

Einfluss von Zink- und Lipidalimentation auf die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase und ausgewählte Merkmale des Lipidstoffwechsels wachsender Ratten

Jennifer Justus

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

Aus dem Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Einfluss von Zink- und Lipidalimentation auf die
 Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase und ausgewählte Merkmale
des Lipidstoffwechsels wachsender Ratten**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. oec. troph.)
am Fachbereich 09 - Agrarwissenschaften, Ökotrophologie
und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Dipl. oec. troph. Jennifer Justus

Gießen 2007

Dissertation am Fachbereich
Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. R. Herrmann

Prüfungskommission:

Vorsitzende: Prof. Dr. I. Hoffmann
1. Gutachter: Prof. Dr. E. Weigand
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Pallauf
Prüfer: Prof. Dr. H. Brückner
Prüferin: PD Dr. S. Rudloff

Tag der Disputation: 22. Januar 2007

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen.....	IV
Verzeichnis der Übersichten	V
Verzeichnis der Anhangstabellen und -abbildungen.....	VII
Verzeichnis der Abkürzungen	IX
1 Einleitung	1
2 Zinkmangel und dessen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel	2
2.1 Das Spurenelement Zink	2
2.1.1 Zinkmangel	2
2.1.2 Biologische Funktionen von Zink	4
2.1.3 Zinkmetabolismus und Zinkstatusbestimmung	6
2.2 Regulation der Genexpression durch Zink	10
2.3 Veränderungen im Lipidstoffwechsel und spezifischer Metabolismus ungesättigter Fettsäuren.....	13
2.3.1 Veränderungen des Lipidstoffwechsels im Zinkmangel.....	13
2.3.2 Degradation ungesättigter Fettsäuren und Funktion der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase	16
2.3.3 Expressionsmodulatorisches Potential ungesättigter Fettsäuren	20
3 Experimenteller Teil.....	24
3.1 Fragestellung	24
3.2 Versuchsbeschreibung	25
3.3 Zusammensetzung der Versuchsdieten	28
3.4 Gewinnung und Aufbereitung des Analysenmaterials	29
3.5 Analytische Methoden	30
3.5.1 Hämoglobin, Hämatokrit	30
3.5.2 Fettgehalt der Faeces.....	30
3.5.3 Bestimmung des Zinkstatus.....	30
3.5.4 Proteinkonzentrationen.....	31
3.5.5 Aktivität der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase	31
3.5.5.1 Substrat-Herstellung	31
3.5.5.2 Gewinnung der Mitochondrienfraktionen	34
3.5.5.3 Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase-Assay	35
3.5.5.4 Succinatdehydrogenase-Assay	36
3.5.6 Genexpressionsanalysen	37
3.5.6.1 Extraktion der Gesamt-RNA	37

3.5.6.2	RT-PCR	38
3.5.6.3	Agarose-Gelelektrophorese und Auswertung der optischen Dichten	40
3.5.7	Lipidprofil	40
3.5.7.1	Plasmalipide	40
3.5.7.2	Lipidprofil der Leber	40
3.5.7.3	Fettsäuremuster der Lipidfraktionen der Leber	41
3.5.8	Ketonkörper in Plasma und Urin	45
3.6	Statistische Auswertung	46
4	Ergebnisse	47
4.1	Versuchsverlauf	47
4.2	Futtermittelaufnahme, Lebendmasseentwicklung, Futtermittelnutzung und Fettverdaulichkeit	47
4.3	Zinkstatus und hämatologische Parameter	49
4.4	Aktivität der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase	50
4.5	mRNA-Expression der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase sowie der PPARs <i>alpha</i> und <i>gamma</i>	54
4.6	Plasmalipide	57
4.7	Lipidfraktionen der Leber	58
4.8	Fettsäuremuster der Leber-Lipidfraktionen	60
4.9	Ketonkörper	68
5	Diskussion	69
5.1	Anmerkung zum Tiermodell	69
5.2	Einfluss der alimentären Lipid- und Zinkversorgung auf Wachstum und Zinkstatus der Versuchstiere	70
5.3	Einfluss der Zink- und Lipidalimentation auf Aktivität und Expression der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase	74
5.4	Beeinflussung der Expression von PPAR <i>alpha</i> , PPAR <i>gamma</i> und der Ketonkörperkonzentration	79
5.5	Auswirkungen auf das Lipidprofil von Plasma und Leber	82
5.6	Einfluss der Zink- und Lipidalimentation auf das Fettsäuremuster der Gesamtlipide, Triglyceride und Phospholipide der Leber	85
5.7	Fazit	89
6	Zusammenfassung	91
7	Literaturverzeichnis	93
8	Anhang	106

Kurzfassung.....134

Abstract.....135

Erklärung.....136

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1:	Zinkstrukturen (A) in Zink-Metalloenzymen, (B) in DNA-Bindungsdomänen von Transkriptionsfaktoren (nach VALLEE und AULD 1992)	5
Abbildung 2:	Theoretische Modelle der Beziehung zwischen endogener Zink-Exkretion und absorbiertes Zinkmenge bei defizitärer Zinkzufuhr. (a) Absorptionsunabhängige Exkretion, (b) Absorptionsabhängige Exkretion (HAMBIDGE 2003b)	7
Abbildung 3:	Mögliche Einflussebenen von Zink auf die Genexpression (nach COUSINS 1998)	10
Abbildung 4:	Abbauewege ungesättigter FS mit Doppelbindungen an gerad- oder ungeradzahigen C-Atomen. Mitte: NADPH-unabhängiger Isomeraseweg, rechts: NADPH-abhängiger Reduktaseweg (nach GEISBRECHT et al. 1999)	18
Abbildung 5:	Postulierte Mechanismen der Regulation der Genexpression durch mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (PUFA) (CLARKE 2001)	21
Abbildung 6:	Schema der Festphasenextraktion zur Separation individueller Lipidklassen	42
Abbildung 7:	GC-Chromatogramm des FAME-Mix C4-C24	45
Abbildung 8:	Wöchentliche Futtermittelaufnahme der <i>ad libitum</i> -Versuchsgruppen	47
Abbildung 9:	Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase-Expression: Ethidiumbromidfluoreszenz der RT-PCR-Amplifikate von ECI und GAPDH (A)	54
Abbildung 10:	PPAR γ -Expression: Ethidiumbromidfluoreszenz der RT-PCR-Amplifikate von PPAR γ und GAPDH (B)	55
Abbildung 11:	PPAR α -Expression: Ethidiumbromidfluoreszenz der RT-PCR-Amplifikate von PPAR α und GAPDH (A)	55
Abbildung 12:	GC-Chromatogramm der GL-FS von Versuchstier 13 (50Zn-GFS)	63
Abbildung 13:	GC-Chromatogramm der GL-FS von Versuchstier 26 (50Zn-UFS)	63
Abbildung 14:	Relativwerte ausgewählter Zinkstatusparameter wachsender Ratten nach 4wöchiger Versuchsdauer	72
Abbildung 15:	Einfluss von Zink- und Lipidalimentation auf (A) die Aktivität der ECI, (B) die Aktivität der SDH und (C) die ECI-SDH-Relation in untersuchten Geweben	76
Abbildung 16:	Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidkonzentrationen der Leber	84
Abbildung 17:	Summierte Fettsäuregehalte in den Gesamtlipiden der Leber	86

Verzeichnis der Übersichten

Übersicht 1:	Dietary Reference Intakes (DRI) für Zink (TRUMBO et al. 2001).....	8
Übersicht 2:	Mögliche Kriterien zur Diagnose eines Zink-Mangels (ROTH und KIRCHGESSNER 1999).....	9
Übersicht 3:	Ausgewählte Genexpressionsanalysen und verifizierte zinksensitive Gene	12
Übersicht 4:	Am Tiermodell (Ratte) dokumentierte Veränderungen des Lipidmetabolismus im experimentellen Zinkmangel	14
Übersicht 5:	Versuchsparameter	24
Übersicht 6:	Versuchsplan.....	25
Übersicht 7:	Zusammensetzung der Versuchsdäten	26
Übersicht 8:	Fettsäuremuster der Diätfette (Mol %)	27
Übersicht 9:	Rohnährstoffgehalte (% AM) und Bruttoenergie (kJ/g AM) der Diäten	28
Übersicht 10:	Fettsäuremuster der Versuchsdäten (g/100g FS)	29
Übersicht 11:	HPLC-Bedingungen für die Aufreinigung der <i>trans</i> -3-Hexenoyl-CoA-Lösung.....	33
Übersicht 12:	Gen-spezifische Vorwärts- und Rückwärts-Primer.....	39
Übersicht 13:	PCR-Amplifikationsprotokoll	39
Übersicht 14:	GC-Parameter und Temperaturprogramme zur Bestimmung des FS-Musters	44
Übersicht 15:	Lebendmasse zu Beginn und am Ende des Versuchs, Gesamtzunahme und durchschnittliche Futterverwertung (g Futter-TM je g Gewichtszunahme).....	48
Übersicht 16:	Zinkkonzentrationen des Plasma und des Femurs, Gesamtzinkmenge der Leber, Aktivität der Alkalischen Phosphatase des Plasmas und Metallothioneinkonzentration der Leber.....	49
Übersicht 17:	Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase der Leber und der Niere (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U).....	51
Übersicht 18:	Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase der Herz- und der Skelettmuskulatur (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U)	52
Übersicht 19:	Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase des Testis und des Fettgewebes (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U).....	53
Übersicht 20:	Relative mRNA-Expression der Enoyl-CoA-Isomerase und der PPAR γ und PPAR α in der Leber	56
Übersicht 21:	Cholesterinkonzentration und Triglyceridkonzentration des Plasmas.....	57
Übersicht 22:	Gesamtlipidgehalt, Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidkonzentrationen der Leber (mg/g Leber-FM)	58

Übersicht 23:	Relative Gesamtlipid-, Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidgehalte der Leber (mg/100 g Lebendmasse).....	59
Übersicht 24:	Fettsäuren der Gesamtlipide der Leber (g/100g Gesamtfettsäuren)	61
Übersicht 25:	Fettsäuren der Gesamtlipide der Leber (mg/g Leber-FM).....	64
Übersicht 26:	Fettsäuren der hepatischen Triglyceridfraktion (g/100g Gesamtfettsäuren).....	66
Übersicht 27:	Fettsäuren der hepatischen Phospholipidfraktion (g/100g Gesamtfettsäuren).....	67

Verzeichnis der Anhangstabellen und -abbildungen

Tabelle A 1:	Lebendmasse (g) und Lebendmassezunahme im Versuchszeitraum.....	106
Tabelle A 2:	Wöchentliche Futtermittelaufnahme (g FM), Gesamtfuttermittelaufnahme und durchschnittliche Futtermittelverwertung (g TM je g Gewichtszunahme).....	107
Tabelle A 3:	Frischgewichte von Leber, Herz, Nieren, Testes, rechtem Femur (g) sowie relatives Lebergewicht (g/100 g Lebendmasse)	108
Tabelle A 4:	Hämoglobingehalt und Hämatokrit im Vollblut; Faecesfettgehalt (% TM), Fettbilanz (Aufnahme minus Ausscheidung) und Fettverdaulichkeit im Bilanzzeitraum	109
Tabelle A 5:	Zinkkonzentrationen in Plasma und Femur; Zinkkonzentration, Gesamtzinkgehalt und Eisenkonzentration der Leber	110
Tabelle A 6:	Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Plasma sowie Metallothionein-Konzentration der Leber (ng/mg Protein, µg/g Leber-Frischmasse, Gesamtmenge Leber-MT)	111
Tabelle A 7:	Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase der Leber und der Niere (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U).....	112
Tabelle A 8:	Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase der Herz- und der Skelettmuskulatur (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U).....	113
Tabelle A 9:	Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase des Testis und des Fettgewebes (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U).....	114
Tabelle A 10:	Relative mRNA-Expression von Enoyl-CoA-Isomerase, PPARgamma und PPARalpha der Leber.....	115
Tabelle A 11:	Gesamtlipid-, Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidgehalte der Leber (mg/g Leber-FM) sowie Anteile an der GL-Fraktion (%)	116
Tabelle A 12:	Cholesterin- und Triglyceridgehalte des Plasmas; Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidgehalte der Gesamtleber pro 100 g Lebendmasse	117
Tabelle A 13:	Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (g/100g FS), Teil 1	118
Tabelle A 14:	Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (g/100g FS), Teil 2	119
Tabelle A 15:	Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (g/100g FS), Teil 3	120
Tabelle A 16:	Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (mg/g FM), Teil 1.....	121
Tabelle A 17:	Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (mg/g FM), Teil 2.....	122
Tabelle A 18:	Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (mg/g FM), Teil 3.....	123
Tabelle A 19:	Fettsäuren der Triglycerid-Fraktion der Leber (g/100g FS), Teil 1	124
Tabelle A 20:	Fettsäuren der Triglycerid-Fraktion der Leber (g/100g FS), Teil 2	125
Tabelle A 21:	Fettsäuren der Phospholipid-Fraktion der Leber (g/100g FS), Teil 1	126
Tabelle A 22:	Fettsäuren der Phospholipid-Fraktion der Leber (g/100g FS), Teil 2.....	127

Tabelle A 23:	3-Hydroxybutyrat-Konzentrationen in Plasma und im Urin der Sammelperiode	128
Tabelle A 24:	FS-Methylester im FAME-Mix C4-C24 (18919, Sigma).....	129
Tabelle A 25:	LCQ-Daten	130
Abbildung A 1:	Molekülstruktur und Molekulargewicht von <i>trans</i> -3-Hexenoyl-CoA	130
Abbildung A 2:	Massenspektren des aufgereinigten <i>trans</i> -3-Hexenoyl-CoA, oben positiver Modus, unten negativer Modus.....	131
Abbildung A 3:	Protokoll des Autokit 3-HB (Wako Chemicals)	132

Verzeichnis der Abkürzungen

3-HB	3-Hydroxybutyrat
AI	<i>Adequate Intake</i>
ALA	alpha-Linolensäure
AP	Alkalische Phosphatase
BHT	Butylhydroxytoluol
BSA	Bovines Serumalbumin
Chol	Cholesterin
CoA	Coenzym A
CRIP	cysteinreiches intestinales Protein
d	Tag
DCIP	2,6-Dichlorophenol-Indophenol
DCT1	<i>Divalent Cation Transporter 1</i> (auch Nramp2)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHA	Docosahexaensäure
DRI	<i>Dietary Reference Intake</i>
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)
ECI	Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase
EPA	Eicosapentaensäure
f	Verdünnungsfaktor
FAME	Fettsäuremethylester
FID	Flammenionisationsdetektor
FM	Frischmasse
FS	Fettsäure
GAPDH	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GFS	Gesättigte Fettsäuren (Kakaobutter-Diät)
GL	Gesamtlipide
Hb	Hämoglobin
Hk	Hämatokrit
HNF-4	<i>Hepatic Nuclear Factor-4</i>
hZip4	<i>human zrt-, irt-like Protein 4</i>
hZTL1	<i>human ZnT-like Transporter 1</i>
ICP-AES	<i>Inductively Coupled Plasma-Atom-Emissions-Spektrometer</i>
IS	Interner Standard
LM	Lösungsmittel
M	Mittelwert

MFE1	Multifunktionales Enzym 1
min	Minute
MRE	<i>Metal Response Element</i>
MT	Metallothionein
MTF1	<i>MRE-binding Transcription Factor-1</i>
MUFS	mehrfach-ungesättigte Fettsäure
n.n.	nicht nachweisbar, Menge unterhalb der Nachweisgrenze
ns	nicht signifikant
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PC	Phosphatidylcholin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PL	Phospholipid
PP	Peroxisomen-Proliferator
PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
PPRE	<i>PPAR-Response Element</i>
RDA	<i>Recommended Dietary Allowance</i>
RT	Reverse Transkriptase
RXR	Retinoid X Receptor
SD	Standardabweichung
SDH	Succinatdehydrogenase
SREBP-1	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein-1</i>
T _a	<i>Annealing</i> -Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TG	Triglycerid
T _m	Schmelz-Temperatur
TM	Trockenmasse
TMSH	N-Trimethylsulfoniumhydroxid
U	Enzymaktivität (Unit, Substratumsatz in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$)
UFS	Ungesättigte Fettsäuren (Distelöl-Diät)
UL	<i>Tolerable Upper Intake Level</i>
v	Volumen
vgl.	vergleiche
vs.	versus
w	Gewicht
Zn	Zink
ZnT-1	Zink-Transporter-1

1 Einleitung

Alimentäre Lipide sichern einen Großteil der Energieversorgung im menschlichen und tierischen Organismus. Essentielle wie nicht-essentielle Fettsäuren (FS) sind „Bausteine“ der Biomembranen, sie regulieren die Zellproliferation und die Genexpression, beeinflussen die antioxidative Kapazität und sind in Form von Eicosanoiden wichtige Mediatoren des Immunsystems. Die Kettenlänge und der Desaturierungsgrad bestimmen ebenso über die modulatorische Potenz der FS wie über ihren Weg im Lipidstoffwechsel.

Ein Zinkmangel kann zu gravierenden Störungen des Lipidstoffwechsels führen. Zink ist ein essentielles Spurenelement mit (seit seiner Entdeckung) immer vielfältigeren physiologischen Funktionen. Obwohl klinische Mangelsymptome selten sind, scheint ein großer Teil der Bevölkerung nur marginal mit Zink versorgt zu sein. Interaktionen zwischen Zink- und Lipidstoffwechsel zeigen sich in einer Vielzahl tierexperimenteller Studien, die bestätigen, dass diese wechselseitige Beeinflussung von der FS-Zusammensetzung der Nahrungsfette abhängig ist.

Untersuchungen zu Aktivität und Genexpression diverser Enzyme scheinen zu beweisen, dass ein absolutes Zinkdefizit bei zwangsernährten Ratten zu einem reduzierten Abbau energieliefernder FS und deren Speicherung in der Leber führt. Unter weniger unphysiologischen Bedingungen, wie infolge marginaler Zinkversorgung, wurden diese Ergebnisse noch nicht bestätigt. Auch liegen bislang nur unzureichende Erkenntnisse über den Einfluss der Zinkversorgung auf die "Hilfsenzyme der β -Oxidation" zum Abbau ungesättigter FS, wie der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase oder der 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase, vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher am Modelltier Ratte zu prüfen, ob die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase als wichtigstes Enzym der β -Oxidation ungesättigter FS durch ein marginales Zinkdefizit in ihrer Aktivität oder Expression beeinflusst wird und ob es zu Änderungen im hepatischen FS-Muster oder anderer Parameter des Lipidstoffwechsels kommt, die auf eine selektive Beeinträchtigung der β -Oxidation ungesättigter FS zurückzuführen sind.

2 Zinkmangel und dessen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel

2.1 Das Spurenelement Zink

Zink (Zn) ist ein zweiwertiges Metall mit der Ordnungszahl 30 und einer relativen Atommasse von 65,38. Das Spurenelement ist für alle Organismen essentiell. Erst 1934 bewiesen TODD et al. die Essentialität von Zink für wachsende Ratten. Zu Beginn der sechziger Jahre wurden von PRASAD Zinkmangelsymptome am Menschen dokumentiert: Junge persische und ägyptische Männer mit einseitiger vegetarischer Kost zeigten neben Eisenmangelanämie Kleinwuchs, Hypogonadismus und verzögerte sexuelle Entwicklung (PRASAD et al. 1961, 1963).

Zink zeigt als divalentes Kation keine Redoxeigenschaften sowie eine äußerst geringe Toxizität. Seine Häufigkeit verglichen mit anderen Übergangsmetallen, seine Verwendung in allen sechs Enzym-Klassen und seine Rolle in der Strukturbildung von Proteinen scheint auf seinen einzigartigen physikochemischen Eigenschaften zu beruhen (VALLEE und FALCHUK 1993, MARET 2005).

Der größte Anteil des humanen Gesamtkörperbestands an Zink von 1,5 - 2,5 g findet sich in Muskulatur und Knochen (AGGETT und FAVIER 1993) und ist zu 95 % intrazellulär lokalisiert. Zink ist nahezu vollständig fest an Proteine gebunden, die Konzentration an freiem bzw. metabolisch aktivem Zink ist somit äußerst niedrig. Mit 11-17 µmol/L repräsentiert die Plasma-Zn-Konzentration etwa 0,1% des menschlichen Körperbestandes.

Die Zn-Homöostase wird über intestinale Absorption und endogene Exkretion im Dünndarm reguliert. Verschiedene physiologische und diätetische Faktoren beeinflussen dabei die Verfügbarkeit von Zink (RIMBACH et al. 1995, HARA et al. 2000, siehe auch CAMARA und AMARO 2003).

2.1.1 Zinkmangel

Zinkmangelsymptome wurden in tierexperimentellen Studien an Spezies wie Ratte, Schwein und Rind (PRASAD et al. 1967) umfassend dokumentiert. In Untersuchungen an Ratten zeigten PALLAUF und KIRCHGESSNER nach wenigen Tagen alimentären Zinkmangels stark reduzierte Futtermittelaufnahmen mit deutlichen zyklischen Schwankungen, und im weiteren Verlauf stagnierendes Wachstum, Alopezie und ausgeprägte Epidermalläsionen bis zu fortgeschrittener Apathie und Kachexie der Versuchstiere (PALLAUF und KIRCHGESSNER 1971a, 1971b, PALLAUF 1983).

Eine Anhebung der Futteraufnahme auf ein "normales" Niveau durch Zwangsernährung der Tiere resultiert in einer höheren Inzidenz und früherer Manifestation klinisch apparenter Zinkmangelsymptome (SCHÜLEIN et al. 1992). ROTH (2003) zeigte an wachsenden Ratten eindrücklich den Einfluss der Proteinzufuhr auf die Entwicklung des Zinkmangels. Die mit der Reduktion der Futteraufnahme einhergehende Wachstumsreduktion als Anpassungsmechanismus an eine unzureichende Zn-Zufuhr verzögerte das Auftreten des Zinkmangels. Mit steigendem Proteingehalt stiegen Futteraufnahme und Gewichtszunahmen der Zn-Mangel-Tiere. Dabei erhöht der höhere Proteinumsatz, der eine Folge einer gestörten Proteinsynthese zu sein scheint, den Zn-Bedarf, welcher über die aus dem Skelett mobilisierbare Zn-Menge nicht mehr gedeckt werden kann und zum Auftreten der charakteristischen Mangelsymptome führt (ROTH 2003).

Beim Menschen gilt die *Akrodermatitis enteropatica*¹ als einzige erbliche Zinkmangel-erkrankung (MOYNAHAN 1974). Die Symptome des seltenen, autosomal-rezessiv vererbten Defekts der intestinalen Zn-Absorption, der auf einer genetischen Mutation des Zn-Transporters ZIP4 zu basieren scheint (DUFNER-BEATTIE et al. 2003), sind schubweise auftretende periorifizielle und akrale Hauteffloreszenzen, Alopezie, Diarrhöen aufgrund erosiv-ulzeröser Kolitis und begleitende psychomotorische Entwicklungsstörungen.

Die Hautveränderungen sind charakteristisch für einen ausgeprägten Zn-Mangel und treten auch bei einer erworbenen Zn-Malabsorption, z. B. infolge chronisch-entzündlicher Darm-erkrankungen, und bei nutritivem Mangel, z. B. aufgrund ungenügender Zn-Substitution bei parenteraler Ernährung, auf (LÖFFLER und EFFENDY 1999).

Im Kontext des alimentär bedingten Zn-Mangels stehen weiterhin eine verminderte Immunabwehr, Störungen der Wundheilung, verzögerte Rekonvaleszenz, Dermatitis, Haarausfall, vermindertes Geschmackempfinden und Appetitlosigkeit (siehe SHANKAR und PRASAD 1998, ABBASI und SHETTY 1999, ROTH und KIRCHGESSNER 1999, HAMBIDGE 2000, FISCHER und BLACK 2004).

Im Vergleich zum eher seltenen schweren Zinkmangel mit pathologischen Symptomen ist der marginale Zn-Mangel weltweit verbreitet (PRASAD 1998, WOOD 2000, BROWN et al. 2001). Von einer suboptimalen Versorgung sind Entwicklungsländer durch allgemeine Unterernährung, niedrige Zn-Gehalte der Nahrung und geringe Zn-Verfügbarkeit besonders betroffen, aber auch in industrialisierten Nationen wie den USA (BRIEFEL et al. 2000), Russland (SCHEPLYAGINA 2005) oder Deutschland (ABBASI und SHETTY 1999) wird von einer latenten Unterversorgung verschiedener Bevölkerungsgruppen ausgegangen. Insbesondere Kleinkinder, heranwachsende Frauen und Ältere werden als Risikogruppen eingestuft. Die Diagnose einer marginalen Zn-Versorgung gestaltet sich noch immer

¹ der englischen oder einer anderen Fremdsprache entnommene Namen und Begriffe sind *kursiv* dargestellt

schwierig. Ergebnisse von Zn-Supplementationsstudien weisen jedoch signifikante positive Effekte auf das Wachstum, das Risiko für infektiöse Erkrankungen (Diarrhöe, Pneumonie) und auf die kognitive Entwicklung bei Kleinkindern nach (BLACK 2003).

2.1.2 Biologische Funktionen von Zink

Die Fülle der dokumentierten Symptome eines Zinkmangels resultiert aus der Beeinträchtigung einer oder mehrerer biologischer Funktionen von Zink. Zink ist an einem extrem breiten Spektrum fundamentaler physiologischer Prozesse wie der Proteinsynthese und -degradation, der DNA- und RNA-Synthese, der Zellproliferation und -differenzierung sowie an der extra- und intrazellulären Signaltransduktion (SALGUEIRO et al. 2000, BEYERSMANN und HAASE 2001) beteiligt. Zink ist essentiell für die Funktionalität von Plasmamembranen (BETTGER und O' DELL 1993, GARCIA et al. 2005) und besitzt offenbar direkten Einfluss auf die Regulation der Apoptose (MEERARANI et al. 2000, TRUONG-TRAN et al. 2001, FRAKER 2005). Eine Beeinflussung der Glucosetoleranz wird auch aufgrund der Beteiligung von Zink an der Speicherung und Sekretion von Insulin diskutiert (BRAND und KLEINEKE 1996, HALL et al. 2005).

Zink ist auch essentiell für die Aufrechterhaltung der Funktion des zellulären Immunsystems. Bereits ein marginaler Zn-Mangel führt zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen. Ausreichend belegt ist die Beeinträchtigung der T-Zell-vermittelten Immunantwort (SHANKAR und PRASAD 1998). Mögliche Mechanismen, durch die Zink das Immunsystem beeinflusst, umfassen die Reifung der B-Lymphocyten und die Produktion von Antikörpern, die Generation von Sauerstoffradikalen, die Produktion von Cytokinen und die Regulation von Apoptose und Genexpression (FIELD et al. 2002, BAO et al. 2003).

Für Zink wurden auch antioxidative Eigenschaften nachgewiesen (DISILVESTRO und BLOSTEIN-FUJII 1997, HENNIG et al. 1999). Generell werden zwei Mechanismen postuliert: Eine Protektion der Sulfhydrylgruppen durch eine Reaktivitätsreduktion infolge Zn-Bindung, sterischer Hemmung oder Konformationsänderung des Enzyms, oder eine Reduktion der Entstehung von Hydroxylradikalen durch den Antagonismus mit redoxaktiven Übergangsmetallen wie Eisen und Kupfer (POWELL 2000). Auch eine indirekte Wirkung über eine Induktion von Metallothionein (MT) und dessen Verbindung zum zellulären Redoxstatus wird diskutiert (siehe dazu MARET 2000, COYLE et al. 2002).

Viele der genannten Funktionen vermittelt Zink über Veränderungen der Expression verschiedener Gene. Die zugrunde liegenden Mechanismen werden in Kapitel 2.2 erläutert.

Generell erfüllt Zink katalytische, strukturelle und/oder regulatorische Funktion in mehreren hundert Enzymen und zinkbindenden Proteinen. Als katalytische Komponente ist Zink an vier

Liganden gebunden: An drei Aminosäuren (His, Glu, Asp oder Cys) und ein Wassermolekül. So wird Zink in der Carboanhydrase von drei His und in der Carboxypeptidase von His-Glu-His fixiert (VALLEE und AULD 1990, MCCALL et al. 2000), das Fehlen von Zink führt zum Verlust der katalytischen Aktivität. Als strukturelle Komponente ist Zink tetraedrisch an vier Aminosäuren (Cys oder His) gebunden und beeinflusst die lokale Konformation und Stabilität des Enzyms (Abbildung 1 A).

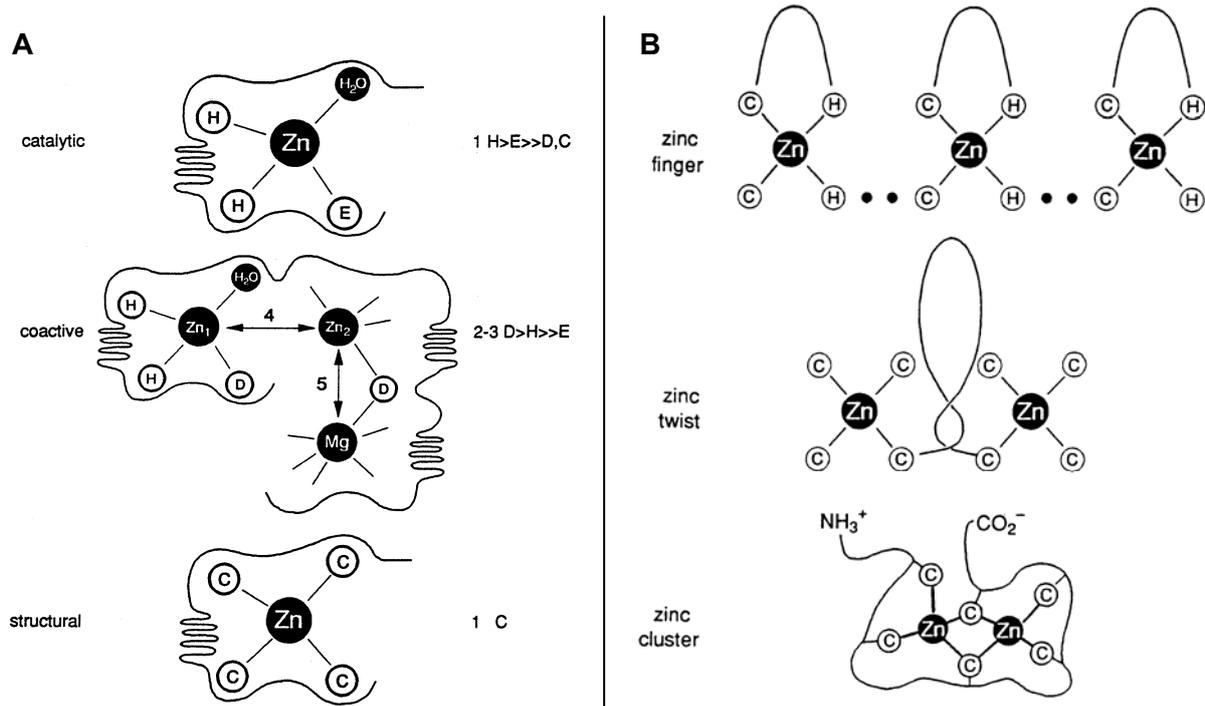


Abbildung 1: Zinkstrukturen (A) in Zink-Metalloenzymen, (B) in DNA-Bindungsdomänen von Transkriptionsfaktoren (nach VALLEE und AULD 1992)

Zink determiniert auch die dreidimensionale Struktur von Zinkfinger-, Zinkcluster- und Zinkdrehungsproteinen, einer Gruppe von zinkhaltigen Transkriptionsfaktoren (Abbildung 1 B). Zinkfingerproteine gehören zu den häufigsten Proteinen des eukaryotischen Genoms, die bedingt durch ihre dreidimensionale Konformation direkt mit der DNA interagieren können. Einige ihrer vielfältigen Funktionen in der transkriptionalen Regulation werden noch geklärt (LAITY et al. 2001). So können Cys₂His₂- und Cys₃His-Zinkfinger durch unterschiedliche Mechanismen auch spezifische RNA-Sequenzen erkennen und an diese binden (HALL 2005).

2.1.3 Zinkmetabolismus und Zinkstatusbestimmung

Die Absorption von exogen zugeführtem und gastrointestinal exkretiertem Zink findet im Duodenum, Jejunum und Ileum statt. Der Transport erfolgt in Anhängigkeit von der luminalen Zn-Konzentration entweder aktiv carriervermittelt oder passiv über einen nicht sättigbaren Mechanismus. Die molekularen Prozesse der Zn-Absorption sind teils noch ungeklärt. Es wird davon ausgegangen, dass bei der apikalen Zinkaufnahme spezifische Transporter involviert sind (ROLFS und HEDIGER 2001). Der Zn-Transporter ZnT-1, der basolateral in den Villi des Duodenums und Jejunums lokalisiert ist, scheint jedoch vorrangig als Zn-Exporter bei hoher Zn-Zufuhr zu fungieren (MCMAHON und COUSINS 1998).

Neuere Untersuchungen konnten eine apikale enterocytäre Lokalisation des *human ZnT-like Transporter 1* (hZTL1/ZnT-5) und des *human zrt-, irt-like Protein 4* (hZIP4) nachweisen (CRAGG et al. 2002, FORD 2004). hZTL1 gehört der *Cation Diffusion Facilitator*-Familie an, zu der auch die Zn-Transporter (ZnT) 1 bis 7 zählen. Sie weisen fast alle eine ähnliche Topologie mit sechs Transmembrandomänen und einer intrazellulären histidinreichen Schleife, die eine potentielle Zink-Bindungsregion repräsentiert, auf. Die hZIP-Proteine 1 bis 8 sind Mitglieder der ZIP-Familie mit acht Transmembrandomänen und extracytoplasmatischen N- und C-Termini. Verschiedene Mutationen in hZIP4 konnten mit der massiv beeinträchtigten intestinalen Zn-Absorption bei *Acrodermatitis enteropatica* assoziiert werden (DUFNER-BEATTIE et al. 2003). Entgegen früheren Vermutungen ist der *Divalent Cation Transporter 1* (DCT1/Nramp2) nicht am Import von Zink beteiligt (GAITHER und EIDE 2001).

HEMPE und COUSINS (1992) postulierten eine Regulation des transmucosalen Zn-Transports durch die Interaktion von Metallothionein (MT) mit einem cysteinreichen intestinalen Protein (CRIP) als sättigbaren intrazellulären Zn-Carrier. Basierend auf der inversen Relation von MT-Konzentration und Zn-Absorptionsrate und der Induktion der MT-Synthese durch Zink wird davon ausgegangen, dass MT als Zn-Pool der Zelle dient und so die Konzentration an freiem Zink reguliert (KREBS 2000).

Als grundlegend für die Zn-Homöostase, d. h. die Aufrechterhaltung eines konstanten internalen Status bei variierenden externen Bedingungen, wird eine Regulation der intestinalen Absorption durch die synergistische Anpassung von intestinaler Absorptionsrate und absoluter endogener Zn-Exkretion angesehen (reviewed von KING et al. 2000). Bei nicht mehr ausreichender Zn-Zufuhr führen sekundäre Anpassungsmechanismen zu einer Reduktion der renalen Zn-Exkretion, einem veränderten Plasma-Zn-Turnover und der Freisetzung von Zink aus den Knochen und verschiedenen anderen Geweben (JOHNSON et al. 1993, WINDISCH 2003).

Im Plasma ist Zink relativ locker an Albumin und zum geringeren Teil an α -Makroglobulin und Oligopeptide gebunden. Plasma-Zn und Teile des Leber-Zn-Bestandes repräsentieren einen schnell austauschbaren Zn-Pool, der entscheidend für die Aufrechterhaltung Zn-abhängiger biologischer Funktionen ist und in seiner Größe von der aufgenommenen Zn-Menge abhängt (KREBS et al. 2003, WINDISCH 2003). Es wird vermutet, dass bereits die Depletion dieses labilen Pools zum Auftreten von Zn-Mangelsymptomen führt (KING 1990).

Bedingt durch die homöostatischen Regulationsmechanismen ist die Ermittlung der gerade adäquaten Zn-Zufuhr ausgesprochen schwierig. Die Bestimmung des physiologischen Bedarfs (zuzuführende Zn-Menge zum Ausgleich der Zn-Verluste) mithilfe einer Zn-freien Diät beruhte auf der Annahme, dass die minimalen Verluste (bei null Absorption) bei ansteigender Aufnahme solange auf einem unveränderten Level bleiben, bis endogene Exkretion und absorbierte Zn-Menge identisch sind (Abbildung 2 a). Das kürzlich vom *Food and Nutrition Board* (FNB) des *Institute of Medicine* zur Ermittlung der *Dietary Reference Intakes* (DRIs) verwendete Modell geht nunmehr davon aus, dass die endogenen Verluste mit steigender Zn-Aufnahme ebenfalls ansteigen und das Gleichgewicht erst deutlich später erreicht wird (TRUMBO et al. 2001) (Abbildung 2 b). Bestätigung erhält dieses neuere Modell durch eine Studie an wachsenden Ratten, die bereits 1980 von WEIGAND und KIRCHGESSNER veröffentlicht wurde und den physiologischen Bedarf der Tiere anhand ihrer Gewichtszunahme ermittelte. Obwohl die Zn-Exkretion bei extrem niedrigem Absorptions-Level konstant war, zeigt sich eine abhängige Beziehung zwischen intestinaler Zn-Exkretion und absorbierter Zn-Menge unterhalb des physiologischen Bedarfs (HAMBIDGE 2003b).

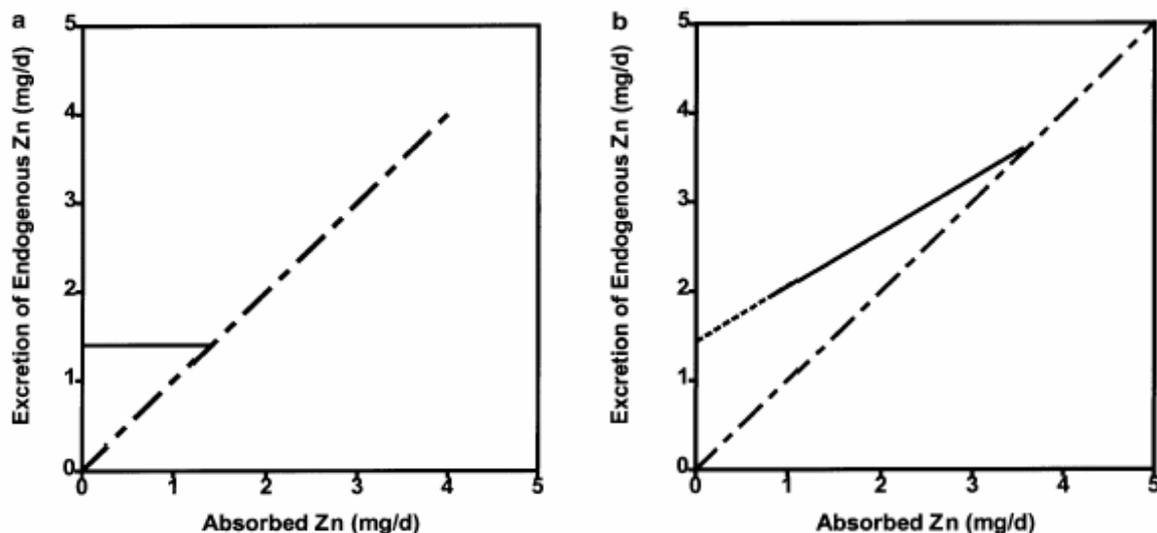


Abbildung 2: Theoretische Modelle der Beziehung zwischen endogener Zink-Exkretion und absorbierter Zinkmenge bei defizitärer Zinkzufuhr. (a) Absorptionsunabhängige Exkretion, (b) Absorptionsabhängige Exkretion (HAMBIDGE 2003b)

Eine höhere Absorptionseffizienz kann bei erhöhtem Bedarf (Gravidität, Laktation) oder bei Menschen mit gewohnheitsmäßig niedriger Zn-Aufnahme als Anpassungsmechanismus der Zn-Homöostase an eine marginale Zn-Zufuhr beobachtet werden (DONANGELO et al. 2005). COUSINS et al. (2003) diskutieren eine differentielle Regulation der verschiedenen Zn-Transporter (LIUZZI et al. 2001, PFAFFL und WINDISCH 2003) als molekulare Erklärung für die veränderten Absorptionsraten als Reaktion auf eine Depletion oder Supplementation von Zink. Die gastrointestinale Verfügbarkeit von Zink aus der Nahrung wird neben vorausgegangenem Versorgungsniveau und anabolem Bedarf durch Faktoren wie den Gehalt an Phytinsäure, die chemische Zn-Bindungsform, interagierende Liganden oder Komponenten sowie durch Infektionen oder Leber- und Nierenerkrankungen bestimmt (siehe auch RIMBACH et al. 1996, CAMARA und AMARO 2003).

Die WHO schätzt den Grundbedarf auf 1,0 mg/d für Männer bzw. 0,7 mg/d für Frauen. Der normative physiologische Bedarf (1,4 bzw. 1,0 mg/d), der höhere Verluste während der Adaptation an eine niedrigere Zufuhr berücksichtigt, wurde zur Festlegung des *Population Mean Dietary Requirement* um die Bioverfügbarkeit von Zink in Abhängigkeit vom Phytinsäuregehalt (hoch, mittel, niedrig) und einen Sicherheitszuschlag von 2 SD korrigiert (BROWN et al. 2001). Bei hoher Bioverfügbarkeit ergibt sich laut WHO ein Bedarf von 5,6 bzw. 4,0 mg/d. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE 2000) empfiehlt auf der Grundlage einer mittleren Absorptionsrate von 30 % eine tägliche Zink-Zufuhr von 10 mg für Männer bzw. 7 mg für Frauen. Die vom FNB als Weiterentwicklung der *Recommended Dietary Allowances* (RDA) veröffentlichten *Dietary Reference Intakes* (DRI) umfassen insgesamt vier Referenzwerte (*Estimated Average Requirement* (EAR), RDA bzw. *Adequate Intake* (AI), und *Tolerable Upper Intake Level* (UL), welche eine differenzierte Beurteilung der Zn-Aufnahme von Individuen und Bevölkerungsgruppen ermöglichen (Übersicht 1) (KENNEDY und MEYERS 2005).

Für wachsende Ratten liegt die Versorgungsempfehlung bei 12 mg Zn/kg phytatfreier Diät auf Eiklarprotein- oder Kaseinbasis (NATIONAL RESEARCH COUNCIL 1995).

Übersicht 1: Dietary Reference Intakes (DRI) für Zink (TRUMBO et al. 2001)

	Männer 19 bis >70 Jahre	Frauen 19 bis >70 Jahre	Schwangerschaft	Laktation
EAR	9,4 mg/d	6,8 mg/d	9,5 mg/d	10,4 mg/d
RDA	11 mg/d	8 mg/d	11 mg/d	12 mg/d
UL		40 mg/d		

Trotz intensiven Bemühungen wurde noch kein allein ausreichend sensitiver und spezifischer Indikator zur Beurteilung des individuellen Zinkstatus und zur Diagnose einer marginalen Versorgung identifiziert. In Übersicht 2 sind einige der möglichen diagnostischen Parameter zusammengestellt. Relativ häufig wird die Zn-Konzentration des Plasmas bestimmt, obwohl ihre Eignung aufgrund der leichten Beeinflussbarkeit durch verschiedenste Faktoren vielfach in Frage gestellt wurde (AGGETT und FAVIER 1993, RIMBACH et al. 1996, HAMBIDGE 2003a). Unter standardisierten experimentellen Bedingungen spiegelt bei Versuchstieren wie Ratten die Zn-Konzentration der Knochen den Zn-Status ausreichend gut wider (PALLAUF 1983, SCHÜLEIN et al. 1992).

Da bisher weder die Aktivität Zn-abhängiger Enzyme noch die Protein- oder mRNA-Menge von MT die nötige Eindeutigkeit im Hinblick auf den Zn-Status aufwies, wird generell eine Kombination mehrerer Parameter favorisiert (KING 1990, ROTH und KIRCHGESSNER 1999, WOOD 2000). Neue Einblicke in den Zinkmetabolismus und neue Möglichkeiten zur Identifikation sensitiver Biomarker des Zn-Status offeriert die umfassende Differenzierung genetischer Expressionsprofile und die Identifizierung physiologisch relevanter zink-regulierter Gene.

Übersicht 2: Mögliche Kriterien zur Diagnose eines Zink-Mangels (ROTH und KIRCHGESSNER 1999)

Zn-Konzentration in Geweben

- Knochen
- Haare
- Bilanz-Studien

Zn-Konzentrationen in Flüssigkeiten

- Plasma
- Urin
- Speichel

Zn-Konzentrationen in Blutzellen

- Erythrocyten
- Thrombocyten
- Leukocyten

Zn-Aufnahme der Erythrocyten

Aktivität von Zn-Metalloenzymen

Proteinkonzentrationen

- Metallothionein
- Thymulin
- Insulin, IGF-1
- ⁶⁵Zn-Bindungskapazität

Respons auf Zn-Supplementierung

- Serum-Zn
 - Serum-Aktivität der alkal. Phosphatase
 - Zn-Bindungskapazität
 - ⁶⁵Zn-Aufnahme der Erythrocyten
-

2.2 Regulation der Genexpression durch Zink

Sowohl die katalytische und strukturelle wie auch die regulatorische Funktion von Zink steht in Verbindung zu einer Beeinflussung der Genexpression (reviewed von VALLEE und FALCHUK 1993, COUSINS 1998, DREOSTI 2001). Als essentieller Schritt der Transkription erfolgt die RNA-Synthese durch die katalytische Aktivität von RNA-Polymerasen, die als Metalloenzyme zwei Atome Zink benötigen. Die Bedeutung der strukturellen Funktion von Zink wird am eindrucklichsten anhand der Zinkfinger-Motive offenbar: Die schleifenförmige Fingerstruktur entsteht dadurch, dass ein Zinkatom durch Cysteinyl- oder Histidylreste der Peptidkette tetraedrisch komplexiert wird (Abbildung 1 B). Sie ist Voraussetzung für die Interaktion mit der DNA.

Neuen Berechnungen zufolge sind 10 % des humanen Proteoms potentiell zinkbindende Proteine (ANDREINI et al. 2006), deren zahlreichste Klasse die Zinkfinger bilden, die in der Mehrzahl als Transkriptionsfaktoren fungieren.

