

Simeonova, RL., Vitcheva, VB., Kondeva-Burdina, MS., Krasteva, IN., Nikolov, SD., Mitcheva, MK.: Effect of purified saponin mixture from *Astragalus corniculatus* on enzyme- and non-enzyme-induced lipid peroxidation in liver microsomes from spontaneously hypertensive rats and normotensive rats. Phytomedicine 17(5). 346-349. 2010

Singh, J., Adeghate, E., Cummings, E., Giannikipolous, C., Sharma, AK., Ahmed, I.: Beneficial effects and mechanism of action of *Momordica charantia* juice in the treatment of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rat. Mol Cell Biochem 261(1-2). 63-70. 2004

Sivaramakrishnan, S., Keerthi, K., Gates, KS.: A chemical model for redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) activity. J Am Chem Soc 127(31). 10830-10831. 2005

Smyth, GK., Speed, T.: Normalization of cDNA microarray data. Methods 31(4). 265-273. 2003

Smyth, GK.: Limma: linear models for microarray data. In: Gentleman, R., Carey, V., Dudoit, S., Irizarry, R., Huber, W. (Hrsg): Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor. Springer. New York. 397-420. 2005

Smyth, GK.: Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. Stat Appl Genet Mol Biol 3. Article 3. 2004

Sridhar, MG., Vinayagamoorthi, R., Arul Suyambunathan, V., Bobby, Z., Selvaraj, N.: Bitter gourd (*Momordica charantia*) improves insulin sensitivity by increasing skeletal muscle insulin-stimulated IRS-1 tyrosine phosphorylation in high-fat-fed rats. Br J Nutr 99(4). 806–812. 2008

Staiger, H., Häring, HU.: Adipocytokines: fat-derived humoral mediators of metabolic homeostasis. Exp Clin Endocrinol Diabetes 113(2). 67-79. 2005

Streuli, M., Krueger, NX., Thai, T., Tang, M., Saito, H.: Distinct functional roles of the two intracellular phosphatase like domains of the receptor-linked protein tyrosine phosphatases LCA and LAR. EMBO J 9(8). 2399-2407. 1990

Suzuki, R., Abe, M., Miyashita, K.: Comparative study of the autoxidation of TAG containing conjugated and nonconjugated C18 PUFA. JAOCS 81(6). 563-569. 2004

Suzuki, R., Arato, S., Noguchi, R., Miyashita, K., Tachikawa, O.: Occurrence of conjugated linolenic acid in flesh and seed of bitter gourd. J Oleo Sci 50(9). 753-758. 2001

Tan, MJ., Ye, JM., Turner, N., Hohnen-Behrens, C., Ke, CQ., Tang, CP., Chen, T., Weiss, HC., Gesing, ER., Rowland, A., James, DE., Ye, Y.: Antidiabetic activities of triterpenoids isolated from bitter melon associated with activation of the AMPK pathway. Chem Biol 15(3). 263-273. 2008

Tirard, J., Gout, J., Lefrançois-Martinez, AM., Martinez, A., Begeot, M., Naville, D.: A novel inhibitory protein in adipose tissue, the aldo-keto reductase AKR1B7: its role in adipogenesis. Endocrinology 148(5). 1996-2005. 2007

Tong, Q., Dalgin, G., Xu, H., Ting, CN., Leiden, JM., Hotamisligil, GS.: Function of GATA transcription factors in preadipocyte-adipocyte transition. Sience 290. 134-138. 2000

Tongia, A., Tongia, SK., Dave, M.: Phytochemical determination and extraction of *Momordica charantia* fruit and its hypoglycemic potentiation of oral hypoglycemic drugs in diabetes mellitus (NIDDM). Indian J Physiol Pharmacol 48(2). 241-244. 2004

Tonks, NK.: Minireview: PTP1B: From the sidelines to the front lines! FEBS Letters 546(1). 140-148. 2003

Tsuchida, A., Yamauchi, T., Kadowaki, T.: Nuclear receptors as targets for drug development: molecular mechanisms for regulation of obesity and insulin resistance by peroxisome proliferator-activated receptor gamma, CREB-binding protein, and adiponectin. J Pharmacol Sci 97(2). 164-170. 2005

Uebanso, T., Arai, H., Taketani, Y., Fukaya, M., Yamamoto, H., Mizuno, A., Uryu, K., Hada, T., Takeda, E.: Extracts of *Momordica charantia* suppress postprandial hyperglycemia in rats. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 53(6). 482–488. 2007

Vikrant, V., Grover, JK., Tandon, N., Rathi, SS., Gupta, N.: Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. J Ethnopharmacol 76(2). 139-143. 2001

Walton, KM., Dixon, JE.: Protein tyrosine phosphatases. Annu Rev Biochem 62. 101-120. 1993

Wilmanns, W., Sauer, H., Gelinsky, P.: Beziehung zwischen enzymatischer Formiataktivierung und Erythrozytenlebensdauer. Ann Hematol 19(8). 457–469. 1969