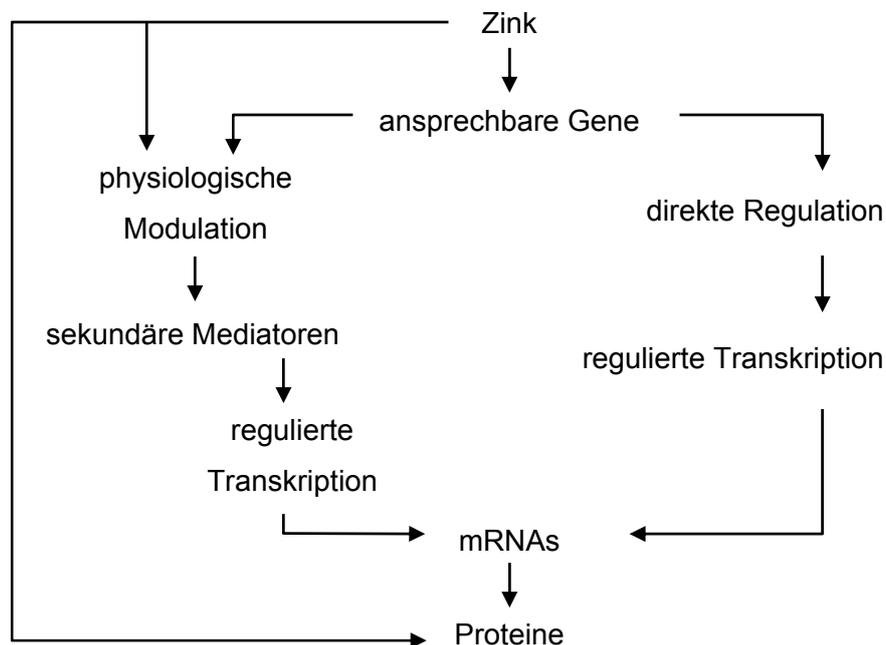


Abbildung 3: Mögliche Einflussebenen von Zink auf die Genexpression (nach COUSINS 1998)

Eine direkte regulatorische Funktion von Zink auf die Genexpression wurde exemplarisch für die Transkriptionsrate des MT-Gens nachgewiesen (siehe COUSINS 1994): Die Aktivierung der Transkription durch Zink wird über regulatorische Gensequenzen, so genannte *Enhancer*-Elemente (z. B. das *Metal Response Element*, MRE), vermittelt. Durch die spezifische Interaktion des zinkhaltigen diffusiblen Transkriptionsfaktors MTF-1 (*MRE-binding Transcription Factor-1*) mit der MRE-Sequenz des MT-Promotors wird die Initiation der Transkription induziert. Für die Regulation von MTF-1 wurde eine Funktion als zellulärer Zinksensor, aber auch das Vorhandensein eines Zn-sensitiven Inhibitors diskutiert (COYLE et al. 2002). SAYDAM et al. (2002) zeigten, dass die Aktivierung der MT-Transkription durch den Grad der MTF-1-Phosphorylierung bestimmt und von Zn- (und Cd-) Konzentration sowie von diversen Signaltransduktionskaskaden moduliert wird. KINDERMANN et al. (2005) wiesen auch für weitere Gene eine zumindest teilweise Kontrolle durch MTF-1 im Zellkulturmodell nach.

Abbildung 3 zeigt die verschiedenen Einflussmöglichkeiten, über die Zink die Genexpression auf DNA-, RNA- oder Proteinebene verändern kann. Eine möglichst umfassende Darstellung der im Zn-Mangel (oder Exzess) in ihrer Expression veränderten Gene, also des Transkriptoms oder Expressionsprofils, steht im Focus aktueller Array-Untersuchungen (BLANCHARD et al. 2001, MOORE et al. 2001, PFAFFL et al. 2003, TOM DIECK et al. 2003). Identifizierte zink-sensitive Gene, deren Transkripte also in Abhängigkeit vom Zinkangebot messbare Veränderungen der Transkriptmenge erfahren, sind in Übersicht 3 zusammengefasst.

Es ist davon auszugehen, dass neben der verwendeten Methode auch das verwendete tierexperimentelle Studiendesign einen nicht vernachlässigbaren Einfluss auf die Ergebnisse der in Übersicht 3 zitierten Expressionsanalysen hatte. So wurden sowohl wachsende (BLANCHARD und COUSINS 1996, 2000, BLANCHARD et al. 2001) oder adulte *pair-fed* Ratten (LIUZZI et al. 2001), adulte restriktiv ernährte (PFAFFL et al. 2003) oder wachsende zwangsernährte Ratten (TOM DIECK et al. 2003) als Tiermodell eingesetzt. Effekte könnten somit aus der defizitären Zinkversorgung und/oder aus allgemeinen metabolischen Unterschieden resultieren.

Übersicht 3: Ausgewählte Genexpressionsanalysen und verifizierte zinksensitive Gene

Autoren	Methode/Gewebe	Gen/Protein/Homologie
SHAY und COUSINS (1993)	differentielle Hybridisierung mit cDNA-Bibliothek; Darm, Leber, Herz, Niere, Hirn, Lunge (Ratte)	<i>Apolipoprotein A-1, Aldolase B, Cytochrome b, Ubiquitin, Calbindin, Cryptidin, Cytochrome c oxidase, Pancreatic alpha-amylase, Fatty acid-binding protein (FABP)</i>
BLANCHARD und COUSINS (1996)	mRNA Differential Display und Northern Blot; Dünndarm (Ratte)	<i>Bovine ubiquinone oxidoreductase, Cholecystokinin, Human uroguanylin</i>
BLANCHARD und COUSINS (2000)	mRNA Differential Display und Northern Blot; Dünndarm (Ratte)	<i>Bovine ubiquinone oxidoreductase, Cholecystokinin, cis-Golgy protein 28, Human uroguanylin, Intestinal alkaline phosphatase type II, Fatty acid binding protein, Human GCAP-II/uroguanylin, Mouse Ig active J chain, Proteasomal ATPase</i>
LIUZZI et al. (2001)	Northern Blot-Analyse; Darm, Niere, Leber (Ratte)	<i>Zinc transporter 1 (ZnT-1), Zinc transporter 2 (ZnT-2),</i>
MOORE et al. (2001)	cDNA-Array und quantitative RT-PCR; T-Lymphocyten (Maus)	<i>DNA damage repair and recombination protein 23B, Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase, Mouse laminin receptor, Myeloid cell leukemia sequence-1</i>
BLANCHARD et al. (2001)	cDNA-Array und quantitative RT-PCR; Dünndarm (Ratte)	<i>Aldehyde reductase, Fatty acid binding protein, Glutathione S-transferase subunit 8, Proteasomal ATPase, Ribosomal protein L36a</i>
PFAFFL et al. (2003)	cDNA-Microarray und quantitative RT-PCR; Leber, Dünndarm (Ratte)	<i>Albumin D box-binding protein, Metallothionein-I, Metallothionein-II; Complement receptor type 2 precursor, Cytochrome P450 2B1, Epithelial-cadherin precursor, Heat-shock protein 105, Nuclear receptor ROR-GAMMA, Transthyretin precursor</i>
TOM DIECK et al. (2003)	cDNA- bzw. Oligonucleotid-Array und Northern Blot; Leber (Ratte)	<i>Acyl-peptide hydrolase, Alcohol dehydrogenase A subunit, 5-Aminolevulinat synthase, Arrestin D, Ceruloplasmin, Cytosolic aspartate aminotransferase, Cytochrome P450, Delta-2,3-enoyl-CoA isomerase, EGF-receptor, F0F1-ATP synthase, Galactose-1-phosphate uridyl transferase, Glycerol kinase, IGF-binding protein 1, 2, acid-labile subunit, Lipogenic factor (S14 gene), Liver aldehyde oxidase, Metallothionein, NADPH-cytochrome P450 reductase, Neuropeptide Y, Serine dehydratase, Syntaxin 4, Ubiquitin-like protein</i>

2.3 Veränderungen im Lipidstoffwechsel und spezifischer Metabolismus ungesättigter Fettsäuren

2.3.1 Veränderungen des Lipidstoffwechsels im Zinkmangel

Physiologische Interaktionen zwischen Zink und dem Metabolismus essentieller Fettsäuren (FS) werden seit langem postuliert (ROTH und KIRCHGESSNER 1977, BETTGER et al. 1979). Die klinischen Merkmale des Zn-Mangels ähneln in ihrer Pathologie dem Mangel an essentiellen FS, und die Symptome eines essentiellen FS-Mangels werden durch ein Zn-Defizit noch verstärkt. Da die Supplementation mit γ -Linolensäure, nicht aber mit Linolsäure, zu einer deutlichen Linderung der Zn-Mangelsymptome führte, wurde eine Funktion von Zink bei der enzymatischen $\Delta 6$ -Desaturierung postuliert (CUNNANE und HORROBIN 1980, HUANG et al. 1982).

Der Versuch, die Funktionen von Zink im Stoffwechsel der essentiellen FS anhand der Veränderungen der FS-Zusammensetzung von Phospholipiden (PL), Triglyceriden (TG) oder Gesamtlipiden (GL) verschiedener Gewebe im Zn-Mangel zu klären, ergab widersprüchliche Ergebnisse. Es wurden sowohl reduzierte Arachidonsäuregehalte und somit ein erhöhtes Linolsäure zu Arachidonsäure-Verhältnis (HUANG et al. 1982, AYALA und BRENNER 1983, CUNNANE et al. 1984) nachgewiesen, als auch erniedrigte Linolsäure/Arachidonsäure-Relationen beschrieben (BETTGER et al. 1979). Auch wurde keine Beeinträchtigung der $\Delta 6$ -Desaturase-Aktivität festgestellt (CLEJAN et al. 1982, KRAMER et al. 1984).

Neben Veränderungen bei den Lipoproteinen (EDER und KIRCHGESSNER 1997, KETTLER et al. 2000) und der FS-Zusammensetzung der Erythrocytenmembran (DRISCOLL und BETTGER 1992, EDER und KIRCHGESSNER 1994c) ist hauptsächlich das FS-Muster der Lipide in der Leber im Zinkmangel verändert (siehe Übersicht 4). EDER und KIRCHGESSNER (1993, 1994a, 1996a) dokumentierten eine vermehrte Akkumulation von Triglyceriden sowie erhöhte Aktivitäten lipogener Enzyme und verringerte Aktivitäten am FS-Abbau beteiligter Enzyme (EDER und KIRCHGESSNER 1995b).

Die am Tiermodell ermittelten Veränderungen im Lipidmetabolismus werden maßgeblich von der Reduktion der *ad libitum*-Futtermittelaufnahme der Zn-Mangeltiere bzw. durch das Fütterungsprotokoll (*force-feeding*, *pair-feeding*) mit beeinflusst. Dass die Veränderungen jedoch wie von KRAMER et al. (1984) behauptet ausschließlich durch die verringerte Futtermittelaufnahme bedingt sind, wurde hinreichend widerlegt (CUNNANE 1985, CUNNANE 1988, SCHÜLEIN et al. 1992). Unterschiede im Versuchsdesign bedingen trotzdem viele der uneinheitlichen

Übersicht 4: Am Tiermodell (Ratte) dokumentierte Veränderungen des Lipidmetabolismus im experimentellen Zinkmangel

Veränderung im Zinkmangel	Autoren
Erniedrigte $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Desaturaseaktivität in Leber und Testes, gesteigerte hepatische $\Delta 9$ -Desaturaseaktivität, reduzierte Arachidonsäurekonzentration in Mikrosomen von Leber und Testes	AYALA und BRENNER (1983)
Erhöhte Linolsäure und Dihomo- γ -Linolensäure, reduzierte Docosapentaensäure (n-6)-Anteile in Phospholipiden der Leber auch bei Zn-versorgten <i>pair fed</i> Tieren	KRAMER et al. (1984)
Erhöhter Anteil gesättigter und einfach-ungesättigter FS, verminderter Anteil essentieller FS in hepatischen Triglyceriden; erhöhtes Linolsäure/Arachidonsäure-Verhältnis in Phospholipiden	CUNNANE et al. (1984)
Erhöhtes Linolsäure/Arachidonsäure-Verhältnis in Phospholipiden von Plasma und Leber, höherer Arachidonsäureanteil in Triglyceriden, reduzierte Triglyceridmenge	CUNNANE (1988)
Erhöhter hepatischer Fettgehalt, erhöhte Laurin-, Myristin-, Palmitin-, Myristolein-, Palmitolein- und Ölsäure-, verminderte Arachidonsäure-Gehalte in der Leber von <i>force fed</i> -Tieren	EDER und KIRCHGESSNER (1993)
Verminderte Gesamtkörper-Akkumulation von Linolsäure, n-3-LCPs und n-6-LCPs, vermehrte Akkumulation von Stearinsäure	CUNNANE et al. (1993)
Reduzierte Linolsäure-, Arachidonsäure- und n-6-FS-Gehalte in den Phospholipiden, erhöhter Triglyceridgehalt in der Leber von <i>force fed</i> -Tieren bei Kokosöl-Fütterung	EDER und KIRCHGESSNER (1994a)
Erhöhter Anteil an n-3-FS (α -Linolensäure, EPA) in hepatischen und plasmatischen Phospholipiden, verminderter Anteil an n-6-FS (insbes. Linolsäure) bei <i>force fed</i> -Tieren mit Leinöl-Diät	EDER und KIRCHGESSNER (1994b)
Erhöhte Serumlipide (Chol, PL); bei Kokosöl erhöhte Gehalte hepatischer Triglyceride mit gesättigten und einfach-ungesättigten FS, gesteigerte Aktivität lipogener Enzyme bei <i>force-fed</i> -Tieren	EDER und KIRCHGESSNER (1995b)
Niedrigere Gesamt-n-6-FS-Gehalte in hepatischen Phospholipiden nach Distelölsupplementation fettfrei zwangsernährter Tiere, reduzierte Gehalte der $\Delta 5$ - und $\Delta 6$ -Desaturase-Produkte	EDER und KIRCHGESSNER (1996c)
Erhöhte Aktivität von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, erhöhte hepatische Triglyceridkonzentration, erhöhte Plasmalipide, vermehrt gesättigte und einfach-ungesättigte FS in der Leber von <i>force fed</i> -Tieren	EDER und KIRCHGESSNER (1996b)
Erhöhte Lipoprotein-Lipase-Aktivität im Herzmuskelgewebe, reduzierte Aktivität im Serum von <i>force fed</i> -Tieren mit Kokosöldiät	KETTLER et al. (2000)
Erhöhte Gesamtlipid-, Cholesterin-, Triglycerid- und LDL-Gehalte in der Leber	YOUSEF et al. (2002)
Erhöhter hepatischer Triglyceridgehalt, erhöhte Ölsäure-, α -Linolensäure- und EPA-Anteile, weniger Stearin- und Arachidonsäure in der Leber von <i>force fed</i> -Tieren	TOM DIECK et al. (2005)

LCP (*long chain polyunsaturated*) langkettige mehrfach ungesättigte FS, EPA Eicosapentaensäure, PC Phosphatidylcholin, Chol Cholesterin

Versuchsergebnisse. So entwickeln zwangsernährte Tiere im Zn-Mangel eine charakteristische Fettleber, bei *ad libitum*-Fütterung hingegen wurde keine Lipidakkumulation beobachtet.

Die Art des Fettes in der Versuchsdiet hat ebenfalls grundlegenden Einfluss auf den Lipidstoffwechsel und die Veränderungen im Zn-Mangel. In einer Serie von Interaktionsstudien mit unterschiedlichen Fettgaben stellten EDER und KIRCHGESSNER fest, dass sich die Effekte des Zn-Mangels jeweils in Abhängigkeit vom eingesetzten Futterfett manifestieren. Beispielsweise verursachte Kokosöl bei den Zn-Mangel-Tieren eine Fettleber mit hohen hepatischen TG-Konzentrationen, dagegen wurde bei Fischöl (1994a) oder Leinöl (1994b, 1995b) die TG-Konzentration nicht signifikant durch das Zinkdefizit beeinflusst. Die gleiche Abhängigkeit vom Futterfett wurde auch für das Herzmuskelgewebe nachgewiesen (1994d). Aufgrund des FS-Musters der TG, die vermehrt gesättigte und einfach-ungesättigte FS aufwiesen (EDER und KIRCHGESSNER 1994a, 1996c), postulierten die Autoren eine gesteigerte *de novo*-Synthese der TG. Die erhöhte Aktivität lipogener Enzyme im Zn-Mangel war jedoch signifikant von der Art des Futterfetts beeinflusst und bei fettfreier Diät trotz TG-Akkumulation nicht gegenüber der Kontrolle verändert. Daher gehen EDER und KIRCHGESSNER (1996b) davon aus, dass weitere Faktoren, möglicherweise eine verminderte Sekretion von Lipoproteinen, in die Symptomatik der Fettleber involviert sind.

Lipide mit hohem Gehalt an mehrfach-ungesättigten FS können die Expression lipogener Enzyme reduzieren (siehe auch CLARKE 2001) und somit die Lipogenese unterdrücken. Nach einer Distelöl-Zulage war die Aktivitätsreduktion der untersuchten lipogenen Enzyme im Zn-Mangel deutlich geringer ausgeprägt als in der zinkversorgten Kontrolle (EDER und KIRCHGESSNER 1996b). Dies ließ eine beeinträchtigte Suppression der Lipogenese im Zn-Mangel und einen Einfluss von Zink auf die Regulation verschiedener lipogener Enzyme durch alimentäre FS vermuten.

Eine umfassende Darstellung der im Zn-Mangel in ihrer Expression veränderten Gene der Leber erfolgte durch die Arbeiten von TOM DIECK et al. (2003, 2005). Die identifizierten zink-sensitiven Gene des hepatischen Lipidmetabolismus wurden anhand der biologischen Funktion der korrespondierenden Proteine gruppiert. Eine reduzierte Expression wiesen Gene der Funktionsgruppen (Anzahl Gene) TG-Degradation (6), FS-Degradation (7), PL-Degradation (2), FS-Transport (2), FS-Aufnahme (1), peroxisomale β -Oxidation (3), Biotransformation Phase I und ω -Oxidation (8), Gallensäuretransport (1) und der nucleäre Rezeptor PPAR auf. Eine erhöhte Expression wurde für Enzyme der TG-Synthese (2), der FS-Aktivierung und -synthese (5), des Ketonkörpermetabolismus und des Gallensäureabbaus ermittelt. Generell zeigten somit die im hepatischen TG-Turnover und in der FS- β -Oxidation benötigten Enzyme reduzierte mRNA-Level, während die Enzyme der *de novo*-Lipogenese eine erhöhte Expressionsrate im Zn-Mangel aufwiesen (TOM DIECK et al. 2005).

Eine erhöhte Aktivität der Schlüsselenzyme der FS-Synthese, wie Acetyl-CoA-Carboxylase und Fettsäure-Synthase, wurde bereits *in vivo* dokumentiert (EDER und KIRCHGESSNER 1995b). Konsistent mit den Ergebnissen von EDER und KIRCHGESSNER (1995a) wurde trotz verändertem Verhältnis von gesättigten und einfach-ungesättigten zu mehrfach-ungesättigten FS in den Leberlipiden keine veränderte Expression der $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 9$ -Desaturasen im Zn-Mangel festgestellt (TOM DIECK et al. 2003, 2005). Die Autoren erklären das veränderte FS-Muster und den erhöhten Ölsäuregehalt der Leberlipide mit der erniedrigten Expressionsrate und einem folglich verminderten Abbau der Ölsäure durch die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase.

Viele der Veränderungen im Zinkmangel könnten also durch veränderte Expressionsraten der Enzyme des Lipidstoffwechsels bedingt sein. Als Gemeinsamkeit auf transkriptioneller Ebene vermuten DANIEL und TOM DIECK (2004) eine Regulation über nucleäre Rezeptoren wie den *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha* (PPAR α) oder das *Sterol Regulatory Element Binding Protein-1* (SREBP-1). Für eine Reihe von Genen des hepatischen Lipidmetabolismus ist eine PPAR α -vermittelte Transkriptionskontrolle beschrieben (KLIOWER et al. 1997, GERVOIS et al. 2000, MANDARD et al. 2004), und die Genstruktur der PPARs weist in der DNA-Bindungsregion zwei funktionelle Zinkfingerdomänen auf (vgl. Kapitel 2.3.3). Die beobachtete leichte Abnahme der PPAR α -mRNA und die verminderten mRNA-Level der PPAR-Zielgene könnten auf eine generelle Beeinträchtigung aller durch PPAR α vermittelten Prozesse im Zn-Mangel hindeuten (TOM DIECK et al. 2005).

2.3.2 Degradation ungesättigter Fettsäuren und Funktion der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase

Der Großteil des zellulären Energiebedarfs der Herzmuskulatur, der Leber und der Skelettmuskulatur wird über den Abbau von FS durch die mitochondriale β -Oxidation gedeckt (siehe auch GUZMAN und GEELEN 1993, KUNAU et al. 1995). Die sukzessive Abspaltung von C_2 -Einheiten liefert Acetyl-CoA und Reduktionsäquivalente in Form von $FADH_2$ und NADH. Sie dienen im Citratcyclus bzw. in der Atmungskette der Generation von ATP. Zudem nutzt die Leber Acetyl-CoA zur Ketogenese und damit zur alternativen Energieversorgung extrahepatischer Gewebe. Im Gegensatz zur mitochondrialen hat die peroxisomale β -Oxidation primär keine energieliefernde Funktion. Sie spielt eine wichtige Rolle in der Degradation überlanger FS und ist essentiell für die Synthese mehrfach-ungesättigter FS (MUFS) mit einer Doppelbindung in Position $\Delta 4$, wie der Docosapentaen- und Docosahexaensäure (SPRECHER 2000).

Die Speicherung der FS erfolgt hauptsächlich in Form von TG in den Adipocyten. Dabei reflektieren die relative FS-Zusammensetzung und die gespeicherten TG-Spezies die des Nahrungsfettes (PERONA et al. 2000, WEBER et al. 2002). SUMMERS et al. (2000) ermittelten sogar eine bevorzugte Aufnahme einfach-ungesättigter FS und mehrfach-ungesättigter n-6-FS in die Adipocyten beim Menschen.

Die Lipolyse der TG in den Adipocyten erfolgt selektiv und in Abhängigkeit von den molekularen Eigenschaften der FS: Kürzerkettige oder ungesättigte FS werden leichter mobilisiert und daher bevorzugt metabolisiert als langkettige oder gesättigte FS (RACLOT und GROSCOLAS 1993, RACLOT et al. 1997, YLI-JAMA et al. 2001). Als mögliche Ursache wird die unterschiedliche Wasserlöslichkeit der FS und die somit bessere Verfügbarkeit polarerer FS für eine Spaltung durch die hormonsensitive Lipase angesehen.

Die Degradation gesättigter FS erfolgt in den Mitochondrien in einer Sequenz aus vier Einzelreaktionen: Die aktivierte FS wird FAD-abhängig durch Acyl-CoA-Dehydrogenasen zu 2-*trans*-Enoyl-CoA dehydriert und an der eingefügten *trans*-2-Doppelbindung durch Enoyl-CoA-Hydratasen hydratisiert. Durch stereospezifische 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenasen wird das L(+)-3-Hydroxyacyl-CoA NAD-abhängig oxidiert und anschließend durch Acetyl-CoA-Acyltransferasen (3-Ketoacyl-CoA-Thiolasen) thiolytisch in Acetyl-CoA und ein um C₂ verkürztes Acyl-CoA gespalten (EATON et al. 1996, HILTUNEN und QIN 2000, BARTLETT und EATON 2004). Der Abbau ungesättigter FS benötigt zusätzliche Hilfsenzyme wie die 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase und die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase (EC1).

Gen-Defekte wurden bereits für fast alle Enzyme der β -Oxidation identifiziert (siehe dazu WANDERS et al. 1999, VOCKLEY et al. 2002, GREGERSEN et al. 2004). Bei Nahrungskarenz, erhöhtem Energiebedarf oder metabolischem Stress (intensive körperliche Belastung, Infektionen) kommt es bei mitochondrialen β -Oxidationsdefekten neben schweren hypoketotischen Hypoglykämien zu einer Akkumulation jeweils charakteristischer Metabolite im Gewebe und Urin (POURFARZAM et al. 1994, ONKENHOUT et al. 1995). ONKENHOUT et al. (2001) zeigten, dass die aus der partiellen Oxidation ungesättigter FS resultierenden Intermediate ausschließlich in die TG inkorporiert werden und außer im Plasma in den übrigen Lipidfraktionen der untersuchten Organe nicht nachweisbar sind. Auch das Spektrum gesättigter bzw. ungesättigter Dicarbonsäuren und deren Elimination im Urin resultiert aus der ω -Oxidation freier ungesättigter FS (JIN und TSERNG 1990, PASSI et al. 1993).

Im Zyklus der β -Oxidation ungesättigter FS unterbrechen die Doppelbindungen in *cis*-Konfiguration die kontinuierliche Kettenverkürzung. Der Abbau von FS mit Doppelbindungen an geradzahigen C-Atomen (wie die *cis*-12-Doppelbindung der Linolsäure) erfolgt bis zur 4-*cis*-Enoyl-CoA-Verbindung, welche anschließend durch die Acyl-CoA-Dehydrogenase zum 2-*trans*,4-*cis*-Enoyl-CoA dehydriert wird (KUNAU und DOMMES 1978, CHU et al. 1984,

SCHULZ 1994). Durch die NADPH-abhängige 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase (DOMMES und KUNAU 1984) wird eine Doppelbindung eliminiert und der weitere Abbau des 3-*cis*-Enoyl-CoAs im β -Oxidationszyklus ermöglicht (siehe Abbildung 4).

Für die Degradation von FS mit Doppelbindungen an ungeradzahigen C-Atomen (wie der *cis*-9-Doppelbindung der Linolsäure) werden zwei Reaktionswege diskutiert: Ein Abbau bis zum 3-*cis*-Enoyl-CoA, dessen Isomerisierung zum 2-*trans*-Enoyl-CoA durch die ECI und anschließender β -Oxidation, oder eine Isomerisierung des 2-*trans*,5-*cis*-Enoyl-CoAs durch die ECI zum 3,5-Enoyl-CoA und nachfolgender Isomerisierung durch eine $\Delta^{3,5},\Delta^{2,4}$ -Dienoyl-CoA-Isomerase (TSERNG und JIN 1991, SMELAND et al. 1992, LUO et al. 1994). Die entstandene 2-*trans*,4-*trans*-Enoyl-CoA-Verbindung wird NADPH-abhängig durch die

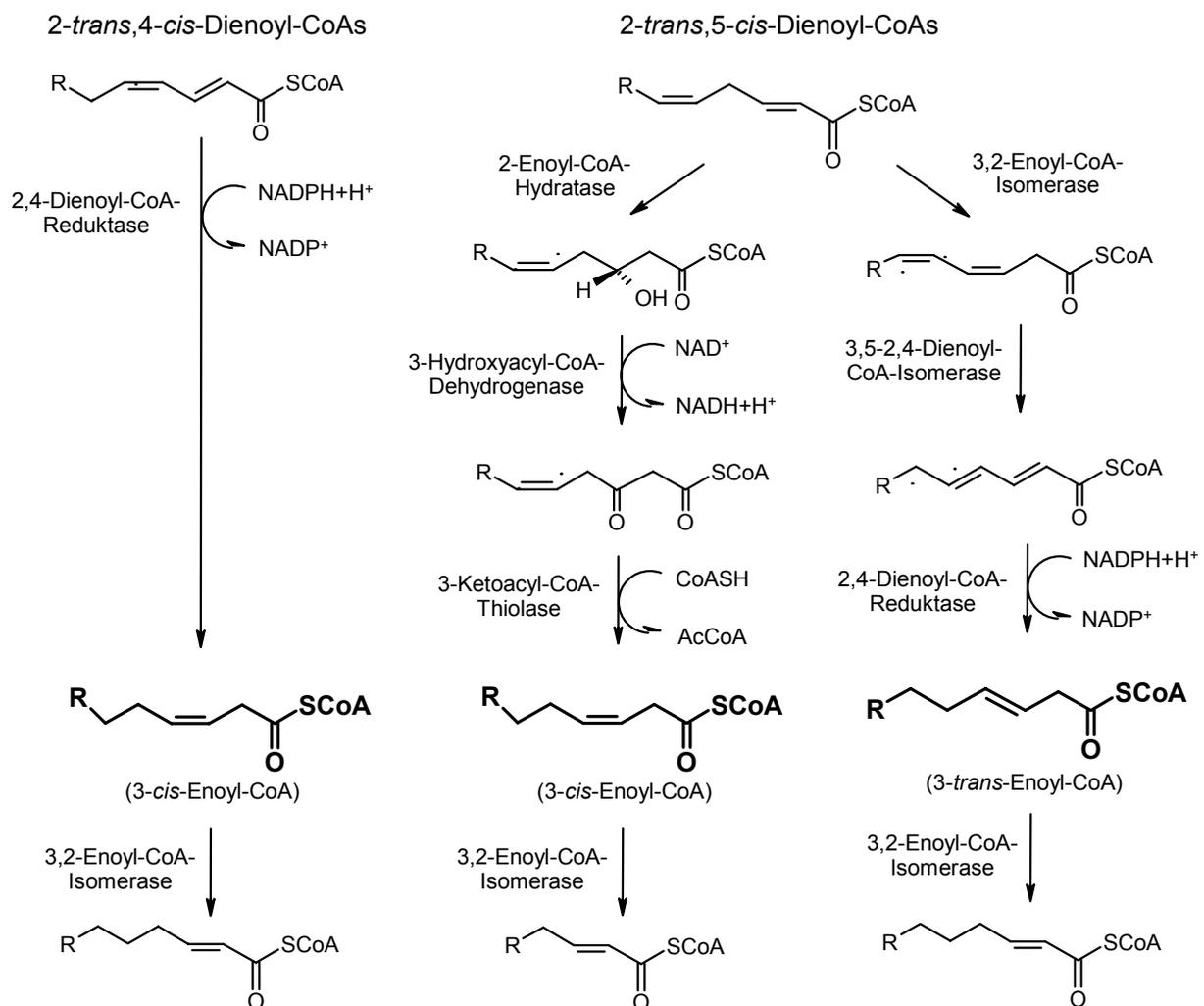


Abbildung 4: Abbauwege ungesättigter FS mit Doppelbindungen an gerad- oder ungeradzahigen C-Atomen. Mitte: NADPH-unabhängiger Isomeraseweg, rechts: NADPH-abhängiger Reduktaseweg (nach GEISBRECHT et al. 1999). AcCoA Acetyl-CoA, CoASH Coenzym A

2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase zum 3-*trans*-Enoyl-CoA reduziert, welches dann durch die ECI zum 2-*trans*-Enoyl-CoA isomerisiert und in den β -Oxidationszyklus zurückgeführt werden kann (KUNAU et al. 1995, SHOUKRY und SCHULZ 1998, HILTUNEN und QIN 2000).

Der jeweils letzte Schritt im Abbau der ungesättigten FS, die Umlagerung der 3-*cis* oder 3-*trans*-Enoyl-CoA-Intermediate zu den entsprechenden 2-*trans*-Verbindungen, wird durch die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase (EC 5.3.3.8) katalysiert (vgl. Abbildung 4). Dieses Schlüsselenzym in der Degradation ungesättigter FS wurde aus Leber (STOFFEL und GROL 1978, KILPONEN et al. 1990) und Herz (PALOSAARI et al. 1990) von Ratten, aus der Leber von Schwein (MIESOWICZ und BLOCH 1979) und Rind (EULER-BERTRAM und STOFFEL 1990) sowie aus humaner Leber (KILPONEN und HILTUNEN 1993) isoliert. Die cDNA der ECI der Ratte (MUELLER-NEWEN und STOFFEL 1991, PALOSAARI et al. 1991, TOMIOKA et al. 1992, LI et al. 2002) und der Maus (STOFFEL et al. 1993) wurde cloniert und sequenziert. Die 261 Aminosäuren lange, reife mitochondriale ECI der Ratte wurde als homodimeres Protein mit einer Masse von 29 kDa identifiziert. In Skelettmuskulatur, Leber, Herz und Niere der Ratte wird die ECI relativ stark exprimiert, in Milz und Gehirn hingegen nur sehr schwach (MUELLER-NEWEN und STOFFEL 1991).

Beim Säuger sind sieben Enzyme mit Enoyl-CoA-Isomeraseaktivität beschrieben. Die von KILPONEN et al. (1990) dokumentierte mitochondriale *long-chain* Enoyl-CoA-Isomerase und die peroxisomale Enoyl-CoA-Isomerase von GEISBRECHT et al. (1999) wurden von ZHANG et al. (2002) als dasselbe Enzym identifiziert, welches sowohl in den Mitochondrien als auch in den Peroxisomen vorkommt und von den Autoren als monofunktionale Enoyl-CoA-Isomerase (ECI) bezeichnet wurde. Weitere mitochondriale Enzyme sind die Enoyl-CoA-Hydratase, die jedoch nur minimale ECI-Aktivität aufweist (KIEMA et al. 1999), und die mitochondriale Enoyl-CoA-Isomerase (MECI). Ausschließlich in den Peroxisomen lokalisiert ist das multifunktionale Enzym 1 (MFE1) mit 2-Enoyl-CoA-Hydratase-, 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase- und Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomeraseaktivität (PALOSAARI und HILTUNEN 1990). Die peroxisomale Acyl-CoA-Oxidase 1 und die mitochondriale *medium-chain* Acyl-CoA-Dehydrogenase scheinen ebenfalls intrinsische Enoyl-CoA-Isomeraseaktivität zu besitzen (ZENG und LI 2005, ZENG et al. 2006). Auf der Grundlage ihrer Substratspezifität und der Gesamtaktivität der Enoyl-CoA-Isomerasen in der Leber folgern ZHANG et al. (2002), dass in den Mitochondrien die MECI die Isomerisierung von 3-*cis* und 2-*trans*,5-*cis*-Enoyl-CoA-Intermediaten katalysiert und 3-*trans*-Doppelbindungen bevorzugt durch die ECI isomerisiert werden. In den Peroxisomen katalysiert die ECI mit einer höheren Affinität für langkettige Substrate ebenfalls die Isomerisierung von 3-*trans* und 3-*cis*-Verbindungen, 2-*trans*,5-*cis*-Isomerisierungen werden dort mit maximaler Effizienz durch das MFE1 katalysiert.

Bei ECI-defizienten Mäusen (JANSSEN und STOFFEL 2002) wird die β -Oxidation ungesättigter FS auf dem Level der 3-*cis* bzw. 3-*trans*-Intermediate unterbrochen. Unter normalen Bedingungen zeigen die Tiere keine pathologischen Symptome. Erst wenn ihr Energiebedarf vermehrt durch die mitochondriale FS-Oxidation gedeckt werden muss (bei reduzierter oder fehlender Nahrungsaufnahme, reduzierter Kohlenhydratversorgung), werden die metabolischen Konsequenzen der ECI-Defizienz offensichtlich. In den Lipiden von Leber und Niere sind die Anteile der ungesättigten FS Palmitolein-, Öl-, Linol- und Linolensäure relativ zur Stearinsäure deutlich erhöht und es kommt zu einer massiven Deposition von TG in den Hepatocyten. Nach einer 48stündigen Hungerperiode werden vielfach höhere Konzentrationen gesättigter, einfach und zweifach ungesättigter C6-, C7- und C8-Dicarbonsäuren, die aus der mikrosomalen bzw. peroxisomalen Oxidation ungesättigter FS resultieren, im Urin ausgeschieden. Außerdem ermittelten JANSSEN und STOFFEL eine stärkere Induktion der Expression der peroxisomalen bzw. mikrosomalen FS-Oxidationsenzyme MFE1 und Cytochrom P450 4A1 sowie des hepatischen Transkriptionsfaktors PPAR α bei ECI-defizienten Tieren.

Zinkmangelversuche resultierten in ähnlichen Veränderungen des Lipidstoffwechsels (vgl. Kapitel 2.3.1): Neben Veränderungen im Spektrum ungesättigter FS und einer Akkumulation von TG in der Leber dokumentierten TOM DIECK et al. (2003, 2005) auch eine reduzierte Expression der ECI und anderer β -Oxidationsenzyme. Inwieweit ein Zn-Defizit die Aktivität einzelner β -Oxidationsenzyme reduziert und somit möglicherweise die Unterschiede in den Auswirkungen unterschiedlicher Fettarten (bzw. FS) auf die Veränderungen des Lipidstoffwechsels im Zinkmangel bedingen könnte, wurde noch nicht untersucht. Die Induktion der mitochondrialen, peroxisomalen oder mikrosomalen FS-Oxidation erfolgt durch transkriptionelle Aktivierung der entsprechenden Enzyme auch über PPAR-abhängige Mechanismen. Der Einfluss, den die FS auf die Regulation des Lipidstoffwechsels und die Induktion diverser Transkriptionsfaktoren haben, ist Inhalt des nachfolgenden Kapitels.

2.3.3 Expressionsmodulatorisches Potential ungesättigter Fettsäuren

Mehrfach ungesättigte FS (MUFS), insbesondere der n-3- und n-6-Familien, beeinflussen eine Vielzahl physiologischer Prozesse. Im Tiermodell und beim Menschen hat die alimentäre Zufuhr von MUFS erwünschte hypolipidämische Effekte. Experimentell gesichert ist, dass MUFS die Lipidsynthese in der Leber unterdrücken und die FS-Oxidation in Leber und Skelettmuskulatur verstärken (CLARKE und JUMP 1994, RACLOT und OUDART 1999). Gesättigte FS sowie einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte n-9-FS besitzen hingegen kein modulatorisches Potential in Bezug auf FS-Synthese oder FS-Oxidation.

Neben langfristigen Veränderungen, die auf der adaptiven Modulation des FS-Musters der Membranen und daraus resultierenden Änderungen in Eicosanoidsynthese, Hormonwirkung oder Rezeptoraktivität basieren, besitzen MUFS einen direkten membranunabhängigen Einfluss auf die Regulation von Genen der FS-Oxidation, der TG-Synthese, der FS-Desaturation, der Gluconeogenese, des FS-Transports, des Cholesteroll-Metabolismus und der Ketogenese (siehe auch CLARKE 2001, JUMP 2002, LAPILLONNE et al. 2004). Weitere Funktionen betreffen die Response auf oxidativen Stress bzw. die antioxidative Kapazität (TAKAHASHI et al. 2002), die Regulation von Zellwachstum, -differenzierung und Apoptose sowie zelluläre Signaltransduktionsprozesse (ROBERTS et al. 1998, VANDEN HEUVEL 1999).

Die molekularen Mechanismen der Genexpressionsregulation durch MUFS sind noch nicht vollständig geklärt (CLARKE 2004). Einige der oben genannten Effekte werden vermittelt, indem MUFS die DNA-Bindungsaktivität und das Vorkommen verschiedener Transkriptionsfaktoren, der *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (PPARs), der *Sterol Regulatory Element Binding Proteins* (SREBP) und des *Hepatic Nuclear Factor-4* (HNF-4), modulieren (Abbildung 5).

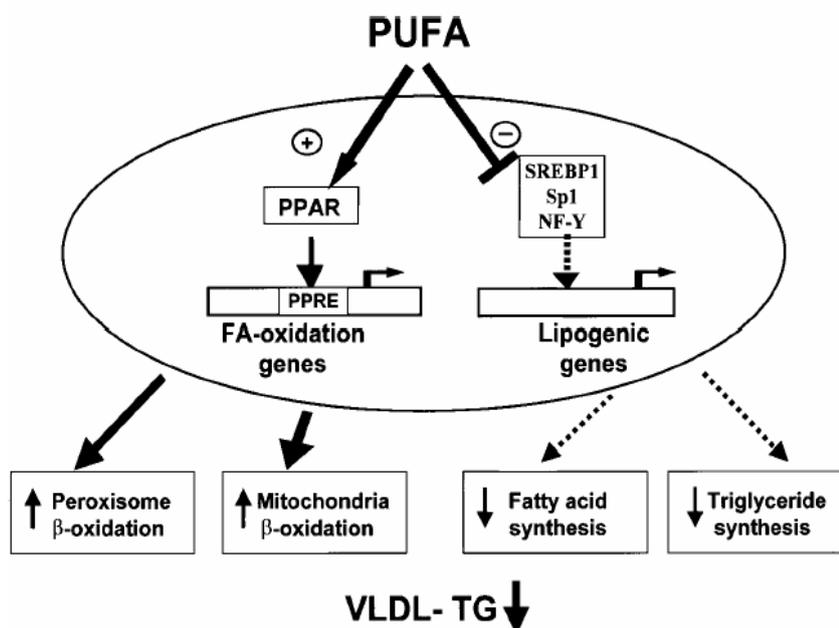


Abbildung 5: Postulierte Mechanismen der Regulation der Genexpression durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) (CLARKE 2001). FA Fettsäuren, NF-Y *Nuclear Factor Y*, Sp1 *Stimulatory Protein-1*.

Die Induktion der FS-Oxidation erfolgt via PPAR: Als ligandenaktiviertes Heterodimer mit dem *Retinoid X Receptor* (RXR) bindet PPAR an das korrespondierende DNA-*Response Element* PPRE der Zielgene und initiiert deren Transkription (KELLER et al. 1993). Gleichzeitig wird die Transkription lipogener Gene (z.B. FS-Synthase, S14-Gen) über einen PPAR-unabhängigen Mechanismus durch die Reduktion der nucleären SREBP-1-Level (MATER et al. 1999) gehemmt.

PPARs sind soluble FS-Rezeptoren, die als Mitglieder der nucleären Steroidrezeptor-Superfamilie in ihrer Gensequenz zwei DNA-bindende Zinkfinger motive sowie eine hydrophobe Ligandenbindungsdomäne aufweisen und als Heterodimer mit RXR mit der Promotorregion der Zielgene interagieren (KELLER et al. 1993, HIHI et al. 2002). Namensgebend war ihre Induzierbarkeit durch diverse Peroxisomen-Proliferatoren (PP) und die daraus resultierende Induktion der peroxisomalen β -Oxidation. Alle anderen Zellkompartimente wie Mitochondrien (AOYAMA et al. 1998) und Mikrosomen sind jedoch ebenso betroffen (LATRUFFE und VAMECQ 1997).

Die drei bekannten PPAR-Subtypen α , δ/β und γ weisen eine charakteristische Distribution und differierende biologische Aktivitäten auf (siehe auch GERVOIS et al. 2000, LATRUFFE et al. 2000, LEE et al. 2003). PPAR α wird hauptsächlich in Leber, Herz, Muskel und Niere exprimiert und reguliert dort die Transkriptionsrate der Gene von Schlüsselenzymen des FS-Katabolismus, also der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation (FREDERIKSEN et al. 2004). Ohne PPAR α akkumulieren PPAR α -Null-Mäuse bei Nüchternung oder bei sehr fetthaltigen Diäten immense Lipidmengen in der Leber (KERSTEN et al. 1999, HASHIMOTO et al. 2000). Für die Adaptation des Stoffwechsels auf eine Hungersituation und die verstärkte Transkription der Gene für FS-Aufnahme und FS-Oxidation ist demnach PPAR α von zentraler Bedeutung.

PPAR γ ist überwiegend im Fettgewebe lokalisiert und moduliert dort die Adipocyten-differenzierung, Lipidspeicherung und Glucosehomöostase (GRAY et al. 2005). Obwohl er in Leber und Muskulatur deutlich geringer exprimiert wird, scheint PPAR γ auch im Muskel den FS-Metabolismus zu regulieren (WOLF 2004). Die Lokalisation und Funktion von PPAR δ ist weniger gut geklärt, er wird ubiquitär exprimiert und als "VLDL-Sensor" mit einer Kontrolle der TG-Level (LEE et al. 2003) oder mit einer Beteiligung an Prozessen der Zellproliferation und Apoptose (HIHI et al. 2002) in Verbindung gebracht.

Ihre expressionsmodulatorische Wirkung entfalten die PPARs erst durch die Interaktion mit spezifischen Liganden. Langkettige MUFS wie Arachidonsäure oder die essentiellen FS Linol- und Linolensäure sowie verschiedene Eicosanoide zählen zu den natürlichen PPAR-Aktivatoren, für die eine direkte Bindung an PPAR nachgewiesen wurde (KLIWER et al. 1997). Andere Aktivatoren, darunter auch verschiedene FS, aktivieren PPAR wahrscheinlich

durch indirekte Mechanismen (WILLSON und WAHLI 1997). Auch synthetische Agonisten wie Fibrate und Thiazolidinedione vermitteln ihre lipidsenkende bzw. insulinsensibilisierende Wirkung über die Aktivierung von PPAR α bzw. PPAR γ (GERVOIS et al. 2000).

Zu den Enzymen, die als PPAR α -Zielgene mit funktionellem PPRE in der Promotorsequenz identifiziert wurden oder für die eine PPAR α -abhängige Genregulation beschrieben wurde, zählen neben anderen:

- die Acyl-CoA-Oxidase und die Enoyl-CoA-Hydratase / 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (peroxisomale β -Oxidation);
- alle Acyl-CoA-Dehydrogenasen, die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase und die 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (mitochondriale β -Oxidation);
- die Carnitin-Palmitoyl-Transferase I und das *Fatty acid binding protein-1* (FS-Aufnahme und -aktivierung);
- das Cytochrom P450 4A1 (mikrosomale ω -Hydroxylierung);
- die HMG-CoA-Synthetase (Ketogenese)
- sowie die $\Delta 9$ -, $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturase (FS-Desaturierung) (MANDARD et al. 2004).

Alimentäre FS, insbesondere MUFS, könnten somit über eine Aktivierung von PPAR α auch die Expression der ECI modulieren. Nicht mit natürlichen Liganden, sondern mit dem Peroxisomen-Proliferator Clofibrat ermittelten HAKKOLA et al. (1994) fast 30mal höhere mRNA-Level und eine 25fach erhöhte Aktivität der mitochondrialen ECI bei Ratten. Auch an Mäusen wurde nach Applikation von Fenofibrate oder Wy-14,643 eine drei- bis vierfache Induktion der ECI-mRNA mittels Oligonucleotidarray bestätigt (YAMAZAKI et al. 2002).

Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang auch die Studien von MEERARANI (2003) und REITERER (2004) et al., die in Zellkultur die Interaktion von PPAR α und PPAR γ mit Zink untersuchten und eine beeinträchtigte Aktivierung und Funktion der PPARs im Zinkdefizit nachwiesen. Auch DANIEL und TOM DIECK (2004) dokumentierten im tierexperimentellen Zinkmangel eine reduzierte Expression vieler PPAR α -regulierter Gene, die in der Mehrzahl Enzyme des Lipidstoffwechsels repräsentieren.

3 Experimenteller Teil

3.1 Fragestellung

Der Einfluss der Zinkversorgung auf den Lipidstoffwechsel und die β -Oxidation ungesättigter FS ist noch sehr unzureichend geklärt. Das Ziel dieser Arbeit war es, am Modelltier Ratte bei einer hohen alimentären Fettzufuhr zu prüfen, ob die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase als essentielles Enzym der β -Oxidation ungesättigter FS durch ein marginales Zinkdefizit beeinflusst wird und ob es zu Veränderungen im Lipidstoffwechsel kommt, die auf eine selektive Beeinträchtigung der Degradation ungesättigter FS zurückzuführen sind.

Dazu wurden Versuchsdiäten mit marginaler und bedarfsdeckender Zinkzufuhr (7 mg/kg bzw. 50 mg/kg Diät) konzipiert, die Kakaobutter (GFS) oder Distelöl (UFS) als pflanzliche Quellen langkettiger gesättigter bzw. ungesättigter FS enthielten. Der verminderten Futteraufnahme der Ratten mit marginaler Zn-Versorgung wurde durch eine entsprechend restriktive Futterzuteilung der optimal Zn-versorgten Gruppen begegnet. Zusätzlich wurde eine *ad libitum*-Kontrollgruppe mitgeführt. Der Einfluss und die Interaktion von Zink- und Fettalimentation sollten anhand mehrerer Zn-Statusparameter, der ECI-Aktivität in verschiedenen Geweben, ihrer Expression in der Leber sowie der FS-Zusammensetzung wichtiger Lipidfraktionen der Leber untersucht werden. Zusätzlich wurden weitere Merkmale des Lipidstoffwechsels bestimmt. Im Einzelnen sind die analysierten Parameter der Übersicht 5 zu entnehmen.

Übersicht 5: Versuchsp Parameter

Zootechnische Parameter	Lebendmasseentwicklung, Futteraufnahme, Futtermittelverwertung
Faeces	Rohfettgehalt, Fettverdaulichkeit
Zinkstatus	Zinkkonzentration in Femur, Plasma und Leber, Aktivität der Alkalischen Phosphatase (Plasma), Metallothionein (Leber)
Plasma-Lipidprofil	Cholesteringehalt, Triglyceridgehalt
Leber-Lipidprofil	Gesamt-Lipidgehalt, Cholesteringehalt, Triglyceridgehalt und Phospholipidgehalt; Fettsäuremuster der hepatischen Gesamtlipide, der Triglyceridfraktion und der Phospholipidfraktion
Δ^3, Δ^2-Enoyl-CoA-Isomerase	Aktivität in Leber, Herzmuskulatur, Skelettmuskulatur, Niere, Testis und Fettgewebe; ECI/SDH-Relation
Genexpressionsanalyse	Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase, PPAR α und PPAR γ in der Leber
Ketonkörper	Plasma und Urin

3.2 Versuchsbeschreibung

Tiere und Versuchsplan

Es wurden 40 entwöhnte männliche Wistar-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln) mit einer Anfangsmasse von $50,8 \pm 0,2$ g in 5 Gruppen mit je 8 Tieren eingeteilt (Übersicht 6). Die Futterzuteilung der marginal Zn-versorgten Gruppen I und III sowie der Kontrollgruppe V erfolgte *ad libitum*. Den *pair fed*-Gruppen II und IV wurde täglich eine Futtevorlage zugeteilt, die der mittleren Futteraufnahme der Tiere mit gleichem Diätfett und marginaler Zinkversorgung am Vortag entsprach. Entmineralisiertes Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

Die tierschutzrechtliche Genehmigung des Versuchs erfolgte durch das Regierungspräsidium Gießen.

Übersicht 6: Versuchsplan

Gruppe		n	Zn-Zulage (mg/kg Diät)	Futterfett (220 g/kg Diät)	Futterzuteilung
I	7Zn - GFS	8	7	Kakaobutter	<i>ad libitum</i>
II	50Zn - GFS	8	50	Kakaobutter	<i>pair fed</i> zu Gruppe I
III	7Zn - UFS	8	7	Distelöl	<i>ad libitum</i>
IV	50Zn - UFS	8	50	Distelöl	<i>pair fed</i> zu Gruppe III
V	50Zn - UFS	8	50	Distelöl	<i>ad libitum</i>

Versuchsdiät

Zur Erzielung definierter Zinkkonzentrationen wurden halbsynthetische Diäten auf der Basis von Eiklarprotein (ein im Vergleich zu Kasein zinkarmer Eiweißträger), Maisstärke und Saccharose konzipiert (Übersicht 7). Zur Aufwertung des Aminosäuremusters wurde Lysin und Methionin supplementiert. Vitamin- und Mineralstoffergänzungen erfolgten entsprechend aktueller Bedarfsschätzungen (REEVES et al. 1993, NATIONAL RESEARCH COUNCIL 1995), wobei native Vitamin- und Mineralstoffgehalte unberücksichtigt blieben. Der Bedarf an α -Linolensäure wurde durch Zugabe von 3% Sojaöl (ca. 7,7 g ALA pro 100 g) gedeckt. Der Zinkgehalt sollte 7 mg/kg (marginale Versorgung) bzw. 50 mg/kg (bedarfsdeckend) betragen.

Um den Gehalt an metabolisierbarer Energie bei einem Gesamtfettanteil von 250 g/kg Diät auf dem empfohlenen Level von 16 – 17 MJ ME/kg (NRC 1995) halten zu können, wurde ein hoher Anteil Cellulose eingesetzt.

Übersicht 7: Zusammensetzung der Versuchsdiäten

Komponente	(g/kg)
Maisstärke ¹	67
Eiklarprotein ²	200
Saccharose ³	100
Sojaöl ⁴	30
Cellulose ⁵	280
AS-Zulage (L-Lysin, DL-Methionin) ⁶	3
Mineralstoffvormischung ⁷	70
Vitaminvormischung ⁸	10
Zinkvormischung ⁹	20
Diätfett ¹⁰	220
Summe	1000

1 Maisstärke GL 03402, Caerstar Deutschland, Krefeld

2 Eiklarprotein sprühgetrocknet, Sanova Eiprodukte, Zeven

3 Saccharose (Kölner Puderzucker), handelsüblich, Pfeifer & Langen, Köln

4 Sojaöl handelsüblich, Karl Heidenreich, Mannheim

5 Cellulose BWV 40, Rettenmaier und Söhne, Ellwangen-Holzmühle

6 L-Lysin, DL-Methionin, Reinsubstanzen (je 1,5 g/kg), Degussa, Frankfurt/Main

7 Mineralstoffvormischung (Angaben je kg Diät): 17,88 g CaHPO₄ x 2 H₂O; 10,02 g KH₂PO₄; 6,08 g MgSO₄ x 7 H₂O; 6,44 g CaCO₃; 1,65 g NaCl; 0,81 g Na₂CO₃; 248,9 mg FeSO₄ x 7 H₂O; 76,9 mg MnSO₄ x H₂O; 31,4 mg CuSO₄ x 5 H₂O; 9,6 mg KCr(SO₄)₂ x 12 H₂O; 2,4 mg CoSO₄ x 7 H₂O; 2,2 mg NaF; 0,8 mg Na₂SeO₃ x 5 H₂O; 0,5 mg KJ; 0,5 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O, Maisstärke ad 70 g. Alle Mineralstoffe wurden von Merck, Darmstadt bezogen.

8 Vitaminvormischung (Angaben je kg Diät): 12 mg Rovimix A-500 (500.000 IE Retinol/g); 2,2 mg Rovimix D3-500 (500.000 IE Cholecalciferol/g), 80 mg Rovimix E-50 (50 % RRR- α -Tocopherol); 9,8 mg Menadion (51 %); 6,1 mg Thiamin-HCl (98 % Thiamin); 10 mg Riboflav (80 % Riboflavin); 3 mg Folsäure (80 % Folsäure); 40,2 mg Niacin (99,5 % Niacin); 30,6 mg Rovimix D-Calpan (98 % Ca-Pantothenat); 10,1 mg Pyridoxin (99 % Pyridoxin); 100 mg Cobalamin-Präparat 1000 (0,1 % Cobalamin); 30 mg Ascorbinsäure (Reinsubstanz); 100 mg Biotin (2 % d-Biotin); 2200 mg Cholinchlorid (50 % Cholin); 100 mg myo-Inositol (Reinsubstanz). Alle Vitamine außer Cholinchlorid (BASF, Ludwigshafen) und Ascorbinsäure (Merck, Darmstadt) wurden von Hoffmann-La-Roche, Grenzach-Whylen bezogen.

9 Zinkvormischung (Angaben je kg Diät): 7Zn-Diäten: 30,8 mg ZnSO₄ x 7 H₂O, Maisstärke ad 20 g; 50Zn-Diäten: 219,9 mg ZnSO₄ x 7 H₂O, Maisstärke ad 20 g.

10 Diätfette: Kakaobutter: handelsüblich, BÄKO Fulda-Lahn; Distelöl: handelsüblich, BRÖLIO Europe, TOOM, Gießen

Alle Vormischungen wurden fein gemörsert in Maisstärke eingemischt und im 1L- bzw. 5L-Labormischer (Lödige, Paderborn) erstellt. Die Diät-Grundmischung wurde ohne Zinkvormischung und ohne Diätfett im 50L-Präzisionsmischer (Dierks und Söhne, Osnabrück) gemischt. In Aliquote dieser Grundmischung wurden im 50L-Mischer die Zinkvormischungen

eingemischt, aufgeteilt und anschließend eines der Diätfette eingemischt. Die Kakaobutter wurde erwärmt und flüssig zugegeben. Die Lagerung der mehligen Diäten erfolgte bei +4°C.

Übersicht 8 zeigt das Fettsäuremuster der verwendeten pflanzlichen Diätfette. Die Kakaobutter enthielt ca. 60 % gesättigte FS, unter 6 % mehrfach ungesättigte FS und einen Quotienten aus mehrfach-ungesättigten zu gesättigten FS von 0,1. Das Distelöl lieferte ca. 90 % ungesättigte FS und wies ein Verhältnis von mehrfach-ungesättigten zu gesättigten FS von 7,9 auf.

Übersicht 8: Fettsäuremuster der Diätfette (Mol %)

Fettsäure	Kakaobutter		Distelöl	
	Literaturwert (%)	Nachweis mit GC (%)	Literaturwert (%)	Nachweis mit GC (%)
Palmitinsäure (C16:0)	24,9	26,3	6,3	6,8
Stearinsäure (C18:0)	34,4	32,5	2,4	2,3
Ölsäure (C18:1 n-9)	32,0	33,9	10,4	12,3
Linolsäure (C18:2 n-6)	2,0	5,1	75,1	77,1
α-Linolensäure (C18:3 n-3)	0,3	0,3	0,5	0,3
Docosansäure (C22:0)	1,0	0,2	-	0,3
weitere Fettsäuren	in Spuren enthalten			

Die Literaturwerte wurden aus SOUCI et al. (2000) entnommen. Zusätzlich wurden die Gehalte der Fettsäuren der verwendeten Fette quantitativ mittels Gaschromatographie nachgewiesen.

Haltung der Versuchstiere und Versuchsdurchführung

Die Haltung der Versuchsratten erfolgte einzeln in Makrolonkäfigen mit Edelstahlgitterboden, die eine quantitative Erfassung der Futteraufnahme sowie eine getrennte Kot- und Harnsammlung ermöglichten.

Während der 4-wöchigen Versuchsdauer wurden die Tiere bei einer Temperatur von 22°C, ca. 60 % Luftfeuchte und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Futterzuteilung erfolgte einmal täglich um 9 Uhr. Die Lebendmasse wurde wöchentlich, der Futterverbrauch täglich erfasst (Gruppe V wöchentlich). Kot und Harn wurden in der 3. und 4. Versuchswoche täglich quantitativ gesammelt und bei -20°C gelagert. Zu Versuchsende wurden die Ratten nach ca. 10-stündiger Nüchternung mit Kohlenstoffdioxid betäubt und dekapitiert.

3.3 Zusammensetzung der Versuchsdiäten

Die Zusammensetzung und Homogenität der Versuchsdiäten wurde analytisch überprüft und ergab eine sehr gute Übereinstimmung mit den angestrebten Nährstoffgehalten.

Rohnährstoffe und Bruttoenergie

Übersicht 9 zeigt die nach VDLUFA (NAUMANN und BÄSSLER 1997) bestimmten Rohnährstoffgehalte. Die Rohfett-Extraktion erfolgte nach Säurehydrolyse mit n-Hexan (Büchi B-811). Die Bestimmung der Rohfaser erfolgte mit Aluminiumoxid anstatt mit Asbest. Zur Bestimmung der neutralen Detergentienfaser wurde die Methode nach Van Soest angewandt. Die Bruttoenergie wurde im adiabatischen Bombenkalorimeter (IKA-Kalorimeter C400) bestimmt.

Übersicht 9: Rohnährstoffgehalte (% AM) und Bruttoenergie (kJ/g AM) der Diäten

	Diät I 7Zn - GFS	Diät II 50Zn - GFS	Diät III 7Zn - UFS	Diät IV 50Zn - UFS
TM (%)	94,43	94,52	94,70	95,01
XA (%)	4,28	4,26	4,21	4,23
XL (%)	23,4	24,9	25,3	24,9
XP (%)	17,2	16,9	16,7	16,6
XF (%)	32,4	28,4	29,8	28,7
NDF (%)	23,0	22,8	23,1	22,9
GE (kJ/g)	20,56	20,56	20,50	20,54

Mengen- und Spurenelemente

Die Überprüfung der Mineralstoff- und Spurenelementgehalte (Ca, Mg, P, Fe, Cu, Mn, Zn) in den Versuchsdiäten erfolgte nach Trockenveraschung am ICP-AES-System (Typ 701; Unicam). Die Analysen (3 Parallelen) ergaben Zinkgehalte von 6,8 ±1,1 mg/kg (Diät I), 47,2 ±10,0 mg/kg (Diät II), 6,7 ±1,1 mg/kg (Diät III) und 45,6 ±1,6 mg/kg (Diät IV). Für Zink wie auch für die übrigen Mengen- bzw. Spurenelemente wurde eine hinreichende Übereinstimmung mit den angestrebten Werten erzielt.

Fettsäuremuster

Jeweils 3 g Diät wurden nach Soxhlet mit n-Hexan heiß extrahiert und in 25 mL Hexan aufgenommen. Die Bestimmung des Fettsäuremusters erfolgte analog der Bestimmung in den Leberlipiden (vgl. 3.5.7.3). Von dem Lipidextrakt wurden jeweils 100 µL eingesetzt. Das analysierte Fettsäuremuster der Diäten ist in Übersicht 10 wiedergegeben.

Übersicht 10: Fettsäuremuster der Versuchsdiäten (g/100g FS)

	Diät I 7Zn - GFS	Diät II 50Zn - GFS	Diät III 7Zn - UFS	Diät IV 50Zn - UFS
C 16:0	24,63	24,45	7,20	7,32
C 16:1	0,22	0,22	0,09	0,08
C 18:0	30,03	30,21	2,26	2,33
C 18:1	32,58	32,55	12,54	12,86
C 18:2 n-6	10,82	10,60	76,13	75,64
C 18:3 n-3	1,26	1,23	1,16	1,13
C 20:0	0,91	0,91	0,30	0,30
C 20:1	0,08	0,08	0,26	0,25
C 22:0	0,23	0,23	0,22	0,22
C 24:0	0,11	0,11	0,08	0,07
C 24:1	0,00	0,00	0,09	0,10

3.4 Gewinnung und Aufbereitung des Analysenmaterials

Blut und Plasma

Die Versuchstiere wurden nach Kohlenstoffdioxidbetäubung dekapitiert und das Blut in heparinisierten Kunststoffröhrchen aufgefangen. Zur Plasmagewinnung wurde das Vollblut für 10 min bei 1500 x g zentrifugiert.

Organe und Gewebe

Nach vollständigem Entbluten wurden sofort Leber, Nieren, Herz, Testes, der rechte Femur, Skelettmuskulatur des rechten Oberschenkels sowie abdominelles Fettgewebe entnommen. Für die RNA-Extraktion wurde unter sterilen Bedingungen vom kleinen Segment des mittleren Leberlappens ca. 0,2 g abgetrennt, in ein steriles Cup gegeben und in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Gewebeproben wurden nach Ermittlung der Frischmasse in Flüssigstickstoff bzw. auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

Faeces

Die gesammelten Faeces der 3. und 4. Versuchswoche wurden gewogen, unter Vakuum gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Gamma 1-20), fein gemahlen und anschließend bei $+4^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Hämoglobin, Hämatokrit

Zur Ermittlung des Hämatokrit-Wertes (Hk) wurde Vollblut in zwei heparinisierten Hk-Kapillaren aufgezogen, für 10 min in der Hämatokrit-Zentrifuge (Hettich, Tuttlingen) auszentrifugiert und mithilfe einer Schablone abgelesen.

Die Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration (Hb) des Vollbluts erfolgte nach der Hämiglobincyanid-Methode photometrisch bei 546 nm unter Verwendung des Testsatzes MPR 3 Hämoglobin (Boehringer Mannheim).

3.5.2 Fettgehalt der Faeces

Der Fettgehalt und die Trockenmasse der lyophilisierten und gemahlenden Faeces wurde analog zur Diät nach VDLUFA bestimmt. Die Extraktion nach der Hydrolyse mit 4 M HCl erfolgte ebenfalls mit n-Hexan. Die Verdaulichkeit der Diätfette wurde anhand der Rohfett-Analysendaten aus Diät und Faeces berechnet.

3.5.3 Bestimmung des Zinkstatus

Zink-Konzentration

Die Zink-Konzentration des Plasmas wurde mittels Hydrid-AAS (PU 9400, Phillips) bestimmt. Die Proben wurden mit 0,1 M HCl 1:20 (v/v) verdünnt und direkt in der Flamme gemessen. Zur Bestimmung der Zink-Konzentrationen von Femur und Leber wurden die Proben (ca. 1 g) über 16 Stunden mit 65%iger HNO₃ nass verascht und mit Aqua bidest in 25 mL-Kolben überführt. Die Messung erfolgte am ICP-AES-System (Typ 701, Unicam). Von jeder Probe wurden mindestens 2 Einzelmessungen durchgeführt.

Alkalische Phosphatase

Die Aktivität des Zn-Metalloenzym Alkalische Phosphatase (AP) (EC 3.1.3.1) wurde nach den Empfehlungen der DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE (1972) durchgeführt. Die AP katalysiert die Spaltung von p-Nitrophenylphosphat in p-Nitrophenol und anorganisches Phosphat, wobei die Bildungsgeschwindigkeit des gelb gefärbten p-Nitrophenols der AP-Aktivität direkt proportional ist. Die Messung erfolgte im Halbmikromaßstab am UV-Spektralphotometer (Beckmann DU-64) bei 405 nm und 25°C. Es wurden ein

Kontrollserum (Qualitrol, Merck) mitgeführt und pro Plasmaprobe 3 Parallelen erstellt. Die Berechnung erfolgte in mU/mL Plasma.

Metallothionein

Das Gesamt-Metallothionein der Leber wurde nach EATON und TOAL (1982) mittels radioaktivem Cadmium-Bindungsassay bestimmt. Cadmium besitzt die höchste Bindungsaffinität und verdrängt somit Zink und andere zweiwertige Metallionen quantitativ von den Bindungsstellen des MT. Die Aktivität des ^{109}Cd -markierten MTs kann im Gammacounter gegen Blindwert und Totalaktivität gemessen werden.

Dazu wurden 0,5 g Leber mit 10 mM TRIS-Puffer pH 7,4 (1:10, w/w) mit einem Dispergiergerät (Micra RT) unter N_2 -Atmosphäre homogenisiert, 10 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert und ein Aliquot des Überstands (250 μL) mit 200 μL einer Cadmiumlösung (1,5 $\mu\text{g Cd/mL}$ plus 1,15 $\mu\text{Ci }^{109}\text{Cd/mL}$) versetzt. Nach 10minütiger Inkubation wurde überschüssiges Cadmium durch die Zugabe einer 2%igen (w/v) Hämoglobinlösung gebunden, bei 100°C präzipitiert und abzentrifugiert. Aus der Aktivität des MT-gebundenen ^{109}Cd im Überstand wurde der MT-Gehalt der Proben unter Annahme eines Molekulargewichts von 6000 Da und einer Bindung von 6 mol Cd/mol MT berechnet und als ng MT/g FM sowie als ng MT/mg Protein angegeben. Pro Leber wurden zwei parallele Bestimmungen durchgeführt.

3.5.4 Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach BRADFORD (1976). Für die Standarddeichkurve wurde bovines Serumalbumin (BSA) verwendet. Pro Probe wurden 3 Parallelen angesetzt und die Probenextinktion nach 10 min Inkubationsdauer bei 595 nm gemessen. Zur Berechnung der spezifischen Enzymaktivitäten wurde die Volumenaktivität auf den Proteingehalt der Probe bezogen.

3.5.5 Aktivität der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase

Die Bestimmung der Aktivität der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase (ECI) (EC 5.3.3.8) erfolgte in Anlehnung an STOFFEL und ECKER (1969) in mitochondrien-angereicherten Gewebekomogenaten mit *trans*-3-Hexenoyl-CoA.

3.5.5.1 Substrat-Herstellung

Synthese des *trans*-3-Hexenoyl-CoA

Der CoA-Ester der *trans*-3-Hexensäure wurde nach dem Prinzip des gemischten Anhydrids (GOLDMAN und VAGELOS 1961) nach STOFFEL et al. (1964) und FONG und SCHULZ

(1981) synthetisiert. Hierbei reagiert eine Δ^3 -Carbonsäure mit Ethylchloroformiat unter der selektiven Basenwirkung von Triethylamin mit der Bildung eines gemischten Anhydrids, welches bei pH 8 mit der freien Sulfhydrylgruppe von Coenzym A zu einem FS-CoA-Ester reagieren kann.

In einem Cup wurde 70 μmol *trans*-3-Hexensäure (Aldrich, W31,700-4) zu 1 mL Tetrahydrofuran (wasserfrei) (FSA, T/0706) gegeben. Bei -15°C wurde unter Rühren 70 μmol Triethylamin (Merck, 8.08352) und 70 μmol Ethyl-Chloroformiat (Merck, 8.00881) zugefügt und nach 2 Stunden das gebildete Triethylammoniumchlorid abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde langsam zu einer kalten Lösung aus 20 mg Coenzym A (Gerbu, 1094) in 1,3 mL Aqua bidest (pH 8) gegeben und mit 1 mL kaltem Tetrahydrofuran nachgewaschen. Der pH-Wert wurde durch Zugabe verdünnter NaOH bei 8 gehalten. Nach Ablauf der Reaktion (20 min) wurde mit HCl auf pH 3 angesäuert und das Tetrahydrofuran im Stickstoffstrom entfernt. Nach kurzem Erwärmen auf ca. 80°C wurde auf Eis gekühlt und im Vakuumrotationsverdampfer (AES1010, Savant) zur Trockne eingengt. Das leicht klebrige Präzipitat wurde mit 5 mL Aceton (HPLC-Qualität) und dreimal mit 5 mL peroxidfreiem Diethylether gewaschen (PULLMAN 1973). Das Lösungsmittel wurde vorsichtig unter N_2 entfernt, der kristalline FS-CoA-Ester in 2,5 mL Bidest gelöst und bei -20°C eingefroren. Die Ausbeute lag bei ca. 60 %.

HPLC-Aufreinigung

Verunreinigungen bzw. Nebenprodukte, die noch in der *trans*-3-Hexenoyl-CoA-Lösung vorlagen, störten die Bestimmung der ECI-Aktivität empfindlich und mussten mittels präparativer HPLC entfernt werden.

Die Auftrennung erfolgte modifiziert nach ZHANG et al. (2002) auf einem *reversed-phase* Merck Hitachi-HPLC-System über eine LiChrospher 100 RP-18-Säule (5 μm , 250 x 4 mm; Merck) mit einem Puffersystem aus 50 mM Ammonium-Dihydrogenphosphatpuffer (pH 5,5) und Acetonitril/ H_2O 9:1 (v/v). Fließmittelgradient und HPLC-Bedingungen sind Übersicht 11 zu entnehmen. Die *trans*-3-Hexenoyl-CoA-haltige Fraktion eluierte zwischen 11 und 13 min.

Das Acetonitril im *trans*-3-Hexenoyl-CoA-haltigen Eluat wurde im Vakuumrotationsverdampfer evaporiert und das *trans*-3-Hexenoyl-CoA über RP-18-Extraktionssäulen (LiChrolut, Merck) konzentriert. Die Säulen wurden dafür mit je einem Volumen (ca. 2,5 mL) Methanol und Aqua bidest konditioniert. Je zwei Fraktionen des Eluats wurden über eine Säule gegeben und mit zwei Volumen Aqua bidest gewaschen. Der *trans*-3-Hexenoyl-CoA-Ester wurde mit 1,5 mL Methanol eluiert, zur Trockne eingengt und in Aqua bidest aufgenommen.

Übersicht 11: HPLC-Bedingungen für die Aufreinigung der *trans*-3-Hexenoyl-CoA-Lösung

Injektionsvolumen	50 μ L
Säule	LiChrospher 100 RP-18, 5 μ m, 250 x 4 mm
Vorsäule	LiChroCART 4-4 RP-18e, 5 μ m
Fließmittelgradient	linear
0 min	90 % 50 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄ , 10 % Acetonitril/H ₂ O
15 min	60 % 50 mM (NH ₄)H ₂ PO ₄ , 40 % Acetonitril/H ₂ O
Flussrate	1,0 mL/min
Säulendruck	145 bar
Detektion	254 nm (UV)

Zur Verifizierung der aufgereinigten Substanz als *trans*-3-Hexenoyl-CoA wurden ESI-Massenspektren (LCQ, Thermo Finnigan MAT) erstellt. Die Analyse wurde freundlicherweise bei Prof. Dr. H. Brückner, Institut für Ernährungswissenschaften, Professur für Lebensmittelwissenschaft, durchgeführt. Analysebedingungen und Spektren sind im Anhang dargestellt. Die Massenfragmente (positiver bzw. negativer Modus) entsprachen dem berechneten Molekulargewicht von 863,1 (+ H bzw. – H) und wiesen das *trans*-3-Hexenoyl-CoA somit eindeutig und in hoher Reinheit nach.

Das HPLC-Chromatogramm des aufgereinigten Substrats zeigte ebenfalls nur einen einzelnen Peak mit einem Flächenanteil von 99,3 %. Dieser Anteil reduzierte sich jedoch im Laufe der Lagerung bei -20°C. Die Verwendung des aufgereinigten Substrats für die Bestimmung der ECI-Aktivität erfolgte daher direkt am folgenden Tag.

Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach ELLMAN (1959) nach Spaltung der Thioesterbindung durch Hydroxylamin. Dabei reagiert 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB) mit der freigewordenen Thiolgruppe des Coenzym A. Das freigesetzte intensiv gefärbte p-Nitrothiophenol ist der Menge des CoA-Thioesters direkt proportional.

Die *trans*-3-Hexenoyl-CoA-Lösung wurde mit 30 mM Kalium-Phosphat-Puffer (pH 8) verdünnt. Davon wurden 50 μ L mit dem gleichen Volumen 2 M Hydroxylamin (pH 7) versetzt und 5 min inkubiert. Nach Zugabe von 10 μ L 10 mM DTNB und 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer (pH 8) ad 1000 μ L wurde die Extinktion von Probe und Blindwert bei 412 nm bestimmt. Die Linearität wurde durch eine Standardkurve mit Glutathion bestätigt ($r=0,9999$).

Die Berechnung der Konzentration erfolgte nach der folgenden Formel:

$$c [mM] = \frac{\Delta E \cdot V \cdot f}{\varepsilon \cdot d \cdot v}$$

c	Konzentration
ΔE	Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Blindwert
V	Gesamtvolumen (1 mL)
f	Verdünnungsfaktor
ε	molarer Extinktionskoeffizient (DTNB _{412nm} : 13,6 mM ⁻¹ cm ⁻¹)
d	Schichtdicke (1 cm)
v	Probenvolumen (0,05 mL)

Die *trans*-3-Hexenoyl-CoA-Stammlösung wurde auf eine Endkonzentration von 0,7 mM (Gebrauchslösung) verdünnt. Anhand der Extinktion bei 260 nm wurde die Konzentration im ECI-Assay (70 μM) nochmals kontrolliert (molarer Extinktionskoeffizient von Hexenoyl-CoA_{260nm}: 13,7 mM⁻¹ cm⁻¹ (LAWSON und KUMMEROW 1979)).

3.5.5.2 Gewinnung der Mitochondrienfraktionen

Mitochondrienreiche Gewebefractionen wurden aus Homogenaten von Leber, Herzmuskulatur, Niere, Skelettmuskulatur und Testis mittels differentieller Zentrifugation gewonnen. Alle Arbeitsschritte erfolgten bei +4°C. Jeweils 0,5 g gefrorenes Gewebe wurde im Verhältnis 1:5 (w/w) unter Eiskühlung im Präparationspuffer (50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,4) homogenisiert (Potter, B. Braun), mit 500 μL Präparationspuffer in ein Spitzbodenröhrchen überführt und 10 min bei 630 x g zentrifugiert, um ganze Zellen, Zellkerne u.ä. zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment mit 2 mL Präparationspuffer nachgewaschen. Die Überstände wurden in Cups überführt, 15 min bei 13000 x g zentrifugiert, die Mitochondrien (sowie Lysosomen und Peroxisomen) somit sedimentiert, und der Überstand abgenommen. Die Sedimente wurden mit 1,5 mL Präparationspuffer nachgewaschen, vereinigt und nochmals gewaschen. Das resultierende Mitochondrien-Pellet wurde in 500 μL Präparationspuffer homogen suspendiert und in Aliquoten bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Vorversuche hatten gezeigt, dass sich die Mitochondrien des Fettgewebes nicht in ausreichender Menge und reproduzierbar präparieren ließen. Hierfür war auch der unterschiedliche Schmelzpunkt der eingelagerten Fette (Kakaobutter – Distelöl) verantwortlich. Daher wurde 0,7 g Fettgewebe im Verhältnis 1:5 in 50 mM Na-Phosphat-Puffer (pH 7,4) homogenisiert (Dispergiergerät Miccra D-8), für 10 min bei 630 x g zentrifugiert und vorsichtig 2 mL der wässrigen Phase unter der Fettschicht entnommen.

3.5.5.3 Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase-Assay

Die Bestimmung der ECI-Aktivität erfolgte in Anlehnung an STOFFEL und ECKER (1969), MUELLER-NEWEN (1993) und JANSSEN (1997). Die ECI katalysiert die Isomerisierung der Δ^3 -Doppelbindung (*cis* oder *trans*) ungesättigter FS zur 2-*trans*-Doppelbindung. Der Konzentrationsanstieg des 2-*trans*-FS-CoA, der dem Substratumsatz durch die ECI entspricht, kann direkt bei 263 nm (Absorptionsmaximum der α, β -ungesättigten Thioesterbindung) gemessen werden. Eine weitere Umsetzung (Hydratisierung) des 2-*trans*-FS-CoA wird durch die Inaktivierung der hitzeempfindlichen Enoyl-CoA-Hydratase verhindert.

Für die ECI-Bestimmung wurden die mitochondrienreichen Gewebefractionen in 1 mL-Glasröhrchen gegeben, in einem Wasserbad bei 70°C für 120 sec inkubiert und auf Eis abgekühlt. Denaturiertes Protein wurde durch Zentrifugation (15 min, 13000 x g) abgetrennt und der klare Überstand für die Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

Der Assay wurde im Halbmikromaßstab in UV-Einmalküvetten (Plastibrand) bei 25°C durchgeführt. Es wurden 50 μ L *trans*-3-Hexenoyl-CoA (0,7 mM), 50 μ L BSA-Lösung (Fraction V, *fatty acid free*) (0,1 %, w/v) und 380 μ L 50 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,4) sorgfältig gemischt und nach Zugabe von 20 μ L der Probe die Extinktionszunahme bei 263 nm für 2 min verfolgt (Cary 50 Bio, Varian). Lineare Extinktionsänderungen wurden im Bereich zwischen 0,01 und 0,04 Einheiten pro min erzielt ($r > 0,995$). Es wurden 3 Parallelen erstellt und die Aktivität der ECI in Units (U) pro mg Protein wie folgt berechnet:

$$U / mg = \frac{\Delta E \cdot V \cdot f}{t \cdot \varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \frac{1}{P}$$

ΔE	Extinktionsänderung
V	Gesamtvolumen (0,5 mL)
f	Verdünnungsfaktor
t	Zeit (2 min)
ε	molarer Extinktionskoeffizient (<i>trans</i> -2-Hexenoyl-CoA _{263nm} : 6,7 mM ⁻¹ cm ⁻¹)
d	Schichtdicke (1 cm)
v	Probenvolumen (0,02 mL)
P	Proteinkonzentration der Probe in mg/mL

Da eine standardisierte Enoyl-CoA-Isomerase mit definierter Aktivität nicht zur Verfügung stand, wurde die Linearität der Bestimmung mit unterschiedlichen Volumina der gleichen Probe bestimmt. Es ergab sich eine Korrelation von 0,999 (Extinktionsänderung zwischen 0,005 und 0,050 pro min). Die Reproduzierbarkeit im linearen Messbereich wurde anhand einer 10fach-Bestimmung einer Probe (VK 4,0 %) und 6 paralleler Aufarbeitungen einer Leber (VK 5,7 %) bestätigt. Die Spezifität der Umsetzung der 3-*trans*-FS-CoA-Verbindung

wurde nachgewiesen, indem nach Ablauf der Reaktion durch die Zugabe von Enoyl-CoA-Hydratase die Extinktion wieder auf den Ausgangswert zurückkehrte, d.h. die Umsetzung eines 2-*trans*-FS-CoAs erfolgte.

3.5.5.4 Succinatdehydrogenase-Assay

Die Succinatdehydrogenase (SDH) (EC 1.3.5.1) ist ein Enzym der Atmungskette und als integrales Protein in der inneren Mitochondrienmembran verankert. Sie stellt ein typisches Leitmolekül für Mitochondrien dar und ist im Zinkmangel nicht in ihrer Aktivität verändert (PRASAD et al. 1967).

Die Bestimmung der SDH-Aktivität wurde nach VEEGER et al. (1969) durchgeführt. Die SDH oxidiert *in vivo* Succinat zu Fumarat und überträgt die Reduktionsäquivalente auf Ubichinon. Im Assay wird durch 1 Mol Succinat 1 Mol 2,6-Dichlorophenol-Indophenol (DCIP) reduziert und dessen Extinktionsabnahme bei 600 nm bestimmt. Für die SDH-Bestimmung wurde zunächst eine Reaktionslösung aus 1,2 mM KCN, 60 µM DCIP und 0,1 % BSA (w/v) in 0,1 M Kalium-Phosphat-Puffer (1,5 mM EDTA, pH 7,6) hergestellt. Zu 1250 µL der Reaktionslösung wurde 150 µL 0,4 M Succinat (pH 7,6) und 50 µL 1% (w/v) Phenazinmethosulfat in H₂O gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µL der Probe gestartet und unter Lichtausschluss für 3 min und 25°C bei 600 nm verfolgt. Für den Leerwert wurde anstelle des Succinats Kalium-Phosphat-Puffer eingesetzt. Die Reproduzierbarkeit wurde an 6 parallelen Aufarbeitungen einer Leber (VK 4,1 %) und anhand einer Mehrfachbestimmung einer Leberprobe (n = 10; VK 2,1 %) bestätigt.

Für Probe und Leerwert wurden jeweils 3 Parallelen erstellt. Die Berechnung der SDH-Aktivität in Units (U) pro mg Protein erfolgte analog zu Kapitel 3.5.5.3:

$$U / mg = \frac{(\Delta E_{\text{Probe}} - \Delta E_{\text{Leerwert}}) \cdot V \cdot f}{t \cdot \varepsilon \cdot d \cdot v} \cdot \frac{1}{P}$$

ΔE	Extinktionsänderung von Probe bzw. Leerwert
V	Gesamtvolumen (1,5 mL)
f	Verdünnungsfaktor
t	Zeit (3 min)
ε	molarer Extinktionskoeffizient (DCIP _{600nm} : 21,0 mM ⁻¹ cm ⁻¹)
v	Probenvolumen (0,05 mL)
P	Proteinkonzentration der Probe in mg/mL

3.5.6 Genexpressionsanalysen

3.5.6.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Die RNA-Extraktion wurde nach dem Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Verfahren von CHOMCZYSKI und SACCHI (1987) durchgeführt. Alle Arbeiten erfolgten bei +4°C, verwendete Materialien oder Lösungen waren RNase-frei bzw. wurden autoklaviert oder mit 70 % Ethanol desinfiziert, und das eingesetzte Wasser wurde mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) (0,1 %, v/v) behandelt.

Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurden 100 mg Lebergewebe-Pool (50 mg pro Tier, 3 Pools pro Gruppe) in ein Cup mit 600 µL RNase-hemmendem Guanidinthiocyanat-Puffer (4 M Guanidinthiocyanat, 25 mM Tri-Natriumcitrat-2-hydrat, 0,5 % (w/v) N-Lauroyl-Sarcosin, 0,1 M β-Mercaptoethanol in H₂O-DEPC) gegeben und vollständig homogenisiert (Micra D-8). Nacheinander wurden 60 µL 2 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,0), 225 µL Chloroform-Isoamylalkohol (49:1, v/v) und 600 µL gesättigte Phenollösung zupipettiert. Die verschlossenen Proben wurden auf einem Schüttler sorgfältig gemischt, 30 min auf Eis gestellt, nochmals kurz gemischt und anschließend bei 2°C zentrifugiert (40 min, 6000 x g). 600 µL der oberen wässrigen Guanidinthiocyanat-Phase (mit gelöster RNA) wurden abgenommen, in einem Cup mit 600 µL kaltem 2-Propanol versetzt, gemischt und über Nacht bei -20°C eingefroren. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugation (30 min, 14000 x g, 2°C) sedimentiert, das Lösungsmittel sofort abgegossen und das RNA-Pellet zweimal mit 1 mL 70 % Ethanol gewaschen (10 min, 14000 x g). Anschließend wurden die Proben im Vakuumrotationsverdampfer schonend getrocknet, in 40 µL H₂O-DEPC gelöst und portioniert bei -80°C gelagert.

Die Konzentration der RNA-Lösungen wurde ermittelt, indem in eine UV-Quarz-Halbmikroküvette 2,5 µL der RNA-Lösung in 1000 µL H₂O-DEPC pipettiert und die Extinktion bei 260 nm gegen den Leerwert (H₂O-DEPC) bestimmt wurde. Reine RNA weist bei 260 nm und einer Konzentration von 40 µg/mL eine Extinktion von 1,000 auf. Der RNA-Gehalt der Lösungen errechnete sich daher wie folgt:

$$\mu\text{g RNA} / \mu\text{L} = \frac{\Delta E \cdot 40 \cdot f}{1000}$$

ΔE Extinktionsdifferenz zwischen Probe und Leerwert
 f Verdünnungsfaktor ((1000 µL + 2,5 µL) / 2,5 µL = 401)

Die Qualität und Reinheit der Präparationen wurde ermittelt, indem der Quotient der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm berechnet und die Ethidiumbromidfluoreszenz in der

Elektrophorese eines Aliquots der Präparationen unter denaturierenden Bedingungen bestimmt wurde.

Dazu wurde ein 1,5 %iges Agarose-Gel aus 2,25 g Agarose ad 150 g mit 1x TAE-Puffer hergestellt und in ein Gießbett (12,5 x 25,0 cm) mit Probenkamm (15 Slots) gegossen. Jeweils 7 µg RNA wurden mit 15,5 µL eines Denaturierungsansatzes aus 2 µL 50x TAE-Puffer (0,8 M Tris, 0,4 M Natrium-Acetat, 20 mM EDTA; pH 7,4), 3,5 µL Formaldehyd und 10 µL Formamid vermischt und durch Erhitzen auf 70°C (10 min) denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt, gründlich mit 4 µL Ladepuffer (50 % (w/w) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,25 % (w/w) Bromphenolblau) und 2 µL Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/mL) vermischt und quantitativ in die Slots des Agarose-Gels pipettiert. Das Gel war zuvor in die Elektrophorese-Kammer (Bio-Rad Subcell GT) eingesetzt und mit 1x TAE leicht überschichtet worden. Nach 40 min bei 100 Volt wurde die Elektrophorese beendet, das Gel entnommen und unter UV-Licht (Chemi Imager) ausgewertet.

3.5.6.2 RT-PCR

cDNA-Synthese

Die extrahierte RNA muss für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in DNA bzw. cDNA umgeschrieben werden. Die reverse Transkription wurde mithilfe des RevertAID First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt (A). Die RNA-Lösungen wurden auf eine Endkonzentration von 2 µg/µL verdünnt und davon 2,5 µL (entsprechend 5 µg RNA) eingesetzt. Die Proben-RNA wurde zum oligo(dT)₁₈-Primer pipettiert, 5 min bei 70°C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Der Mastermix aus 5x Reaktionspuffer, Ribonuclease-Inhibitor und dNTP-Mix wurde zugegeben, anschließend 5 min bei 37°C inkubiert und danach die Reverse Transkriptase hinzupipettiert. Nach 60 min bei 42°C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C (10 min) beendet, die cDNA-Proben auf Eis abgekühlt, mit 40 µL H₂O-DEPC verdünnt und bis zur Verwendung in Aliquoten bei -20°C gelagert.

Zur Absicherung der erhaltenen Ergebnisse wurde eine zweite reverse Transkription mit *random hexamer*-Primern durchgeführt. Dafür wurde das iScript cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad verwendet (B). Zu 1,5 µL RNA (1 µg/µL) wurden 4 µL 5x iScript Reaction Mix, 1 µL iScript Reverse Transkriptase und H₂O ad 20 µL gegeben, 5 min bei 25°C gehalten, dann für 30 min bei 42°C inkubiert und die Reaktion durch Erhitzen auf 85°C (5 min) beendet. Nach Abkühlen auf 4°C wurden die Transkripte mit 40 µL H₂O-DEPC verdünnt und wie oben beschrieben gelagert.

PCR

Die PCR-Amplifikation erfolgte in Volumen von 50 µL. Die Reaktionsansätze enthielten 5,0 µL 10x PCR-Puffer mit 20 mM MgCl₂ (Fermentas), 3,8 µL 2 mM dNTP Mix (Fermentas),

1,0 U Taq-Polymerase (5 U/ μ L; Peqlab), jeweils 2,5 μ L spezifische Vorwärts- und Rückwärts-Primer (10 μ M; MWG-Biotech) (Übersicht 12) und H₂O-DEPC ad 48 μ L.

Übersicht 12: Gen-spezifische Vorwärts- und Rückwärts-Primer

Genidentifikation	ampifizierte Region	Primer 3'- 5' (T _m)	Primer 5' - 3' (T _m)
ECI (X61184)	450 – 839	caggataatggcggacaact (57,3)	tacacgtgcagggacttctg (59,4)
PPAR γ (NM_013196)	418 – 766	gagtctgtggggataaagcatc (60,3)	gcgggaaggactttatgatga (58,4)
PPAR α (NM_013124)	955 – 1347	acgatgctgtcctccttgat (57,3)	cttcttgatgacctgcacga (57,3)
GAPDH (NM_017008)	668 – 971	acgggaagctcactggcatg (61,4°C)	ctacagcaacaggggtggtg (61,4°C)

Von der generierten cDNA wurden 2 μ L (ca. 1 μ g (A) bzw. 0,7 μ g (B) cDNA) eingesetzt. Auf Eis wurde die cDNA in PCR-Cups vorgelegt, der Mastermix aufpipettiert und vorsichtig herunterzentrifugiert. Die Amplifikation wurde nach dem folgenden Schema im Thermal Cycler (MyCycler, Bio-Rad) mit 26 – 32 Cyclen durchgeführt (Übersicht 13). Die *Annealing*-Temperatur T_a wurde für jedes Primer-Paar aus dem Mittel der Schmelztemperaturen T_m minus 3°C berechnet. Zwei und vier Cyclen vor Ende der Reaktion wurden 15 μ L der Amplifikate aus den 50 μ L-Ansätzen entnommen. Bei jeder Amplifikation wurde das *House Keeping*-Gen GAPDH mitgeführt, wobei das Volumen des Reaktionsansatzes hierfür halbiert und entsprechend 1 μ L cDNA eingesetzt wurde.

Zur Bestimmung der optimalen PCR-Cyclenzahl und zur Überprüfung der Fragmentlängen wurden vorab Test-Amplifikationen (eine Probe pro Gruppe) durchgeführt sowie ein Basenpaar-Standard (GeneRuler DNA Ladder Plus, Fermentas) in der Gelelektrophorese mitgeführt.

Übersicht 13: PCR-Amplifikationsprotokoll

Initiale Denaturierung	180 sec	95°C	
Denaturieren	45 sec	95°C	
<i>Annealing</i>	40 sec	T _a	
<i>Extension</i>	55 sec	72°C	
Endsynthese	150 sec	72°C	Kühlung auf 4°C

3.5.6.3 Agarose-Gelelektrophorese und Auswertung der optischen Dichten

Die semiquantitative Bestimmung der Transkriptmenge erfolgte anhand ihrer Ethidiumbromidfluoreszenz nach Agarose-Gelelektrophorese. 6 μL Amplifikat wurden mit 2 μL DNA-Ladepuffer (200 μL Glycerin, 20 mg Bromphenolblau, H_2O -DEPC ad 1600 μL) gemischt und quantitativ in ein 1,5%iges Ethidiumbromid-Agarosegel (0,75 g Agarose, 50 g 1x TAE, 12 μL Ethidiumbromidlösung (1 mg/mL) von 6 x 10 cm mit 2 mal 15 Slots pipettiert. Die Elektrophorese wurde 30 min bei 80 Volt in 1x TAE durchgeführt.