Wolff, SP.: Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. Br Med Bull 49(3). 642-652. 1993

Wong, SH., Knight, JA., Hopfer, SM., Zaharia, O., Leach Jr, CN., Sunderman Jr, FW.: Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. Clin Chem 33(2). 214-220. 1987

Wu, Y., Ouyang, JP., Wu, K., Wang, SS., Wen, CY., Xia, ZY.: Rosiglitazone ameliorates abnormal expression and activity of protein tyrosine phosphatase 1B in the skeletal muscle of fat-fed, streptozotocin-treated diabetic rats. Br J Pharmacol 146(2). 234-243. 2005

Ye, JM., Dzamko, N., Cleasby, ME., Hegarty, BD., Furler, SM., Cooney, GJ., Kraegen, EW.: Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. Diabetologia 47(7). 1306-1313. 2004

Yibchok-Anun, S., Adisakwattana, S., Yao, CY., Sangvanich, P., Roengsumran, S., Hsu, WH.: Slow acting protein extract from fruit pulp of *Momordica charantia* with insulin secretagogue and insulinomimetic activities. Biol Pharm Bull 29(6). 1126—1131. 2006

Yin, X., Zhang, Y., Wu, H., Zhu, X., Zheng, X., Jiang, S., Zhuo, H., Shen, J., Li, L., Qiu, J.: Protective effects of Astragalus saponin I on early stage of diabetic nephropathy in rats. J Pharmacol Sci 95(2). 256-266. 2004

Youngren, JF.: Regulation of insulin receptor function. Cell Mol Life Sci 64(7-8). 873-891. 2007

Yuwai, KE., Rao, KS., Kaluwin, C., Jones, GP., Rivett, DE.: Chemical composition of *Momordica charantia L.* fruits. J Agric Food Chem 39(10). 1762-1763. 1991

Zhou, H., Yang, X., Wang, NL., Zhang, YO., Cai, GP.: Macostemonoside A promotes visfatin expression in 3T3-L1 cells. Biol Pharm Bull 30(2). 279-283. 2007

Zhu, L., Goldstein, B.: Use of anaerobic chamber environment for the assay of endogenous cellular protein-tyrosine phosphatase activities. Biol Proced Online 4. 1-9. 2002

Zimmet, P., Alberti, KG., Shaw, J.: Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature 414(6865). 782-787. 2001

Zinker, BA., Rondinone, CM., Trevillyan, JM., Gum, RJ., Clampit, JE., Waring, JF., Xie, N., Wilcox, D., Jacobson, P., Frost, L., Kroeger, PE., Reilly, RM., Koterski, S., Opgenorth, TJ., Ulrich, RG., Crosby, S., Butler, M., Murray, SF., McKay, RA., Bhanot, S., Monia, BP., Jirousek, MR.: PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose, and improves insulin sensitivity in diabetic mice. PNAS 99(17). 11357-11362. 2002

Anhang

Anhangstabelle 1: Zusammensetzung der Diät für Mäuse nach NRC (1995)

Futterkomponenten	**[%]**	**Gesamt für 50 kg [kg]**
Weizen (Weil, Langgöns, Deutschland)	24,19	11,885
Mais (Weil, Langgöns, Deutschland)	20,00	10,000
Gerste (Weil, Langgöns, Deutschland)	15,60	7,800
Sojaextraktionsschrot (Weil, Langgöns, Deutschland)	22,00	11,000
Weizenkleie (Weil, Langgöns, Deutschland)	8,00	4,000
Hafer (Weil, Langgöns, Deutschland)	7,00	3,500
Sonnenblumenöl (Handel)	1,50	0,750
Mineralfutter† (Sauenglück® von Josera, Eschborn, Deutschland)	0,60	0,300
Calciumcarbonat $CaCo_3$† (Sigma-Aldrich, U.S.A.)	0,50	0,250
Dicalciumphosphat $CaHPO_4*2H_2O$† (Sigma-Aldrich, U.S.A.)	0,30	0,150
Lysin HCL† (DEGUSSA, Essen, Deutschland)	0,03	0,015
DL-Methionin† (DEGUSSA, Essen, Deutschland)	0,20	0,100
Vitaminvormischung‡ (alle Vitamine von Roche, Schweiz)	0,08	0,250
Gesamt	**100**	**50,00**

† Mineralstoffe und Aminosäuren wurden unter Berücksichtigung ihrer natürlichen Konzentrationen in Weizen, Mais, Gerste, Sojaextraktionsschrot, Weizenkleie und Hafer entsprechend der Empfehlungen (NRC 1995) ergänzt.

‡ Alle Vitamine wurden unter Berücksichtigung ihres Gehaltes im Mineralfutter (Sauenglück® von Josera, Eschborn, Deutschland) den Empfehlungen (NRC 1995) entsprechend ergänzt.