Die Dokumentation erfolgte mittels Chemi Imager mit CCD-Videosystem und Alpha Ease Imaging Software (ZBB, JLU Gießen). Die digitalen Bilder wurden anschließend mit der Software Gelscan 5.1 (BioSciTec) ausgewertet. Die Ausgabe der optischen Dichte der Spots erfolgte dabei als *Absolute Integrated Density* (AID) vor Subtraktion der mittleren Hintergrund-Intensität. Die Berechnung der genspezifischen mRNA-Expression erfolgte als relative Intensität des Zielgens gegenüber der GAPDH-Intensität. Zur besseren Darstellung der Expressionsunterschiede wurden die Daten auf den niedrigsten Gruppenmittelwert bezogen.

3.5.7 Lipidprofil

3.5.7.1 Plasmalipide

Die Bestimmung der Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen des Plasmas erfolgte mit den Testsätzen Cholesterin CHOD-PAP (Merck) bzw. Triglyceride GPO-PAP (Roche). Ein Volumen von 20 μL Plasma wurde zu 500 μL der Reaktionslösung pipettiert, 10 min bei 37°C inkubiert und die Extinktion von Proben und Standard (SMT Calibrator, Merck) bei 500 nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen. Alle Analysen erfolgten in Doppelbestimmungen. Zur Kontrolle von Präzision und Richtigkeit wurde bei beiden Bestimmungen Qualitrol (Merck) mitgeführt.

3.5.7.2 Lipidprofil der Leber

Lipidextraktion

Zur Bestimmung der Lipid-, Cholesterin- (Chol), Triglycerid- (TG) und Phospholipid- (PL) Gehalte wurde die Gesamtlipidfraktion (GL) der Leber mit Hexan-Isopropanol extrahiert (HARA und RADIN 1978). Dazu wurden 0,5 g Lebergewebe mit 0,15 M NaCl im Verhältnis 1:5 (w/w) unter Stickstoffatmosphäre homogenisiert und das Homogenat mit 5 mL Hexan-Isopropanol (3:2, v/v; inklusive 0,005 % (w/v) BHT) extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurden die Proben zentrifugiert (15 min, 4000 x g). Die lipidhaltige organische Phase wurde abgenommen, das Homogenat mit 5 mL des Hexan-Isopropanol-Gemisches nachextrahiert und die vereinigten Extrakte bei 40°C im Stickstoffstrom eingeeengt. Abschließend wurden die

Lipidextrakte im Vakuumtrockenschrank schonend nachgetrocknet. Der hepatische GL-Gehalt wurde anhand der Rückwaage gravimetrisch ermittelt. Es erfolgten jeweils zwei Extraktionen pro Leber. Die extrahierten Lipide wurden in 3,5 mL Hexan-Isopropanol (3:2, v/v; 0,005 % BHT) aufgenommen, aliquotiert und dicht verschlossen bei -80°C gelagert.

Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidbestimmung

Chol- und TG-Konzentrationen der Leber wurden analog zu Kapitel 3.5.7.1 mit den Testsätzen für Plasma bestimmt. Zur Bestimmung des Cholesteringehalts wurden 100 µL des Lipidextrakts zur Trockne eingengt und in 20 µL Isopropanol aufgenommen. Von dieser hexanfreien aufkonzentrierten Probe wurden 5 µL eingesetzt. Zur Triglyceridbestimmung wurden 50 µL Lipidextrakt zur Trockne eingengt, in 50 µL Isopropanol aufgenommen und davon 5 µL eingesetzt. Es wurden jeweils zwei Parallelen erstellt. Zur Berechnung wurde das Testsatz-Ergebnis auf das Gesamtvolumen des Lipidextrakts (3,5 mL) sowie die Einwaage bezogen und in mg/g Leber angegeben.

Die Bestimmung der PL-Konzentration erfolgte mit der Molybdat-Vanadat-Reaktion. Dabei wird der Phospholipid-Phosphor in den organischen Lipidextrakten nach Oxidation mit Perchlorsäure und Wasserstoffperoxid und anschließender Komplexbildung mit Molybdat und Vanadat bei 405 nm photometrisch bestimmt.

Vom Lipidextrakt wurden 100 µL zur Trockne eingengt, in 200 µL Aqua bidest suspendiert, mit 500 µL Perchlorsäure (70 %ig) und 200 µL Wasserstoffperoxidlösung (30 %ig) versetzt und für 20 min bei 180°C oxidiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden 1 mL Ammoniummonovanadatlösung (0,25 %, w/v) und 1 mL Ammoniumheptamolybdat (5,0 %, w/v) zugegeben und 15 min inkubiert. Die photometrische Messung erfolgte bei 405 nm gegen den Reagenzienleerwert. Der Phospholipidgehalt der Probe wurde anhand einer Kalium-Dihydrogenphosphat-Eichkurve und der Annahme eines mittleren Phosphorgehalts der Phospholipide von 4 % berechnet, auf das Gesamtvolumen des Lipidextrakts sowie die Einwaage bezogen und in mg/g Leber angegeben.

3.5.7.3 Fettsäuremuster der Lipidfraktionen der Leber

Isolation der Lipidfraktionen

Zur Bestimmung der individuellen FS wurden die TG- und die PL-Fraktion aus dem Lipidextrakt durch Festphasenextraktion isoliert. Das Schema des Extraktionsverfahrens ist in Abbildung 6 dargestellt (KALUZNY et al. 1985).

Zur Isolation der gewünschten Lipidfraktionen wurden 500 µL des Hexan-Isopropanol-Lipidextrakts nach Trocknung in Chloroform-Isopropanol (2:1, v/v) aufgenommen und auf ein mit Hexan konditioniertes Aminopropyl-Säulchen (Bond Elut NH₂ 500 mg, Varian) gegeben. Die

neutralen Lipide wurden mit Chloroform-Isopropanol (2:1, LM 1) eluiert, aufgefangen und für die weitere Auftrennung eingetrocknet und in Hexan aufgenommen. Die polareren freien FS wurden mit 2 % Essigsäure in Diethylether (LM 2), und die sehr polaren PL anschließend mit Methanol (LM 3) eluiert. Die neutralen Lipide wurden auf ein zweites mit Hexan konditioniertes NH_2 -Säulchen aufgeben und die Cholesterinester (CE) mit Hexan (LM 4) ausgewaschen. Die TG wurde mithilfe von Hexan mit 1 % Diethylether und 10 % Dichlormethan (LM 5) eluiert.

Die isolierten PL- und TG-Fractionen wurden vollständig zur Trockne eingengt, in 500 μL Isopropanol (mit 0,005 % (w/v) BHT) aufgenommen und portioniert bei -80°C gelagert. Es wurden zwei Extraktionen pro Leber durchgeführt.

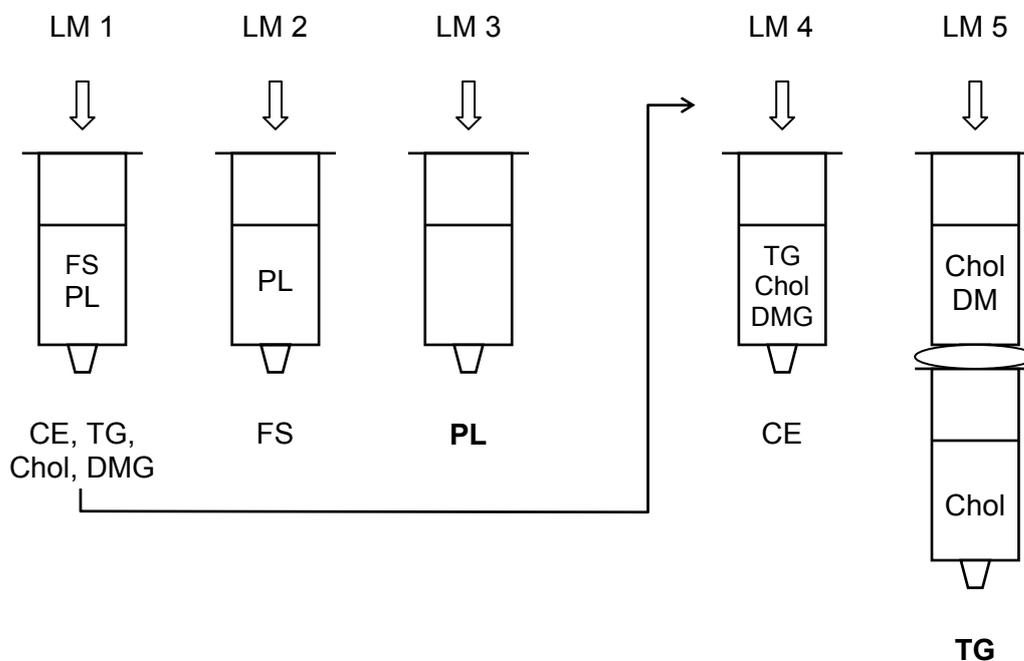


Abbildung 6: Schema der Festphasenextraktion zur Separation individueller Lipidklassen. LM Lösungsmittel, CE Cholesterinester, DMG Di- und Monoglyceride

Bestimmung des Fettsäuremusters

Die gaschromatographische Bestimmung der FS erfolgte nach Derivatisierung der nicht-flüchtigen Leberlipide zu flüchtigen Methylestern mit TMSH (SYHRE et al. 1996). Von dem Gesamtlipidextrakt und den TG- bzw. PL-Eluaten wurden 200 – 400 μL mit 100 μL Interner Standard-Mix (je 2,5 mg/mL C 17:0 (Tri-Heptadecanoid) und C 20:0 (Arachinsäure) in Dichlormethan-Chloroform (2:1, v/v) mit 0,005 % (w/v) BHT) bei 45°C im Stickstoffstrom ein-

geengt. Durch Zugabe von 50 µL Hexan mit 0,005 % (w/v) BHT und 50 µL N-Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) (Macherey & Nagel) wurden die Proben bei Raumtemperatur im Dunkeln methyliert. Die Injektion von jeweils 1 µL erfolgte mittels Autosamplers. Es wurden zwei parallele Methylierungen pro Probe angesetzt.

Zur Identifikation der FS-Methylester (FAMES) anhand ihrer Retentionszeiten wurde der FAME-Mix C4–C24 (18919, Sigma) verwendet. Folgende FS-Methylester waren im Mix nicht enthalten und wurden durch Einzelstandards identifiziert: cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaensäure (C 20:5 n-3), cis-7, 10, 13, 16, 19-Docosapentaensäure (C 22:5 n-3) (beide Supelco); cis-13, 16, 19-Docosatriensäure (C 22:3 n-3) und cis-7, 10, 13, 16-Docosatetraensäure (C 22:4 n-6) (beide Sigma).

Die Analyse der FS-Muster erfolgte mit einem Chrompack 9400-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (FID), *split/splitless*-Injektion mit Glasglockenbodeninlay und Autosampler (Chrompack 910). Als Trennsäule wurde eine Permabond FFAP-DF-Säule mit 0,25 mm Innendurchmesser, 0,25 µm Filmdicke und 50 m Länge (Macherey & Nagel) verwendet. Injektion und Detektion erfolgten bei 260°C. Die übrigen Parameter sind in Übersicht 14 zusammengestellt. Die Änderungen des Temperaturprogramms wurden aufgrund nachlassender Trennleistung der Säule notwendig.

Die Responsefaktoren wurden nach Integration der Peakflächen über das Verhältnis von Peakfläche und Konzentration einer FS im Standard zu Peakfläche und Konzentration des Internen Standards (IS) C 17:0 ermittelt.

Die Berechnung der FS in den Lipidfraktionen erfolgte als relativer Anteil der Responsefaktor-korrigierten Peakfläche an der Summe aller korrigierten Peakflächen nach Abzug des IS, und wurde als Normprozent (Gramm pro 100 Gramm Gesamtfettsäuren) angegeben.

Die Berechnung der FS-Konzentration der GL erfolgte mit der nachstehenden Formel:

$$c_{FS} = \frac{IS \cdot f \cdot A_{FS} \cdot RF}{A_{IS} \cdot EW}$$

c_{FS}	Konzentration der FS in mg/g Leber
IS	Menge des zugesetzten Internen Standards in mg
f	Verdünnungsfaktor
A_{FS}	Peakfläche der FS
RF	Responsefaktor
A_{IS}	Peakfläche des Internen Standards
EW	Einwaage in g

Übersicht 14: GC-Parameter und Temperaturprogramme zur Bestimmung des FS-Musters

Detektion: FID
Brenngase:
H₂ (35 ccm/min)
synthetische Luft (250 ccm/min)
Makeup-Gas N₂ (25 ccm/min)

Autosampler: Chrompack Typ 910

Injektion: Split

Volumen: 1 µL

Inlay: Glasglockenboden

Trägergas: H₂

Gesamtlipid-Extrakte:

Splitflow: 25 ccm/min

Trägergas-Vordruck: 80 kPa

Temperaturprogramm: 200°C, 2°C/min auf 220°C
220°C 45 min

Triglycerid-Eluate:

Splitflow: 20 ccm/min

Trägergas-Vordruck: 60 kPa

Temperaturprogramm: 220°C 23 min
2°C/min auf 230°C
230°C 35 min

Phospholipid-Eluate:

Splitflow: 15 ccm/min

Trägergas-Vordruck: 55 kPa

Temperaturprogramm: 220°C 20 min
4°C/min auf 235°C
235°C 25 min

Die Wiederfindungsrate des FAME-Standard wurde regelmäßig (nach 2 bis 3 Proben) kontrolliert und zur Auswertung wurden jeweils mindestens drei GC-Läufe pro Probe herangezogen. Peaks, die keiner FS zugeordnet werden konnten, wurden nicht in die Auswertung eingeschlossen. Die Bestimmungsgrenze lag in Abhängigkeit von der individuellen FS und dem Lipidgehalt des Extrakts bei 0,05 % bis 0,2 % (w/w) der Gesamtfettsäuren.

Ein Chromatogramm des FAME-Standards zeigt Abbildung 7. Die vollständigen Bezeichnungen der enthaltenen FAMES sind im Anhang angegeben.

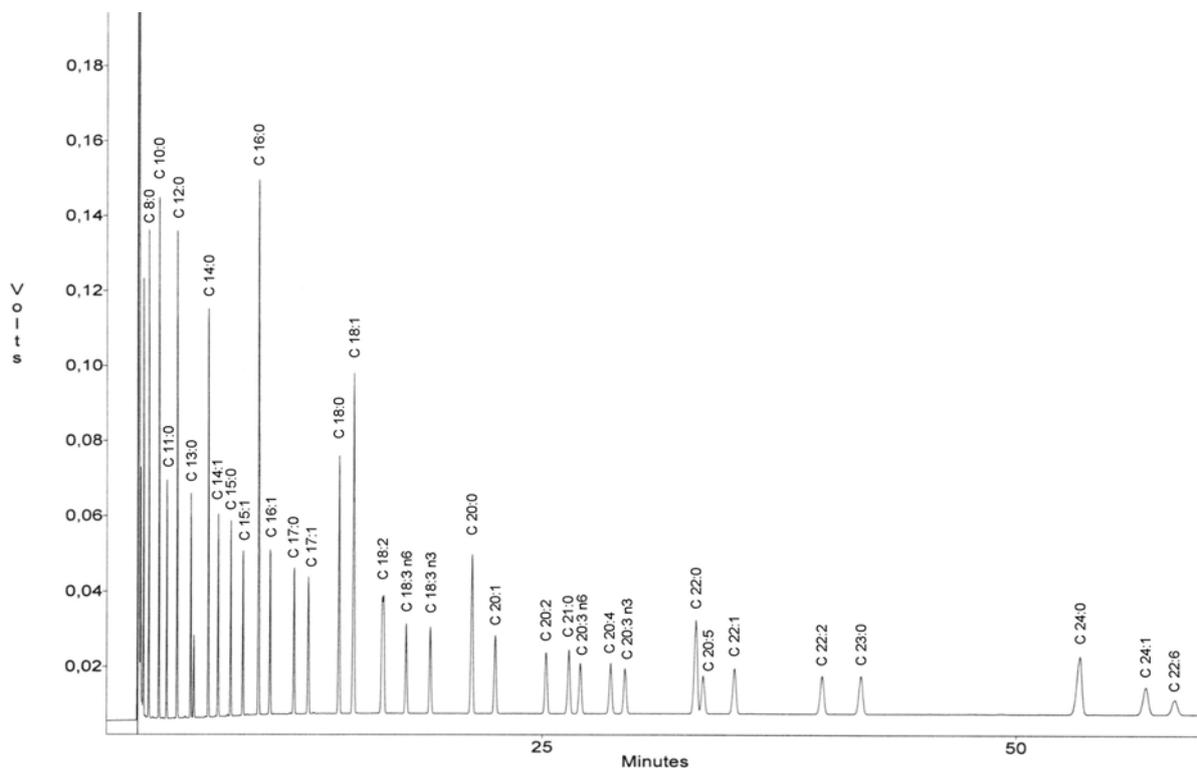


Abbildung 7: GC-Chromatogramm des FAME-Mix C4-C24

3.5.8 Ketonkörper in Plasma und Urin

Die 3-Hydroxybutyrat-(3-HB)-Konzentration in Plasma und Urin wurde mit dem Autokit 3-HB (Wako Chemicals) bestimmt. Das Protokoll der Bestimmung ist im Anhang aufgeführt. Es wurden 8 μ L Plasma bzw. 20 μ L Urin und für die Blindwertbestimmung Aqua bidest eingesetzt. Der 3-HB-Standard (Ketone Body Calibrator 300) wurde dem Probenvolumen entsprechend verdünnt. Die 3-HB-Konzentrationen in Plasma und Urin wurden in Doppelbestimmung bei jeweils fünf Tieren pro Gruppe ermittelt.

3.6 Statistische Auswertung

In den Tabellen angegebene Ergebnisse stellen jeweils den Gruppenmittelwert (M) sowie die Standardabweichung (SD) der Einzelwerte dar.

Die deskriptive Aufbereitung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel 2000. Die statistischen Analysen wurden mithilfe von SPSS 11.5.1 für Windows durchgeführt und beinhalteten die Prüfung auf Varianzhomogenität (Levene-Test $\geq 0,05$), auf Normalverteilung der Residuen (Kolmogorov-Smirnov-Test $\geq 0,05$ und Shapiro-Whilk-Test $\geq 0,01$) und eine einfaktorische Varianzanalyse (*Analysis of Variance*, ANOVA). Der paarweise Vergleich aller Mittelwerte erfolgte mit dem Post Hoc-Test nach Tukey-HSD bzw. bei nicht angenommener Varianzhomogenität nach Games-Howell. Im Fall nicht vorliegender Normalverteilung erfolgte eine logarithmische Transformation der Messwerte. Ergab sich dadurch keine Normalverteilung, wurde der Median-Test mit Signifikanzkorrektur nach SHAFFER (1986) angewandt. Als signifikant gelten Mittelwertsunterschiede mit $p < 0,05$, diese sind in den Ergebnistabellen durch unterschiedliche Hochbuchstaben gekennzeichnet.

Die Daten der Versuchsgruppen I bis IV wurden weiterhin einer zweifaktoriellen Varianzanalyse unterzogen, um Einflüsse der Faktoren Zn (marginale oder bedarfsgerechte Zn-Versorgung) und FS (Kakaobutter oder Distelöl) sowie Interaktionen zwischen diesen Faktoren (Zn*FS) nachzuweisen. Bei Varianzhomogenität und/oder fehlender Normalverteilung der Residuen erfolgte die Auswertung mit SAS 8.2 (*Mixed Procedure*) am Hochschulrechenzentrum der JLU. Statistisch relevante Unterschiede wurden auf dem Niveau $p < 0,05$ = signifikant, $p < 0,01$ = hochsignifikant bzw. $p < 0,001$ = höchstsignifikant differenziert.

4 Ergebnisse

4.1 Versuchsverlauf

Während des 28-tägigen Versuchs traten keine Tierverluste auf. Die Futteraufnahme der Tiere der 7Zn-Gruppen zeigte insbesondere in Versuchsgruppe III individuelle zyklische Schwankungen. In der 4. Versuchswoche nahmen zwei Tiere der *pair fed*-Gruppe II die vorgelegte Futtermenge nicht mehr vollständig auf. Zu Versuchsende war bei zwei Tieren der 7Zn-Gruppe III ein leichter Haarausfall (Alopezie) im Bauchbereich festzustellen.

4.2 Futteraufnahme, Lebendmasseentwicklung, Futterverwertung und Fettverdaulichkeit

Abbildung 8 zeigt den Verlauf der wöchentlichen Futteraufnahme der *ad libitum*-Versuchsgruppen I, III und V. Über den 4-wöchigen Versuchszeitraum betrug die Gesamtfutteraufnahme der Gruppe V (50Zn-UFS) 410,3 g Futter-TM und unterschied sich hochsignifikant ($p < 0,01$) von der 7Zn-GFS-Gruppe I, die mit 364,1 g im Mittel 11 % weniger Futter aufnahm. Das Futteraufnahmeniveau der 7Zn-UFS-Gruppe III lag mit 265,0 g durchschnittlich 35 % niedriger als Gruppe V und war höchstsignifikant ($p < 0,001$) gegenüber den Gruppen I und V reduziert. Den 50Zn-*pair fed*-Gruppen II (GFS) und IV (UFS) wurde die Futtermenge vorgegeben, ihre Futteraufnahme war praktisch identisch mit den Gruppen I bzw. III (Tabelle A 2, Anhang).

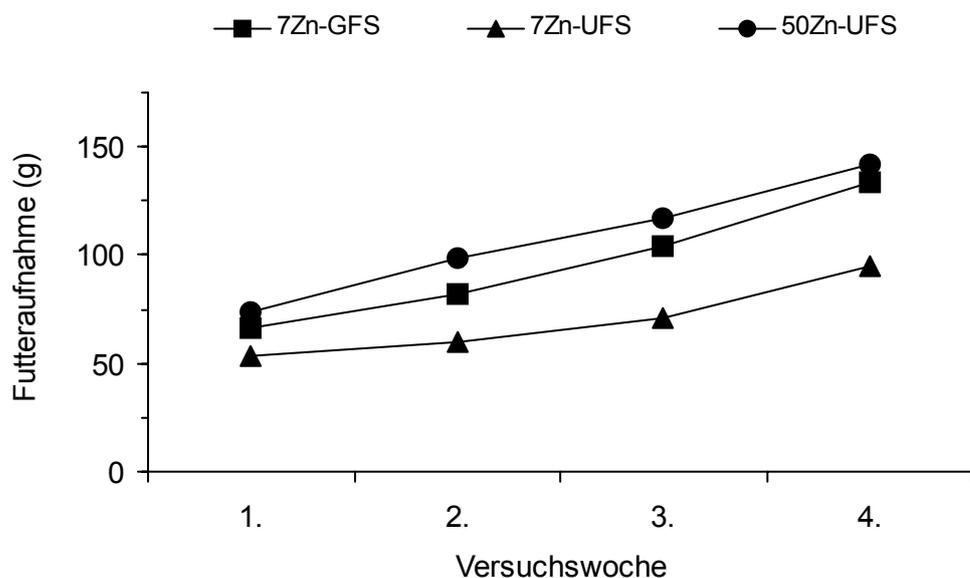


Abbildung 8: Wöchentliche Futteraufnahme der *ad libitum*-Versuchsgruppen

Versuchsgruppen mit unterschiedlicher Futteraufnahme unterschieden sich in ihrer Lebendmassezunahme und den Endgewichten ebenfalls signifikant voneinander (Übersicht 15). Im Vergleich zu Gruppe III ergab sich für die *pair fed*-Gruppe IV eine tendenziell höhere Gewichtszunahme und eine signifikant bessere Futterverwertung als die Gruppen I, II und III. Mittels zweifaktorieller ANOVA wurde unter dem angewandten Fütterungsregime nur für die Futterverwertung ein signifikanter Einfluss von Zn ermittelt, während die Parameter Endgewicht, Lebendmassezunahme und Futterverwertung höchstsignifikant durch das Futterfett beeinflusst wurden.

Übersicht 15: Lebendmasse zu Beginn und am Ende des Versuchs, Gesamtzunahme und durchschnittliche Futterverwertung (g Futter-TM je g Gewichtszunahme)

Gruppe	Beginn (g)	Ende (g)	Zunahme (g)	Futterverwertung (g/g)
I 7Zn-GFS <i>ad libitum</i>	51,0 ± 3,5	205,3 ^b ± 14,8	154,4 ^b ± 14,9	2,42 ^b ± 0,11
II 50Zn-GFS <i>pair fed</i> zu I	51,0 ± 3,4	204,5 ^b ± 11,5	153,6 ^b ± 11,8	2,33 ^b ± 0,10
III 7Zn-UFS <i>ad libitum</i>	50,7 ± 3,7	164,0 ^a ± 18,2	113,3 ^a ± 16,4	2,31 ^b ± 0,12
IV 50Zn-UFS <i>pair fed</i> zu III	50,8 ± 3,9	175,0 ^a ± 9,9	124,3 ^a ± 6,5	2,12 ^a ± 0,08
V 50Zn-UFS <i>ad libitum</i>	50,7 ± 4,2	237,5 ^c ± 13,7	186,8 ^c ± 10,3	2,16 ^a ± 0,04
zweifaktorielle ANOVA (I - IV)				
Zn	ns	ns	ns	<0,01
FS	ns	<0,001	<0,001	<0,001
Zn*FS	ns	ns	ns	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Spalte sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden.

Die scheinbare Verdaulichkeit der Futterfette wurde anhand der im Bilanzzeitraum aufgenommenen und der fäkal ausgeschiedenen Fettmenge berechnet (Tabelle A 4). Für die Kakaobutter ergab sich eine Verdaulichkeit von 79,9 % (Gruppe I) bzw. 81,2 % (Gruppe II). Die Verdaulichkeit des Distelöls lag deutlich höher und unterschied sich mit 98,7 % in Gruppe IV signifikant von Gruppe V mit 98,1 %. In der 7Zn-Gruppe III wurde eine Verdaulichkeit von 98,6 % berechnet. Im zweifaktoriellen Vergleich ließ sich ein höchstsignifikanter Einfluss des Faktors Fett (FS) absichern.

4.3 Zinkstatus und hämatologische Parameter

Zinkstatus

Die marginale Zinkversorgung der Gruppen I und III zeigte sich in signifikant reduzierten Zinkkonzentrationen in Plasma und Femur sowie in einer niedrigeren Gesamtzinkmenge der Leber verglichen mit den 50Zn-Gruppen (Übersicht 16). Gleichzeitig korrespondierten die Parameter Plasma-, Femur- und Gesamtleber-Zn mit der Futteraufnahme und lagen somit in den UFS-Gruppen III und IV signifikant niedriger als in den GFS-Gruppen mit gleicher Zinkversorgung. Mit 276,2 µg war die Gesamtleberzinkmenge in der *ad libitum*-Gruppe V am höchsten und konnte als signifikant gegenüber den 50Zn-*pair fed*-Gruppen abgesichert werden. Die Zink-Konzentration der Leber blieb hingegen unverändert (Tabelle A 5).

Der Zinkmangel der 7Zn-Gruppen führte zu einer signifikanten Aktivitätsreduktion der Alkalischen Phosphatase von 22 % (7Zn-GFS) bzw. 45 % (7Zn-UFS) gegenüber den beiden Zn-versorgten *pair fed*-Gruppen. Noch deutlicher waren die Unterschiede in der Metallothioneinkonzentration der Leber: Mit 28,2 ng/mg Protein und 32,2 ng/mg Protein wiesen die

Übersicht 16: Zinkkonzentrationen des Plasma und des Femurs, Gesamtzinkmenge der Leber, Aktivität der Alkalischen Phosphatase des Plasmas und Metallothioneinkonzentration der Leber

Gruppe	Plasma-Zn (µg/mL)	Femur-Zn (µg/g FM)	Gesamtleber (µg Zn)	Plasma-AP (mU/mL)	Leber-MT [§] (ng/mg)
I 7Zn-GFS	0,97 ^b ± 0,12	51,4 ^b ± 8,6	197,7 ^{bc} ± 15,5	443,4 ^{ab} ± 63,8	28,2 ^a ± 6,2
II 50Zn-GFS	1,41 ^d ± 0,07	137,3 ^d ± 8,5	223,0 ^c ± 17,8	567,9 ^c ± 96,6	84,6 ^b ± 34,9
III 7Zn-UFS	0,63 ^a ± 0,04	39,5 ^a ± 2,2	156,1 ^a ± 22,6	396,1 ^a ± 41,9	32,2 ^a ± 10,5
IV 50Zn-UFS	1,18 ^c ± 0,12	116,9 ^c ± 9,2	183,5 ^{ab} ± 8,9	717,2 ^d ± 101,0	114,1 ^b ± 27,0
V 50Zn-UFS	1,08 ^{bc} ± 0,13	127,4 ^{cd} ± 5,9	276,2 ^d ± 30,8	543,3 ^{bc} ± 65,4	193,8 ^c ± 54,2
zweifaktorielle ANOVA (I - IV)					
Zn	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
FS	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns
Zn*FS	ns	ns	ns	<0,01	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Spalte sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden,[§] Statistik nach Transformation (ln).

7Zn-Gruppen I und III um mehr als den Faktor 3 niedrigere MT-Konzentrationen auf. Die mit 194 ng/mg Protein signifikant höchste MT-Konzentration zeigte sich in der *ad libitum*-Gruppe V.

Der Faktor Zn übte einen höchstsignifikanten Einfluss auf alle gemessenen Zinkstatusparameter aus. Darüber hinaus wurden die Zn-Konzentrationen von Plasma und Femur sowie die Leberzinkmenge statistisch signifikant ($p < 0,001$) durch die alimentären FS beeinflusst. Signifikante Interaktionen zwischen Zn und FS (Zn*FS) ergaben sich nur für die Aktivität der Plasma-AP.

Hämoglobin und Hämatokrit

Die Hämoglobin- und Hämatokrit-Bestimmung im Vollblut ergab eine mittlere Hb-Konzentration von 13,4 g/dL und einen Hk-Wert von 42,9 % (Tabelle A 4, Anhang). Die hämatologischen Parameter zeigten zu Versuchsende keine statistisch signifikanten Gruppenunterschiede und wurden durch die Faktoren Zn und FS nicht beeinflusst.

4.4 Aktivität der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase

Die ECI-Aktivität wurde in mitochondrialen Gewebefractionen von Leber und Niere, Herz- und Skelettmuskulatur sowie Testis und Fettgewebe bestimmt. Zur Eliminierung möglicher präparativ bedingter Differenzen in der Mitochondriendichte der Gewebefractionen erfolgte die Bestimmung der Succinatdehydrogenase (SDH) als mitochondriales Leitenzym und zur zusätzlichen Normierung wurde der Quotient aus ECI- und SDH-Aktivität berechnet.

Leber

Die Aktivität der ECI der Leber betrug in den GFS-Gruppen I und II 2,39 U/mg Protein bzw. 2,79 U/mg Protein und lag im Mittel 68 % niedriger als in den UFS-Gruppen IV (8,16 U/mg Protein) und V (7,93 U/mg Protein). Gleichzeitig resultierte die marginale Zn-Versorgung der UFS-Gruppe III in einer signifikanten Verminderung der ECI-Aktivität auf 5,87 U/mg Protein bzw. um 28 % im Vergleich zur zinkversorgten *pair fed*-Gruppe IV. In der 7Zn-GFS-Gruppe I war die Aktivität der ECI nur um 14 % und somit nicht signifikant gegenüber der Gruppe II reduziert (Übersicht 17).

In der Tendenz zeigte die SDH etwas höhere Aktivitäten in den Lebern der beiden 7Zn-Gruppen. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant und bestätigten somit insgesamt vergleichbare Mitochondriendichten in den einzelnen Leberpräparationen. Das ECI/SDH-Verhältnis ergab folglich ebenfalls 2,5- bzw. 3,2-fach höhere Werte für die UFS-Gruppen. Durch das Zn-Defizit war die ECI-SDH-Relation der 7Zn-GFS-Gruppe I um 21 % und die der 7Zn-UFS-Gruppe III signifikant um 38 % gegenüber den entsprechenden 50Zn-*pair fed*-

Gruppen reduziert. Für die ECI-Aktivität und die ECI-SDH-Relation der Leber wurden in der zweifaktoriellen Varianzanalyse signifikante Einflüsse von Zn ($p < 0,001$), FS ($p < 0,001$) und Zn*FS-Interaktionen ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,001$) abgesichert.

Niere

In der Niere wies die ECI mit 10-12 U/mg Protein (Übersicht 17) die höchste spezifische Aktivität aller untersuchten Gewebe auf. In den beiden *pair fed*-Gruppen wurden geringfügig niedrigere ECI-Aktivitäten ermittelt, Gruppenunterschiede konnten jedoch keine abgesichert werden, obwohl sich aus der zweifaktoriellen ANOVA ein hochsignifikanter Zn-Effekt ergab. Die SDH verhielt sich analog zur ECI und zeigte in den *pair fed*-Gruppen II und IV niedrigere Aktivitäten als in den Gruppen I bzw. III, signifikant unterschieden sich aber nur die Mittelwerte der 50Zn-UFS-Gruppe IV und der 7Zn-GFS-Gruppe. Hinsichtlich der resultierenden ECI-SDH-Relationen ergaben sich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen weder statistisch gesicherte Differenzen noch ein Einfluss der Zinkversorgung oder des Futterfettes.

Übersicht 17: Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase der Leber und der Niere (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U)

Gruppe	Leber			Niere		
	ECI (U/mg) [#]	SDH (U/mg)	ECI/SDH (U/U) [#]	ECI (U/mg)	SDH (U/mg) ^V	ECI/SDH (U/U)
I 7Zn-GFS <i>ad libitum</i>	2,39 ^a ± 0,62	0,154 ± 0,022	15,4 ^a ± 3,1	11,58 ± 1,34	0,430 ^b ± 0,020	27,0 ± 3,5
II 50Zn-GFS <i>pair fed</i> zu I	2,79 ^a ± 0,52	0,145 ± 0,013	19,4 ^a ± 4,0	10,21 ± 1,39	0,410 ^{ab} ± 0,052	25,1 ± 4,0
III 7Zn-UFS <i>ad libitum</i>	5,87 ^b ± 0,77	0,155 ± 0,016	38,0 ^b ± 3,6	12,12 ± 1,49	0,418 ^{ab} ± 0,033	28,9 ± 4,8
IV 50Zn-UFS <i>pair fed</i> zu III	8,16 ^c ± 0,95	0,133 ± 0,013	61,2 ^c ± 4,0	10,47 ± 1,22	0,388 ^a ± 0,023	27,1 ± 3,4
V 50Zn-UFS <i>ad libitum</i>	7,93 ^{bc} ± 2,44	0,132 ± 0,018	60,4 ^{bc} ± 21,3	11,51 ± 1,63	0,404 ^{ab} ± 0,041	28,8 ± 5,4
zweifaktorielle ANOVA (I - IV)						
Zn	<0,001	<0,05	<0,001	<0,01	ns	ns
FS	<0,001	ns	<0,001	ns	ns	ns
Zn*FS	<0,01	ns	<0,001	ns	ns	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Spalte sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden, [#] Mediantest mit Signifikanzkorrektur nach Shaffer, ^V ANOVA mit SAS.

Herz- und Skelettmuskulatur

Die ECI-Aktivität der Herzmuskulatur der 50Zn-UFS-Gruppe IV lag mit 7,14 U/mg Protein signifikant unter der Aktivität der *ad libitum*-Gruppe V (9,88 U/mg Protein) mit gleicher Zink- und FS-Alimentation, unterschied sich jedoch nicht signifikant von den übrigen Versuchsgruppen (Übersicht 18). Ähnlich der Leber ergab die SDH-Bestimmung tendenziell höhere Werte für die marginal Zn-versorgten Tiere und einen statistisch signifikanten Zn-Einfluss mittels zweifaktorieller ANOVA. Die ECI-SDH-Relation der Herzmuskulatur blieb durch die Versuchsparameter Zn und FS unbeeinflusst.

Im Muskel ergaben sich für die Parameter ECI-Aktivität, SDH-Aktivität und ECI-SDH-Relation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Für den Einfluss der FS auf die SDH wurde eine Signifikanz von $p < 0,05$ und somit eine etwas niedrigere Mitochondriendichte in den Muskelpräparationen der UFS-Gruppen III und IV beobachtet. ECI und ECI-SDH-Quotient des Muskels wurden durch die Versuchsparameter Zn und FS nicht beeinflusst (Übersicht 18).

Übersicht 18: Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase der Herz- und der Skelettmuskulatur (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U)

Gruppe	Herz			Muskel		
	ECI (U/mg)	SDH (U/mg) ^{#V}	ECI/SDH (U/U)	ECI (U/mg)	SDH (U/mg)	ECI/SDH (U/U)
I 7Zn-GFS	8,44 ^{ab} ± 1,05	0,707 ± 0,038	12,0 ± 1,8	2,27 ± 0,83	0,475 ± 0,108	4,85 ± 1,65
II 50Zn-GFS	8,88 ^{ab} ± 1,61	0,666 ± 0,037	13,4 ± 2,4	2,28 ± 0,58	0,483 ± 0,095	4,73 ± 0,75
III 7Zn-UFS	8,24 ^{ab} ± 1,67	0,702 ± 0,060	11,9 ± 3,2	1,93 ± 0,78	0,368 ± 0,080	5,16 ± 1,37
IV 50Zn-UFS	7,14 ^a ± 1,39	0,656 ± 0,047	11,0 ± 2,5	2,61 ± 0,62	0,442 ± 0,045	5,96 ± 1,55
V 50Zn-UFS	9,88 ^b ± 2,14	0,681 ± 0,052	14,7 ± 4,0	2,58 ± 0,90	0,472 ± 0,110	5,50 ± 1,60
zweifaktorielle ANOVA (I - IV)						
Zn	ns	<0,05	ns	ns	ns	ns
FS	ns	ns	ns	ns	<0,05	ns
Zn*FS	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Spalte sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden, [#] Mediantest mit Signifikanzkorrektur nach Shaffer, ^V ANOVA mit SAS.

Testis und Fettgewebe

Im Testis betrug die Aktivität der ECI im Mittel 1,47 U/mg Protein sowie die der SDH durchschnittlich 90 mU/mg Protein, womit im Testis die niedrigste spezifische SDH-Aktivität der untersuchten Gewebe nachgewiesen wurde (Übersicht 19). Es ergaben sich weder statistisch gesicherte Differenzen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen noch ein Einfluss der Zinkversorgung oder des Futterfettes.

Im Fettgewebe wurden für die ECI Werte zwischen 0,32 U/mg Protein (Gruppe I) und 0,52 U/mg Protein (Gruppe IV) ermittelt. Signifikante Gruppenunterschiede waren für ECI, SDH und ECI-SDH-Relation auch aufgrund hoher Varianzen innerhalb der Gruppen nicht abzusichern. Der ECI-SDH-Quotient zeigte jedoch einen tendenziellen Anstieg von Gruppe I zu Gruppe IV und mittels zweifaktorieller ANOVA signifikante Effekte ($p < 0,05$) von Zn und FS.

Übersicht 19: Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase des Testis und des Fettgewebes (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U)

Gruppe	Testis			Fettgewebe		
	ECI (U/mg)	SDH (U/mg)	ECI/SDH (U/U)	ECI (U/mg)	SDH (mU/mg)	ECI/SDH (U/U) ^V
I 7Zn-GFS	1,40 ± 0,16	0,093 ± 0,006	15,0 ± 1,8	0,323 ± 0,093	10,41 ± 1,88	32,9 ± 14,3
II 50Zn-GFS	1,54 ± 0,21	0,089 ± 0,009	17,4 ± 2,5	0,383 ± 0,096	9,75 ± 1,58	39,5 ± 7,7
III 7Zn-UFS	1,46 ± 0,17	0,088 ± 0,008	16,7 ± 2,7	0,406 ± 0,104	9,91 ± 1,55	41,7 ± 10,7
IV 50Zn-UFS	1,45 ± 0,13	0,091 ± 0,008	16,0 ± 1,7	0,520 ± 0,250	8,89 ± 2,30	58,9 ± 22,5
V 50Zn-UFS	1,48 ± 0,11	0,089 ± 0,005	16,7 ± 1,4	0,338 ± 0,081	7,65 ± 2,07	47,7 ± 18,0
zweifaktorielle ANOVA (I - IV)						
Zn	ns	ns	ns	ns	ns	<0,05
FS	ns	ns	ns	ns	ns	<0,05
Zn*FS	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Mittelwerte sind nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$), ^V ANOVA mit SAS.

4.5 mRNA-Expression der Δ^3,Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase sowie der PPARs *alpha* und *gamma*

Die mRNA-Expression der drei Zielgene ECI, PPAR α und PPAR γ wurde semiquantitativ anhand der Intensität der Ethidiumbromidfluoreszenz ihrer PCR-Amplifikate bestimmt. Die reverse Transkription der mRNA erfolgte jeweils mithilfe von zwei unterschiedlichen cDNA-Synthese-Kits, in denen zum einen oligo(dT)₁₈-Primer, zum anderen *random hexamer*-Primer verwendet wurden. Dies wurde mit (A) bzw. mit (B) gekennzeichnet (vgl. Kapitel 3.5.6.2).

Die Berechnung der genspezifischen Expression erfolgte nach Normalisierung auf das konstitutiv exprimierte *House Keeping* Gen GAPDH. Zur übersichtlicheren Darstellung der Expressionsunterschiede wurden die Daten auf den niedrigsten Gruppenmittelwert bezogen.

Abbildung 9 zeigt die ECI- und die korrespondierende GAPDH-Expression der Leber. Die ECI-Expression war in allen fünf Versuchsgruppen nahezu identisch. Zwar wies die 7Zn-GFS-Gruppe I eine etwas niedrigere Intensität bzw. relative Expression der ECI als die übrigen Gruppen auf, unterschied sich aber auf dem Niveau $p < 0,05$ nur signifikant von Gruppe V (A) bzw. von Gruppe III (B) (Übersicht 20). Weder die marginale Zn-Versorgung noch der unterschiedliche Desaturierungsgrad der alimentären FS führten zu einer signifikanten Beeinflussung der mRNA-Expression der ECI (zweifaktorielle ANOVA).

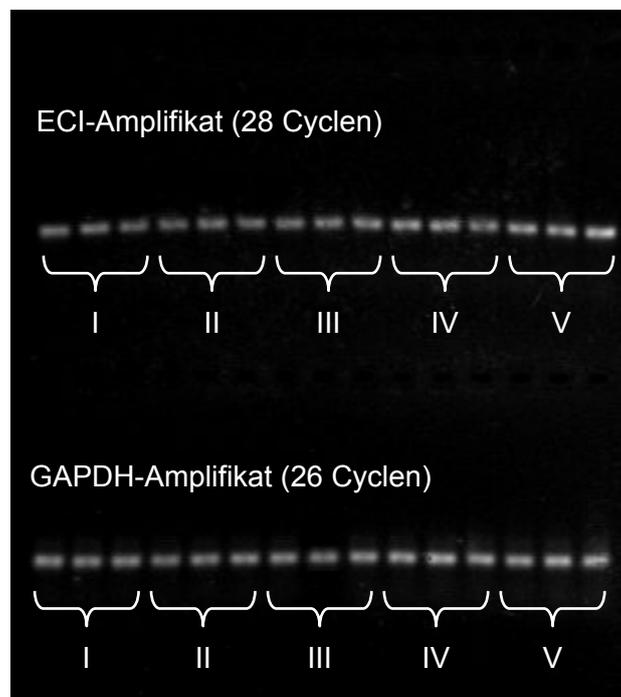


Abbildung 9: Δ^3,Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase-Expression: Ethidiumbromidfluoreszenz der RT-PCR-Amplifikate von ECI und GAPDH (A).

In Abbildung 10 und Abbildung 11 sind Gele der PCR-Amplifikate von *PPAR γ* und *PPAR α* sowie der zugehörigen GAPDH-Amplifikate gezeigt. *PPAR γ* wies in der Leber keine gerichteten Expressionsunterschiede auf. Zwar unterschied sich in (A) die mittlere Expressionshöhe zwischen Gruppe I und Gruppe IV nahezu um den Faktor 1,8 und der Einfluss des Faktor FS verfehlte mit $p=0,052$ das Signifikanzniveau nur knapp, die Unterschiede konnten aber durch die hohe Streuung der Werte nicht als signifikant abgesichert und in der Parallel-Bestimmung (B) auch nicht bestätigt werden (Übersicht 20).

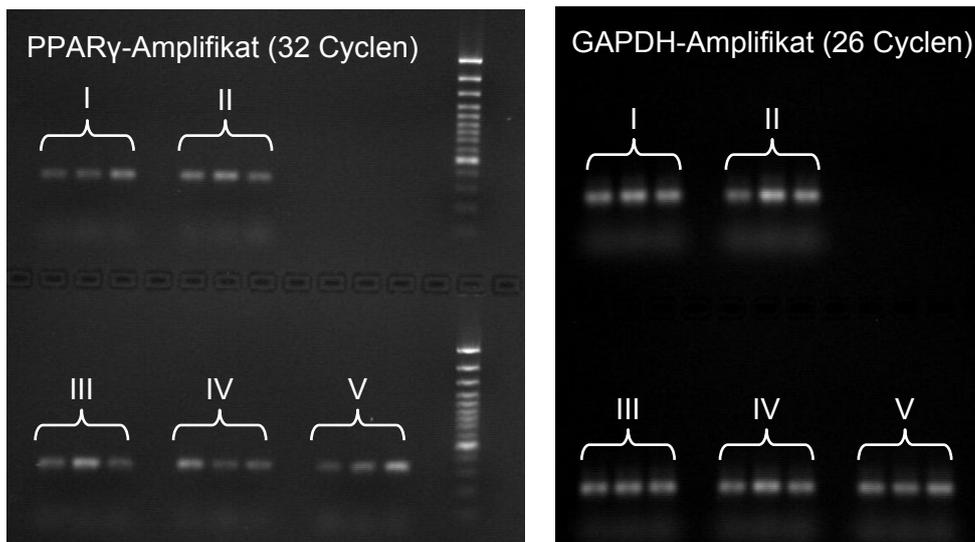


Abbildung 10: *PPAR γ* -Expression: Ethidiumbromidfluoreszenz der RT-PCR-Amplifikate von *PPAR γ* und GAPDH (B)

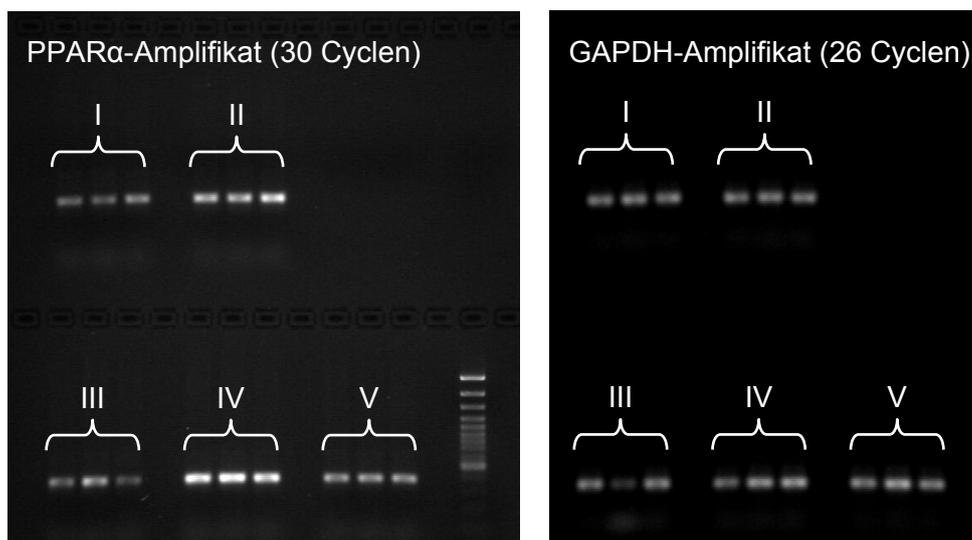


Abbildung 11: *PPAR α* -Expression: Ethidiumbromidfluoreszenz der RT-PCR-Amplifikate von *PPAR α* und GAPDH (A)

Die Expression des PPAR α der Leber wurde sehr deutlich durch das Versuchsdesign beeinflusst. Wie in Abbildung 11 zu sehen, war PPAR α in den beiden *pair fed*-Gruppen II und IV gegenüber den *ad libitum*-Gruppen um mehr als das Zweifache induziert. Mit einer relativen Expression von 2,1 und 2,4 in (A) bzw. in (B) unterschied sich die 50Zn-GFS-Gruppe II nicht ($p=0,056$) bzw. signifikant ($p<0,05$) von der 7Zn-GFS-Gruppe II. Die PPAR α -Expression der 50Zn-UFS-Gruppe IV lag in beiden Analysen signifikant über den UFS-Gruppen III und V.