Anhangstabelle 2: Wöchentliche und gesamte Futteraufnahme [g/d]

Gruppe	Tier	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5	Gesamt
Kontrolle	1	10,0	11,8	14,6	15,6	20,6	14,5
	2	11,4	14,7	14,3	21,5	20,3	16,4
	3	10,5	15,6	14,1	20,7	18,2	15,8
	4	10,3	13,7	18,8	22,2	27,9	18,6
	5	12,0	16,4	15,2	22,1	21,4	17,4
	6	10,7	16,9	20,3	21,8	20,8	18,1
	7	8,3	17,0	14,4	14,7	15,7	14,0
	8	10,7	16,1	15,2	21,9	20,6	16,9
	9	13,4	20,1	23,4	24,2	26,6	21,5
	MW	**10,8**	**15,8**	**16,7**	**20,5**	**21,3**	**17,0**
	SD	**1,4**	**2,3**	**3,3**	**3,2**	**3,8**	**2,3**
Gesamte Frucht	1	10,9	16,2	18,1	20,6	24,2	18,0
	2	11,2	13,2	18,7	23,6	22,1	17,8
	3	9,0	14,5	16,6	21,3	21,0	16,5
	4	9,1	17,0	18,6	18,8	18,2	16,3
	5	10,5	17,9	19,7	12,7	12,2	14,6
	6	9,2	19,8	22,1	22,7	23,2	19,4
	7	13,5	21,3	19,5	15,3	20,4	18,0
	8	11,9	28,1	28,3	26,8	25,6	24,1
	9	12,5	20,0	18,5	15,0	19,7	17,1
	MW	**10,9**	**18,7**	**20,0**	**19,6**	**20,8**	**18,0**
	SD	**1,6**	**4,4**	**3,4**	**4,6**	**3,9**	**2,7**
Lipidfraktion	1	9,8	19,5	13,7	14,0	15,4	14,5
	2	8,6	15,1	18,3	15,1	16,2	14,7
	3	11,9	18,2	21,9	18,4	18,9	17,9
	4	11,8	15,6	18,9	12,0	17,6	15,2
	5	11,3	18,4	19,3	20,9	18,9	17,8
	6	11,8	18,7	19,1	21,0	21,3	18,4
	7	10,8	18,7	18,1	21,1	23,3	18,4
	8	8,9	18,2	18,4	18,3	16,5	16,1
	9	11,1	19,6	20,6	22,7	22,1	19,2
	MW	**10,7**	**18,0**	**18,7**	**18,2**	**18,9**	**16,9**
	SD	**1,3**	**1,6**	**2,2**	**3,7**	**2,8**	**1,8**
Saponinfraktion	1	8,6	12,3	13,3	13,3	15,4	12,6
	2	10,7	12,6	16,7	21,4	26,0	17,5
	3	11,2	18,2	21,2	---	---	16,9
	4	12,1	19,7	17,9	20,0	19,0	17,7
	5	15,5	24,6	27,5	24,1	27,5	23,8
	6	14,2	20,4	20,0	20,4	18,0	18,6
	7	9,1	13,4	14,4	11,7	12,1	12,1
	8	9,4	13,3	11,4	13,1	13,8	12,2
	9	11,2	19,5	19,2	21,8	22,8	18,9
	MW	**11,3**	**17,1**	**18,0**	**18,3**	**19,3**	**16,7**
	SD	**2,3**	**4,4**	**4,8**	**4,8**	**5,7**	**3,9**
Wasserlösliche Fraktion	1	10,3	13,6	18,2	22,0	21,4	17,1
	2	11,0	17,8	21,5	23,8	24,9	19,8
	3	10,3	12,3	4,7	11,0	13,9	10,4
	4	10,6	17,4	21,3	25,0	28,9	20,6
	5	13,4	17,7	23,6	21,2	21,3	19,5
	6	11,9	16,5	21,7	23,9	32,3	21,2
	7	10,5	15,3	11,4	14,5	15,3	13,4
	8	10,7	13,0	18,7	15,6	18,0	15,2
	9	13,7	22,7	18,0	22,6	22,5	19,9
	MW	**11,4**	**16,3**	**17,7**	**20,0**	**22,0**	**17,5**
	SD	**1,3**	**3,2**	**6,0**	**5,0**	**6,0**	**3,7**
Gesamt	**MW**	**11,0^{A}**	**17,2^{B}**	**18,2^{BC}**	**19,3^{C}**	**20,5^{C}**	**17,2**
	SD	**1,6**	**3,4**	**4,1**	**4,2**	**4,5**	**2,9**

Unterschiedliche Großbuchstaben kennzeichnen signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede zwischen den Zeitpunkten nach nicht-parametrischem Test (Mann-Whitney)

Anhangstabelle 3: Körpergewicht [g] vor Versuchsbeginn (T_0) sowie nach jeder Versuchswoche