Laut zweifaktorieller ANOVA übte die Zn-Versorgung einen höchstsignifikanten Einfluss auf die Expression des PPAR α aus (Übersicht 20). Im Vergleich mit der 50Zn-Gruppe V wird jedoch offensichtlich, dass dieser Effekt dem mit der höheren Zn-Versorgung der Gruppen II und IV gekoppelten Fütterungsregime (*pair feeding*) zuzuschreiben ist.

Eine Induktion der PPARs durch ungesättigte alimentäre FS (UFS) wurde nicht beobachtet.

Übersicht 20: Relative mRNA-Expression der Enoyl-CoA-Isomerase und der PPAR γ und PPAR α in der Leber (n = 3, niedrigster Gruppenmittelwert = 1)

Gruppe	ECI A	ECI B	PPAR γ A	PPAR γ B [§]	PPAR α A	PPAR α B
I 7Zn-GFS <i>ad libitum</i>	1,00 ^a ± 0,26	1,00 ^a ± 0,05	1,00 ± 0,28	1,00 ± 0,58	1,00 ^a ± 0,28	1,00 ^a ± 0,27
II 50Zn-GFS <i>pair fed</i> zu I	1,40 ^{ab} ± 0,18	1,22 ^{ab} ± 0,16	1,39 ± 0,43	1,55 ± 0,48	2,13 ^{ab} ± 0,37	2,38 ^{bc} ± 0,35
III 7Zn-UFS <i>ad libitum</i>	1,40 ^{ab} ± 0,11	1,43 ^b ± 0,05	1,60 ± 0,52	1,44 ± 0,84	1,03 ^a ± 0,47	1,45 ^{ab} ± 0,31
IV 50Zn-UFS <i>pair fed</i> zu III	1,40 ^{ab} ± 0,26	1,32 ^{ab} ± 0,31	1,78 ± 0,19	1,25 ± 0,84	2,75 ^b ± 0,67	2,62 ^c ± 0,62
V 50Zn-UFS <i>ad libitum</i>	1,61 ^b ± 0,07	1,59 ^{ab} ± 0,69	1,60 ± 0,20	1,49 ± 0,93	1,27 ^a ± 0,18	1,21 ^a ± 0,36
zweifaktorielle ANOVA (I - IV)						
Zn	ns	ns	ns	ns	<0,001	<0,001
FS	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Zn*FS	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Spalte sind signifikant ($p<0,05$) verschieden, [§] Statistik nach Transformation (ln).

4.6 Plasmalipide

Die Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen des Plasmas sind in Übersicht 21 zusammengestellt. Gruppe III zeigte bei beiden Parametern übereinstimmend die niedrigsten Werte. Mit einem Plasma-Chol von 81,5 mg/dL lag die 7Zn-UFS-Gruppe III signifikant unter den *pair fed*-Gruppen II (104,6 mg/dL) und IV (101,4 mg/dL). Die TG-Konzentration im Plasma von Gruppe V (43,4 mg/dL) war ähnlich niedrig wie in Gruppe III (38,5 mg/dL), beide ließen sich aufgrund der hohen Varianz innerhalb der Gruppen nur von der dreimal höheren TG-Konzentration in Gruppe II signifikant unterscheiden.

Im Vergleich der Gruppen I bis IV wiesen die 7Zn-Gruppen bei der Plasma-Chol und Plasma-TG-Konzentration tendenziell niedrigere Gruppenmittelwerte auf und die zwei GFS-Gruppen lagen auf einem etwas höheren Niveau als die UFS-Gruppen. Mittels ANOVA errechneten sich für beide Plasmalipidparameter signifikante Effekte für Zn und FS.

Übersicht 21: Cholesterinkonzentration und Triglyceridkonzentration des Plasmas

Gruppe	Plasma-Chol (mg/dL) ^V	Plasma-TG (mg/dL) ^{#V}
I 7Zn-GFS	99,1 ^{ab} ± 21,2	92,1 ^{ab} ± 32,5
II 50Zn-GFS	104,6 ^b ± 8,2	141,1 ^b ± 68,4
III 7Zn-UFS	81,5 ^a ± 8,5	38,5 ^a ± 13,5
IV 50Zn-UFS	101,4 ^b ± 8,1	57,8 ^{ab} ± 28,5
V 50Zn-UFS	96,9 ^{ab} ± 16,3	43,4 ^a ± 10,2
zweifaktorielle ANOVA (I - IV)		
Zn	<0,05	<0,001
FS	<0,01	<0,05
Zn*FS	ns	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Spalte sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden, [#] Mediantest mit Signifikanzkorrektur nach Shaffer, ^V ANOVA mit SAS.

4.7 Lipidfraktionen der Leber

Übersicht 22 zeigt den Gesamtfettgehalt und die mittleren Konzentrationen von Cholesterin, Triglyceriden und Phospholipiden in der Leber. Der hepatische GL-Gehalt war in den UFS-Gruppen höher als in den Gruppen mit GFS-Diät. Dieser Einfluss der Nahrungs-FS wurde als höchstsignifikant ($p < 0,001$) abgesichert, statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich aber nur zwischen dem niedrigsten GL-Gehalt in Gruppe I (53,3 mg/g Leber-FM) und Gruppe IV (69,3 mg/g) sowie zu der *ad libitum*-Gruppe V (90,4 mg/g).

Die Chol-Konzentrationen der Tiere mit UFS-Diät (Gruppen III und IV) waren um 84 % höher als die der entsprechenden GFS-Gruppen. Gleichzeitig war bei den *pair fed*-Gruppen II und IV eine leichte Tendenz zu niedrigeren Chol-Werten zu erkennen.

Die UFS-Fütterung resultierte außerdem in insgesamt höheren TG-Konzentrationen. Auffällig waren hier die gegenüber der *ad libitum*-Gruppe V um 44 % bzw. um 33 % reduzierten TG-Konzentrationen der 7Zn-Gruppe III und der 50Zn-*pair fed*-Gruppe IV. Mit 26,4 mg/g unterschied sich die Konzentration der TG der Gruppe III aber nicht mehr signifikant von den übrigen Versuchsgruppen.

Übersicht 22: Gesamtlipidgehalt, Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidkonzentrationen der Leber (mg/g Leber-FM)

Gruppe	Leber-GL (mg/g)	Leber-Chol (mg/g)	Leber-TG (mg/g)	Leber-PL (mg/g)
I 7Zn-GFS <i>ad libitum</i>	53,3 ^a ± 6,0	2,23 ^a ± 0,29	18,0 ^a ± 5,4	33,2 ^{bc} ± 2,0
II 50Zn-GFS <i>pair fed</i> zu I	57,2 ^{ab} ± 9,5	2,02 ^a ± 0,21	18,5 ^a ± 5,9	34,2 ^c ± 2,5
III 7Zn-UFS <i>ad libitum</i>	66,2 ^{ab} ± 13,2	4,11 ^b ± 0,50	26,4 ^{ab} ± 9,5	30,3 ^a ± 2,2
IV 50Zn-UFS <i>pair fed</i> zu III	69,3 ^b ± 6,3	3,72 ^b ± 0,42	31,4 ^b ± 5,4	30,1 ^a ± 1,6
V 50Zn-UFS <i>ad libitum</i>	90,4 ^c ± 9,8	4,08 ^b ± 0,80	46,8 ^b ± 14,0	30,7 ^{ab} ± 1,2
zweifaktorielle ANOVA (I - IV)				
Zn	ns	<0,05	ns	ns
FS	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Zn*FS	ns	ns	ns	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Spalte sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden.

Der PL-Gehalt der Leber wurde ebenfalls durch das Futterfett beeinflusst, die UFS-Fütterung führte aber im Vergleich zur GFS-Fütterung zu niedrigeren PL-Konzentrationen in der Leber der UFS-Tiere. Für alle untersuchten hepatischen Lipidfraktionen bestätigte die zweifaktorielle Varianzanalyse einen höchstsignifikanten Einfluss der alimentären FS.

Die relativen Anteile der verschiedenen Lipidfraktionen an den GL unterschieden sich ebenfalls zwischen GFS- und UFS-Gruppen (Tabelle A 11). Der Chol-Anteil und der TG-Anteil der GL war in den GFS-Gruppen niedriger und der PL-Anteil höher als bei den UFS-Gruppen, die einen insgesamt höheren Fettgehalt der Leber aufwiesen. Die *ad libitum*-Gruppe V wies den höchsten TG-Anteil und den niedrigsten PL-Anteil im Vergleich aller fünf Gruppen auf. Die zweifaktorielle Varianzanalyse bestätigte einen jeweils höchstsignifikanten FS-Einfluss auf alle relativen Anteile der Lipidfraktionen und einen höchstsignifikanten Zn-Einfluss auf den Chol-Anteil der GL.

Das Endgewicht der Versuchstiere wurde höchstsignifikant durch die alimentären FS, und die relative Lebermasse (Lebergewicht/100 g Lebendmasse) (Tabelle A 3) signifikant durch die Zn-Versorgung beeinflusst. In Übersicht 23 sind daher die GL-, Chol-, TG- und PL-

Übersicht 23: Relative Gesamtlipid-, Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidgehalte der Leber (mg/100 g Lebendmasse)

Gruppe	GL (mg)	Chol (mg)	TG (mg)	PL (mg)
I 7Zn-GFS	186 ^a ± 25	7,8 ^a ± 1,0	63 ^a ± 18	116 ^{ab} ± 8
II 50Zn-GFS	212 ^a ± 47	7,4 ^a ± 0,8	69 ^a ± 26	124 ^b ± 14
III 7Zn-UFS	231 ^{ab} ± 45	14,2 ^b ± 1,2	93 ^{ab} ± 33	106 ^a ± 7
IV 50Zn-UFS	259 ^b ± 28	13,8 ^b ± 1,3	117 ^{bc} ± 23	112 ^{ab} ± 6
V 50Zn-UFS	362 ^c ± 63	16,2 ^b ± 2,8	189 ^c ± 67	122 ^b ± 11
zweifaktorielle ANOVA (I - IV)				
Zn	ns	ns	ns	<0,05
FS	<0,01	<0,001	<0,001	<0,01
Zn*FS	ns	ns	ns	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Spalte sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden.

Gehalte der Gesamtleber pro 100 g Lebendmasse dargestellt. Generell sind die Ergebnisse mit den Konzentrationen pro Gramm Leberfrischmasse (Übersicht 22) vergleichbar. Trotz etwas höherer Chol-Gehalte in den Lebern der 7Zn-Gruppen konnte kein Einfluss der Zn-Versorgung auf den relativen Chol-Gehalt abgesichert werden. Die marginale Zn-Versorgung ergab statistisch gesichert niedrigere relative PL-Gehalte, die parallel durch die alimentären FS beeinflusst wurden.

4.8 Fettsäuremuster der Leber-Lipidfraktionen

Die FS der Lipide der Leber wurden in den Gesamtlipiden, in der TG-Fraktion und in der PL-Fraktion bestimmt, welche aus dem GL-Extrakt isoliert wurden. Das FS-Muster wurde in Form der prozentualen Anteile (w/w, siehe Kapitel 3.5.7.3) der einzelnen FS angegeben, wobei nur FS, die anhand der FS-Standards eindeutig identifiziert werden konnten, in die Berechnung eingeschlossen wurden. Aufgrund von Matrixeffekten waren nur FS ab einer Kettenlänge von C 14 (GL) bzw. C 15 (TG und PL) eindeutig quantifizierbar. FS, deren Anteile in allen Versuchsgruppen unterhalb der Bestimmungsgrenze lagen, sind ausschließlich in den Anhangstabellen aufgeführt.

Fettsäuremuster der Gesamtlipide

Zwei repräsentative Chromatogramme der Gesamtlipid-FS von Tieren mit GFS- bzw. UFS-Diät sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 gezeigt. Das FS-Muster der hepatischen GL ist in Übersicht 24 aufgezeigt. Die relativen Anteile aller dargestellten GL-FS wurden signifikant durch die alimentären FS beeinflusst (zweifaktorielle ANOVA). Dabei wiesen die Versuchsgruppen mit GFS-Diät (Gruppe I und II) generell höhere Anteile gesättigter und einfach-ungesättigter FS (C 14:0, C 16:0, C 18:0, C 16:1, C 18:1) in den GL als die UFS-Gruppen auf. Entsprechend waren in den GL der UFS-Gruppen III, IV und V die Anteile der mehrfach-ungesättigten n-6-FS (C 18:2, C 18:3, C 20:2, C 20:3, C 22:4) höher als in den GFS-Gruppen. Diese Unterschiede waren alle statistisch abzusichern.

Der Einfluss der Diät-FS auf den Gehalt an Arachidonsäure (C 20:4 n-6) war weniger deutlich ausgeprägt ($p < 0,05$). Der Anteil von 24,0 % und 23,9 % in den UFS-Gruppen III und IV war von den etwas niedrigeren Mittelwerten der GFS-Gruppen (22,7 % in Gruppe I und 21,5 % in Gruppe II) statistisch nicht abzugrenzen, sie unterschieden sich jedoch signifikant von den 19,2 % Arachidonsäure in der *ad libitum*-UFS-Gruppe V.

Auch die prozentualen Anteile der n-3-FS wurden höchstsignifikant durch die Nahrungs-FS verändert, obwohl die Diäten nahezu identische α -Linolensäure-Gehalte (ALA, C 18:3 n-3)

Übersicht 24: Fettsäuren der Gesamtlipide der Leber (g/100g Gesamtfettsäuren)

	I 7Zn- GFS	II 50Zn- GFS	III 7Zn- UFS	IV 50Zn- UFS	V 50Zn- UFS	ANOVA (I-IV)		
						Zn	FS	Zn*FS
C 14:0 ^{#S}	0,21 ^b ± 0,03	0,22 ^b ± 0,02	0,13 ^a ± 0,02	0,12 ^a ± 0,02	0,13 ^a ± 0,02	ns	<0,001	ns
C 16:0	16,00 ^b ± 1,36	16,93 ^b ± 1,32	9,43 ^a ± 0,64	9,07 ^a ± 0,72	9,69 ^a ± 1,25	ns	<0,001	ns
C 18:0	17,79 ^c ± 1,49	17,12 ^c ± 1,09	9,88 ^b ± 1,56	9,15 ^b ± 0,90	6,96 ^a ± 1,61	ns	<0,001	ns
C 21:0	0,10 ^a ± 0,03	0,10 ^a ± 0,03	0,14 ^{ab} ± 0,02	0,15 ^b ± 0,02	0,13 ^{ab} ± 0,02	ns	<0,001	ns
C 16:1 [§]	0,17 ^{bc} ± 0,04	0,22 ^c ± 0,07	0,08 ^a ± 0,01	0,07 ^a ± 0,02	0,11 ^{ab} ± 0,05	ns	<0,001	<0,05
C 18:1 n-9 [§]	20,26 ^c ± 3,52	22,73 ^c ± 4,18	5,85 ^a ± 0,64	6,46 ^a ± 0,81	8,45 ^b ± 1,32	ns	<0,001	ns
C 20:1 n-9 ^{#V}	0,31 ^{ab} ± 0,06	0,31 ^{ab} ± 0,07	0,24 ^a ± 0,01	0,27 ^b ± 0,01	0,24 ^{ab} ± 0,02	ns	<0,01	ns
C 18:2 n-6 [§]	10,41 ^a ± 1,60	9,87 ^a ± 1,39	38,04 ^{bc} ± 4,74	39,24 ^b ± 2,01	43,70 ^c ± 3,27	ns	<0,001	ns
C 18:3 n-6 [§]	0,26 ^a ± 0,06	0,25 ^a ± 0,06	1,24 ^b ± 0,29	1,43 ^b ± 0,21	1,26 ^b ± 0,24	ns	<0,001	ns
C 20:2 n-6 [§]	0,20 ^a ± 0,04	0,19 ^a ± 0,02	1,19 ^b ± 0,15	1,39 ^b ± 0,20	1,18 ^b ± 0,13	ns	<0,001	ns
C 20:3 n-6 [§]	0,42 ^a ± 0,11	0,42 ^a ± 0,06	1,15 ^b ± 0,22	1,57 ^c ± 0,21	1,47 ^{bc} ± 0,34	<0,05	<0,001	<0,05
C 20:4 n-6	22,71 ^{ab} ± 2,61	21,47 ^{ab} ± 2,20	24,00 ^b ± 2,86	23,91 ^b ± 2,12	19,22 ^a ± 2,43	ns	<0,05	ns
C 22:4 n-6 [§]	0,62 ^a ± 0,09	0,65 ^a ± 0,10	3,01 ^b ± 0,38	2,69 ^b ± 0,44	2,84 ^b ± 0,73	ns	<0,001	ns
C 18:3 n-3	0,21 ^a ± 0,04	0,22 ^a ± 0,04	0,27 ^{ab} ± 0,05	0,27 ^{ab} ± 0,03	0,32 ^b ± 0,04	ns	<0,001	ns
C 20:5 n-3 [§]	0,10 ^b ± 0,04	0,10 ^b ± 0,04	0,05 ^a ± 0,01	0,06 ^{ab} ± 0,01	0,05 ^a ± 0,02	ns	<0,001	ns
C 22:5 n-3	0,59 ^b ± 0,15	0,63 ^b ± 0,19	0,45 ^{ab} ± 0,08	0,38 ^a ± 0,05	0,32 ^a ± 0,08	ns	<0,001	ns
C 22:6 n-3	9,36 ^b ± 1,01	8,34 ^b ± 0,99	4,07 ^a ± 0,84	3,49 ^a ± 0,29	3,72 ^a ± 0,83	<0,05	<0,001	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Zeile sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden, [#] Mediantest mit Signifikanzkorrektur nach Shaffer, ^V ANOVA mit SAS, [§] Statistik nach Transformation (ln).

aufwiesen (vgl. Kapitel 3.3 Übersicht 10). Zwar unterschieden sich im einfaktoriellen Vergleich die C 18:3 n-3-Anteile der GFS-Gruppen I und II (0,21 % und 0,22 %) nicht von den 0,27 % C 18:3 n-3 in Gruppe III und IV, die Anteile der ALA-Metabolite Eicosapentaensäure (EPA, C 20:5 n-3), Docosapentaensäure (C 22:5 n-3) und Docosahexaensäure (DHA, C 22:6 n-3) der UFS-Gruppen waren jedoch gegenüber den GFS-Gruppen vermindert. Am deutlichsten wurde der DHA-Gehalt beeinflusst, hier ergab sich durch die UFS-Fütterung ein Unterschied von Faktor 2,4 bzw. um 57 % niedrigere DHA-Gehalte in den UFS-Gruppen.

Für die DHA (C 22:6 n-3) wie auch für den Anteil an C 20:3 n-6 ergab sich in der zweifaktoriellen ANOVA ein signifikanter Einfluss der Zinkversorgung. Zn*FS-Interaktionen wurden nur für C 20:3 und C 16:1 ermittelt.

Das FS-Muster der 50Zn-UFS-Gruppe V, die sich durch das Fütterungsregime von Gruppe IV (*pair fed*) unterschied, wies signifikante Unterschiede in den Prozentanteilen von Stearinsäure (C 18:0), Ölsäure (C 18:1), Linolsäure (C 18:2 n-6) und Arachidonsäure (C 20:4 n-6) auf: C 18:1 und C 18:2 n-6 (mit 8,45 % und 43,70 %) waren wesentlich höher, C 18:0 und C 20:4 n-6 (6,96 % und 19,22 %) waren wesentlich niedriger als in Gruppe IV oder III.

Aus Übersicht 25 sind die absoluten Gehalte der einzelnen GL-FS in Milligramm FS pro Gramm Leber-FM zu entnehmen. FS, deren Konzentration unter 0,1 mg/g lag, sind nur im Anhang aufgeführt.

Die absoluten Gehalte von C 14:0, C 20:1 n-9, C 20:5 n-3 und C 22:5 n-3 wurden durch die alimentären FS nicht signifikant beeinflusst. Die Konzentrationen der übrigen GL-FS ergaben ein ähnliches Bild wie schon die prozentualen FS-Anteile: Die Versuchsgruppen mit GFS-Diät hatten signifikant höhere Konzentrationen gesättigter und einfach-ungesättigter FS (C 16:0, C 18:0, C 16:1, C 18:1) sowie höhere C 22:6 n-3-Konzentrationen als die UFS-Gruppen, und in den UFS-Gruppen waren die Gehalte der mehrfach-ungesättigten n-6-FS (C 18:2, C 18:3, C 20:2, C 20:3 und C 22:4) signifikant höher als in den GFS-Gruppen.

Bei einigen FS änderte sich die Differenz zwischen den Versuchsgruppen, so dass sich die C 16:0- und C 18:0-Gehalte der GFS-Gruppen I und II nicht mehr signifikant von den UFS-Gruppen IV und V unterschieden. Die Unterschiede der C 20:4 n-6- und C 18:3 n-3-Gehalte zwischen den Gruppen I / II und IV / V konnten hingegen statistisch abgesichert werden.

In Gruppe III (7Zn-UFS) wurden allgemein niedrigere FS-Konzentrationen als in den UFS-Gruppen IV und V nachgewiesen. Statistisch konnte dies zwischen Gruppe III und IV für die n-6-FS C 20:2 und C 20:3 abgesichert werden. Die Konzentrationsunterschiede zwischen Gruppe III und der *ad libitum*-Gruppe V waren deutlich höher und somit bei fast allen FS außer bei C 18:0, C 18:2 n-6 und C 22:4 n-6 signifikant.

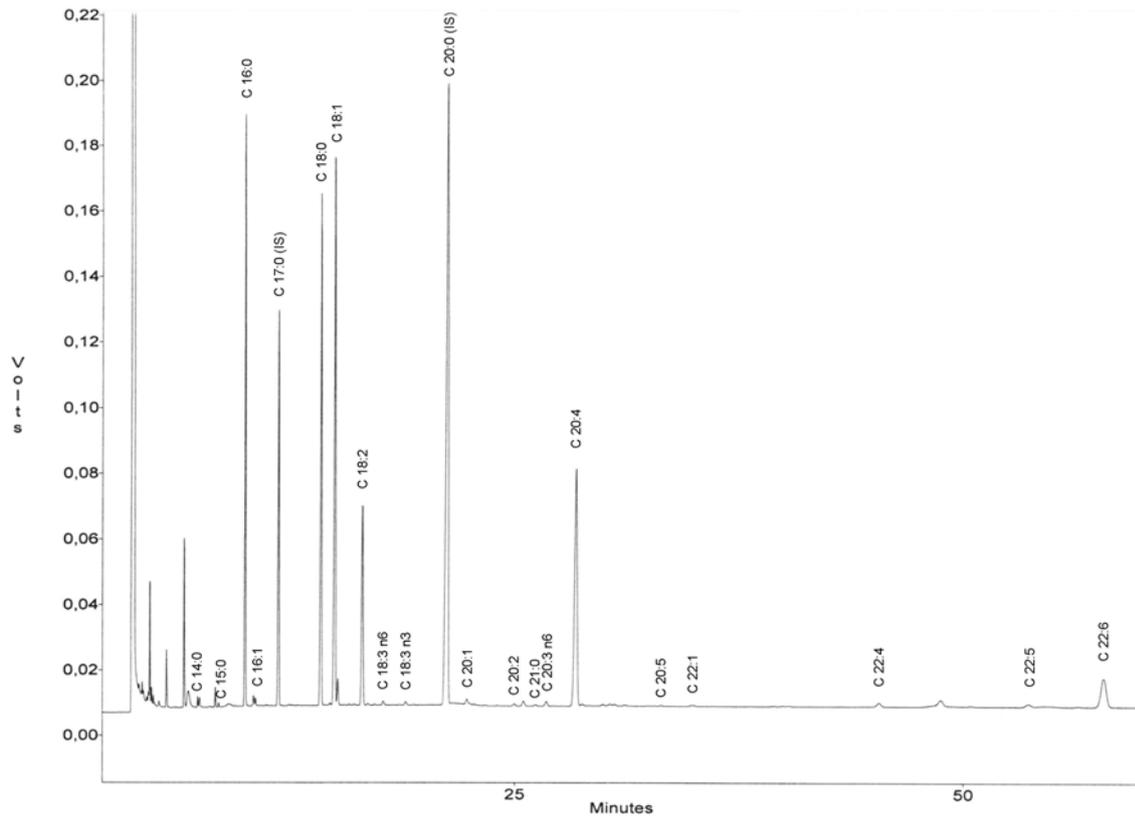


Abbildung 12: GC-Chromatogramm der GL-FS von Versuchstier 13 (50Zn-GFS)

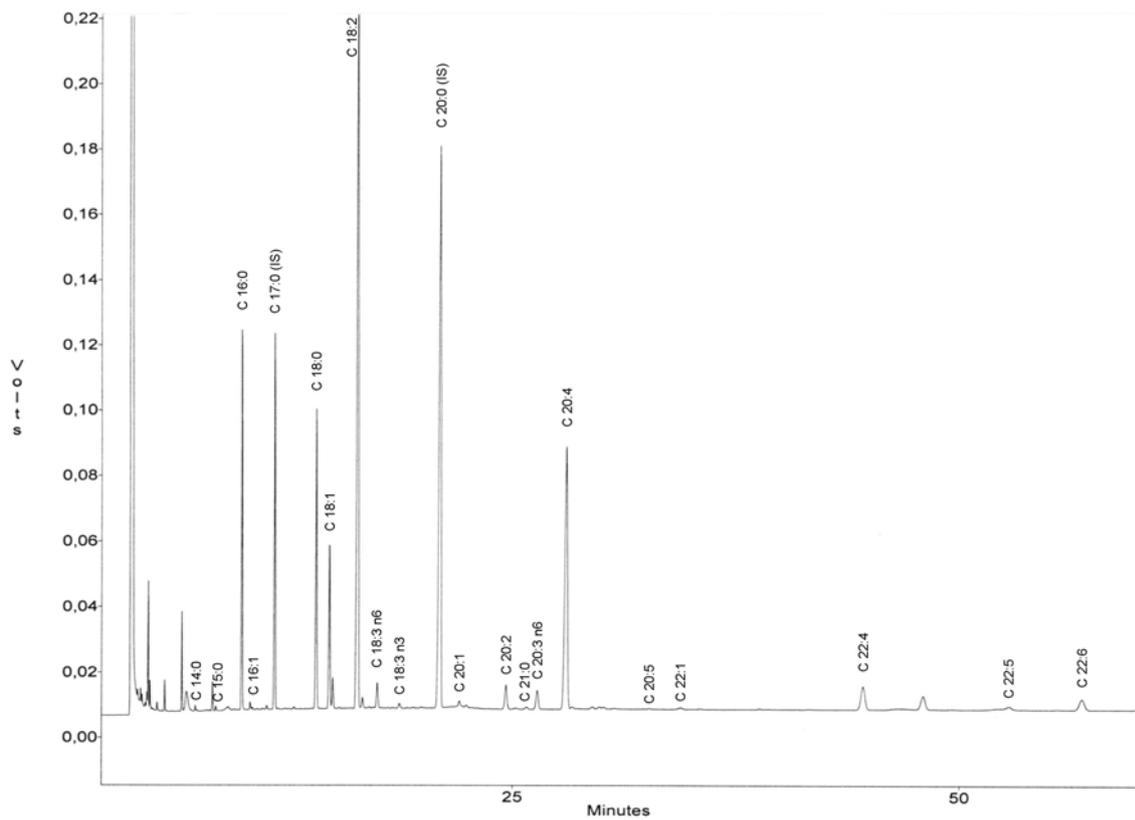


Abbildung 13: GC-Chromatogramm der GL-FS von Versuchstier 26 (50Zn-UFS)

Übersicht 25: Fettsäuren der Gesamtlipide der Leber (mg/g Leber-FM)

	I	II	III	IV	V	ANOVA (I-IV)		
	7Zn- GFS	50Zn- GFS	7Zn- UFS	50Zn- UFS	50Zn- UFS	Zn	FS	Zn*FS
C 14:0	0,10 ^{ab} ± 0,03	0,10 ^{ab} ± 0,01	0,08 ^a ± 0,03	0,09 ^a ± 0,03	0,14 ^b ± 0,04	ns	ns	ns
C 16:0	7,53 ^{ab} ± 1,74	7,96 ^{ab} ± 1,32	5,35 ^a ± 1,37	6,83 ^a ± 1,70	9,89 ^b ± 2,36	ns	<0,01	ns
C 18:0	8,24 ^b ± 1,03	8,27 ^b ± 1,08	5,69 ^a ± 0,70	6,83 ^{ab} ± 1,43	6,80 ^{ab} ± 0,46	ns	<0,001	ns
C 21:0 [§]	0,05 ^a ± 0,03	0,05 ^a ± 0,01	0,08 ^{ab} ± 0,03	0,11 ^{bc} ± 0,04	0,14 ^c ± 0,05	ns	<0,001	ns
C 16:1	0,08 ^b ± 0,02	0,10 ^b ± 0,03	0,05 ^a ± 0,01	0,05 ^{ab} ± 0,03	0,12 ^b ± 0,06	ns	<0,001	ns
C 18:1 n-9	9,59 ^b ± 2,81	10,43 ^b ± 2,12	3,40 ^a ± 1,17	4,89 ^a ± 1,41	8,82 ^b ± 2,82	ns	<0,001	ns
C 20:1 n-9 [§]	0,15 ^a ± 0,05	0,16 ^a ± 0,05	0,14 ^a ± 0,04	0,20 ^{ab} ± 0,05	0,25 ^b ± 0,07	<0,05	ns	ns
C 18:2 n-6 ^{#V}	4,93 ^a ± 1,49	4,94 ^a ± 0,73	22,31 ^b ± 8,36	29,76 ^b ± 8,32	45,81 ^b ± 14,98	ns	<0,001	ns
C 18:3 n-6 [§]	0,12 ^a ± 0,04	0,12 ^a ± 0,03	0,72 ^b ± 0,27	1,07 ^{bc} ± 0,26	1,36 ^c ± 0,61	ns	<0,001	ns
C 20:2 n-6 [§]	0,09 ^a ± 0,03	0,10 ^a ± 0,02	0,69 ^b ± 0,23	1,04 ^c ± 0,30	1,22 ^c ± 0,35	<0,05	<0,001	ns
C 20:3 n-6 [§]	0,20 ^a ± 0,08	0,21 ^a ± 0,04	0,67 ^b ± 0,24	1,17 ^c ± 0,27	1,58 ^c ± 0,77	<0,01	<0,001	<0,05
C 20:4 n-6	10,50 ^a ± 1,30	10,81 ^a ± 1,73	13,38 ^{ab} ± 2,45	16,69 ^{bc} ± 2,56	19,54 ^c ± 4,57	<0,05	<0,001	ns
C 22:4 n-6 [§]	0,29 ^a ± 0,07	0,33 ^a ± 0,06	1,74 ^b ± 0,60	2,02 ^b ± 0,55	2,67 ^b ± 1,08	ns	<0,001	ns
C 18:3 n-3 ^V	0,11 ^a ± 0,05	0,11 ^a ± 0,01	0,16 ^{ab} ± 0,07	0,21 ^{bc} ± 0,07	0,34 ^c ± 0,12	ns	<0,01	ns
C 20:5 n-3 [§]	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,02	ns	ns	ns
C 22:5 n-3	0,27 ± 0,09	0,31 ± 0,06	0,25 ± 0,05	0,28 ± 0,09	0,32 ± 0,10	ns	ns	ns
C 22:6 n-3	4,31 ^b ± 0,33	4,21 ^b ± 0,81	2,24 ^a ± 0,37	2,63 ^a ± 0,69	3,66 ^b ± 0,47	ns	<0,001	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Zeile sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden, [#] Mediantest mit Signifikanzkorrektur nach Shaffer, ^V ANOVA mit SAS, [§] Statistik nach Transformation (ln).

Ein Effekt des Faktors Zn wurde hinsichtlich der GL-Konzentrationen von C 20:1 n-9, C 20:2 n-6, C 20:4 n-6 (jeweils $p < 0,05$) und C 20:3 n-6 ($p < 0,01$) sowie Zn*FS-Interaktionen ($p < 0,05$) für C 20:3 n-6 berechnet.

Fettsäuremuster der hepatischen Triglyceride

Die prozentualen Anteile der FS der hepatischen TG sind in Übersicht 26 zusammengestellt. Für alle TG-FS wurde mittels zweifaktorieller ANOVA ein signifikanter Einfluss der Nahrungs-FS bestätigt ($p < 0,001$), nur für C 18:3 n-3 wurde mit $p < 0,05$ ein schwächerer Effekt ermittelt. Der Einfluss der alimentären FS resultierte in signifikant höheren Anteilen an gesättigten und einfach-ungesättigten FS (C 16:0, C 18:0, C 16:1, C 18:1 und C 20:1) bei beiden GFS-Gruppen und signifikant höheren Anteilen an mehrfach-ungesättigten n-6-FS (C 18:2, C 18:3, C 20:2, C 20:3, C 20:4 und C 22:4) bei den UFS-Gruppen. In der zweifaktoriellen Varianzanalyse wurden Zn-Effekte für die FS C 16:0, C 18:0, C 18:1 und C 22:6 n-3 sowie Zn*FS-Interaktionen im Fall von C 16:0, C 16:1 und C 22:5 n-3 abgesichert. Im einfaktoriellen Vergleich konnten signifikante Unterschiede zwischen Versuchsgruppen mit gleichem Futterfett nur für den Anteil von C 16:0 (Gruppe I vs. II) bestätigt werden.

Verglichen mit den FS-Anteilen in der GL-Fraktion hatten Palmitinsäure (C 16:0), Ölsäure und Linolsäure in den TG deutlich höhere sowie die Stearinsäure, Arachidonsäure und DHA um ein Vielfaches niedrigere Anteile an den Gesamt-FS der TG.

Fettsäuremuster der hepatischen Phospholipide

In Übersicht 27 sind die prozentualen Anteile der FS der hepatischen PL zusammengestellt. Aufgrund von überlagernden Matrixeffekten konnte die Peakfläche von C 18:3 n-6 (γ -Linolensäure) nicht quantifiziert werden, sie ist somit nicht in den Gesamt-FS enthalten.

Die gesättigten und einfach-ungesättigten C 18-FS kamen auch in der PL-Fraktion der GFS-Gruppen in höheren Anteilen und die mehrfach-ungesättigten n-6-FS C 18:2, C 20:2 und C 20:4 in geringeren Anteilen als in den UFS-Gruppen vor, die Unterschiede zwischen GFS- und UFS-Gruppen waren aber weniger gravierend. C 16:0, C 16:1, C 22:1 und C 20:3 n-6 wurden durch die alimentären FS nicht beeinflusst und wiesen in allen fünf Versuchsgruppen praktisch vergleichbare Gehalte auf. Die zweifaktorielle Varianzanalyse ergab außerdem statistisch gesicherte Zn-Effekte und Zn*FS-Interaktionen für die FS C 20:1 und C 20:2 n-6, deren Anteile in der 50Zn-UFS-Gruppe IV mit 0,36 % bzw. 1,95 % signifikant über denen der übrigen UFS- oder GFS-Gruppen lagen. Die Zinkversorgung konnte zudem als signifikanter Einflussfaktor auf die PL-Anteile von C 16:0 ($p < 0,01$), C 20:3 n-6 ($p < 0,001$) und C 20:4 n-6 ($p < 0,05$) ermittelt werden.

Mit 13,6 % und 13,3 % DHA in den PL der GFS-Gruppen I und II waren auch die n-3-FS signifikant gegenüber den UFS-Gruppen III (7,9 %), IV (7,2 %) und V (9,6 %) erhöht.

Übersicht 26: Fettsäuren der hepatischen Triglyceridfraktion (g/100g Gesamtfettsäuren)

	I	II	III	IV	V	ANOVA (I-IV)		
	7Zn- GFS	50Zn- GFS	7Zn- UFS	50Zn- UFS	50Zn- UFS	Zn	FS	Zn*FS
C 16:0 [§]	22,77 ^b ± 0,54	26,05 ^c ± 1,57	8,82 ^a ± 0,47	9,26 ^a ± 0,44	9,18 ^a ± 1,13	<0,001	<0,001	<0,05
C 18:0 [§]	9,67 ^b ± 1,11	8,64 ^b ± 0,98	2,51 ^a ± 0,25	2,36 ^a ± 0,21	2,43 ^a ± 0,25	<0,05	<0,001	ns
C 16:1 [§]	0,34 ^b ± 0,08	0,43 ^b ± 0,09	0,08 ^a ± 0,02	0,07 ^a ± 0,03	0,14 ^b ± 0,05	ns	<0,001	<0,05
C 18:1 n-9 [§]	44,55 ^c ± 2,18	45,62 ^c ± 2,22	8,73 ^a ± 0,66	9,76 ^{ab} ± 0,84	10,71 ^b ± 1,48	<0,05	<0,001	ns
C 20:1 n-9 ^V	1,11 ^b 0,26	0,86 ^b 0,20	0,42 ^a 0,16	0,44 ^a 0,06	0,42 ^a 0,07	ns	<0,001	ns
C 22:1 n-9 ^{#V}	n.n. ^a	n.n. ^a	0,38 ^b 0,13	0,27 ^b 0,07	0,30 ^b 0,11	ns	<0,001	ns
C 18:2 n-6	14,26 ^a ± 2,06	13,09 ^a ± 2,70	55,70 ^b ± 2,55	55,69 ^b ± 1,79	56,42 ^b ± 1,45	ns	<0,001	ns
C 18:3 n-6 [§]	0,42 ^a ± 0,11	0,36 ^a ± 0,13	1,76 ^b ± 0,48	1,97 ^b ± 0,34	1,47 ^b ± 0,19	ns	<0,001	ns
C 20:2 n-6 ^{#V}	n.n. ^a	n.n. ^a	1,05 ^b ± 0,17	1,02 ^b ± 0,20	1,06 ^b ± 0,15	ns	<0,001	ns
C 20:3 n-6 ^{#V}	n.n. ^a	n.n. ^a	1,77 ^b ± 0,32	2,12 ^b ± 0,36	1,81 ^b ± 0,40	ns	<0,001	ns
C 20:4 n-6	3,21 ^a ± 0,57	2,54 ^a ± 0,82	11,52 ^b ± 1,09	10,99 ^b ± 1,30	11,75 ^b ± 1,74	ns	<0,001	ns
C 22:4 n-6	0,78 ^a ± 0,24	0,82 ^a ± 0,28	5,20 ^c ± 0,48	4,54 ^{bc} ± 0,79	3,42 ^b ± 0,78	ns	<0,001	ns
C 18:3 n-3 [§]	0,49 ± 0,11	0,48 ± 0,14	0,40 ± 0,05	0,39 ± 0,03	0,44 ± 0,06	ns	<0,05	ns
C 22:5 n-3 [§]	1,42 ^c ± 0,33	1,80 ^c ± 0,27	0,74 ^b ± 0,08	0,66 ^b ± 0,11	0,38 ^a ± 0,06	ns	<0,001	<0,01
C 22:6 n-3 [§]	0,84 ^c ± 0,17	0,63 ^{ac} ± 0,17	0,48 ^{ab} ± 0,07	0,45 ^a ± 0,05	0,62 ^{bc} ± 0,12	<0,05	<0,001	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Zeile sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden, [#] Mediantest mit Signifikanzkorrektur nach Shaffer, ^V ANOVA mit SAS, [§] Statistik nach Transformation (ln), n.n. nicht nachweisbar. Die Gehalte der FS C 21:0 und C 20:5 n-3 lagen jeweils unterhalb der Nachweisgrenze.

Übersicht 27: Fettsäuren der hepatischen Phospholipidfraktion (g/100g Gesamtfettsäuren)

	I	II	III	IV	V	ANOVA (I-IV)		
	7Zn- GFS	50Zn- GFS	7Zn- UFS	50Zn- UFS	50Zn- UFS	Zn	FS	Zn*FS
C 16:0	13,71 ^{abc} ± 0,47	13,05 ^a ± 1,04	14,05 ^{bc} ± 0,47	13,10 ^{ab} ± 0,70	14,35 ^c ± 0,61	<0,01	ns	ns
C 18:0	26,75 ^b ± 0,93	27,45 ^b ± 0,87	23,68 ^a ± 1,32	23,07 ^a ± 1,71	24,71 ^a ± 1,10	ns	<0,001	ns
C 16:1	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	ns	ns	ns
C 18:1 n-9	3,82 ^b ± 0,42	3,58 ^b ± 0,35	1,86 ^a ± 0,29	2,09 ^a ± 0,22	1,70 ^a ± 0,20	ns	<0,001	ns
C 20:1 n-9	0,16 ^a ± 0,02	0,16 ^a ± 0,03	0,28 ^b ± 0,05	0,36 ^c ± 0,04	0,26 ^b ± 0,05	<0,05	<0,001	<0,05
C 22:1 n-9	0,23 ± 0,07	0,24 ± 0,10	0,31 ± 0,15	0,18 ± 0,11	0,20 ± 0,11	ns	ns	ns
C 18:2 n-6	4,58 ^a ± 1,14	4,27 ^a ± 1,07	10,32 ^c ± 0,99	10,15 ^c ± 0,79	7,14 ^b ± 0,86	ns	<0,001	ns
C 20:2 n-6 ^{#V}	0,06 ^a ± 0,03	0,06 ^a ± 0,02	1,33 ^b ± 0,28	1,95 ^c ± 0,37	1,32 ^b ± 0,34	<0,01	<0,001	<0,01
C 20:3 n-6 ^{\$}	0,34 ^a ± 0,09	0,44 ^{ab} ± 0,08	0,34 ^a ± 0,05	0,54 ^b ± 0,10	0,34 ^a ± 0,07	<0,001	ns	ns
C 20:4 n-6	35,17 ^a ± 0,70	35,97 ^{ab} ± 1,09	37,26 ^{bc} ± 1,48	38,88 ^c ± 1,63	38,22 ^c ± 0,90	<0,05	<0,001	ns
C 22:4 n-6 ^{\$}	0,57 ^a ± 0,10	0,56 ^a ± 0,07	1,84 ^b ± 0,28	1,74 ^b ± 0,17	1,55 ^b ± 0,17	ns	<0,001	ns
C 22:5 n-3	0,85 ^b ± 0,13	0,82 ^b ± 0,22	0,74 ^b ± 0,15	0,68 ^{ab} ± 0,10	0,52 ^a ± 0,15	ns	<0,05	ns
C 22:6 n-3 ^{\$}	13,56 ^c 2,09	13,30 ^c 1,55	7,92 ^a 0,53	7,22 ^a 0,58	9,62 ^b 0,79	ns	<0,001	ns

Mittelwerte mit unterschiedlicher Buchstabenkennzeichnung innerhalb einer Zeile sind signifikant ($p < 0,05$) verschieden, [#] Mediantest mit Signifikanzkorrektur nach Shaffer, ^V ANOVA mit SAS, ^{\$} Statistik nach Transformation (ln). Die Gehalte der FS C 21:0, C 18:3 n-3 und C 20:5 n-3 lagen jeweils unterhalb der Nachweisgrenze, C 18:3 n-6 konnte aufgrund von Matrixeffekten nicht quantifiziert werden.

4.9 Ketonkörper

Die 3-Hydroxybutyrat-Bestimmung im Plasma der *pair fed*-Gruppen ergab Konzentrationen von 588 $\mu\text{mol/L}$ (50Zn-GFS) bzw. 694 $\mu\text{mol/L}$ (50Zn-UFS) und somit signifikant niedrigere Gehalte als im Plasma der *ad libitum*-versorgten Gruppen I (1182 $\mu\text{mol/L}$), III (1418 $\mu\text{mol/L}$) und V (1633 $\mu\text{mol/L}$) (Tabelle A 23). Der zweifaktorielle Vergleich der Gruppen I bis IV ergab einen höchstsignifikanten Einfluss der Zn-Versorgung auf die 3-HB-Konzentration des Plasmas. Im Vergleich mit der 50Zn-Gruppe V wird jedoch offensichtlich, dass dieser Effekt dem Fütterungsregime (*pair feeding*) zuzuschreiben ist. Die 3-HB-Ausscheidung im Urin lag durchschnittlich bei 134 nmol/d (Woche 3 und 4) und wurde von den Versuchsparametern nicht beeinflusst.

5 Diskussion

5.1 Anmerkung zum Tiermodell

Ein alimentärer Zinkmangel führt bei Ratten zu einer Reduktion der Futtermittelaufnahme und zur Manifestation eines zyklischen Futtermittelaufnahmeverhaltens (MILLS et al. 1969, PALLAUF und KIRCHGESSNER 1971a, ROTH und KIRCHGESSNER 1979, PALLAUF 1983, YAMASAKI et al. 1999). Die Ausprägung ist dabei abhängig von der Zn-Versorgung. Beim Einsatz einer sonst bedarfsgerechten Diät auf Kaseinbasis ermittelten ROTH und KIRCHGESSNER (1979) bereits bei 12 mg Zn/kg maximale Wachstumsraten. Um in der vorliegenden Untersuchung die Folgen einer niedrigeren Futtermittelaufnahme der mit 7 mg/kg Diät marginal zinkversorgten Versuchstiere von den Effekten des Zn-Mangels abgrenzen zu können, wurden *pair fed*-Gruppen mitgeführt, die eine identische Futtermittelmenge wie die Depletionstiere erhielten. Zwar war eine Tendenz zum *meal feeding* der *pair fed*-Tiere zu erkennen, die Futtermittelvorgabemenge war aber ausreichend groß, um nicht vollständig (in einer Portion) direkt nach der Fütterung aufgenommen zu werden.

Auch eine Zwangsernährung (*force feeding*) der Depletionstiere führt zu einer Veränderung der physiologischen Situation, die sich zwar in einer schnelleren Ausbildung der Zn-Mangelsymptome, aber auch in höherer Letalität äußert und die Untersuchungen auf kurzfristige Effekte des Zinkmangels beschränkt (SCHÜLEIN et al. 1992, ROTH et al. 1992, EDER und KIRCHGESSNER 1994a). Gleichzeitig bestätigt die Mehrzahl der Ergebnisse aus *force fed*-Studien, dass sich die Stoffwechsellage der Ratte aufgrund der energetischen Überversorgung ebenfalls charakteristisch verändert, wovon insbesondere der Lipidstoffwechsel betroffen ist.

Für die Fragestellung dieser Arbeit besitzt die *ad libitum*-Versorgung mit suboptimalem Diät-Zink-Gehalt somit eine deutlich höhere physiologische Relevanz und gewährleistet gleichzeitig eine ausreichende Futtermittelaufnahme der Versuchstiere. Zinkmangelwirkungen, die eventuell im extremen Zinkmangel zum Vorschein kämen, werden aber mit dem hier gewählten Modell womöglich nicht erkannt.

5.2 Einfluss der alimentären Lipid- und Zinkversorgung auf Wachstum und Zinkstatus der Versuchstiere

Das Wachstum junger Ratten korreliert eng mit der Zn-Versorgung und ein alimentärer Zn-Mangel führt innerhalb weniger Tage zur Reduktion der Futteraufnahme und folgenden Wachstumsdepression (PALLAUF und KIRCHGESSNER 1971a). In der vorliegenden Untersuchung wurde die Futteraufnahme der *ad libitum*-Versuchsgruppen sowohl von der Höhe der Zinksupplementation als auch von der Art des Futterfettes beeinflusst und betrug durchschnittlich 13,0 g TM/d in Gruppe I (7Zn-GFS), nur 9,5 g TM/d in Gruppe III (7Zn-UFS) und 14,7 g TM/d in Gruppe V (50Zn-UFS). Die marginale Zn-Versorgung mit 7 mg/kg Diät lag deutlich unter dem Bedarf von 12 mg/kg (ROTH und KIRCHGESSNER 1979, NATIONAL RESEARCH COUNCIL 1995) und der Zufuhrempfehlung von 30 mg/kg (AIN-93G; REEVES 1997) und ließ eine mäßige Reduktion der Futteraufnahme erwarten. Der Einfluss des Futterfettes äußerte sich in Form einer 27 % niedrigeren Gesamtfutteraufnahme der UFS-Tiere (Distelöl) gegenüber den GFS-Tieren (Kakaobutter) bei marginaler Zn-Versorgung.

Die Lebendmasse der Ratten entwickelte sich nahezu parallel zur Futteraufnahme und war in beiden GFS-Gruppen (Gruppe I und II) deutlich höher als in den UFS-Gruppen III und IV. Die höchste Lebendmasse erreichten die Tiere der *ad libitum*-versorgten 50Zn-Gruppe V. Sie unterschied sich signifikant von den übrigen Gruppen. Auch ROTH und KIRCHGESSNER (1980) ermittelten bei jungen Ratten mit 6 mg Zn/kg Diät deutlich und mit 9 mg/kg gering aber signifikant verminderte Lebendmassezunahmen gegenüber der 60Zn-Gruppe. HALL et al. (2005) konnten hingegen in einer aktuellen Studie an entwöhnten Ratten unter Verwendung einer Eiklarprotein-Diät mit 42 % Glucose, 20 % Maisstärke und 8 % Maiskeimöl nach 3wöchiger Versuchsdauer keine Unterschiede in Futteraufnahme und Lebendmasse von mit 7, 15 und 25 mg/kg Zn-versorgten Tieren erkennen.

Bei der Manifestation des Zn-Mangels wurde von ROTH (2003) der Proteingehalt der Diät als bestimmender Faktor verifiziert. Erst ab einem Proteingehalt von ≥ 10 % resultierte die defizitäre Zn-Versorgung (0,8 mg/kg) in Wachstumsretardation und schlechterer Futterverdaulichkeit gegenüber der *pair fed*-Kontrolle. Die schlechtere Futterverwertung der GFS-Gruppen I und II ist aber nicht auf den Proteingehalt der Diät zurückzuführen, sondern zum Großteil auf die geringere Verdaulichkeit des GFS-Fettes. Anhand des Fettgehalts der Faeces wurde für Kakaobutter eine scheinbare Verdaulichkeit von 81 % berechnet, für Distelöl wurden 98,6 % ermittelt. Dies kongruiert mit den Werten anderer Autoren (APGAR et al. 1987, MONSMA et al. 1996) und den vom NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1995) zitierten Kakaobutterverdaulichkeiten von 81,6 % bei 150 g/kg Diät bzw. 71,7 % bei 200 g/kg Diät, sowie in ihrer Tendenz mit den Daten von PORSGAARD und HOY (2000), die für

Kakaobutter eine intestinale Absorptionsrate von 66,5 % nach 24 Stunden dokumentierten. Gleichzeitig konnte auch eine schlechtere Futtermittelverwertung im Zn-Mangel, die schon von anderen Autoren beobachtet wurde (WEIGAND und KIRCHGESSNER 1977, ROTH und KIRCHGESSNER 1979, PALLAUF 1983, ROTH et al. 1992), nachgewiesen werden ($p < 0,01$; Übersicht 15).

Trotz höherer Verdaulichkeit des Distelöls war die verdaute Fettmenge in den GFS-Gruppen größer und ihre Gewichtszunahmen signifikant höher als in den UFS-Gruppen III und IV. Bei ausreichender Zn-Zufuhr und *ad libitum*-Fütterung wurden für linolsäurereiche hochverdauliche Fette wie Maiskeim- oder Distelöl allgemein höhere oder zumindest gleich hohe Lebendmassezunahmen wie für Kakaobutter oder Rindertalg dokumentiert (APGAR et al. 1987, KAWAHARA et al. 1997). Eine generell verminderte Fettverdaulichkeit, wie von ROTH und KIRCHGESSNER (1980) beschrieben, wurde bei den marginal zinkversorgten Tieren nicht festgestellt. Ebenso wenig scheint eine im Zn-Mangel verstärkte Präferenz für Fett, die von KENNEDY et al. (1998) konstatiert, aber von verschiedenen anderen Autoren (ROTH 2003, REEVES 2003, NORII 2005) nicht bestätigt wurde, den Unterschied in der Futteraufnahme zwischen GFS- und UFS-Zinkmangeltieren zu bedingen.

Aus der Höhe der Futtermittelverwertung und anhand der hämatologischen Parameter Hb und Hk ergaben sich keine Hinweise auf einen gravierenden Energie- oder Nährstoffmangel der Versuchstiere.

Als biochemische Parameter zur Beschreibung des Zinkversorgungsstatus wurden jeweils die Zn-Konzentrationen des Plasmas, des Femurs und der Leber sowie die Aktivität des Zn-Metalloenzym Alkalische Phosphatase im Plasma und die Metallothioneinkonzentration in der Leber erfasst (Übersicht 16). Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden in Abbildung 14 Relativwerte dargestellt, wobei Gruppe V als Bezugsbasis (100 %) gewählt wurde. Mit Ausnahme der Zn-Konzentration der Leber reagierten alle untersuchten Zn-Statusparameter eindeutig auf das marginale alimentäre Zn-Angebot und gaben einen signifikant reduzierten Zn-Status der beiden 7Zn-Gruppen wieder. Gleichzeitig waren die Gesamtleber-Zinkmenge, die Plasma- sowie die Femur-Zinkkonzentrationen der UFS-Gruppen III (7Zn *ad libitum*) und IV (50Zn *pair fed*) gegenüber den GFS-Gruppen noch weiter erniedrigt. Dieser Unterschied könnte auch durch die deutlich niedrigere Futter- bzw. Zinkaufnahme bedingt sein.

Die Plasma-Zinkkonzentration und die AP-Aktivität im Plasma der 50Zn-Gruppen II, IV und V suggerieren eine scheinbar bessere Zn-Versorgung der restriktiv ernährten Versuchstiere. Die unzureichende Eignung der genannten Parameter als alleinige Zn-Statusanzeiger und ihre Beeinflussbarkeit durch eine Vielzahl unspezifischer Faktoren wurde bereits ausgiebig

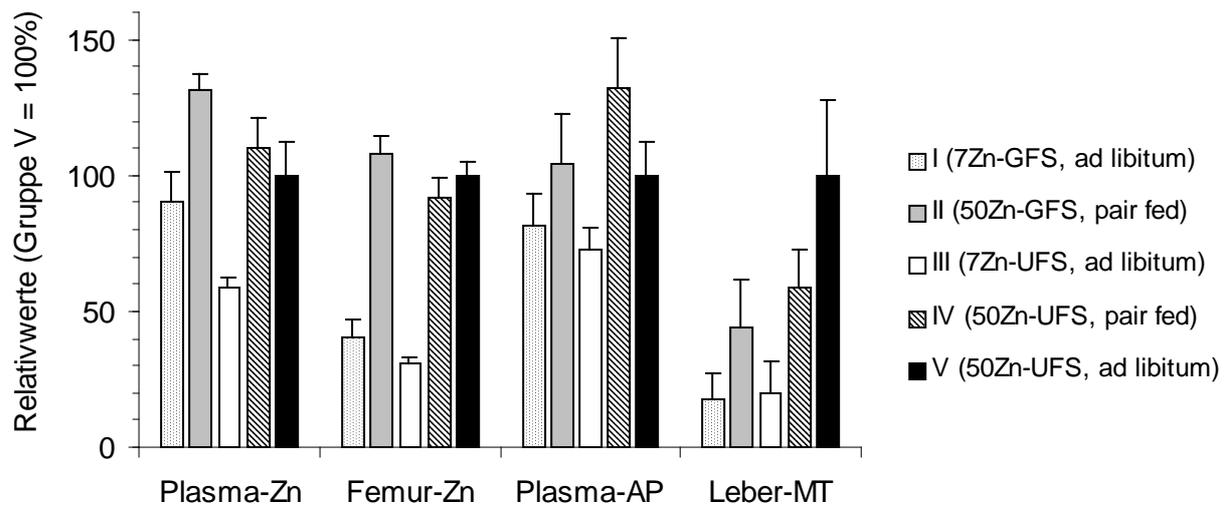


Abbildung 14: Relativwerte ausgewählter Zinkstatusparameter wachsender Ratten nach 4wöchiger Versuchsdauer

Statistisch signifikante Unterschiede sind Übersicht 16 zu entnehmen.

diskutiert (siehe ROTH und KIRCHGESSNER 1980, KING 1990, WOOD 2000, HAMBIDGE 2003a). Die insgesamt recht hohe Aktivität der plasmatischen AP (zwischen 396 mU/mL in Gruppe III und 717 mU/mL in Gruppe IV) kann auf eine TG- bzw. fettbedingte Induktion ihres Isoenzym, der auch in das Plasma sezernierten intestinalen Alkalischen Phosphatase, zurückgeführt werden (SEETHARAM et al. 1987, HOFFMANN et al. 1994, YAMAGISHI et al. 1994).

Die ermittelten Zn-Konzentrationen der marginal zinkversorgten Tiere lagen im Plasma bei 0,97 µg/mL (7Zn-GFS) bzw. 0,63 µg/mL (7Zn-UFS), im Femurknochen bei 51,4 µg/g bzw. 39,5 µg/g FM (Übersicht 16) und in der Leber bei 27,7 µg/g bzw. 27,3 µg/g FM. Im Gegensatz zur Zinkkonzentration der Leber waren die Plasma- und Femur-Zinkgehalte signifikant gegenüber den mit 50 mg Zn/kg Diät versorgten Tieren reduziert. Diese Daten decken sich mit Ergebnissen anderer Studien mit ähnlichen Diät-Zn-Gehalten. In der bereits erwähnten Untersuchung von HALL et al. (2005) wurden im Fall der 7 mg/kg-Gruppe nach 3 Versuchswochen Zn-Konzentrationen von 1,34 µg/mL Serum, 57,8 µg/g Femur und 25,4 µg/g Leber ermittelt, die jeweils signifikant gegenüber der 25 mg/kg-Kontrollgruppe reduziert waren. ROTH und KIRCHGESSNER (1979) dokumentierten bei 6 mg Zn/kg Diät bzw. 8 mg Zn/kg Diät nach zwei Wochen und vorausgegangener zweiwöchiger Zn-Depletion Konzentrationen von 0,34 µg/mL bzw. 0,48 µg/mL im Serum und 48 µg/g bzw. 51 µg/g in der Femur-FM. Ohne vorausgehende Depletion wurde bei 6 mg Zn/kg Diät nach 6 Wochen eine Zn-Konzentration von 0,68 µg/mL Plasma und bei 9 mg/kg von 1,17 µg/mL Plasma

bestimmt. Die Werte der 9 mg/kg-Gruppe unterschieden sich nicht von der 60 mg/kg-Kontrolle, was wieder die begrenzte Sensitivität der Plasma-Zn-Konzentration im marginalen Zn-Mangel dokumentiert (ROTH und KIRCHGESSNER 1980).

Anhand der zweifaktoriellen Varianzanalyse wurde ein signifikanter Einfluss der alimentären Fettsäuren ($p < 0,001$, Übersicht 16) auf die Gesamtleber-Zinkmenge, die Plasma- sowie die Femur-Zinkkonzentration statistisch bestätigt. Da in einigen Untersuchungen an perfundierten Dünndarmsegmenten (WAPNIR und LEE 1990, LEE und WAPNIR 1993) und *in vivo* (CUNNANE 1982, WAPNIR und SIA 1996) eine veränderte Absorption von Mineralstoffen bzw. Zink in Abhängigkeit von einzelnen freien FS oder Fetten beschrieben wurde, ist auch eine direkte Beeinflussung der Zn-Aufnahme durch die verwendeten Nahrungsfette denkbar. Weil aber die Futteraufnahme der 7Zn-UFS-Gruppe ebenfalls höchstsignifikant gegenüber der 7Zn-GFS-Gruppe reduziert war, sind mögliche additive Effekte hier nicht einzeln nachzuweisen. In einem vorausgegangenen fütterungskontrollierten Versuch am hiesigen Institut wurde bei identischer Futteraufnahme der beiden 7Zn-Gruppen eine Zn-Absorptionsrate von $66,1 \pm 8,4 \%$ aus der Sonnenblumenöl-Diät und von $72,8 \pm 3,9 \%$ aus der Rindertalg-Diät (jeweils 25 % Fett) ermittelt. Die FS-Zusammensetzung des Sonnenblumenöls bzw. des Rindertalgs ähnelt den hier verwendeten Fetten Distelöl (UFS) bzw. Kakaobutter (GFS). Statistisch konnte weder ein signifikanter Gruppenunterschied noch ein Einfluss des Futterfetts auf die scheinbare Zn-Absorptionsrate abgesichert werden (BÖSCH-SAADATMANDI 2004).

Am deutlichsten und vom Futterfett unbeeinflusst reagierte das Metallothionein der Leber auf die Höhe der alimentären Zn-Versorgung. MT ist als ubiquitär exprimiertes, niedermolekulares Zn-Bindungsprotein auch an der Regulation des Zn-Metabolismus beteiligt (DAVIS und COUSINS 2000, TAPIERO und TEW 2003, vgl. Kapitel 2.1.3). Die tetraedrische Bindung von Zink, Kupfer oder Cadmium in zwei Clustern aus insgesamt 20 Cysteinresten ergibt eine hohe Metallbindungskapazität von 7 Atomen Zink pro MT-Molekül, und die *de novo*-Synthese von MT korreliert in vielen Geweben direkt mit der Zn-Akkumulation bzw. dem zellulären Zn-Status. Die MT-Konzentration wird allgemein als recht zuverlässiger Indikator der Zn-Versorgung angesehen (GRIDER et al. 1990, ROTH und KIRCHGESSNER 1999, HAMBIDGE 2003a). MT-mRNA-Expression und MT-Proteinkonzentration sind jedoch nicht immer vergleichbar, sie werden von einer Vielzahl physiologischer Mediatoren über mehrere *Response*-Elemente im MT-Promotor reguliert und auch durch verschiedene Faktoren wie Futterrestriktion oder Schwermetalle (Cadmium, Quecksilber, Kobalt) induziert (BREMNER und DAVIES 1975, BEATTIE et al. 2000, PHILCOX et al. 2000, SZCZUREK et al. 2001, COYLE et al. 2002, VASCONCELOS et al. 2002).

Unter den Bedingungen dieses Versuchs entsprach die hepatische MT-Konzentration der marginal zinkversorgten Ratten mit 28 ng/mg Protein (7Zn-GFS) und 32 ng/mg Protein (7Zn-UFS) nur 33 % bzw. 28 % der jeweiligen 50Zn-*pair fed*-Gruppen. Die moderate Futterrestriktion der 50Zn-Gruppen II und IV führte nicht zu einer erkennbaren MT-Induktion gegenüber der *ad libitum*-Kontrollgruppe V. Diese wies mit 194 ng/mg Leberprotein eine etwa zweimal höhere MT-Konzentration als die beiden restriktiv ernährten 50Zn-Gruppen auf. Eine Abhängigkeit der MT-Induktion von der Höhe der Futterrestriktion hatten bereits BREMNER und DAVIES (1975) und SHINOGI et al. (1999) konstatiert. Ihre Befunde wurden auch von SZCZUREK et al. (2001) bestätigt, die eine um 153 % höhere MT-Konzentration der sehr restriktiv ernährten *pair fed*-Gruppe gegenüber der *ad libitum*-Gruppe ermittelten. Unter den Versuchsbedingungen der vorliegenden Arbeit wurde diese MT-Induktion nicht beobachtet.

Ebenso wenig kann anhand der vorliegenden Daten eine positive Korrelation zwischen dem MT-Gehalt und der Zn-Konzentration der Leber belegt werden. Auch SZCZUREK et al. (2001) konnten in der oben erwähnten Studie keinen Unterschied in der Leber-Zinkkonzentration zwischen Mangel- und *ad libitum*-Kontrollgruppe feststellen und konstatierten, dass bei niedriger Zn-Versorgung die hepatische MT-Konzentration nicht durch den Zn-Gehalt der Leber determiniert wird, sondern dass MT dort eher als kurzzeitiger Speicher überschüssiger Zn-Mengen zu dienen scheint.

In der vorliegenden Arbeit führte die marginale alimentäre Zn-Versorgung somit eindeutig zu einer Zn-Mangelsituation und zu einem deutlich beeinträchtigten Zn-Status der beiden 7Zn-Gruppen.

5.3 Einfluss der Zink- und Lipidalimentation auf Aktivität und Expression der Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase

Die Aktivität der ECI wurde in der durch differentielle Zentrifugation isolierten Mitochondrienfraktion der Gewebehomogenate bestimmt. Die Aktivität repräsentiert dabei die Summe des Substratumsatzes aller ECI-Isoenzyme (der mitochondrialen MECI, der mitochondrialen und peroxisomalen monofunktionalen ECI sowie des peroxisomalen MFE1) mit unterschiedlicher Substratspezifität (ZHANG et al. 2002). Die höchste katalytische Effizienz mit *trans*-3-Hexenoyl-CoA besitzt die MECI; es ist daher anzunehmen, dass der Großteil des Substratumsatzes durch die Aktivität der MECI bedingt wurde.

Die ECI (und die 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase) wird bei der Degradation ungesättigter FS via β -Oxidation zusätzlich zu den Enzymen benötigt, die an der β -Oxidation gesättigter FS beteiligt sind. Bei hoher Zufuhr ungesättigter FS wäre demnach eine höhere Aktivität der ECI

zu erwarten. In der vorliegenden Untersuchung ergab die Bestimmung der ECI-Aktivität in der Leber der UFS-Versuchsgruppen deutlich (im Mittel um 183 %) höhere Werte als in GFS-Gruppen. Innerhalb der UFS-Gruppen zeigte die ECI bei marginaler Zn-Versorgung (Gruppe III) eine signifikant niedrigere Aktivität als bei adäquater Zn-Versorgung, unabhängig vom Fütterungsregime (Übersicht 17, Abbildung 15 A).

Der Aktivitätsunterschied zwischen GFS- und UFS-Gruppen sollte leicht durch die biochemische Funktion der ECI im Rahmen der β -Oxidation zu erklären sein. Zwar zeigen viele Studien eine Induktion der hepatischen FS-Oxidation durch ungesättigte FS anhand unterschiedlicher Parameter (MANNAERTS et al. 1979, REUBSAET et al. 1989, IDE et al. 1996, HALVORSEN et al. 2001, TAKEUCHI et al. 2001), publizierte Daten zur Aktivität der ECI sind hingegen limitiert. Sie bestätigen jedoch eine Induktion der Hilfsenzyme der β -Oxidation durch mehrfach ungesättigte FS (IDE et al. 1996, KABIR und IDE 1996, KUMAMOTO und IDE 1998, IDE et al. 2000). Nach 15 Versuchstagen und einem Diätfettgehalt von 15 % wurden bei Distelöl signifikant höhere ECI-Aktivitäten bestimmt (KUMAMOTO und IDE 1998) als bei Palmöl, welches mit 45 % C 16:0, 4 % C 18:0, 39 % C 18:1 n-9 und 9 % C 18:2 n-6 relativ arm an mehrfach ungesättigten FS ist. Die ECI-Aktivität der C 18:3 n-3-versorgten Tiere unterschied sich nicht signifikant von der Distelöl-Gruppe. Auch die Aktivität der 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase war in beiden UFS-Gruppen höher als in der Palmöl-Gruppe.

Die Steigerung der ECI-Aktivität durch linolsäurereiches Distelöl bestätigte sich aber nicht in allen Studien dieser Arbeitsgruppe (KABIR und IDE 1996, IDE et al. 2000). Konsistent wurde hingegen in allen Studien eine signifikante Induktion der ECI durch C 18:3 n-3 reiches Lein- oder Perillaöl festgestellt.

Ein Vergleich der spezifischen ECI-Aktivität mit Literaturwerten ist nur mit Einschränkungen möglich. Obwohl *trans*-3-Hexenoyl-CoA oft als Substrat eingesetzt wurde (MIESOWICZ und BLOCH 1979, PALOSAARI et al. 1990, KABIR und IDE 1996, GURVITZ et al. 1999, IDE et al. 2000, LI et al. 2002, ZHANG et al. 2002), ergibt die Bestimmung mittels direktem UV-Assay durch die notwendige Hitzebehandlung (Denaturierung der Enoyl-CoA-Hydratase) ein anderes ECI/Gesamtprotein-Verhältnis als im gekoppelten Assay ohne Hitzedenaturierung. Auch durch die Isolation definierter Zellorganellen kann die Aktivität in der ursprünglichen Gewebemasse nur extrapoliert werden. IDE et al. (2000) gaben eine Aktivität der ECI, welche mit *trans*-3-Hexenoyl-CoA in hepatischen Gesamthomogenaten bestimmt wurde, von 75,7 U/Leber pro 100 g Lebendmasse in ihrer Distelöl-Gruppe an. Wird im eigenen Versuch von der Volumenaktivität der ECI auf die Gesamtaktivität in der Mitochondrienpräparation (pro Leber pro 100 g Lebendmasse) extrapoliert und um einen pauschalen Präparationsverlust von 60 % korrigiert (Verlust der SDH-Aktivität in der Mitochondrienpräparation

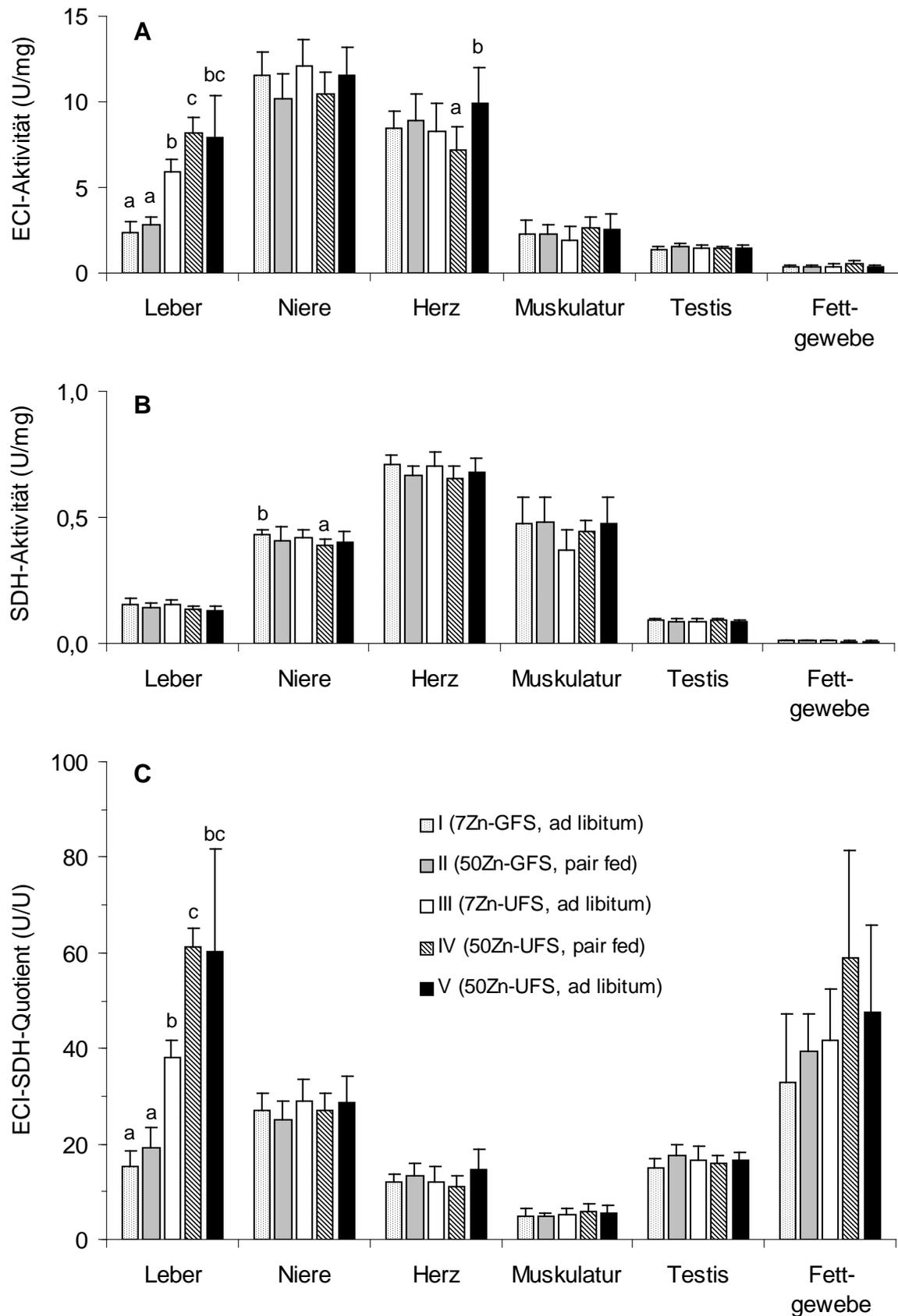


Abbildung 15: Einfluss von Zink- und Lipidalimentation auf (A) die Aktivität der ECI, (B) die Aktivität der SDH und (C) die ECI-SDH-Relation in untersuchten Geweben

Innerhalb eines Parameters sind signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen durch unterschiedliche Buchstaben angezeigt.

gegenüber dem Gesamthomogenat, exemplarisch in einem Vorversuch ermittelt), dann ergibt sich eine Aktivität von 64 U (Gruppe III), 83 U (Gruppe IV) bzw. 109 U (Gruppe V) pro Leber pro 100 g Lebendmasse der UFS-Gruppen. IDE et al. (2000) konnten aber keine Induktion der ECI gegenüber der Palmöl-Gruppe feststellen. Gründe für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen von IDE und Mitarbeitern (IDE et al. 1996, KABIR und IDE 1996, IDE et al. 2000) und der vorliegenden Untersuchung könnten durch die kürzere Versuchsdauer, den niedrigeren Diätfettgehalt, das höhere Alter bzw. das geringere Wachstumspotential der Versuchstiere in den zitierten Studien bedingt sein. Auch der Unterschied im FS-Muster zwischen Palmöl und Kakaobutter könnte Einfluss auf die Aktivität der ECI haben: Während Palmöl mit 4 % C 18:0 und 48,6 % ungesättigten FS einen GFS/UFS-Quotienten von 1,0 aufweist, besitzt Kakaobutter mit 33 % C 18:0 und insgesamt 58,8 % gesättigten FS einen GFS/UFS-Quotienten von 1,5 sowie einen geringeren Anteil der mehrfach ungesättigten FS Linolsäure (C 18:2 n-6). Der höhere Anteil ungesättigter FS im Palmöl könnte durch eine stärkere Aktivierung der ECI die Unterschiede zwischen Palmöl- und Distelöl-Gruppe abgeschwächt haben, die zwischen den Kakaobutter- und Distelölgruppen der vorliegenden Untersuchung deutlich zu Tage traten.

Die moderate Futterrestriktion allein führte nicht zu einer höheren Aktivität der ECI und einer möglicherweise verstärkten Degradation ungesättigter TG-FS (RACLOT und GROSCOLAS 1993, RACLOT et al. 1997): Die ECI-Aktivität der *pair fed*-Gruppe IV (50Zn-UFS) unterschied sich nicht von der *ad libitum*-Gruppe V (50Zn-UFS), die keinen β -oxidationsinduzierenden Faktoren (wie Nahrungsentzug, Energie-, Glucosemangel, Stress) (ROE et al. 1990, JANSSEN und STOFFEL 2002) ausgesetzt war. Das Futteraufnahmeniveau der *pair fed*-Gruppe II (50Zn-GFS) lag über dem der *pair fed*-Gruppe IV, es ist daher auch bei Gruppe II nicht von einer Induktion der ECI durch das *pair feeding* auszugehen.

In der marginal zinkversorgten 7Zn-UFS-Gruppe war die Aktivität der ECI in der Leber auf 72 % des 50Zn-Wertes reduziert (7Zn-UFS 5,87 U/mg Protein, 50Zn-UFS 8,16 U/mg Protein). Der Einfluss der Zn-Versorgung auf die Aktivität der ECI wurde jedoch nur bei einer hohen Zufuhr ungesättigter FS evident. Zwar war die ECI-Aktivität der 7Zn-GFS-Gruppe mit 2,39 U/mg Protein geringfügig niedriger als in der 50Zn-GFS-Gruppe (2,79 U/mg Protein), der Unterschied war aber nicht signifikant.

Vergleichsdaten zum Einfluss der Zn-Versorgung auf die ECI sind nur aus einer Untersuchung zum hepatischen Expressionsprofil im extremen Zn-Mangel bekannt, in der eine eindeutige Reduktion der ECI-Expression als Folge des Zn-Defizits dokumentiert wurde (TOM DIECK et al. 2003, 2005). Auch ist die Induzierbarkeit der ECI der Leber durch pharmakologische Peroxisomen-Proliferatoren bekannt (HAKKOLA et al. 1994, YAMAZAKI et al. 2002) und eine Funktionsbeeinträchtigung der PPARs bei mangelnder Zn-Versorgung

beschrieben (MEERARANI et al. 2003, REITERER et al. 2004), die diese Expressionsänderung im Zn-Mangel erklären könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde in allen fünf Versuchsgruppen unabhängig von der Zn-Versorgung eine nahezu identische Expressionshöhe der ECI-mRNA nachgewiesen. Dieses Ergebnis bestätigt weder eine Reduktion durch eine defizitäre Zn-Versorgung noch eine Steigerung der ECI-Expression durch mehrfach ungesättigte FS. Einer Veränderung der Aktivität geht aber nicht notwendigerweise eine Veränderung der Expressionshöhe voraus, sie kann gleichermaßen durch posttranskriptionale oder posttranslationale Mechanismen reguliert werden. Möglicherweise ist auch die selektive Induktion einer peroxisomalen Isoform der ECI (wie das MFE1), deren Expression nicht erfasst wurde, an der höheren Gesamttätigkeit der ECI in der Leber der UFS-Gruppen beteiligt.

Die deutlich geringere Aktivität der ECI bei marginaler Zn-Versorgung signalisiert einen reduzierten Abbau ungesättigter FS, die zur Deckung des Energiebedarfs beitragen. Bei längerer Nahrungskarenz (24 bzw. 48 Stunden) und völlig fehlender ECI-Aktivität akkumulieren ungesättigte FS in der Leber, und Stoffwechselprodukte der ungesättigten FS werden massiv im Urin ausgeschieden (JANSSEN und STOFFEL 2002). Dabei sind die metabolischen Konsequenzen eines Enzymdefekts der β -Oxidation im Tiermodell (Maus, Ratte) allgemein weniger gravierend als beim Menschen und selten letal (SCHULER und WOOD 2002).

Abbildung 15 zeigt neben der ECI-Aktivität der untersuchten Gewebe (A) die Aktivität der SDH (B) als Marker der Mitochondriendichte der Gewebepräparation und das resultierende Verhältnis aus ECI- und SDH-Aktivität (C). Die Aktivität der ECI in der Herzmuskulatur, der Skelettmuskulatur, der Niere, im Testis und im Fettgewebe wurde nicht maßgeblich durch die Zn-Versorgung oder die Zufuhr unterschiedlich desaturierter FS beeinflusst. Die geringfügig höhere SDH-Aktivität in Leber, Herz und Niere der 7Zn-Gruppen verweist auf eine höhere Mitochondriendichte, die wahrscheinlich eine kompensatorische Folge der geringeren Organgröße der marginal zinkversorgten Tiere ist. In Form der ECI/SDH-Relation sind vorhandene Unterschiede in der ECI-Aktivität noch deutlicher zu erkennen. Der Einfluss des Futterfetts und der Zn-Versorgung auf die Aktivität der ECI war jedoch auf die Leber als zentrales Organ des Zink- und Lipidstoffwechsels beschränkt.

5.4 Beeinflussung der Expression von PPAR α , PPAR γ und der Ketonkörperkonzentration

Als nucleäre Hormonrezeptorproteine modulieren PPARs die Expression ihrer Zielgene im Lipidstoffwechsel über die Bindung an spezifische Nucleotidsequenzen (PPREs) in deren Promotorregion. Voraussetzung für diese Bindung ist eine Dimerisierung mit dem obligaten Bindungspartner RXR und die Aktivierung des PPARs durch einen spezifischen Liganden. Insbesondere fungieren ungesättigte FS, die im Hungerstoffwechsel aus dem Fettgewebe freigesetzt oder über die Nahrung aufgenommen werden, als endogene PPAR-Aktivatoren (KLIEWER et al. 1997, WILLSON und WAHLI 1997, KERSTEN et al. 1999).

Die mRNA-Expression der PPAR α und PPAR γ wurde in der Leber mittels semi-quantitativer RT-PCR bestimmt. PPAR γ wies in allen fünf Versuchsgruppen eine ähnliche mRNA-Expression auf. Die Expression des PPAR α war in den *pair fed*-Versuchsgruppen II (50Zn-GFS) und IV (50Zn-UFS) um mehr als den Faktor 2 gegenüber den *ad libitum*-versorgten Gruppen erhöht, Expressionsunterschiede in Abhängigkeit vom eingesetzten Diätfett (GFS oder UFS) wurden aber nicht festgestellt (Übersicht 20). Obwohl die Induktion der peroxisomalen und mitochondrialen β -Oxidation durch mehrfach ungesättigte FS unstrittig auf eine PPAR α -vermittelte Regulation zurückgeführt wird (CLARKE 2001, NAKAMURA et al. 2004), wird die PPAR α -Aktivierung durch Linolsäure (C 18:2 n-6) kontrovers diskutiert. Mittels *Cotransfection-Assay* hatten KELLER et al. (1993) und KLIEWER et al. (1997) Linolsäure als potenten PPAR α -Aktivator identifiziert, PAWAR und JUMP (2003) ermittelten jedoch nur für C 20:5 n-3 und 22:6 n-3 eine Aktivierung von PPAR α , welche für C 18:2 n-6 sowie C 22:5 n-3, C 20:4 n-6, C 18:3 n-3 und C 18:1 n-9 nicht nachgewiesen wurde. Auch *in vivo* wurde durch linolsäurereiches Distelöl keine konsistente Steigerung der Aktivität oder Expression von Enzymen der β -Oxidation erreicht (IDE et al. 2000). Letztendlich ist ein Einfluss der FS auf die Aktivierung von PPAR α im vorliegenden Versuch nicht auszuschließen. Die mRNA-Expression von PPAR α unterlag zumindest keiner Steigerung durch ungesättigte alimentäre FS.

Die signifikant höhere Expression der PPAR α -mRNA in den *pair fed*-Gruppen II und IV deckt sich mit den Daten von KERSTEN et al. (1999), die bei Mäusen nach einer 24stündigen Nüchterung massiv erhöhte mRNA-Level in der Leber nachwiesen. Am Modell der PPAR α -Null-Maus konnte die essentielle Funktion von PPAR α für die adaptive Response auf einen anhaltenden Nahrungsentzug eindrücklich demonstriert werden (AOYAMA et al. 1998, KERSTEN et al. 1999, HASHIMOTO et al. 2000). Die marginal zinkversorgten *ad libitum*-Gruppen I und III der eigenen Arbeit wiesen eine identische Höhe der PPAR α -Expression wie die adäquat zinkversorgte *ad libitum*-Gruppe V auf. Die vorliegenden Daten implizieren,

dass bereits eine moderate Futterrestriktion die PPAR α -Expression erhöht und sich die Unterschiede zwischen den marginal und adäquat zinkversorgten Tieren nicht aufgrund der Zn-Versorgung, sondern durch den Einfluss der an die höhere Zn-Versorgung gekoppelten Futterrestriktion der *pair fed*-Gruppen II und IV ergaben.

Die marginale Zn-Versorgung hatte demnach keinen Einfluss auf die mRNA-Expression des PPAR α . Im extremen Zn-Mangel war die PPAR-Expression gegenüber der Zn-versorgten Versuchsgruppe reduziert und viele PPAR-Zielgene in ihrer Expression verändert (TOM DIECK et al. 2003, 2005). Da Zink ein essentielles Element in der PPAR-vermittelten Gentranskription darstellt, wurde ein Funktionsverlust der PPARs bzw. der PPREs durch das Zn-Defizit vermutet (DANIEL und TOM DIECK 2004). Eine reduzierte Expression der ECI, wie sie von TOM DIECK et al. dokumentiert wurde, bestätigte sich für die marginale Zn-Versorgung der vorliegenden Untersuchung nicht.

Andererseits wurde trotz deutlicher Induktion der PPAR α -Expression in den *pair fed*-Gruppen II und IV keine höhere ECI-Expression oder eine einheitlich höhere ECI-Aktivität ermittelt. Noch wurde kein PPRE im ECI-Promotor identifiziert, welches eine Regulation der ECI-Expression durch PPAR α beweisen würde. Die Expression und die Aktivität der ECI wird jedoch in der Leber (nicht aber in Herz, Niere, Dünndarm, Testis oder Gehirn) durch verschiedene Peroxisomen-Proliferatoren um ein Vielfaches erhöht (HAKKOLA et al. 1994, YAMAZAKI et al. 2002) und MANDARD et al. (2004) zitieren, dass fastende PPAR α -Null-Mäuse entsprechend reduzierte ECI-mRNA-Level aufweisen. Zudem konnte ein enger Bezug zwischen PP-induzierter PPAR-mRNA-Menge, PPAR-Konzentration und Zielgen-Transkription gezeigt werden (LEMBERGER et al. 1996). Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung, in der die ECI-Expression offensichtlich nicht mit der Expression von PPAR α korreliert. Auch in der *in vivo-Studie* von KERSTEN et al. (1999) zeigte sich bei deutlich vermehrter PPAR α -mRNA nach 24stündiger Nahrungskarenz der Mäuse kein einheitlicher Effekt auf die untersuchten PPAR α -Zielgene: Einige Enzyme des Lipidstoffwechsels waren trotz der PPAR α -Induktion in ihrer Expression nicht verändert, oder auch bei PPAR α -Null-Mäusen erhöht.

Obwohl die Induktion von PPAR α mit einer gesteigerten Expression mitochondrialer und peroxisomaler β -Oxidationsenzyme einher geht (MANDARD et al. 2004) und PPAR α -Null-Mäuse bei hohem Fettgehalt der Diät mehr Fett in der Leber akkumulieren (KERSTEN et al. 1999), war der hepatische Gesamtlipid- und TG-Gehalt der fünf Versuchsgruppen der eigenen Untersuchung offenbar nicht in direkter Abhängigkeit von der PPAR α -Expression verändert. Der höhere TG-Gehalt in der Leber der Zn-Mangeltiere und die gleichzeitig niedrigere PPAR-Expression könnte in der Studie von TOM DIECK et al. (2005) möglicherweise auch durch die Zwangsernährung der Zn-Mangeltiere bedingt sein: Da Ratten bei nicht

ausreichender Zn-Versorgung ihren Stoffwechsel (insbesondere den Protein-*turnover*) (ROTH 2003) an die verfügbare Zn-Menge anpassen und sich folglich ihr Energiebedarf reduziert, müsste eine energetische Überversorgung durch die hohe Nahrungszufuhr in einer Reduktion der FS-Oxidation und dafür in einer Repression der PPAR α -Expression resultieren. Die beobachtete reduzierte PPAR α -Expression wäre folglich nicht ein Resultat des Zn-Mangels *per se*, sondern der physiologischen Anpassung an dieselbe.

Ein wichtiges Produkt der FS- β -Oxidation ist Acetyl-CoA, welches in der Leber zu Acetoacetat bzw. 3-Hydroxybutyrat kondensiert werden kann. Acetoacetat, 3-HB und Aceton werden als "Ketonkörper" bezeichnet. Bei längerer Nahrungskarenz sichern Acetoacetat und 3-HB die Energieversorgung fast aller extrahepatischer Gewebe und minimieren dadurch Glucosebedarf und Proteolyse. Bei Defekten der β -Oxidation bleibt trotz Hypoglycämie der überlebensnotwendige Anstieg der Ketonkörperkonzentration im Blut aus (WANDERS et al. 1999, HASHIMOTO et al. 2000).

Die 3-HB-Konzentration im Plasma der Versuchstiere wurde nach 12stündiger nächtlicher Nüchterung bestimmt und ergab in den *ad libitum*-Gruppen I, III und V mit 1,2 mmol/L, 1,4 mmol/L bzw. 1,6 mmol/L ungefähr doppelt so hohe Werte wie in den *pair fed*-Gruppen (0,6 mmol/L bzw. 0,7 mmol/L) (Tabelle A 23). Dieses Ergebnis steht nur auf den ersten Blick im Widerspruch zum Fütterungsprotokoll und der PPAR α -Expression: Im Gegensatz zu den kontinuierlich und hauptsächlich in der Dämmerung fressenden *ad libitum*-Gruppen hatten beide *pair fed*-Gruppen zu Beginn der Nüchterungsphase die vorgelegte Futtermenge nahezu vollständig aufgenommen. Die Futteraufnahme der *ad libitum*-Gruppen betrug bis dahin ca. 50 % der Aufnahme des Vortages. Sie war folglich deutlich niedriger als die der restriktiv ernährten Gruppen und kann den stärkeren Anstieg der 3-HB-Konzentration im Plasma erklären.

Andererseits resultierte eine defizitäre Zn-Versorgung bereits in anderen Studien in erhöhten Ketonkörperkonzentrationen. Nach nächtlicher Nüchterung wurden bei 1 mg/kg-zinkversorgten Ratten dreifach höhere Ketonkörperkonzentrationen und signifikant höhere Konzentrationen freier FS im Plasma nachgewiesen als bei der 40 mg-*pair fed*-Gruppe (QUARTERMAN und FLORENCE 1972). Daten von GREELEY und SANDSTEAD (1983) lassen annehmen, dass bereits ohne Nüchterung im Zn-Mangel höhere Ketonkörperkonzentrationen vorliegen. Die Autoren hatten postprandial bei marginal zinkversorgten (6 mg/kg Diät) trächtigen Ratten um den Faktor 9 höhere 3-HB-Konzentrationen diagnostiziert und ebenfalls deutlich höhere 3-HB-Oxidationsraten im Vergleich zu *ad libitum* gefütterten Kontrolltieren (50 mg Zn) ermittelt. Trächtige wie nicht trächtige Ratten wiesen bei defizitärer Zn-Versorgung auch in der Untersuchung von CUNNANE et al. (1993) höhere 3-HB-Konzentrationen als die zink-

versorgten Tiere auf. Die Futteraufnahme der Zn-Mangeltiere war jedoch niedriger als die der *ad libitum* versorgten Kontrollgruppen.

Die gleiche Höhe der 3-HB-Konzentration der 50Zn-Gruppe V und beider 7Zn-Gruppen spricht gegen einen Einfluss der Zn-Versorgung, wird aber durch die uncharakteristische metabolische Situation des letzten Versuchstages konfundiert. Im Urin der letzten beiden Versuchswochen unterschied sich die Konzentration an 3-HB nicht zwischen allen fünf Versuchsgruppen. Damit ergibt sich kein Hinweis auf eine generelle Hyper- oder Hypoketonämie durch einen Einfluss der Zn-Versorgung oder einen Defekt der β -Oxidation.