Gruppe	Tier	T_0	Woche 1	Woche 2	Woche 3	Woche 4	Woche 5
Kontrolle	1	22,0	26,8	31,2	34,8	37,7	39,5
	2	25,7	30,6	34,4	37,4	40,3	40,8
	3	25,8	29,6	33,6	36,2	39,5	40,5
	4	29,5	34,8	37,7	40,0	41,1	40,6
	5	30,0	34,2	37,8	40,4	42,8	43,8
	6	31,3	35,1	37,7	40,0	41,2	41,8
	7	31,5	33,3	35,8	37,7	38,9	40,1
	8	32,8	36,6	39,8	42,0	43,2	44,2
	9	35,6	38,5	39,7	39,2	38,5	37,6
	MW	**29,4**	**33,3**	**36,4**	**38,6**	**40,4**	**41,0**
	SD	**4,2**	**3,7**	**2,9**	**2,3**	**1,9**	**2,1**
Gesamte Frucht	1	22,4	26,4	29,3	32,7	35,1	36,9
	2	24,9	28,2	31,2	35,4	36,0	35,3
	3	25,9	28,6	32,4	35,8	38,2	39,6
	4	29,5	32,7	34,7	37,2	39,1	39,6
	5	30,3	30,8	30,9	33,5	34,7	35,9
	6	31,1	35,1	37,2	38,4	40,3	40,2
	7	31,8	34,7	36,8	37,9	38,3	37,8
	8	32,4	33,8	34,0	35,2	35,2	34,6
	9	33,1	35,4	35,2	35,3	35,2	35,5
	MW	**29,0**	**31,7**	**33,5**	**35,7****	**36,9*****	**37,3*****
	SD	**3,8**	**3,4**	**2,7**	**1,9**	**2,1**	**2,1**
Lipidfraktion	1	22,4	26,7	30,6	32,2	32,9	31,4
	2	24,8	26,6	29,9	33,1	35,3	35,6
	3	26,1	29,4	33,1	36,3	36,8	38,1
	4	29,4	30,0	31,4	33,1	33,5	34,0
	5	30,5	33,0	35,1	37,4	39,5	40,2
	6	31,1	32,7	35,6	37,3	38,1	38,0
	7	31,8	35,2	37,1	38,9	39,3	38,8
	8	32,2	36,3	39,2	41,1	41,7	40,6
	9	33,0	36,2	38,7	40,2	40,6	39,9
	MW	**29,0**	**31,8**	**34,5**	**36,6**	**37,5****	**37,4*****
	SD	**3,7**	**3,8**	**3,5**	**3,2**	**3,1**	**3,1**
Saponinfraktion	1	22,7	27,2	31,4	35,0	37,3	39,3
	2	24,6	27,9	31,3	33,5	35,3	34,8
	3	26,7	30,1	33,0	34,2	---	---
	4	29,0	30,8	33,2	35,2	36,4	37,2
	5	30,6	33,5	36,3	37,8	37,9	38,1
	6	31,1	32,6	35,5	36,9	37,6	37,8
	7	31,9	35,1	37,5	38,3	38,4	37,8
	8	32,0	35,1	36,8	37,6	37,5	37,5
	9	33,8	37,3	38,0	37,9	36,6	35,6
	MW	**29,2**	**32,2**	**34,8**	**36,3**	**37,1****	**37,3*****
	SD	**3,7**	**3,4**	**2,6**	**1,8**	**1,0**	**1,4**
Wasserlösliche Fraktion	1	23,1	28,1	32,3	35,9	38,8	40,5
	2	23,2	28,1	32,6	36	38,4	39,3
	3	28,3	30,6	33,5	33,6	38,4	40,6
	4	28,7	31,7	35,2	37,5	38,0	37,0
	5	30,7	34,5	36,6	37,8	37,0	36,0
	6	30,9	32,5	35,3	36,9	36,6	35,3
	7	31,9	34,5	35,6	35,8	35,8	35,5
	8	32,0	36,0	38,2	40,4	40,8	40,8
	9	34,4	38,7	40,7	41,4	40,3	39,3
	MW	**29,2**	**32,7**	**35,6**	**37,3**	**38,2**	**38,3****
	SD	**3,9**	**3,6**	**2,7**	**2,4**	**1,6**	**2,3**
Gesamt	**MW**	**29,2^{A}**	**32,3^{B}**	**35,0^{C}**	**36,9^{D}**	**38,0^{E}**	**38,3^{E}**
	SD	**3,7**	**3,5**	**2,9**	**2,5**	**2,4**	**2,6**

Unterschiedliche Großbuchstaben kennzeichnen signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede zwischen den Zeitpunkten
** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle

Anhangstabelle 4: Blutzuckerspiegel [mg/dL] vor (T_0) und zwei Wochen nach Versuchsbeginn (T_2) sowie HbA_{1C}-Werte [%]

Gruppe	Tier	Blutglucose T_0	Blutglucose T_2	Blutglucose T_2-T_0	HbA_{1C}
Kontrolle	1	101	144	43,0	8,40
	2	93	183	90,0	10,40
	3	112	158	46,0	8,40
	4	151	243	92,0	9,70
	5	42	151	109,0	9,30
	6	170	165	-5,0	8,90
	7	111	211	100,0	8,50
	8	270	249	-21,0	8,90
	9	316	448	132,0	10,80
	MW	**151,8**	**216,9**	**65,1**	**9,26**
	SD	**88,5**	**94,9**	**52,6**	**0,88**
Gesamte Frucht	1	90	130	40,0	8,90
	2	110	178	68,0	8,50
	3	95	167	72,0	7,30
	4	223	342	119,0	7,90
	5	126	152	26,0	7,10
	6	148	229	81,0	8,40
	7	233	318	85,0	9,40
	8	89	269	180,0	9,20
	9	315	301	-14,0	9,50
	MW	**158,8**	**231,8**	**73,0**	**8,47**
	SD	**80,1**	**78,7**	**55,5**	**0,88**
Lipidfraktion	1	92	152	60,0	7,50
	2	121	115	-6,0	7,20
	3	78	157	79,0	7,10
	4	114	138	24,0	7,10
	5	112	181	69,0	7,50
	6	58	196	138,0	9,20
	7	181	209	28,0	8,60
	8	196	228	32,0	9,20
	9	226	265	39,0	8,90
	MW	**130,9**	**182,3**	**51,4**	**8,03***
	SD	**57,2**	**47,3**	**41,5**	**0,92**
Saponinfraktion	1	84	107	23,0	6,60
	2	64	207	143,0	8,30
	3[§]	95	196	101,0	---
	4	106	128	22,0	8,00
	5	112	191	79,0	8,60
	6	120	255	135,0	7,80
	7	268	257	-11,0	8,90
	8	119	233	114,0	7,80
	9	230	347	117,0	11,30
	MW	**133,1**	**213,4**	**80,3**	**8,41**
	SD	**68,7**	**71,9**	**55,7**	**1,35**
Wasserlösliche Fraktion	1	75	156	81,0	6,60
	2	80	145	65,0	7,40
	3	97	206	109,0	6,50
	4	116	285	169,0	8,80
	5	290	193	-97,0	9,30
	6	105	179	74,0	9,10
	7	181	257	76,0	8,90
	8	183	230	47,0	7,90
	9	465	336	-129,0	10,60
	MW	**176,9**	**220,8**	**43,9**	**8,34**
	SD	**127,9**	**62,7**	**95,8**	**1,35**
Gesamt	**MW**	**150,29[A]**	**213,04[B]**	**62,76**	**8,50**
	SD	**85,52**	**71,46**	**61,60**	**1,12**

Unterschiedliche Großbuchstaben kennzeichnen signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede zwischen den Zeitpunkten
[§] vor Versuchsende verstorben
* $p \leq 0,1$ vs. Kontrolle

Anhangstabelle 5: Aktivität [U/g Protein] der Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B nativ (pH 7,2), mit 2 mM Dithiothreitol (+DTT) oder sauer (pH 6,0) gemessen