5.5 Auswirkungen auf das Lipidprofil von Plasma und Leber

Neben möglichen Veränderungen durch einen Zn-Mangel modifizieren alimentäre FS ihrerseits den Lipidstoffwechsel. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gesamtcholesterin- und die Triglyceridgehalte des Plasmas sowie der Lipidgehalt, die Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidkonzentrationen der Leber als charakterisierende Parameter des Lipidstoffwechsels erfasst. Jeder untersuchte Parameter wurde vom Futterfett (Kakaobutter oder Distelöl) beeinflusst, Effekte der Zinkversorgung waren weniger deutlich.

Im Hinblick auf die Plasmalipide wirken insbesondere mehrfach ungesättigte n-3-FS, aber auch ungesättigte n-6-FS wie Linolsäure senkend auf die Chol- und TG-Konzentration des Plasmas (reviewed von FERNANDEZ und WEST 2005). Die gesättigten FS C 12:0, C 14:0 und C 16:0 führen generell zu einem Anstieg des Plasma-Chol und bedingen die beobachtete Hypercholesterinämie durch Kakaobutter (RENAULD 1974). Stearinsäure (C 18:0) besitzt dagegen keine hypercholesterinämische Wirkung (GRUNDY 1994). Ein Einfluss der Futterfette Kakaobutter (GFS) bzw. Distelöl (UFS) auf die Konzentration des Plasma-Chol der fünf Versuchsgruppen war aber kaum erkennbar (Übersicht 21). Auch für die TG-Konzentration des Plasmas, welche in den GFS-Gruppen zwar höher als in den UFS-Gruppen war (92 mg/dL in Gruppe I und 141 mg/dL in Gruppe II gegenüber 39 mg/dL in Gruppe III und 58 mg/dL in Gruppe IV), ließ sich im paarweisen Mittelwertsvergleich kein Unterschied zwischen GFS- und UFS-Gruppen gleicher Zinkversorgung absichern.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch IDE und Mitarbeiter, die den Einfluss unterschiedlich saturierter Fette auf diverse FS-Oxidationsenzyme untersuchten (siehe auch Kapitel 5.3). Der Einsatz von Palmöl (45 % C 16:0, 39 % C 18:1, 9 % C 18:2 n-6) ergab im Vergleich zu Distelöl (77 % C 18:2 n-6, 13 % C 18:1), jeweils in einer Konzentration von 150 g Fett/kg Diät und 15-tägiger Versuchsdauer, keine Differenzen im Plasma-Chol, aber durchgängig höhere Plasma-TG bei der Palmöl-Diät (KABIR und IDE 1996, KUMAMOTO und IDE 1998, IDE et

al. 2000). Auch beim Vergleich von Kakaobutter mit Maiskeimöl oder Rindertalg mit Distelöl wurden keine signifikant höheren Chol-Konzentrationen, sowie nur bei Kakaobutter höhere TG-Konzentrationen im Plasma ermittelt (MONSMA et al. 1996, KAWAHARA et al. 1997).

Plasma-Chol und insbesondere Plasma-TG differierten jedoch sichtbar zwischen den 50Zn-*pair fed*-Gruppen II und IV einerseits und den 7Zn-Gruppen I und III andererseits (Übersicht 21). Beide 7Zn-Gruppen wiesen niedrigere Plasmalipidgehalte auf, und aus den Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen ergab sich ein statistisch gesicherter Einfluss der Zn-Versorgung ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$, zweifaktorielle ANOVA). In der oft zitierten Studie zur Interaktion von Zink und essentiellen FS hatten HUANG et al. (1982) gegenüber ihrer *pair fed*-Gruppe erniedrigte Chol- und TG-Gehalte im Plasma der Zn-Mangeltiere dokumentiert. Andere Autoren konnten die Veränderungen im Zn-Mangel nur auf Effekte der unterschiedlichen Futteraufnahme zurückführen (ROTH und KIRCHGESSNER 1977, SCHNEEMAN et al. 1986). Der geringe Einfluss der Zn-Versorgung wird auch daran ersichtlich, dass KHOJA et al. (2002) signifikante Unterschiede bei *ad libitum*-gefütterten Tieren nur im extremen Zn-Mangel und nicht bei marginaler Zn-Versorgung beobachten konnten. Da sich die Plasmalipidgehalte der *ad libitum*-Gruppe V weder von der 7Zn- noch der 50Zn-*pair fed*-Gruppe unterschieden, ist anzunehmen, dass die höheren Chol- und TG-Gehalte hauptsächlich aus der restriktiven Fütterung und/oder der höheren Futteraufnahme der *pair fed*-Gruppen am letzten Versuchstag resultieren.

Völlig konträre Ergebnisse wurden von EL HENDY et al. (2001) und YOUSEF et al. (2002) publiziert: Je geringer die Zn-Versorgung der *ad libitum*-Versuchstiere war, desto höher waren die von den Autoren ermittelten Plasmalipidkonzentrationen. Bereits bei einer Versorgung mit 19 mg Zn/kg Diät unterschieden sich die Werte signifikant von der Kontrollgruppe (38 mg Zn/kg Diät). Ferner ergab sich in Zn-Mangelstudien mit zwangsernährten Versuchstieren mehrheitlich ein plasmalipiderhöhender Einfluss des Zn-Mangels, der auch unabhängig vom eingesetzten Futterfett beobachtet wurde (EDER und KIRCHGESSNER 1996a).

Die Entwicklung einer Fettleber, d.h. eine Akkumulation hepatischer Lipide im Zn-Mangel wurde mit Ausnahme weniger Studien (CLEJAN et al. 1981, YOUSEF et al. 2002) ausschließlich bei zwangsernährten Tieren beobachtet (EDER und KIRCHGESSNER 1993, 1996a, TOM DIECK et al. 2005) (siehe Kapitel 2.1.3). Sie ist ein artifizielles Phänomen und „kein physiologisch relevanter Effekt“ der defizitären Zn-Versorgung (EDER und KIRCHGESSNER 1995b). Ein Vergleich des hepatischen Lipidprofils mit Literaturdaten aus *force feeding*-Studien erscheint für die Interpretation der Befunde im vorliegenden Versuch somit wenig sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Lipidgehalte der Leber sowie die Konzentrationen der einzelnen Lipidfraktionen (Chol, TG, PL) der *ad libitum* gefütterten 7Zn-Gruppen nicht signifikant durch das Zn-Defizit beeinflusst (Übersicht 22). Zwar wurden in einigen Untersuchungen reduzierte TG-Konzentrationen in der Leber der Zn-Mangeltiere dokumentiert (HUANG et al. 1982, CUNNANE 1988), bei marginaler Zn-Versorgung waren aber weder Chol, TG oder PL-Gehalte gegenüber der *ad libitum*-Kontrollgruppe vermindert (KHOJA et al. 2002).

In Abhängigkeit vom Futterfett ergaben sich Unterschiede in den Chol-, TG- und PL-Konzentrationen der Leber (Abbildung 16). Die Chol- und die TG-Konzentrationen der Gruppen mit UFS-Diät (Gruppen III und IV) waren bei niedrigerer Futteraufnahme aber vergleichbarer verdauter Fettmenge (siehe Kapitel 4.2) höher als in den Gruppen mit GFS-Diät. Bekanntlich reduzieren mehrfach ungesättigte FS die Aktivität und/oder die Expression an der FS- und TG-Synthese beteiligter Enzyme (EDER und KIRCHGESSNER 1996b, IRITANI et al. 1998, KIM et al. 2003) und erhöhen die FS-oxidierender Enzyme (KABIR und IDE 1996, TAKEUCHI et al. 2001). Dennoch ergaben sich in der Leber oft keine niedrigeren Lipidgehalte beim Einsatz ungesättigter FS in Form von Sonnenblumen- oder Distelöl im Vergleich zu gesättigten Fetten wie Rindertalg oder Kokosfett (EDER und KIRCHGESSNER 1995b, KAWAHARA et al. 1997, IDE et al. 2000, PORTILLO et al. 2001). In Übereinstimmung mit den eigenen Ergebnissen ermittelten MONSMA et al. (1996) beim Einsatz von

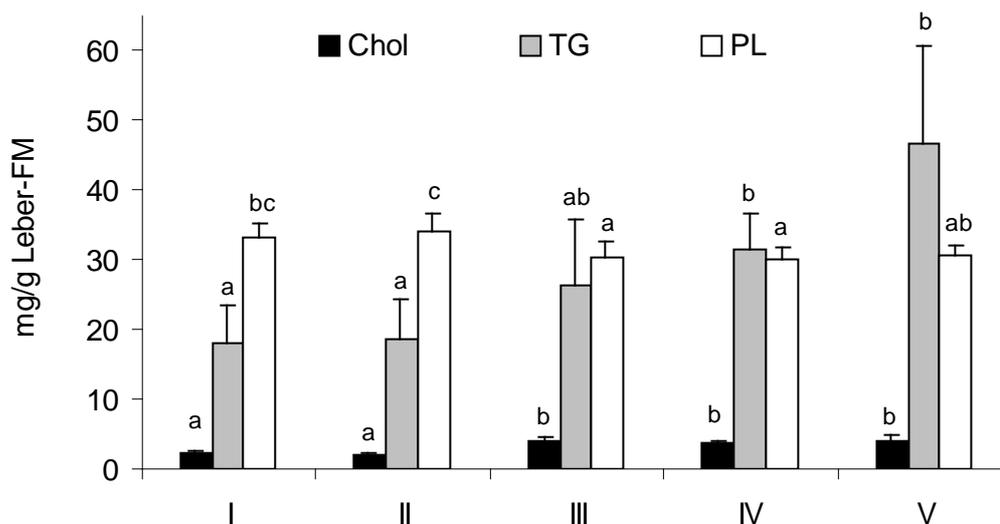


Abbildung 16: Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidkonzentrationen der Leber

Innerhalb eines Parameters sind signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen durch unterschiedliche Buchstaben angezeigt.

Maiskeimöl höhere hepatische TG-Konzentrationen als bei Rindertalg oder Kakaobutter. Auch PORTILLO et al. (2001) wiesen höhere Gesamtlipid-Gehalte und höhere TG-Konzentrationen bei Sonnenblumenöl im Vergleich zu Palmöl in der Diät nach.

Ursächlich für die höheren Lipidgehalte im Zn-Mangel vermuteten EDER und KIRCHGESSNER (1996b) höhere Aktivitäten lipogener Enzyme, gleichzeitig aber auch den Einfluss weiterer Faktoren wie einer verminderten Sekretion TG-reicher Lipoproteine der Leber. Die um 23 % höheren TG-Gehalte (pro 100 g Lebendmasse, Übersicht 23) der UFS-Gruppen im Vergleich mit den GFS-Gruppen könnten auch auf einer leichteren Mobilisation ungesättigter FS aus den TG der Adipocyten (RACLOT und GROSCOLAS 1993, RACLOT et al. 1997, YLI-JAMA et al. 2001) oder einer verminderten Einlagerung basieren und somit vermehrt in der Leber akkumulieren.

5.6 Einfluss der Zink- und Lipidalimentation auf das Fettsäuremuster der Gesamtlipide, Triglyceride und Phospholipide der Leber

Das Fettsäuremuster im Zn-Mangel wurde bereits in vielen Untersuchungen analysiert und die Befunde differieren je nach erfasstem FS-Spektrum, untersuchtem Gewebe, Ausmaß des Zn-Mangels, FS-Muster der Diät und Versuchsdesign (vgl. Kapitel 2.3.1). In der vorliegenden Arbeit erfasste die Analyse der Fettsäuren der Leberlipide mittels GC-FID ein breites Spektrum von 28 individuellen FS ab einer Kettenlänge von C 14. Nur FS, die anhand der Standards eindeutig identifiziert wurden, wurden in die Berechnungen eingeschlossen. Kürzerkettige FS (< C 14) oder mehrfach ungesättigte Oxidationsintermediate konnten nicht bestimmt werden.

Statistisch wurden die Gehalte aller analysierten FS durch die alimentären FS beeinflusst, wobei sich wie zu erwarten die FS des Nahrungsfettes verstärkt im FS-Muster der GL und der TG wiederfanden (Übersicht 24 und 26). Die charakteristischen FS der GFS-Diät (C 16:0, C 18:0 und C 18:1) waren in höheren prozentualen Anteilen in den GL und TG der GFS-Tiere präsent, auch Δ^9 -Desaturaseprodukte- (C 16:1 und C 20:1) und n-3-FS-Anteile waren dort höher als bei den UFS-Gruppen. Die dominierende FS der UFS-Diät (C 18:2 n-6) war wie fast alle n-6-FS (C 18:3 n-6, C 20:3 n-6, C 22:4 n-6) in viel höheren Anteilen in den GL und TG der UFS-Tiere nachzuweisen. Die FS der PL (Übersicht 27) wurden weniger direkt durch die alimentären FS beeinflusst und enthielten recht ähnliche Gehalte an C 16:0, C 18:0 und C 20:4 n-6, aber deutliche Unterschiede im Gehalt an Docosahexaensäure (C 22:6 n-3).

Abbildung 17 zeigt die Konzentrationen der verschiedenen „FS-Familien“ in der Leber der Versuchstiere. Die marginale Zn-Versorgung resultierte in keinen sichtbaren und statistisch abzusichernden Verschiebungen innerhalb der FS-Familien, obwohl in Gruppe III insbesondere bei den n-6-FS eine Tendenz zu niedrigeren FS-Konzentrationen als in Gruppe IV vermutet werden könnte.

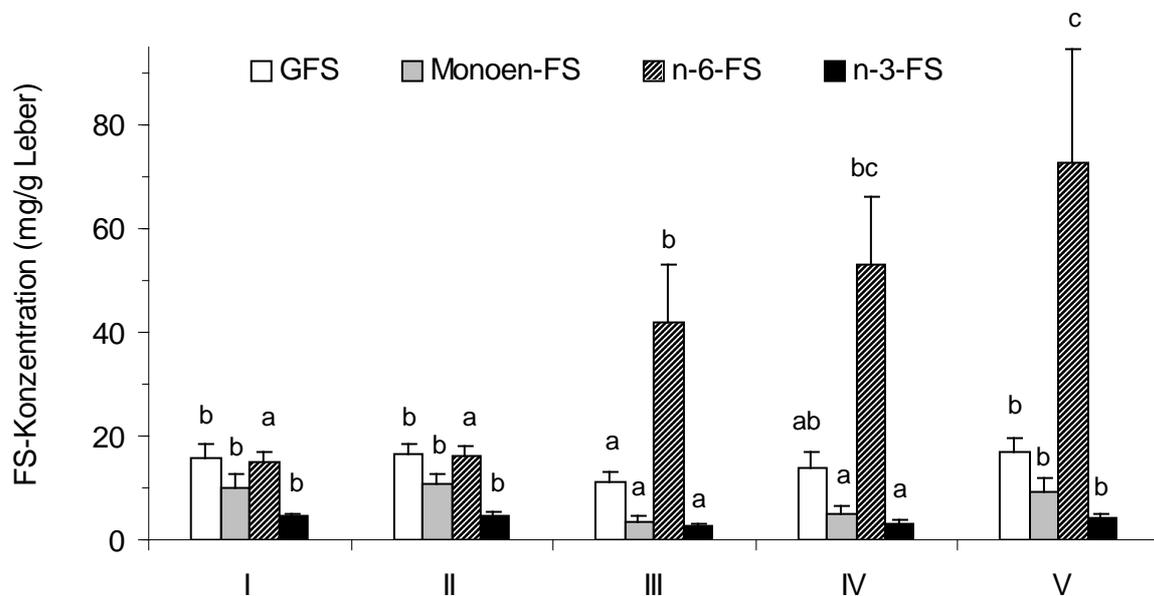


Abbildung 17: Summierte Fettsäuregehalte in den Gesamtlipiden der Leber

Innerhalb eines Parameters sind signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen durch unterschiedliche Buchstaben angezeigt (einfaktorielle Varianzanalyse, $p < 0,05$), n-6-FS-Statistik nach Transformation (ln).

Früher dokumentierte Effekte eines Zn-Mangels auf das FS-Muster waren jeweils abhängig vom verwendeten Futterfett (EDER und KIRCHGESSNER 1993, ROTH und KIRCHGESSNER 1993, EDER und KIRCHGESSNER 1994a, 1994d, 1995a, 1996b). In der vorliegenden Untersuchung ergaben sich zinkmangelbedingte Unterschiede im prozentualen Gehalt oder der Konzentration einzelner FS zwischen den zwei GFS-Gruppen I und II weder bei den GL, noch bei den PL. Nur in den TG war bei den marginal zinkversorgten Tiere der Anteil der gesättigten FS C 16:0 niedriger (Übersicht 26). Dies steht im Kontrast zu höheren Anteilen gesättigter und einfach ungesättigter FS, die im Zn-Mangel in den oben genannten *force feeding*-Studien insbesondere bei gesättigten Fetten wie Kokosöl ermittelt und auf eine gesteigerte endogene FS-Synthese zurückgeführt wurden.

Im Fall der UFS-Gruppen zeigten sich zwischen der marginal zinkversorgten UFS-Gruppe III und der 50Zn-UFS-Gruppe IV mit identischer Futteraufnahme Unterschiede im FS-Muster der GL und PL, aber keine Differenzen bei den TG. In Gruppe III war der Anteil von C 20:1

n-9 an den GL- und PL-FS niedriger als in der *pair fed*-Gruppe IV, aber nicht niedriger als in der 50Zn-*ad libitum*-Gruppe V. Ähnlich war die Konzentration an C 20:2 n-6 in den hepatischen GL der Gruppe III und der C 20:2 n-6-Anteil an den PL-FS der Gruppen III und V niedriger als in Gruppe IV. In Gruppe III war auch der Anteil an C 20:3 n-6 in den GL-FS und PL-FS sowie die Konzentration in den GL niedriger als in Gruppe IV, aber anteilig nicht gegenüber der *ad libitum*-Gruppe V reduziert.

Konsistent wurden im Zn-Mangel reduzierte Arachidonsäure- und/oder erhöhte Linolsäuregehalte bzw. ein erhöhtes C 18:2 n-6/C 20:4 n-6-Verhältnis mit einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels essentieller FS durch eine reduzierte Aktivität der $\Delta 6$ -Desaturase bzw. der $\Delta 5$ -Desaturase erklärt (BETTGER et al. 1979, CUNNANE et al. 1984, 1988, EDER und KIRCHGESSNER 1993, 1996c). Obwohl EDER und KIRCHGESSNER (1995a) eine nicht verminderte Aktivität der $\Delta 6$ - und $\Delta 5$ -Desaturasen im Zn-Mangel ermittelt hatten, führten sie niedrigere n-6-FS-Gehalte der PL wegen höherer C 18:2, C 20:3 und niedrigerer C 20:4, C 22:4 und C 22:5 n-6-Level, die sie nach Supplementation der fettfreien Diät mit 5 % Distelöl gefunden hatten, auf eine reduzierte Desaturaseaktivität zurück (EDER und KIRCHGESSNER 1996c). Im Widerspruch dazu berichteten KUDO et al. (1990) von einer etwas höheren *in vivo*-Konversion von ^{14}C -Linolsäure bei fettfrei *ad libitum*-ernährten Zn-Mangelratten.

Wie bereits erwähnt war der C 20:3 n-6-Gehalt der PL in der 7Zn-UFS-Gruppe III nicht niedriger als in der 50Zn-*ad libitum*-Gruppe V, das Verhältnis C 18:2 n-6/C 20:3 n-6 war hingegen in Gruppe III mit $31,2 \pm 5,5$ deutlich höher und unterschied sich signifikant von beiden 50Zn-Gruppen ($19,2 \pm 3,0$ in Gruppe IV und $21,7 \pm 6,2$ in Gruppe V). Ein höheres Verhältnis würde jedoch eher auf eine verminderte Aktivität der Elongase im Verlauf der Arachidonsäure-Synthese (siehe auch NAKAMURA und NARA 2004) hinweisen.

Aus dem relativ konstanten Arachidonsäuregehalt der PL und der sehr viel niedrigeren Linolsäureaufnahme der GFS-Gruppen ergab sich auch ein deutlich niedrigeres C 18:2/C 20:4-Verhältnis in den PL der Gruppen I und II ($0,13 \pm 0,03$ bzw. $0,12 \pm 0,03$), und folglich eine höhere Desaturierungsrate als in den UFS-Gruppen. Das C 18:2/C 20:4-Verhältnis der 7Zn-UFS-Gruppe III unterschied sich nicht von der 50Zn-*pair fed*-Gruppe IV ($0,28 \pm 0,03$ vs. $0,26 \pm 0,03$) und lässt somit auf eine nicht verminderte Desaturierungsrate schließen. Der Quotient in der *ad libitum*-Gruppe V ($0,19 \pm 0,02$) war durch den niedrigeren C 18:2-Anteil in den PL-FS niedriger als in den Gruppen III und IV und bestätigt den von CUNNANE et al. (1984) konstatierten Einfluss des *pair feeding* auf das C 18:2/C 20:4-Verhältnis in den PL.

In den GL war das Verhältnis von C 18:2 n-6 zu C 20:4 n-6 in der *ad libitum*-Gruppe V signifikant höher als in den UFS-Gruppen III und IV ($2,32 \pm 0,41$ vs. $1,62 \pm 0,37$ und $1,66 \pm 0,25$). Dies kongruiert mit den Daten von REICHLMAYR-LAIS und KIRCHGESSNER (1994), aus denen sich für die Zn-Mangel- und die *pair fed*-Gruppe ebenfalls niedrigere

C 18:2/C 20:4-Quotienten ergaben und die im Wesentlichen auf die reduzierte Futteraufnahme zurückgeführt wurden. In der vorliegenden Untersuchung war auch die Summe der Desaturaseprodukte der Linolsäure (C 18:3 n-6 + C 20:3 n-6 + C 20:4 n-6) relativ zum Linolsäuregehalt zwischen den 7Zn- und den 50Zn-*pair fed*-Gruppen nicht verschieden. Statistisch konnte weder für das Verhältnis von Linolsäure zu Arachidonsäure noch für die Summe der Desaturaseprodukte ein Einfluss der Zn-Versorgung abgesichert werden. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen demzufolge eindeutig gegen eine dezimierte Linolsäure-desaturierung bei marginaler Zn-Versorgung.

Proportionale oder quantitative Unterschiede im FS-Muster zwischen restriktiv und *ad libitum* ernährten Versuchstieren wurden für differierende individuelle FS in vielen Arbeiten dokumentiert. Die höheren C 18:0-, C 20:4 n-6- und niedrigeren C 18:1- und C 18:2 n-6-Anteile in den UFS-Gruppen III und IV gegenüber der *ad libitum*-Gruppe V mit ca. 55 % höherer Futteraufnahme können zum einen von der unterschiedlichen Höhe der FS-Zufuhr und zum anderen von der Energierestriktion *per se* herrühren. JONES et al. (1995) fanden bei gleich hoher FS-Aufnahme unabhängig vom eingesetzten Futterfett höhere C 18:0- und niedrigere 16:0-Gehalte durch die Reduktion der Energiezufuhr auf 68 %. Quantitative Unterschiede zwischen den Gruppen III/IV und V sind sicher maßgeblich auf die höhere FS-Aufnahme und den damit einhergehenden höheren Fettgehalt der Leber der Gruppe V (Übersicht 22) zurückzuführen.

Letztlich offenbarte das FS-Muster der GL, TG und PL keine fundamentalen Unterschiede bei marginaler Zn-Versorgung und wies anteilig nicht mehr ungesättigte FS in den Lipiden der Zn-Mangeltiere auf, was ein Indiz für eine gravierend beeinträchtigte Degradation ungesättigter FS hätte sein können. Die Akkumulation ungesättigter FS im hepatischen FS-Muster ECI-defizitärer Mäuse (JANSSEN und STOFFEL 2002) manifestierte sich jedoch erst nach einem 48stündigen Nahrungsentzug. Ein unverändertes FS-Muster der in der vorliegenden Arbeit ausreichend energiever sorgten Zn-Mangeltiere stellt insofern keinen Widerspruch zur niedrigeren ECI-Aktivität in der 7Zn-UFS-Gruppe III dar.

5.7 Fazit

Bei marginaler Zinkversorgung und hoher Aufnahme ungesättigter Fettsäuren ergab sich eine signifikant verminderte Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase-Aktivität in der Leber wachsender Ratten. Ein möglicherweise durch die Energierestriktion der *pair fed*-Gruppe bedingter Unterschied konnte anhand der ECI-Aktivität in der *ad libitum*-Gruppe V (50Zn-UFS) ausgeschlossen werden. Die generell geringere ECI-Aktivität in den GFS-Gruppen zeigte keine Veränderung im Zn-Mangel. Als Hilfsenzym der β -Oxidation ungesättigter FS unterlag die ECI in der vorliegenden Untersuchung eindeutig einer Regulation durch alimentäre FS in Form einer Aktivitätssteigerung durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren.

Für die Expression der ECI bestätigte sich indes keine Abhängigkeit vom alimentären FS-Muster, von der Höhe der Zinkversorgung (7 mg/kg versus 50 mg/kg) oder von der Expressionshöhe des PPAR α . Letztere wurde durch die Futterrestriktion in beiden *pair fed*-Gruppen um mehr als den Faktor 2, aber nicht durch die ungesättigten FS der UFS-Diät induziert. Die Modulation der ECI-Aktivität durch Zink oder FS scheint daher auf einer posttranskriptionalen Ebene erfolgt zu sein.

Das FS-Muster der Leber offenbarte weder in den Gesamtlipiden, noch in der TG- oder PL-Fraktion grundlegende Unterschiede in Abhängigkeit von der Zn-Versorgung und wies im Fall der Zn-Mangeltiere nicht mehr ungesättigte FS auf. Auch die Ketonkörperkonzentration im Urin gab kein Indiz auf eine gestörte β -Oxidation ungesättigter FS. Vermutlich führt die geringere ECI-Aktivität, ähnlich wie bei ECI-Null-Mäusen (JANSSEN und STOFFEL 2002), erst in Folge einer längeren Nahrungskarenz zu messbaren Verschiebungen im hepatischen FS-Muster.

Die Kombination aus marginalem Zn-Mangel und hoher Aufnahme ungesättigter FS verschlechterte außerdem den Zn-Status der Versuchstiere. Die 7Zn-UFS-Tiere zeigten eine stärker reduzierte *ad libitum*-Futteraufnahme (um 27 % gegenüber den GFS-Tieren) und in Folge der stärkeren Reduktion nahmen sie auch weniger Zink auf. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der Unterschied zur GFS-Gruppe gleichzeitig auf einer direkten Beeinflussung der intestinalen Zn-Absorption durch die alimentären FS basiert. Die Befunde zur Zn-Konzentration im Plasma, Femur und in der Leber deuten ebenfalls in diese Richtung.

Obwohl es eine identische Futteraufnahme der Versuchstiere mit marginaler und mit adäquater Zn-Versorgung gewährleistete, beeinflusste das Fütterungsprotokoll (*pair feeding*) die PPAR α -Expression, die Ketonkörperkonzentration im Plasma und möglicherweise auch die Höhe der Plasmalipide. Eine Verringerung der Effekte der restriktiven Fütterung könnte möglicherweise durch eine bessere zeitliche Synchronisation der Futteraufnahme

erreicht werden. Auch bleibt zu prüfen, ob die Effekte der alimentären FS bei adulten Zinkmangeltieren vergleichbar und unabhängig von einer reduzierten Wachstumsrate sind.

Ein Zn-Defizit resultiert in komplexen Veränderungen im gesamten Lipidstoffwechsel. Zink ist ein regulatorisches, katalytisches oder strukturelles Element hunderter Proteine, und im experimentellen Zn-Mangel sind weitere essentielle Ebenen des Intermediärstoffwechsels gleichzeitig betroffen (MOORE et al. 2003, PFAFFL und WINDISCH 2003, TOM DIECK et al. 2003, FRAKER und KING 2004). Ob die reduzierte Aktivität der ECI ein primärer Effekt des Zn-Mangels ist oder auf sekundären Mechanismen beruht, die durch eine Reduktion des Wachstums und der Energiebereitstellung aus FS eine nicht ausreichende Zn-Versorgung zu kompensieren suchen und dadurch eine längere Überlebensdauer sichern, bleibt noch zu klären.

6 Zusammenfassung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Zinkversorgung und des Sättigungsgrades alimentärer Fettsäuren (FS) auf die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase (ECI) als essentielles Enzym der β -Oxidation ungesättigter FS und auf verschiedene charakteristische Merkmale des Lipidstoffwechsels am Modelltier Ratte zu untersuchen.

Es wurden 5 x 8 entwöhnte männliche Wistar-Ratten mit einer Anfangsmasse von 50,8 g über 4 Wochen mit halbsynthetischen Diäten auf der Basis von Eiklarprotein, Saccharose und Maisstärke ernährt, die einen marginalen oder bedarfsdeckenden Zinkgehalt (7 mg/kg bzw. 50 mg/kg Diät) und 22 % Kakaobutter (GFS) oder Distelöl (UFS) als pflanzliche Quellen langkettiger gesättigter bzw. ungesättigter FS plus jeweils 3 % Sojaöl enthielten. Um Effekten einer verminderten Futteraufnahme der marginal zinkversorgten Versuchsgruppen I (7Zn-GFS) und III (7Zn-UFS) zu begegnen, wurden die adäquat zinkversorgten Gruppen II (50Zn-GFS) und IV (50Zn-UFS) entsprechend restriktiv ernährt (*pair feeding*); zusätzlich wurde eine *ad libitum*-Kontrollgruppe (50Zn-UFS, Gruppe V) mitgeführt.

Als Zinkstatusparameter wurden die Zinkkonzentrationen im Femur, im Plasma und in der Leber, die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Plasma und der Metallothioneingehalt der Leber analysiert. Zur Beschreibung des Lipidstoffwechsels wurden die Gehalte an Gesamtlipiden (GL), Cholesterin (Chol), Triglyceriden (TG) und Phospholipiden (PL) in der Leber und das Lipidprofil des Plasmas herangezogen. Aus den entnommenen Organen Leber, Nieren, Testes, Herz, der Skelettmuskulatur und dem Fettgewebe wurden durch differentielle Zentrifugation mitochondrienreiche Fraktionen gewonnen, in denen die Aktivität der ECI mit *trans*-3-Hexenoyl-CoA bestimmt und zusätzlich auf die Aktivität der Succinatdehydrogenase (SDH) als mitochondrialen Marker bezogen wurde. Die Analyse des FS-Musters der TG, PL und GL der Leber erfolgte mittels Gaschromatographie (GC) der FS-Methylester, und die Genexpressionsanalysen (ECI, PPAR α , PPAR γ) mithilfe semiquantitativer Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).

Die marginale alimentäre Zinkversorgung führte zu einem signifikant beeinträchtigten Zinkstatus beider 7Zn-Gruppen. Gleichzeitig äußerte sich der Einfluss der ungesättigten FS in einer niedrigeren Futteraufnahme, einer geringeren Lebendmasse und stärker reduzierten Zinkkonzentrationen.

Die Aktivität der ECI der Leber betrug in den GFS-Gruppen I und II 2,4 bzw. 2,8 U/mg Protein und war im Mittel 68 % niedriger als in den UFS-Gruppen IV und V (8,2 bzw. 8,0 U/mg Protein). Die marginale Zinkversorgung der 7Zn-UFS-Gruppe III resultierte in einer signifikant geringeren ECI-Aktivität (5,9 U/mg Protein, entsprechend 72 % der 50Zn-UFS-

Gruppe IV). Ein möglicherweise durch die Energierestriktion der *pair fed*-Gruppe IV bedingter Unterschied konnte anhand der Aktivität in der *ad libitum*-Gruppe V (50Zn-UFS) ausgeschlossen werden. Die ECI-Aktivität in den GFS-Gruppen zeigte keine signifikante Veränderung durch den Zinkmangel.

Die mRNA-Expression der ECI lag in der Leber in allen fünf Versuchsgruppen auf gleichem Niveau. Die Aktivität der ECI der Herzmuskulatur, der Skelettmuskulatur, der Niere, des Testis und des Fettgewebes wurde weder von der Zn-Versorgung noch von der alimentären Fettquelle beeinflusst. Generell ergaben sich identische Resultate für die ECI-SDH-Relation wie für die spezifische ECI-Aktivität.

Die GFS-Diät führte zu statistisch höheren Chol- und TG-Konzentrationen im Plasma sowie zu einem niedrigeren Gesamtfettgehalt, zu niedrigeren Chol- und TG-Konzentrationen und höheren PL-Konzentrationen in der Leber. Geringe Unterschiede zwischen marginal und adäquat zinkversorgten Versuchsgruppen stellten in der Mehrzahl Effekte der restriktiven Fütterung bzw. der Höhe der Futteraufnahme dar.

Das FS-Muster der Leberlipide reflektierte das Muster der alimentären FS. In den GL und TG der GFS-Gruppen waren sowohl die charakteristischen FS der Kakaobutter (Palmitin-, Stearin-, Ölsäure) als auch Δ^9 -Desaturaseprodukte (C 16:1 und C 20:1) und n-3-FS in höheren prozentualen Anteilen präsent. Bei den UFS-Gruppen war Linolsäure als dominierende FS des Distelöls sowie C 18:3 n-6, C 20:3 n-6 und C 22:4 n-6 in höheren Anteilen nachzuweisen. Die PL der GFS-Tiere wiesen deutlich mehr Docosahexaensäure auf. Zwischen Gruppe III (7Zn-UFS) und IV (50Zn-UFS) fanden sich Unterschiede im FS-Muster von GL und PL nur im Gehalt an C 20:1 n-9, C 20:2 n-6 und C 20:3 n-6. Das Linolsäure/Arachidonsäure-Verhältnis war bei marginaler Zinkversorgung nicht gegenüber den jeweiligen *pair fed*-Gruppen erhöht.

Die Expression des *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) alpha* war in beiden *pair fed*-Gruppen um mehr als den Faktor 2 höher als in den *ad libitum*-Gruppen. Eine Abhängigkeit vom eingesetzten Diätfett wurde nicht festgestellt. *PPARgamma* wies in der Leber aller fünf Versuchsgruppen eine einheitliche mRNA-Expression auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass Distelöl im Vergleich zu Kakaobutter die Aktivität der hepatischen Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase (ECI) erhöht, und dass die ECI in der Leber als dem zentralen Organ des Zink- und Lipidstoffwechsels einem Aktivitätsverlust im marginalen Zinkmangel unterliegt. Dies könnte einen verminderten Abbau ungesättigter FS bei marginaler Zn-Versorgung signalisieren. Das FS-Muster der Leber, welches deutlich durch die alimentären FS beeinflusst wurde, ließ hingegen keine verminderte Desaturaseaktivität und keine beeinträchtigte Degradation ungesättigter FS im marginalen Zinkmangel erkennen.

7 Literaturverzeichnis

- ABBASI A., SHETTY K. (1999): Zink: Pathophysiologische Effekte, Mangelzustände und Wirkungen einer Supplementierung bei älteren Personen - ein Forschungsüberblick. *Z. Gerontol. Geriatr.* **32** Suppl 1, I75-I79
- AGGETT P.J., FAVIER A. (1993): *Zinc. Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **63**, 301-307
- ANDREINI C., BANCI L., BERTINI I., ROSATO A. (2006): Counting the zinc-proteins encoded in the human genome. *J. Proteome. Res.* **5**, 196-201
- AOYAMA T., PETERS J.M., IRITANI N., NAKAJIMA T., FURIHATA K., HASHIMOTO T., GONZALEZ F.J. (1998): Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J. Biol. Chem.* **273**, 5678-5684
- APGAR J.L., SHIVELY C.A., TARKA S.M., JR. (1987): Digestibility of cocoa butter and corn oil and their influence on fatty acid distribution in rats. *J. Nutr.* **117**, 660-665
- AYALA S., BRENNER R.R. (1983): Essential fatty acid status in zinc deficiency. Effect on lipid and fatty acid composition, desaturation activity and structure of microsomal membranes of rat liver and testes. *Acta Physiol. Lat. Am.* **33**, 193-204
- BAO B., PRASAD A.S., BECK F.W., GODMERE M. (2003): Zinc modulates mRNA levels of cytokines. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **285**, E1095-E1102
- BARTLETT K., EATON S. (2004): Mitochondrial beta-oxidation. *Eur. J. Biochem.* **271**, 462-469
- BEATTIE J.H., WOOD A.M., TRAYHURN P., JASANI B., VINCENT A., MCCORMACK G., WEST A.K. (2000): Metallothionein is expressed in adipocytes of brown fat and is induced by catecholamines and zinc. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **278**, R1082-R1089
- BETTGER W.J., O' DELL B.L. (1993): Physiological roles of zinc in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Nutr. Biochem.* **4**, 194-207
- BETTGER W.J., REEVES P.G., MOSCATELLI E.A., REYNOLDS G., O'DELL B.L. (1979): Interaction of zinc and essential fatty acids in the rat. *J. Nutr.* **109**, 480-488
- BEYERSMANN D., HAASE H. (2001): Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals* **14**, 331-341
- BLACK R.E. (2003): Zinc deficiency, infectious disease and mortality in the developing world. *J. Nutr.* **133**, 1485S-1489S
- BLANCHARD R.K., COUSINS R.J. (1996): Differential display of intestinal mRNAs regulated by dietary zinc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 6863-6868
- BLANCHARD R.K., COUSINS R.J. (2000): Regulation of Intestinal Gene Expression by Dietary Zinc: Induction of Uroguanylin mRNA by Zinc Deficiency. *J. Nutr.* **130**, 1393S-1398S
- BLANCHARD R.K., MOORE J.B., GREEN C.L., COUSINS R.J. (2001): Modulation of intestinal gene expression by dietary zinc status: effectiveness of cDNA arrays for expression profiling of a single nutrient deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 13507-13513
- BÖSCH-SAADATMANDI C. (2004): Zum Einfluss von Nahrungslipiden bei marginaler Zinkversorgung auf den Zinkstatus, Lipidstoffwechsel und antioxidative Merkmale bei der wachsenden Labormaus. Dissertation, Ernährungswissenschaften, Universität Gießen.
- BRADFORD M.M. (1976): 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
- BRAND I.A., KLEINEKE J. (1996): Intracellular zinc movement and its effect on the carbohydrate metabolism of isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 1941-1949
- BREMNER I., DAVIES N.T. (1975): The induction of metallothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake. *Biochem. J.* **149**, 733-738

- BRIEFEL R.R., BIALOSTOSKY K., KENNEDY-STEPHENSON J., MCDOWELL M.A., ERVIN R.B., WRIGHT J.D. (2000): Zinc intake of the U.S. population: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *J. Nutr.* **130**, 1367S-1373S
- BROWN K.H., WUEHLER S.E., PEERSON J.M. (2001): The importance of zinc in human nutrition and estimation of the global prevalence of zinc deficiency. *Food Nutr. Bull.* **22**, 113-125
- CAMARA F., AMARO M.A. (2003): Nutritional aspect of zinc availability. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **54**, 143-151
- CHOMCZYNSKI P., SACCHI N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159
- CHU C.H., KUSHNER L., CUEBAS D., SCHULZ H. (1984): The activity of 3-hydroxyacyl-CoA epimerase is insufficient to account for the rate of linoleate oxidation in rat heart mitochondria. Evidence for a modified pathway of linoleate degradation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **118**, 162-167
- CLARKE S.D. (2001): Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. I. Molecular mechanism for polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**, G865-G869
- CLARKE S.D. (2004): The multi-dimensional regulation of gene expression by fatty acids: polyunsaturated fats as nutrient sensors. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 13-18
- CLARKE S.D., JUMP D.B. (1994): Dietary polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription. *Annu. Rev. Nutr.* **14**, 83-98
- CLEJAN S., CASTRO-MAGANA M., COLLIPP P.J., JONAS E., MADDIAH V.T. (1982): Effects of zinc deficiency and castration on fatty acid composition and desaturation in rats. *Lipids* **17**, 129-135
- CLEJAN S., MADDIAH V.T., CASTRO-MAGANA M., COLLIPP P.J. (1981): Zinc deficiency induced changes in the composition of microsomal membranes and in the enzymatic regulation of glycerolipid synthesis. *Lipids* **16**, 454-460
- COUSINS R.J. (1998): A role of zinc in the regulation of gene expression. *Proc. Nutr. Soc.* **57**, 307-311
- COUSINS R.J. (1994): Metal elements and gene expression. *Annu. Rev. Nutr.* **14**, 449-469
- COUSINS R.J., BLANCHARD R.K., MOORE J.B., CUI L., GREEN C.L., LIUZZI J.P., CAO J., BOBO J.A. (2003): Regulation of zinc metabolism and genomic outcomes. *J. Nutr.* **133**, 1521S-1526S
- COYLE P., PHILCOX J.C., CAREY L.C., ROFE A.M. (2002): Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 627-647
- CRAGG R.A., CHRISTIE G.R., PHILLIPS S.R., RUSSI R.M., KURY S., MATHERS J.C., TAYLOR P.M., FORD D. (2002): A novel zinc-regulated human zinc transporter, hZTL1, is localized to the enterocyte apical membrane. *J. Biol. Chem.* **277**, 22789-22797
- CUNNANE S.C. (1982): Maternal essential fatty acid supplementation increases zinc absorption in neonatal rats: relevance to the defect in zinc absorption in acrodermatitis enteropathica. *Pediatr. Res.* **16**, 599-603
- CUNNANE S.C. (1985): Zinc deficiency, reduced food intake and essential fatty acids. *J. Nutr.* **115**, 500-501
- CUNNANE S.C. (1988): Evidence that adverse effects of zinc deficiency on essential fatty acid composition in rats are independent of food intake. *Br. J. Nutr.* **59**, 273-278
- CUNNANE S.C., HORROBIN D.F. (1980): Parenteral linoleic and gamma-linolenic acids ameliorate the gross effects of zinc deficiency. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **164**, 583-588
- CUNNANE S.C., HORROBIN D.F., MANKU M.S. (1984): Essential fatty acids in tissue phospholipids and triglycerides of the zinc-deficient rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **177**, 441-446
- CUNNANE S.C., YANG J., CHEN Z.Y. (1993): Low zinc intake increases apparent oxidation of linoleic and alpha-linolenic acids in the pregnant rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **71**, 205-210
- DANIEL H., TOM DIECK H. (2004): Nutrient-gene interactions: a single nutrient and hundreds of target genes. *Biol. Chem.* **385**, 571-583

- DAVIS S.R., COUSINS R.J. (2000): Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J. Nutr.* **130**, 1085-1088
- DEUTSCHE GESELLSCHAFT FÜR KLINISCHE CHEMIE (1972): Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten. *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* **8**, 658-660
- DGE (2000): Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Auflage, Umschau/Braus, Frankfurt/Main.
- DISILVESTRO R.A., BLOSTEIN-FUJII A. (1997): Moderate zinc deficiency in rats enhances lipoprotein oxidation in vitro. *Free Radic. Biol. Med.* **22**, 739-742
- DOMMES V., KUNAU W.H. (1984): 2,4-Dienoyl coenzyme A reductases from bovine liver and *Escherichia coli*. Comparison of properties. *J. Biol. Chem.* **259**, 1781-1788
- DONANGELO C.M., ZAPATA C.L., WOODHOUSE L.R., SHAMES D.M., MUKHERJEA R., KING J.C. (2005): Zinc absorption and kinetics during pregnancy and lactation in Brazilian women. *Am. J. Clin. Nutr.* **82**, 118-124
- DREOSTI I.E. (2001): Zinc and the gene. *Mutat. Res.* **475**, 161-167
- DRISCOLL E.R., BETTGER W.J. (1992): Zinc deficiency in the rat alters the lipid composition of the erythrocyte membrane Triton shell. *Lipids* **27**, 972-977
- DUFNER-BEATTIE J., WANG F., KUO Y.M., GITSCHIER J., EIDE D., ANDREWS G.K. (2003): The acrodermatitis enteropathica gene ZIP4 encodes a tissue-specific, zinc-regulated zinc transporter in mice. *J. Biol. Chem.* **278**, 33474-33481
- EATON D.L., TOAL B.F. (1982): Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **66**, 134-142
- EATON S., BARTLETT K., POURFARZAM M. (1996): Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem. J.* **320 (Pt 2)**, 345-357
- EDER K., KIRCHGESSNER M. (1993): Zum Einfluß von Zinkdepletion auf Fettgehalt und Fettsäurezusammensetzung von Leber und Gehirn bei zwangsernährten Ratten. *Z. Ernährungswiss.* **32**, 187-197
- EDER K., KIRCHGESSNER M. (1994a): Dietary fat influences the effect of zinc deficiency on liver lipids and fatty acids in rats force-fed equal quantities of diet. *J. Nutr.* **124**, 1917-1926
- EDER K., KIRCHGESSNER M. (1994b): Levels of polyunsaturated fatty acids in tissues from zinc-deficient rats fed a linseed oil diet. *Lipids* **29**, 839-844
- EDER K., KIRCHGESSNER M. (1994c): The effect of zinc deficiency on erythrocyte membrane lipids of force-fed rats receiving a diet containing coconut oil or fish oil. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **8**, 63-73
- EDER K., KIRCHGESSNER M. (1994d): Zum Einfluß von Zinkmangel auf die Lipide von Herz und Gehirn bei zwangsernährten Ratten mit Kokosfett- oder Fischöldiät. *Z. Ernährungswiss.* **33**, 136-145
- EDER K., KIRCHGESSNER M. (1995a): Activities of liver microsomal fatty acid desaturases in zinc-deficient rats force-fed diets with a coconut oil/safflower oil mixture or linseed oil. *Biol. Trace Elem. Res.* **48**, 215-229
- EDER K., KIRCHGESSNER M. (1995b): Zinc deficiency and activities of lipogenic and glycolytic enzymes in liver of rats fed coconut oil or linseed oil. *Lipids* **30**, 63-69
- EDER K., KIRCHGESSNER M. (1996a): Effects of zinc deficiency on concentrations of lipids in liver and plasma of rats. *Trace Elem. Electrolytes* **13**, 60-65
- EDER K., KIRCHGESSNER M. (1996b): The effect of dietary fat on activities of lipogenic enzymes in liver and adipose tissue of zinc-adequate and zinc deficient rats. *J. Nutr. Biochem.* **7**, 190-195
- EDER K., KIRCHGESSNER M. (1996c): Zinc deficiency and the desaturation of linoleic acid in rats force-fed fat-free diets. *Biol. Trace Elem. Res.* **54**, 173-183
- EDER K., KIRCHGESSNER M. (1997): Concentrations of lipids in plasma and lipoproteins and oxidative susceptibility of low-density lipoproteins in zinc-deficient rats fed linseed oil or olive oil. *J. Nutr. Biochem.* **8**, 461-468