Gruppe	Tier	Muskel pH 7,2	Muskel +DTT	Muskel pH 6,0	Leber pH 7,2	Leber +DTT	Fettgewebe pH 7,2	Fettgewebe +DTT
Kontrolle	1	2,22	2,09	3,97	6,77	9,56	8,62	10,12
	2	2,10	2,19	4,57	9,48	11,39	9,22	8,03
	3	1,87	1,95	3,23	7,72	10,91	10,64	9,24
	4	2,76	2,66	6,65	7,79	9,49	9,60	12,27
	5	3,01	2,18	5,98	5,71	5,75	9,65	8,27
	6	2,45	2,63	7,58	9,45	10,89	12,64	13,61
	7	2,05	2,04	6,76	8,00	10,54	8,80	11,88
	8	1,40	1,54	5,95	10,42	11,58	8,83	9,23
	9	2,13	1,77	6,15	8,62	12,09	13,54	16,72
	MW	**2,22**	**2,12**	**5,56**	**8,22**	**10,24**	**10,17**	**11,04**
	SD	**0,48**	**0,36**	**1,43**	**1,46**	**1,89**	**1,78**	**2,86**
Gesamte Frucht	1	2,73	1,93	6,10	8,54	9,95	9,00	9,52
	2	2,32	2,07	7,07	7,62	9,27	9,58	7,93
	3	1,87	1,47	5,39	7,61	9,16	13,61	13,89
	4	1,83	2,94	9,87	7,49	7,95	10,31	12,52
	5	0,83	1,82	6,92	8,31	9,60	10,68	11,44
	6	1,57	1,98	6,51	8,44	8,59	10,33	14,30
	7	2,52	2,43	7,57	9,60	12,80	7,48	10,30
	8	1,70	2,00	6,36	7,93	11,32	9,07	11,94
	9	2,11	2,47	7,11	8,16	12,81	12,47	16,02
	MW	**1,94**	**2,12**	**6,99****	**8,19**	**10,16**	**10,28**	**11,99**
	SD	**0,57**	**0,43**	**1,26**	**0,65**	**1,76**	**1,85**	**2,53**
Lipidfraktion	1	1,74	1,88	5,19	8,60	10,95	10,68	12,67
	2	1,49	1,61	5,37	8,67	9,07	8,48	7,67
	3	1,58	1,47	5,74	6,72	10,31	11,18	12,24
	4	1,61	1,60	6,55	7,89	10,37	9,34	10,81
	5	1,83	1,95	6,23	6,56	9,42	8,67	10,97
	6	2,05	1,66	6,06	9,77	10,82	9,14	11,43
	7	1,60	1,93	6,36	8,14	8,71	9,21	14,69
	8	1,77	1,74	6,35	7,62	10,85	9,30	10,48
	9	1,70	2,15	6,74	8,23	9,41	10,10	10,10
	MW	**1,71***	**1,78**	**6,07**	**8,02**	**9,99**	**9,57**	**11,23**
	SD	**0,17**	**0,21**	**0,53**	**0,99**	**0,85**	**0,91**	**1,93**
Saponinfraktion	1	2,01	2,53	6,80	9,42	11,34	9,09	9,67
	2	1,90	1,89	7,17	7,49	10,30	9,74	9,29
	3[§]	---	---	---	---	---	---	---
	4	0,61	1,77	6,27	8,92	11,58	13,13	14,94
	5	1,61	2,03	7,92	8,99	8,77	9,32	12,32
	6	1,74	2,45	6,25	7,87	11,44	10,34	13,20
	7	1,91	1,78	5,98	8,63	10,92	11,74	14,73
	8	2,17	2,38	7,18	7,40	10,31	10,16	12,29
	9	1,4030	2,57	7,02	7,80	11,62	11,26	13,56
	MW	**1,67****	**2,17**	**6,83***	**8,32**	**10,78**	**10,60**	**12,50**
	SD	**0,49**	**0,34**	**0,64**	**0,77**	**0,97**	**1,36**	**2,10**
Wasserlösliche Fraktion	1	2,67	2,11	6,65	7,32	9,69	10,96	10,66
	2	2,28	2,60	7,03	8,32	11,54	11,02	10,34
	3	1,76	2,35	5,90	5,89	10,00	11,45	10,52
	4	2,21	2,11	6,51	7,84	8,84	7,74	12,76
	5	1,25	1,56	4,90	9,29	11,05	8,92	10,81
	6	1,64	1,77	5,56	7,19	10,03	11,67	10,97
	7	2,39	2,03	6,78	8,05	10,93	8,38	12,62
	8	1,62	1,26	6,12	7,12	11,51	8,40	12,11
	9	1,66	1,51	5,41	7,51	11,88	7,61	11,70
	MW	**1,94**	**1,92**	**6,09**	**7,62**	**10,61**	**9,57**	**11,39**
	SD	**0,46**	**0,43**	**0,71**	**0,94**	**1,02**	**1,67**	**0,93**
Gesamt	**MW**	**1,90**	**2,02**	**6,31**	**8,07**	**10,35**	**10,03**	**11,61**
	SD	**0,48**	**0,38**	**1,07**	**0,99**	**1,35**	**1,54**	**2,14**

[§] vor Versuchsende verstorben
** $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,01$ vs. Kontrolle

Anhangstabelle 6: Differentielle Expression (in % zur Kontrolle) von Genen, die über Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren reguliert werden, mit oder ohne Korrektur um β Aktin

Gruppe	Tier	β Aktin	Adiponektin ohne Korrektur	Adiponektin mit Korrektur	Resistin ohne Korrektur	Resistin mit Korrektur	Acyl CoA DH[1] ohne Korrektur	Acyl CoA DH[1] mit Korrektur
Kontrolle	1	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	2	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	3	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	4	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	5	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	6	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	7	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	8	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	9	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
	MW	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**	**100,00**
	SD	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**	**0,00**
Gesamte Frucht	1	91,86	103,51	112,68	101,14	110,10	70,57	161,81
	2	120,98	99,24	82,03	94,77	78,33	58,32	67,20
	3	114,57	110,55	96,49	125,96	109,94	275,27	159,79
	4	108,98	101,79	93,40	102,98	94,49	310,75	255,01
	5	118,25	102,11	86,35	116,82	98,79	117,00	81,75
	6	85,74	83,47	97,36	91,15	106,32	82,43	20,32
	7	76,01	94,95	124,92	106,06	139,54	202,01	143,54
	8	109,06	93,07	85,34	169,74	155,64	110,31	77,67
	9	96,71	111,14	114,92	121,30	125,43	182,87	137,27
	MW	**102,46**	**99,98**	**99,28**	**114,44**	**113,17**	**156,61**	**122,71**
	SD	**15,61**	**8,68**	**14,94**	**23,85**	**23,68**	**91,43**	**69,21**
Lipidfraktion	1	113,41	103,95	91,66	103,97	91,68	71,23	96,09
	2	93,37	95,06	101,81	78,44	84,01	20,58	25,71
	3	118,49	118,75	100,22	132,24	111,60	274,94	125,34
	4	114,25	102,85	90,02	93,24	81,61	178,67	197,32
	5	106,97	100,94	94,36	106,53	99,58	109,12	85,16
	6	96,34	81,96	85,07	107,02	111,08	108,81	27,97
	7	67,95	93,11	137,03	58,45	86,03	216,03	137,27
	8	55,63	86,81	156,04	128,39	230,79	111,54	82,79
	9	79,33	118,61	149,52	99,15	124,98	217,46	177,41
	MW	**93,97**	**100,23**	**111,75**	**100,83**	**113,48**	**145,38**	**106,12**
	SD	**22,15**	**12,72**	**27,72**	**22,87**	**46,38**	**81,36**	**59,58**
Saponinfraktion	1	118,21	127,40	107,77	101,38	85,76	49,60	68,45
	2	68,74	75,97	110,52	52,15	75,87	90,61	78,80
	3[§]	---	---	---	---	---	---	---
	4	105,63	96,54	91,40	78,13	73,97	222,49	216,94
	5	80,72	92,84	115,01	86,83	107,56	49,28	83,56
	6	91,25	87,66	96,07	72,35	79,28	79,77	25,29
	7	73,54	105,87	143,97	76,91	104,59	143,76	126,31
	8	77,36	102,53	132,53	198,43	256,49	104,53	80,08
	9	75,21	120,35	160,02	100,26	133,31	157,52	177,08
	MW	**86,33**	**101,15**	**119,66**	**95,81**	**114,60**	**112,20**	**107,07**
	SD	**17,41**	**16,85**	**23,87**	**44,38**	**60,78**	**59,37**	**62,80**
Wasserlösliche Fraktion	1	99,72	117,96	118,29	110,42	110,73	121,36	87,49
	2	115,62	104,52	90,39	91,73	79,34	109,02	98,70
	3	108,63	115,51	106,33	122,45	112,72	236,28	112,71
	4	132,91	108,79	81,85	112,37	84,55	217,23	181,60
	5	132,22	121,82	92,14	99,54	75,29	300,53	124,24
	6	92,44	88,96	96,23	94,80	102,55	91,51	27,00
	7	100,61	97,87	97,28	96,17	95,58	180,89	126,75
	8	81,78	84,91	103,82	202,57	247,69	102,90	101,00
	9	65,95	100,61	152,57	33,02	50,07	157,22	135,74
	MW	**103,32**	**104,55**	**104,32**	**107,01**	**106,50**	**168,55**	**110,58**
	SD	**22,05**	**12,77**	**20,89**	**43,93**	**56,46**	**71,31**	**41,66**

[§] vor Versuchsende verstorben
[1] Acyl CoA Dehydrogenase

Anhangstabelle 7: Konzentration an Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen

Gruppe	Tier	Leber [µmol/g Leber]	Leber [µmol/g Protein]	Fettgewebe [µmol/g Fett]	Fettgewebe [µmol/g Protein]	Muskel [µmol/g Muskel]	Muskel [µmol/g Protein]
Kontrolle	1	6,43	0,06	17,11	3,42	11,02	0,29
	2	9,92	0,10	12,26	3,48	20,16	0,62
	3	12,71	0,10	14,49	3,20	6,60	0,16
	4	11,76	0,09	11,46	2,82	23,87	0,79
	5	7,45	0,08	12,62	4,21	~~73,61~~	~~3,18~~
	6	7,93	0,07	18,62	5,24	18,33	0,48
	7	10,34	0,09	15,36	4,18	15,47	0,42
	8	10,94	0,14	10,45	2,81	7,52	0,15
	9	12,50	0,16	19,50	4,61	19,76	0,55
	MW	**10,00**	**0,10**	**14,65**	**3,77**	**15,34**	**0,43**
	SD	**2,27**	**0,03**	**3,23**	**0,84**	**6,33**	**0,23**
Gesamte Frucht	1	8,96	0,09	7,30	2,31	11,49	0,28
	2	12,84	0,13	10,07	4,64	9,37	0,28
	3	9,56	0,10	9,21	3,85	11,43	0,22
	4	9,69	0,09	6,53	1,79	9,81	0,34
	5	9,74	0,08	4,52	3,62	10,64	0,31
	6	11,83	0,08	6,74	2,71	10,76	0,27
	7	16,60	0,17	6,83	3,51	17,69	0,45
	8	7,55	0,08	8,30	3,42	21,39	0,77
	9	12,06	0,11	18,23	3,24	11,59	0,25
	MW	**10,98**	**0,10**	**8,64**	**3,23**	**12,69**	**0,35**
	SD	**2,69**	**0,03**	**3,94**	**0,85**	**4,07**	**0,17**
Lipidfraktion	1	13,97	0,16	5,09	2,80	21,84	0,76
	2	13,37	0,09	5,61	3,37	23,66	0,57
	3	13,49	0,11	3,57	1,70	10,01	0,22
	4	12,98	0,11	2,32	1,15	5,95	0,16
	5	11,65	0,08	5,61	1,91	7,99	0,20
	6	17,01	0,14	9,49	2,96	25,89	0,60
	7	16,24	0,12	5,25	3,55	6,42	0,19
	8	20,85	0,14	2,25	1,21	6,04	0,16
	9	12,75	0,08	3,41	1,58	4,66	0,14
	MW	**14,70**	**0,11**	**4,73**	**2,25*** **	**12,50**	**0,33**
	SD	**2,86**	**0,03**	**2,23**	**0,93**	**8,67**	**0,24**
Saponinfraktion	1	9,55	0,08	7,95	2,52	9,24	0,29
	2	11,46	0,10	3,87	1,79	6,71	0,21
	3[§]	---	---	---	---	---	---
	4	12,15	0,11	7,54	1,98	14,41	0,46
	5	8,24	0,06	2,27	1,22	11,84	0,36
	6	19,09	0,18	7,28	2,47	8,15	0,26
	7	18,75	0,15	5,20	1,92	11,22	0,38
	8	11,04	0,10	8,03	3,23	6,94	0,17
	9	12,95	0,11	5,35	2,44	15,08	0,38
	MW	**12,90**	**0,11**	**5,93**	**2,19*** **	**10,45**	**0,31**
	SD	**3,99**	**0,04**	**2,12**	**0,60**	**3,22**	**0,10**
Wasserlösliche Fraktion	1	9,37	0,08	9,64	4,55	12,40	0,20
	2	6,84	0,06	10,81	5,91	10,20	0,17
	3	9,96	0,08	6,35	3,22	6,54	0,10
	4	11,72	0,10	~~10,58~~	~~8,88~~	13,54	0,22
	5	17,10	0,10	5,27	2,20	5,36	0,11
	6	11,81	0,10	9,77	3,77	9,61	0,13
	7	18,02	0,17	6,76	2,45	13,54	0,27
	8	11,19	0,10	8,69	5,86	4,78	0,08
	9	19,41	0,15	14,56	5,14	3,84	0,07
	MW	**12,82**	**0,11**	**8,98**	**4,14**	**8,87**	**0,15**** **
	SD	**4,32**	**0,03**	**2,96**	**1,46**	**3,84**	**0,07**
Gesamt	**MW**	**12,27**	**0,11**	**8,64**	**3,12**	**11,92**	**0,31**
	SD	**3,56**	**0,03**	**4,53**	**1,21**	**5,79**	**0,19**

Streichungen=Ausreißer
[§] vor Versuchsende verstorben
** $p \leq 0{,}01$, *** $p \leq 0{,}001$ vs. Kontrolle

Danksagung

Ich bedanke mich vielmals bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Krawinkel, für die Betreuung meiner Promotion und dafür, dass mir dieses interessante Thema anvertraut wurde. Bei der Planung und Durchführung meiner Promotion konnte ich stets eigene Ideen einbringen und verwirklichen.

Bei Herrn Prof. Dr. Josef Pallauf bedanke ich mich für die umfassende Unterstützung während meiner Promotion. Dies beinhaltete abgesehen von der Co-Betreuung meiner Promotion eine Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin vom 15.10.2007 bis zum 30.09.2009, die Nutzung des Stoffwechsellabors und der Laborräume des Instituts für Tierernährung und Ernährungsphysiologie zur Bearbeitung meines Promotionsthemas sowie Unterstützung beim Verfassen der englischen Publikationen durch Herrn und Frau Pallauf.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Dr. (habil.) Andreas Müller, der mir stets als freundschaftlicher und wissenschaftlich kompetenter Ansprechpartner zur Verfügung stand. Vielen Dank auch für die Unterstützung zur Durchführung der Western Blots.

Vielen Dank weiterhin an Dr. Jochen Wilhelm für die Zusammenarbeit bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Microarrays.

Vielen Dank an Veronika Kind, Dr. Christian Borsch und Dr. (habil.) Silvia Rudloff für die Zusammenarbeit bei der Quantifizierung der bioaktiven Inhaltsstoffe der Bittergurke.

Ohne die finanzielle Unterstützung und die Zusammenarbeit mit der GTZ, dem AVRDC und der DANONE Stiftung wäre die erfolgreiche Durchführung meines Promotionsprojektes nicht möglich gewesen. Dafür vielen Dank.

Nicht zuletzt bedanke ich mich an dieser Stelle bei allen Kollegen und Kolleginnen sowie ehemaligen Kollegen und Kolleginnen, Freunden und meiner Familie für jede Art der Unterstützung und Rücksichtnahme ohne diese Personen im einzelnen zu nennen. Ein besonderer Dank gilt dabei meinem Mann Jan Habicht.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5875-3