- EL HENDY H.A., YOUSEF M.I., BO EL-NAGA N.I. (2001): Effect of dietary zinc deficiency on hematological and biochemical parameters and concentrations of zinc, copper, and iron in growing rats. *Toxicology* **167**, 163-170
- ELLMAN G.L. (1959): Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**, 70-77
- EULER-BERTRAM S., STOFFEL W. (1990): Purification and characterization of bovine liver 3-cis-2-trans-enoyl-CoA isomerase. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **371**, 603-610
- FERNANDEZ M.L., WEST K.L. (2005): Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. *J. Nutr.* **135**, 2075-2078
- FIELD C.J., JOHNSON I.R., SCHLEY P.D. (2002): Nutrients and their role in host resistance to infection. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 16-32
- FISCHER W.C., BLACK R.E. (2004): Zinc and the risk for infectious disease. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 255-275
- FONG J.C., SCHULZ H. (1981): Short-chain and long-chain enoyl-CoA hydratases from pig heart muscle. *Methods Enzymol.* **71** Pt C, 390-398
- FORD D. (2004): Intestinal and placental zinc transport pathways. *Proc. Nutr. Soc.* **63**, 21-29
- FRAKER P.J. (2005): Roles for cell death in zinc deficiency. *J. Nutr.* **135**, 359-362
- FRAKER P.J., KING L.E. (2004): Reprogramming of the immune system during zinc deficiency. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 277-298
- FREDERIKSEN K.S., WULFF E.M., SAUERBERG P., MOGENSEN J.P., JEPPESEN L., FLECKNER J. (2004): Prediction of PPAR-alpha ligand-mediated physiological changes using gene expression profiles. *J. Lipid Res.* **45**, 592-601
- GAITHER L.A., EIDE D.J. (2001): Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals* **14**, 251-270
- GARCIA J.J., MARTINEZ-BALLARIN E., MILLAN-PLANO S., ALLUE J.L., ALBENDEA C., FUENTES L., ESCANERO J.F. (2005): Effects of trace elements on membrane fluidity. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **19**, 19-22
- GEISBRECHT B.V., ZHANG D., SCHULZ H., GOULD S.J. (1999): Characterization of PECL, a novel monofunctional delta(3), delta(2)-enoyl-CoA isomerase of mammalian peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **274**, 21797-21803
- GERVOIS P., TORRA I.P., FRUCHART J.C., STAELS B. (2000): Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin. Chem. Lab Med.* **38**, 3-11
- GOLDMAN P., VAGELOS P.R. (1961): The specificity of triglyceride synthesis from diglycerides in chicken adipose tissue. *J. Biol. Chem.* **236**, 2620-2623
- GRAY S.L., DALLA N.E., VIDAL-PUIG A.J. (2005): Mouse models of PPAR-gamma deficiency: dissecting PPAR-gamma's role in metabolic homeostasis. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1053-1058
- GREELEY S., SANDSTEAD H.H. (1983): Oxidation of alanine and beta-hydroxybutyrate in late gestation by zinc-restricted rats. *J. Nutr.* **113**, 1803-1810
- GREGERSEN N., BROSS P., ANDRESEN B.S. (2004): Genetic defects in fatty acid beta-oxidation and acyl-CoA dehydrogenases. Molecular pathogenesis and genotype-phenotype relationships. *Eur. J. Biochem.* **271**, 470-482
- GRIDER A., BAILEY L.B., COUSINS R.J. (1990): Erythrocyte metallothionein as an index of zinc status in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**, 1259-1262
- GRUNDY S.M. (1994): Influence of stearic acid on cholesterol metabolism relative to other long-chain fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* **60**, 986S-990S
- GURVITZ A., WABNEGGER L., YAGI A.I., BINDER M., HARTIG A., RUIS H., HAMILTON B., DAWES I.W., HILTUNEN J.K., ROTTENSTEINER H. (1999): Function of human mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductase and rat monofunctional Delta3-Delta2-enoyl-CoA isomerase in beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *Biochem. J.* **344** Pt 3, 903-914

- GUZMAN M., GEELEN M.J. (1993): Regulation of fatty acid oxidation in mammalian liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1167**, 227-241
- HAKKOLA E.H., HILTUNEN J.K., UTIO-HARMAINEN H.I. (1994): Mitochondrial 2,4-dienoyl-CoA reductases in the rat: differential responses to clofibrate treatment. *J. Lipid Res.* **35**, 1820-1828
- HALL A.G., KELLEHER S.L., LONNERDAL B., PHILIPPS A.F. (2005): A graded model of dietary zinc deficiency: effects on growth, insulin-like growth factor-I, and the glucose/insulin axis in weanling rats. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **41**, 72-80
- HALL T.M. (2005): Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 367-373
- HALVORSEN B., RUSTAN A.C., MADSEN L., RESELAND J., BERGE R.K., SLETNES P., CHRISTIANSEN E.N. (2001): Effects of long-chain monounsaturated and n-3 fatty acids on fatty acid oxidation and lipid composition in rats. *Ann. Nutr. Metab.* **45**, 30-37
- HAMBIDGE M. (2003a): Biomarkers of trace mineral intake and status. *J. Nutr.* **133** Suppl 3, 948S-955S
- HAMBIDGE M. (2003b): Underwood memorial lecture: human zinc homeostasis: good but not perfect. *J. Nutr.* **133**, 1438S-1442S
- HAMBIDGE M. (2000): Human zinc deficiency. *J. Nutr.* **130**, 1344S-1349S
- HARA A., RADIN N.S. (1978): Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* **90**, 420-426
- HARA H., KONISHI A., KASAI T. (2000): Contribution of the cecum and colon to zinc absorption in rats. *J. Nutr.* **130**, 83-89
- HASHIMOTO T., COOK W.S., QI C., YELDANDI A.V., REDDY J.K., RAO M.S. (2000): Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. *J. Biol. Chem.* **275**, 28918-28928
- HEMPE J.M., COUSINS R.J. (1992): Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats. *J. Nutr.* **122**, 89-95
- HENNIG B., MEERARANI P., TOBOREK M., MCCLAIN C.J. (1999): Antioxidant-like properties of zinc in activated endothelial cells. *J. Am. Coll. Nutr.* **18**, 152-158
- HIHI A.K., MICHALIK L., WAHLI W. (2002): PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives. *Cell Mol. Life Sci.* **59**, 790-798
- HILTUNEN J.K., QIN Y. (2000): Beta-oxidation - strategies for the metabolism of a wide variety of acyl-CoA esters. *Biochim. Biophys. Acta* **1484**, 117-128
- HOFFMANN W.E., EVERDS N., PIGNATELLO M., SOLTER P.F. (1994): Automated and semiautomated analysis of rat alkaline phosphatase isoenzymes. *Toxicol. Pathol.* **22**, 633-638
- HUANG Y.S., CUNNANE S.C., HORROBIN D.F., DAVIGNON J. (1982): Most biological effects of zinc deficiency corrected by gamma-linolenic acid (18: 3 omega 6) but not by linoleic acid (18: 2 omega 6). *Atherosclerosis* **41**, 193-207
- IDE T., KOBAYASHI H., ASHAKUMARY L., ROUYER I.A., TAKAHASHI Y., AOYAMA T., HASHIMOTO T., MIZUGAKI M. (2000): Comparative effects of perilla and fish oils on the activity and gene expression of fatty acid oxidation enzymes in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1485**, 23-35
- IDE T., MURATA M., SUGANO M. (1996): Stimulation of the activities of hepatic fatty acid oxidation enzymes by dietary fat rich in alpha-linolenic acid in rats. *J. Lipid Res.* **37**, 448-463
- IRITANI N., KOMIYA M., FUKUDA H., SUGIMOTO T. (1998): Lipogenic enzyme gene expression is quickly suppressed in rats by a small amount of exogenous polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr.* **128**, 967-972
- JANSSEN U. (1997): Die mitochondrialen β -Oxidationsenzyme 3,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase und Enoyl-CoA Hydratase. Erstellung einer Isomerase-defizienten Mauslinie. Dissertation, Universität Köln.
- JANSSEN U., STOFFEL W. (2002): Disruption of mitochondrial beta -oxidation of unsaturated fatty acids in the 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase-deficient mouse. *J. Biol. Chem.* **277**, 19579-19584

- JIN S.J., TSERNG K.Y. (1990): Metabolic origins of urinary unsaturated dicarboxylic acids. *Biochemistry* **29**, 8540-8547
- JOHNSON P.E., HUNT C.D., MILNE D.B., MULLEN L.K. (1993): Homeostatic control of zinc metabolism in men: zinc excretion and balance in men fed diets low in zinc. *Am. J. Clin. Nutr.* **57**, 557-565
- JONES P.J., TOY B.R., CHA M.C. (1995): Differential fatty acid accretion in heart, liver and adipose tissues of rats fed beef tallow, fish oil, olive oil and safflower oils at three levels of energy intake. *J. Nutr.* **125**, 1175-1182
- JUMP D.B. (2002): The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **277**, 8755-8758
- KABIR Y., IDE T. (1996): Activity of hepatic fatty acid oxidation enzymes in rats fed alpha-linolenic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **1304**, 105-119
- KALUZNY M.A., DUNCAN L.A., MERRITT M.V., EPPS D.E. (1985): Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *J. Lipid Res.* **26**, 135-140
- KAWAHARA S., INOUE K., HAYASHI T., MASUDA Y., ITO T. (1997): Lipids easy to accumulate in the liver and lipids hard to accumulate in it. *Nutr. Res.* **17**, 1013-1023
- KELLER H., DREYER C., MEDIN J., MAHFOUDI A., OZATO K., WAHLI W. (1993): Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 2160-2164
- KENNEDY E., MEYERS L. (2005): Dietary Reference Intakes: development and uses for assessment of micronutrient status of women--a global perspective. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 1194S-1197S
- KENNEDY K.J., RAINS T.M., SHAY N.F. (1998): Zinc deficiency changes preferred macronutrient intake in subpopulations of Sprague-Dawley outbred rats and reduces hepatic pyruvate kinase gene expression. *J. Nutr.* **128**, 43-49
- KERSTEN S., SEYDOUX J., PETERS J.M., GONZALEZ F.J., DESVERGNE B., WAHLI W. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J. Clin. Invest.* **103**, 1489-1498
- KETTLER S.I., EDER K., KETTLER A., KIRCHGESSNER M. (2000): Zinc deficiency and the activities of lipoprotein lipase in plasma and tissues of rats force-fed diets with coconut oil or fish oil. *J. Nutr. Biochem.* **11**, 132-138
- KHOJA S.M., MARZOUKI Z.M., ASHRY K.M., HAMDY S.A. (2002): Effect of dietary zinc deficiency on rat lipid concentrations. *Saudi. Med. J.* **23**, 82-86
- KIEMA T.R., ENGEL C.K., SCHMITZ W., FILPPULA S.A., WIERENGA R.K., HILTUNEN J.K. (1999): Mutagenic and enzymological studies of the hydratase and isomerase activities of 2-enoyl-CoA hydratase-1. *Biochemistry* **38**, 2991-2999
- KILPONEN J.M., HILTUNEN J.K. (1993): Beta-oxidation of unsaturated fatty acids in humans. Isoforms of delta 3, delta 2-enoyl-CoA isomerase. *FEBS Lett.* **322**, 299-303
- KILPONEN J.M., PALOSAARI P.M., HILTUNEN J.K. (1990): Occurrence of a long-chain delta 3, delta 2-enoyl-CoA isomerase in rat liver. *Biochem. J.* **269**, 223-226
- KIM H., CHOI S., LEE H.J., LEE J.H., CHOI H. (2003): Suppression of fatty acid synthase by dietary polyunsaturated fatty acids is mediated by fat itself, not by peroxidative mechanism. *J. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 258-264
- KINDERMANN B., DÖRING F., BUDCZIES J., DANIEL H. (2005): Zinc-sensitive genes as potential new target genes of the metal transcription factor-1 (MTF-1). *Biochem. Cell Biol.* **83**, 221-229
- KING J.C. (1990): Assessment of zinc status. *J. Nutr.* **120** Suppl 11, 1474-1479
- KING J.C., SHAMES D.M., WOODHOUSE L.R. (2000): Zinc homeostasis in humans. *J. Nutr.* **130**, 1360S-1366S
- KLIEWER S.A., SUNDSETH S.S., JONES S.A., BROWN P.J., WISELY G.B., KOBLE C.S., DEVCHAND P., WAHLI W., WILLSON T.M., LENHARD J.M., LEHMANN J.M. (1997): Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 4318-4323

- KRAMER T.R., BRISKE-ANDERSON M., JOHNSON S.B., HOLMAN R.T. (1984): Influence of reduced food intake on polyunsaturated fatty acid metabolism in zinc-deficient rats. *J. Nutr.* **114**, 1224-1230
- KREBS N.F. (2000): Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J. Nutr.* **130**, 1374S-1377S
- KREBS N.F., HAMBIDGE K.M., WESTCOTT J.E., MILLER L.V., SIAN L., BELL M., GRUNWALD G. (2003): Exchangeable zinc pool size in infants is related to key variables of zinc homeostasis. *J. Nutr.* **133**, 1498S-1501S
- KUDO N., NAKAGAWA Y., WAKU K. (1990): Effects of zinc deficiency on the fatty acid composition and metabolism in rats fed a fat-free diet. *Biol. Trace Elem. Res.* **24**, 49-60
- KUMAMOTO T., IDE T. (1998): Comparative effects of alpha- and gamma-linolenic acids on rat liver fatty acid oxidation. *Lipids* **33**, 647-654
- KUNAU W.H., DOMMES P. (1978): Degradation of unsaturated fatty acids. Identification of intermediates in the degradation of cis-4-decenoyl-CoA by extracts of beef-liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **91**, 533-544
- KUNAU W.H., DOMMES V., SCHULZ H. (1995): beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog. Lipid Res.* **34**, 267-342
- LAITY J.H., LEE B.M., WRIGHT P.E. (2001): Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**, 39-46
- LAPILLONNE A., CLARKE S.D., HEIRD W.C. (2004): Polyunsaturated fatty acids and gene expression. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **7**, 151-156
- LATRUFFE N., CHERKAoui M.M., NICOLAS-FRANCES V., CLEMENCET M.C., JANNIN B., BERLOT J.P. (2000): Regulation of the peroxisomal beta-oxidation-dependent pathway by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and kinases. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 1027-1032
- LATRUFFE N., VAMECQ J. (1997): Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie* **79**, 81-94
- LAWSON L.D., KUMMEROW F.A. (1979): beta-Oxidation of the coenzyme A esters of elaidic, oleic, and stearic acids and their full-cycle intermediates by rat heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **573**, 245-254
- LEE C.H., OLSON P., EVANS R.M. (2003): Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* **144**, 2201-2207
- LEE S.Y., WAPNIR R.A. (1993): Zinc absorption in experimental osmotic diarrhea: effect of long-chain fatty acids. *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* **7**, 41-46
- LEMBERGER T., SALADIN R., VAZQUEZ M., ASSIMACOPOULOS F., STAELS B., DESVERGNE B., WAHLI W., AUWERX J. (1996): Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is stimulated by stress and follows a diurnal rhythm. *J. Biol. Chem.* **271**, 1764-1769
- LI D., WONG C.K., YU W.H., LI P. (2002): Cloning, expression, and purification of the functional delta(3)-delta(2)-enoyl-CoA isomerase fusion protein. *Protein Expr. Purif.* **26**, 35-41
- LIUZZI J.P., BLANCHARD R.K., COUSINS R.J. (2001): Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats. *J. Nutr.* **131**, 46-52
- LÖFFLER H., EFFENDY I. (1999): Acrodermatitis enteropathica-ähnliche Hautveränderungen durch parenterale Ernährung. *Hautarzt* **50**, 499-502
- LUO M.J., SMELAND T.E., SHOUKRY K., SCHULZ H. (1994): Delta 3,5, delta 2,4-dienoyl-CoA isomerase from rat liver mitochondria. Purification and characterization of a new enzyme involved in the beta-oxidation of unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* **269**, 2384-2388
- MANDARD S., MULLER M., KERSTEN S. (2004): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 393-416
- MANNAERTS G.P., DEBEER L.J., THOMAS J., DE SCHEPPER P.J. (1979): Mitochondrial and peroxisomal fatty acid oxidation in liver homogenates and isolated hepatocytes from control and clofibrate-treated rats. *J. Biol. Chem.* **254**, 4585-4595

- MARET W. (2000): The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J. Nutr.* **130**, 1455S-1458S
- MARET W. (2005): Zinc coordination environments in proteins determine zinc functions. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **19**, 7-12
- MATER M.K., THELEN A.P., PAN D.A., JUMP D.B. (1999): Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J. Biol. Chem.* **274**, 32725-32732
- MCCALL K.A., HUANG C., FIERKE C.A. (2000): Function and mechanism of zinc metalloenzymes. *J. Nutr.* **130**, 1437S-1446S
- MCCMAHON R.J., COUSINS R.J. (1998): Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 4841-4846
- MEERARANI P., RAMADASS P., TOBOREK M., BAUER H.C., BAUER H., HENNIG B. (2000): Zinc protects against apoptosis of endothelial cells induced by linoleic acid and tumor necrosis factor alpha. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 81-87
- MEERARANI P., REITERER G., TOBOREK M., HENNIG B. (2003): Zinc modulates PPARgamma signaling and activation of porcine endothelial cells. *J. Nutr.* **133**, 3058-3064
- MIESOWICZ F.M., BLOCH K. (1979): Purification of hog liver isomerase. Mechanism of isomerization of 3-alkenyl and 3-alkynyl thioesters. *J. Biol. Chem.* **254**, 5868-5877
- MILLS C.F., QUARTERMAN J., CHESTERS J.K., WILLIAMS R.B., DALGARNO A.C. (1969): Metabolic role of zinc. *Am. J. Clin. Nutr.* **22**, 1240-1249
- MONSMA C.C., GALLAHER D.D., NEY D.M. (1996): Reduced digestibility of beef tallow and cocoa butter affects bile acid excretion and reduces hepatic esterified cholesterol in rats. *J. Nutr.* **126**, 2028-2035
- MOORE J.B., BLANCHARD R.K., COUSINS R.J. (2003): Dietary zinc modulates gene expression in murine thymus: results from a comprehensive differential display screening. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 3883-3888
- MOORE J.B., BLANCHARD R.K., MCCORMACK W.T., COUSINS R.J. (2001): cDNA array analysis identifies thymic LCK as upregulated in moderate murine zinc deficiency before T-lymphocyte population changes. *J. Nutr.* **131**, 3189-3196
- MOYNAHAN E.J. (1974): Letter: Acrodermatitis enteropathica: a lethal inherited human zinc-deficiency disorder. *Lancet* **2**, 399-400
- MUELLER-NEWEN G. (1993): Die mitochondriale 3,2-trans-Enoyl-CoA Isomerase. Reinigung, Klonierung, Expression und Kristallisation des Schlüsselenzyms der β -Oxidation ungesättigter Fettsäuren. Dissertation, Universität Köln.
- MUELLER-NEWEN G., STOFFEL W. (1991): Mitochondrial 3-2trans-enoyl-CoA isomerase. Purification, cloning, expression, and mitochondrial import of the key enzyme of unsaturated fatty acid beta-oxidation. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **372**, 613-624
- NAKAMURA M.T., CHEON Y., LI Y., NARA T.Y. (2004): Mechanisms of regulation of gene expression by fatty acids. *Lipids* **39**, 1077-1083
- NAKAMURA M.T., NARA T.Y. (2004): Structure, function, and dietary regulation of delta6, delta5, and delta9 desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* **24**, 345-376
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1995): Nutrient requirement of laboratory animals. 3. Aufl., National Academic Press, Washington.
- NAUMANN C., BÄSSLER R. (1997): Methodenbuch Band III. Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. 4. Ergänzungslieferung, VDLUFA-Verlag, Darmstadt.
- NORII T. (2005): Relationship between zinc parameters and either body weight gain, protein intake or survival time in zinc-deficient rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **51**, 433-439
- ONKENHOUT W., VENIZELOS V., SCHOLTE H.R., DE KLERK J.B., POORTHUIS B.J. (2001): Intermediates of unsaturated fatty acid oxidation are incorporated in triglycerides but not in phospholipids in tissues from patients with mitochondrial beta-oxidation defects. *J. Inher. Metab. Dis.* **24**, 337-344

- ONKENHOUT W., VENIZELOS V., VAN DER POEL P.F., VAN DEN HEUVEL M.P., POORTHUIS B.J. (1995): Identification and quantification of intermediates of unsaturated fatty acid metabolism in plasma of patients with fatty acid oxidation disorders. *Clin. Chem.* **41**, 1467-1474
- PALLAUF J. (1983): Tierexperimentelle Untersuchungen zum Zink-Mangel-Syndrom. *Akt. Ernähr.* **8**, 107-112
- PALLAUF J., KIRCHGESSNER M. (1971a): Experimenteller Zinkmangel bei Ratten. 2. Mitteilung: Zum Stoffwechsel des Zinks bei wachsenden Ratten. *Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd.* **28**, 128-139
- PALLAUF J., KIRCHGESSNER M. (1971b): Konzentration und Verteilung des Zinks im Organismus. 1. Mitteilung: Zum Stoffwechsel des Zinks im tierischen Organismus. *Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd.* **28**, 121-128
- PALOSAARI P.M., HILTUNEN J.K. (1990): Peroxisomal bifunctional protein from rat liver is a trifunctional enzyme possessing 2-enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and delta 3, delta 2-enoyl-CoA isomerase activities. *J. Biol. Chem.* **265**, 2446-2449
- PALOSAARI P.M., KILPONEN J.M., SORMUNEN R.T., HASSINEN I.E., HILTUNEN J.K. (1990): Delta 3,delta 2-enoyl-CoA isomerases. Characterization of the mitochondrial isoenzyme in the rat. *J. Biol. Chem.* **265**, 3347-3353
- PALOSAARI P.M., VIHINEN M., MANTSALA P.I., ALEXSON S.E., PIHLAJANIEMI T., HILTUNEN J.K. (1991): Amino acid sequence similarities of the mitochondrial short chain delta 3, delta 2-enoyl-CoA isomerase and peroxisomal multifunctional delta 3, delta 2-enoyl-CoA isomerase, 2-enoyl-CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase enzyme in rat liver. The proposed occurrence of isomerization and hydration in the same catalytic domain of the multifunctional enzyme. *J. Biol. Chem.* **266**, 10750-10753
- PASSI S., PICARDO M., DE L.C., NAZZARO-PORRO M., ROSSI L., ROTILIO G. (1993): Saturated dicarboxylic acids as products of unsaturated fatty acid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1168**, 190-198
- PAWAR A., JUMP D.B. (2003): Unsaturated fatty acid regulation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha activity in rat primary hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **278**, 35931-35939
- PERONA J.S., PORTILLO M.P., MACARULLA M.T., TUEROS A.I., RUIZ-GUTIERREZ V. (2000): Influence of different dietary fats on triacylglycerol deposition in rat adipose tissue. *Br. J. Nutr.* **84**, 765-774
- PFÄFFL M.W., GERSTMAYER B., BOSIO A., WINDISCH W. (2003): Effect of zinc deficiency on the mRNA expression pattern in liver and jejunum of adult rats: monitoring gene expression using cDNA microarrays combined with real-time RT-PCR. *J. Nutr. Biochem.* **14**, 691-702
- PFÄFFL M.W., WINDISCH W. (2003): Influence of zinc deficiency on the mRNA expression of zinc transporters in adult rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **17**, 97-106
- PHILCOX J.C., STURKENBOOM M., COYLE P., ROFE A.M. (2000): Metallothionein in mice reduces intestinal zinc loss during acute endotoxin inflammation, but not during starvation or dietary zinc restriction. *J. Nutr.* **130**, 1901-1909
- PORSGAARD T., HOY C.E. (2000): Lymphatic transport in rats of several dietary fats differing in fatty acid profile and triacylglycerol structure. *J. Nutr.* **130**, 1619-1624
- PORTILLO M.P., CHAVARRI M., DURAN D., RODRIGUEZ V.M., MACARULLA M.T. (2001): Differential effects of diets that provide different lipid sources on hepatic lipogenic activities in rats under ad libitum or restricted feeding. *Nutrition* **17**, 467-473
- POURFARZAM M., SCHAEFER J., TURNBULL D.M., BARTLETT K. (1994): Analysis of fatty acid oxidation intermediates in cultured fibroblasts to detect mitochondrial oxidation disorders. *Clin. Chem.* **40**, 2267-2275
- POWELL S.R. (2000): The antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.* **130**, 1447S-1454S
- PRASAD A.S. (1998): Zinc deficiency in humans: a neglected problem. *J. Am. Coll. Nutr.* **17**, 542-543
- PRASAD A.S., HALSTED J.A., NADIMI M. (1961): Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism, and geophagia. *Am. J. Med.* **31**, 546

- PRASAD A.S., MIALE A., FARID Z. (1963): Zinc metabolism in patients with the syndrome of iron deficiency anemia, hypogonadism, and dwarfism. *J. Lab. Clin. Med.* **61**, 537-548
- PRASAD A.S., OBERLEAS D., WOLF P., HORWITZ H.P. (1967): Studies on zinc deficiency: changes in trace elements and enzyme activities in tissues of zinc-deficient rats. *J. Clin. Invest.* **46**, 549-557
- PULLMAN M.E. (1973): A convenient and versatile method for the purification of CoA thiol esters. *Anal. Biochem.* **54**, 188-198
- QUARTERMAN J., FLORENCE E. (1972): Observations on glucose tolerance and plasma levels of free fatty acids and insulin in the zinc-deficient rat. *Br. J. Nutr.* **28**, 75-79
- RACLOT T., GROSCOLAS R. (1993): Differential mobilization of white adipose tissue fatty acids according to chain length, unsaturation, and positional isomerism. *J. Lipid Res.* **34**, 1515-1526
- RACLOT T., LANGIN D., LAFONTAN M., GROSCOLAS R. (1997): Selective release of human adipocyte fatty acids according to molecular structure. *Biochem. J.* **324** (Pt 3), 911-915
- RACLOT T., OUDART H. (1999): Selectivity of fatty acids on lipid metabolism and gene expression. *Proc. Nutr. Soc.* **58**, 633-646
- REEVES P.G. (1997): Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr.* **127**, 838S-841S
- REEVES P.G. (2003): Patterns of food intake and self-selection of macronutrients in rats during short-term deprivation of dietary zinc. *J. Nutr. Biochem.* **14**, 232-243
- REEVES P.G., NIELSEN F.H., FAHEY G.C., JR. (1993): AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939-1951
- REICHLMAYR-LAIS A.M., KIRCHGESSNER M. (1994): Concentration of different fatty acids in the liver and brain of rats after insufficient zinc supply. *Arch. Tierernahr.* **46**, 255-260
- REITERER G., TOBOREK M., HENNIG B. (2004): Peroxisome proliferator activated receptors alpha and gamma require zinc for their anti-inflammatory properties in porcine vascular endothelial cells. *J. Nutr.* **134**, 1711-1715
- RENAULD S. (1974): Dietary fats and atherosclerosis in rat and rabbit. *Adv. Cardiol.* **13**, 169-182
- REUBSAET F.A., VEERKAMP J.H., TRIJBELS J.M., MONNENS L.A. (1989): Total and peroxisomal oxidation of various saturated and unsaturated fatty acids in rat liver, heart and m. quadriceps. *Lipids* **24**, 945-950
- RIMBACH G., BRANDT K., MOST E., PALLAUF J. (1995): Supplemental phytic acid and microbial phytase change zinc bioavailability and cadmium accumulation in growing rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **9**, 117-122
- RIMBACH G., MARKANT A., PALLAUF J., KRAMER K. (1996): Zinc - Update eines essentiellen Spurenelements. *Z. Ernahrungswiss.* **35**, 123-142
- ROBERTS R.A., JAMES N.H., WOODYATT N.J., MACDONALD N., TUGWOOD J.D. (1998): Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR alpha). *Carcinogenesis* **19**, 43-48
- ROE C.R., MILLINGTON D.S., NORWOOD D.L., KODO N., SPRECHER H., MOHAMMED B.S., NADA M., SCHULZ H., MCVIE R. (1990): 2,4-Dienoyl-coenzyme A reductase deficiency: a possible new disorder of fatty acid oxidation. *J. Clin. Invest.* **85**, 1703-1707
- ROLFS A., HEDIGER M.A. (2001): Intestinal metal ion absorption: an update. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **17**, 177-183
- ROTH H.P. (2003): Development of alimentary zinc deficiency in growing rats is retarded at low dietary protein levels. *J. Nutr.* **133**, 2294-2301
- ROTH H.P., KIRCHGESSNER M. (1977): Zum Einfluss von Zinkmangel auf den Fettstoffwechsel. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **47**, 275-283
- ROTH H.P., KIRCHGESSNER M. (1979): Experimentelle Untersuchungen zur Diagnose von marginalem Zinkmangel. *Res. Exp. Med.* **174**, 283-300

- ROTH H.P., KIRCHGESSNER M. (1980): Zinkmangel-Diagnose mittels der alkalischen Phosphataseaktivität im Serum vor und nach einer Zn-Injektion. *Zentralblatt Veterinärmed. A* **27**, 290-297
- ROTH H.P., KIRCHGESSNER M. (1993): Influence of Zn- and Ca-deficiency on the concentration of unsaturated fatty acids in the body fat of rats in dependence of dietary fat. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **70**, 236-245
- ROTH H.P., KIRCHGESSNER M. (1999): Diagnostik des Zinkmangels. *Z. Gerontol. Geriatr.* **32** Suppl 1, I55-I63
- ROTH H.P., SCHÜLEIN A., KIRCHGESSNER M. (1992): Influence of alimentary zinc deficiency on digestibility of nutrients and zinc utilization in force-fed rats. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **68**, 136-145
- SALGUEIRO M.J., ZUBILLAGA M., LYSIONEK A., SARABIA M.I., CARO R., DE-PAOLI T., HAGER A., WEILL R., BOCCIO J. (2000): Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr. Res.* **20**, 737-755
- SAYDAM N., ADAMS T.K., STEINER F., SCHAFFNER W., FREEDMAN J.H. (2002): Regulation of metallothionein transcription by the metal-responsive transcription factor MTF-1: identification of signal transduction cascades that control metal-inducible transcription. *J. Biol. Chem.* **277**, 20438-20445
- SCHEPLYAGINA L.A. (2005): Impact of the mother's zinc deficiency on the woman's and newborn's health status. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **19**, 29-35
- SCHNEEMAN B.O., LACY D., NEY D., LEFEVRE M.L., KEEN C.L., LONNERDAL B., HURLEY L.S. (1986): Similar effects of zinc deficiency and restricted feeding on plasma lipids and lipoproteins in rats. *J. Nutr.* **116**, 1889-1895
- SCHÜLEIN A., KIRCHGESSNER M., ROTH H.P. (1992): Auswirkung eines alimentären Zinkmangels bei zwangsernährten Ratten auf Wachstum, Zinkstatus und Serumkonzentrationen von Insulin und Glucacon. *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* **67**, 157-169
- SCHULER A.M., WOOD P.A. (2002): Mouse models for disorders of mitochondrial fatty acid beta-oxidation. *ILAR. J.* **43**, 57-65
- SCHULZ H. (1994): An overview of the pathways for the beta-oxidation of polyunsaturated fatty acids. *World Rev. Nutr. Diet.* **75**, 18-21
- SEETHARAM S., OVITT C., STRAUSS A.W., RUBIN D., ALPERS D.H. (1987): Fat feeding stimulates only one of the two mRNAs encoding rat intestinal membranous and secreted alkaline phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**, 363-368
- SHAFFER J.P. (1986): Modified sequentially rejective multiple test procedures. *J. Am. Stat. Assoc.* **81**, 828-831
- SHANKAR A.H., PRASAD A.S. (1998): Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**, 447S-463S
- SHAY N.F., COUSINS R.J. (1993): Cloning of rat intestinal mRNAs affected by zinc deficiency. *J. Nutr.* **123**, 35-41
- SHINOGI M., SAKARIDANI M., YOKOYAMA I. (1999): Metallothionein induction in rat liver by dietary restriction or exercise and reduction of exercise-induced hepatic lipid peroxidation. *Biol. Pharm. Bull.* **22**, 132-136
- SHOUKRY K., SCHULZ H. (1998): Significance of the reductase-dependent pathway for the beta-oxidation of unsaturated fatty acids with odd-numbered double bonds. Mitochondrial metabolism of 2-trans-5-cis-octadienoyl-CoA. *J. Biol. Chem.* **273**, 6892-6899
- SMELAND T.E., NADA M., CUEBAS D., SCHULZ H. (1992): NADPH-dependent beta-oxidation of unsaturated fatty acids with double bonds extending from odd-numbered carbon atoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 6673-6677
- SOUCI S.W., FACHMANN W., KRAUT H. (2000): Food composition and nutrition tables. Die Zusammensetzung der Lebensmittel, Nährwert-Tabellen. 6. rev. Edition, medpharm.
- SPRECHER H. (2000): Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**, 219-231

- STOFFEL W., CAESAR H., DITZER R. (1964): The metabolism of unsaturated fatty acids. IV. On the beta-oxidation of mono-and polyene-fatty acids. Chemical syntheses of intermediary products. Hoppe Seylers. Z Physiol Chem **339**, 182-193
- STOFFEL W., DUKER M., HOFMANN K. (1993): Molecular cloning and gene organization of the mouse mitochondrial 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase. FEBS Lett. **333**, 119-122
- STOFFEL W., ECKER W. (1969): Delta3-cis,delta2-trans-enoyl-CoA isomerase from rat liver mitochondria. Methods Enzymol. **14**, 99-105
- STOFFEL W., GROL M. (1978): Purification and properties of 3-cis-2-trans-enoyl-CoA isomerase (dodecenoyl-CoA delta-isomerase) from rat liver mitochondria. Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. **359**, 1777-1782
- SUMMERS L.K., BARNES S.C., FIELDING B.A., BEYSEN C., ILIC V., HUMPHREYS S.M., FRAYN K.N. (2000): Uptake of individual fatty acids into adipose tissue in relation to their presence in the diet. Am. J. Clin. Nutr. **71**, 1470-1477
- SYHRE M., HANSCHMANN G., HEBER R. (1996): Derivatisierungstechniken in der Rückstandsanalytik. GIT Fachz. Lab. **11**, 1121-1128
- SZCZUREK E.I., BJORNSSON C.S., TAYLOR C.G. (2001): Dietary zinc deficiency and repletion modulate metallothionein immunolocalization and concentration in small intestine and liver of rats. J. Nutr. **131**, 2132-2138
- TAKAHASHI M., TSUBOYAMA-KASAOKA N., NAKATANI T., ISHII M., TSUTSUMI S., ABURATANI H., EZAKI O. (2002): Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPARalpha activation and ROS production. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **282**, G338-G348
- TAKEUCHI H., NAKAMOTO T., MORI Y., KAWAKAMI M., MABUCHI H., OHISHI Y., ICHIKAWA N., KOIKE A., MASUDA K. (2001): Comparative effects of dietary fat types on hepatic enzyme activities related to the synthesis and oxidation of fatty acid and to lipogenesis in rats. Biosci. Biotechnol. Biochem. **65**, 1748-1754
- TAPIERO H., TEW K.D. (2003): Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. Biomed. Pharmacother. **57**, 399-411
- TODD W.R., ELVEHJEM C.A., HART E.B. (1934): Zinc in the nutrition of the rat. Am. J. Physiol. **107**, 146-156
- TOM DIECK H., DÖRING F., FUCHS D., ROTH H.P., DANIEL H. (2005): Transcriptome and proteome analysis identifies the pathways that increase hepatic lipid accumulation in zinc-deficient rats. J. Nutr. **135**, 199-205
- TOM DIECK H., DÖRING F., ROTH H.P., DANIEL H. (2003): Changes in rat hepatic gene expression in response to zinc deficiency as assessed by DNA arrays. J. Nutr. **133**, 1004-1010
- TOMIOKA Y., HIROSE A., MORITANI H., HISHINUMA T., HASHIMOTO T., MIZUGAKI M. (1992): cDNA cloning of mitochondrial delta 3, delta 2-enoyl-CoA isomerase of rat liver. Biochim. Biophys. Acta **1130**, 109-112
- TRUMBO P., YATES A.A., SCHLICKER S., POOS M. (2001): Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. J. Am. Diet. Assoc. **101**, 294-301
- TRUONG-TRAN A.Q., CARTER J., RUFFIN R.E., ZALEWSKI P.D. (2001): The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. Biometals **14**, 315-330
- TSERNG K.Y., JIN S.J. (1991): NADPH-dependent reductive metabolism of cis-5 unsaturated fatty acids. A revised pathway for the beta-oxidation of oleic acid. J. Biol. Chem. **266**, 11614-11620
- VALLEE B.L., AULD D.S. (1990): Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. Biochemistry **29**, 5647-5659
- VALLEE B.L., AULD D.S. (1992): Functional zinc-binding motifs in enzymes and DNA-binding proteins. Faraday Discuss. **93**, 47-65
- VALLEE B.L., FALCHUK K.H. (1993): The biochemical basis of zinc physiology. Physiol. Rev. **73**, 79-118

- VANDEN HEUVEL J.P. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical link among fatty acids, gene expression and carcinogenesis. *J. Nutr.* **129**, 575S-580S
- VASCONCELOS M.H., TAM S.C., HESKETH J.E., REID M., BEATTIE J.H. (2002): Metal- and tissue-dependent relationship between metallothionein mRNA and protein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **182**, 91-97
- VEEGER C., DERVARTANIAN D.V., ZEYLEMAKER W.P. (1969): Succinate Dehydrogenase. *Methods Enzymol.* **13**, 81-90
- VOCKLEY J., SINGH R.H., WHITEMAN D.A. (2002): Diagnosis and management of defects of mitochondrial beta-oxidation. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **5**, 601-609
- WANDERS R.J., VREKEN P., DEN BOER M.E., WIJBURG F.A., VAN GENNIP A.H., IJLST L. (1999): Disorders of mitochondrial fatty acyl-CoA beta-oxidation. *J. Inherit. Metab. Dis.* **22**, 442-487
- WAPNIR R.A., LEE S.Y. (1990): Zinc intestinal absorption: Effect of free fatty acids and triglycerids. *J. Trace Elem. Exp. Med.* **3**, 255-265
- WAPNIR R.A., SIA M.C. (1996): Copper intestinal absorption in the rat: effect of free fatty acids and triglycerides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **211**, 381-386
- WEBER N., KLEIN E., MUKHERJEE K.D. (2002): The composition of the major molecular species of adipose tissue triacylglycerols of rats reflects those of dietary rapeseed, olive and sunflower oils. *J. Nutr.* **132**, 726-732
- WEIGAND E., KIRCHGESSNER M. (1977): Dietary zinc supply and efficiency of food utilization for growth. *Z. Tierphysiol. Tierernaehr. Futtermittelkd.* **39**, 16-26
- WEIGAND E., KIRCHGESSNER M. (1980): Total true efficiency of zinc utilization: determination and homeostatic dependence upon the zinc supply status in young rats. *J. Nutr.* **110**, 469-480
- WILLSON T.M., WAHLI W. (1997): Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 235-241
- WINDISCH W. (2003): Development of zinc deficiency in 65Zn labeled, fully grown rats as a model for adult individuals. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **17**, 91-96
- WOLF G. (2004): Tissue-specific knockout defines peroxisome proliferator-activated receptor gamma function in muscle and liver. *Nutr. Rev.* **62**, 253-255
- WOOD R.J. (2000): Assessment of marginal zinc status in humans. *J. Nutr.* **130**, 1350S-1354S
- YAMAGISHI F., KOMODA T., ALPERS D.H. (1994): Secretion and distribution of rat intestinal surfactant-like particles after fat feeding. *Am. J. Physiol.* **266**, G944-G952
- YAMASAKI K., KANEKO M., MATSUDA K., SAKATA S.F., TAMAKI N. (1999): The correlation between feed-intake cycle and nutritional zinc-deficient status in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)* **45**, 621-632
- YAMAZAKI K., KUROMITSU J., TANAKA I. (2002): Microarray analysis of gene expression changes in mouse liver induced by peroxisome proliferator- activated receptor alpha agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 1114-1122
- YLI-JAMA P., HAUGEN T.S., REBNORD H.M., RINGSTAD J., PEDERSEN J.I. (2001): Selective mobilisation of fatty acids from human adipose tissue. *Eur. J. Intern. Med.* **12**, 107-115
- YOUSEF M.I., EL HENDY H.A., EL DEMERDASH F.M., ELAGAMY E.I. (2002): Dietary zinc deficiency induced-changes in the activity of enzymes and the levels of free radicals, lipids and protein electrophoretic behaviour in growing rats. *Toxicology* **175**, 223-234
- ZENG J., DENG G., LI D. (2006): Intrinsic enoyl-CoA isomerase activity of rat acyl-CoA oxidase I. *Biochim. Biophys. Acta* **1760**, 78-85
- ZENG J., LI D. (2005): Intrinsic isomerase activity of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase. *Biochemistry* **44**, 6715-6722
- ZHANG D., YU W., GEISBRECHT B.V., GOULD S.J., SPRECHER H., SCHULZ H. (2002): Functional characterization of delta3,delta2-enoyl-CoA isomerases from rat liver. *J. Biol. Chem.* **277**, 9127-9132

8 Anhang

Tabelle A 1: Lebendmasse (g) und Lebendmassezunahme im Versuchszeitraum

Gruppe	Tier	Versuchstag					Zunahme (g)	Zunahme (g/d)
		0	7	14	21	28		
I	1	54,9	99,7	142,9	181,3	214,8	159,9	5,71
	2	54,8	99,9	138,9	182,2	226,6	171,8	6,14
	3	52,8	86,6	120,7	161,1	199,0	146,2	5,22
	4	52,8	90,4	123,5	159,7	186,9	134,1	4,79
	5	50,0	90,7	122,7	160,4	194,3	144,3	5,15
	6	49,9	88,4	118,6	155,7	197,7	147,8	5,28
	7	46,4	81,0	102,4	145,0	198,4	152,0	5,43
	8	46,1	88,8	130,1	176,3	224,8	178,7	6,38
	M	51,0	90,7	125,0	165,2	205,3	154,4	5,51
SD	3,5	6,4	12,6	13,3	14,8	14,9	0,53	
II	9	55,2	93,1	127,1	167,3	212,4	157,2	5,61
	10	54,4	87,7	122,3	163,5	194,3	139,9	5,00
	11	53,4	93,4	123,5	161,6	198,9	145,5	5,20
	12	52,3	92,8	124,6	161,3	202,5	150,2	5,36
	13	50,1	90,2	126,3	165,2	212,4	162,3	5,80
	14	49,8	85,4	123,4	164,8	216,6	166,8	5,96
	15	46,6	87,4	123,8	162,8	214,9	168,3	6,01
	16	46,0	71,3	110,3	145,7	184,2	138,2	4,94
	M	51,0	87,7	122,7	161,5	204,5	153,6	5,48
SD	3,4	7,3	5,2	6,7	11,5	11,8	0,42	
III	17	55,3	91,2	119,4	160,5	194,0	138,7	4,95
	18	54,2	84,1	104,7	125,2	156,0	101,8	3,64
	19	53,4	80,8	104,4	133,1	169,0	115,6	4,13
	20	51,9	85,3	120,1	152,9	182,9	131,0	4,68
	21	50,4	75,3	93,2	117,0	144,7	94,3	3,37
	22	49,0	69,4	96,5	118,3	150,8	101,8	3,64
	23	46,9	83,4	108,1	139,0	170,3	123,4	4,41
	24	44,8	63,0	89,0	119,5	144,3	99,5	3,55
	M	50,7	79,1	104,4	133,2	164,0	113,3	4,05
SD	3,7	9,3	11,4	16,5	18,2	16,4	0,59	
IV	25	55,9	86,7	111,4	138,3	190,0	134,1	4,79
	26	53,8	80,5	104,9	132,3	183,2	129,4	4,62
	27	53,6	81,3	103,2	127,6	175,6	122,0	4,36
	28	51,6	79,7	98,8	126,3	175,5	123,9	4,43
	29	50,6	86,3	105,7	131,5	181,6	131,0	4,68
	30	48,9	68,0	96,9	121,8	169,0	120,1	4,29
	31	47,8	66,2	86,1	116,8	165,0	117,2	4,19
	32	43,8	70,9	94,0	118,5	160,4	116,6	4,16
	M	50,8	77,5	100,1	126,6	175,0	124,3	4,44
SD	3,9	8,0	7,9	7,4	9,9	6,5	0,23	
V	33	56,7	111,7	163,3	210,6	251,9	195,2	6,97
	34	53,7	103,8	149,5	194,1	238,8	185,1	6,61
	35	53,6	100,9	152,1	204,5	247,1	193,5	6,91
	36	50,8	104,5	138,8	187,6	232,2	181,4	6,48
	37	50,8	99,5	149,3	192,6	241,6	190,8	6,81
	38	48,7	104,3	156,2	205,1	240,9	192,2	6,86
	39	48,5	103,9	156,3	204,2	240,8	192,3	6,87
	40	43,0	88,2	133,5	173,8	206,9	163,9	5,85
	M	50,7	102,1	149,9	196,6	237,5	186,8	6,67
SD	4,2	6,7	9,7	12,0	13,7	10,3	0,37	

Tabelle A 2: Wöchentliche Futteraufnahme (g FM), Gesamtfutteraufnahme und durchschnittliche Futterverwertung (g TM je g Gewichtszunahme)

Gruppe	Tier	FA Woche 1	FA Woche 2	FA Woche 3	FA Woche 4	Gesamt-FA (g FM)	Gesamt-FA (g TM)	FV (g TM/g LM)
I	1	73,1	97,0	113,6	132,5	416,2	393,0	2,46
	2	73,1	89,7	111,7	146,3	420,8	397,3	2,31
	3	56,8	76,9	98,9	129,0	361,6	341,4	2,34
	4	68,6	76,8	101,5	115,3	362,2	342,0	2,55
	5	70,2	88,9	106,1	128,0	393,1	371,2	2,57
	6	63,1	78,4	100,4	134,2	376,1	355,2	2,40
	7	56,8	64,9	98,4	149,0	369,2	348,6	2,29
	M	66,0	81,8	104,4	133,5	385,6	364,1	2,42
SD	7,1	10,7	6,2	11,5	24,9	23,5	0,11	
II	9	65,0	82,3	104,2	137,6	389,1	367,8	2,34
	10	64,7	82,4	102,5	113,2	362,9	343,0	2,45
	11	65,5	77,6	104,7	120,2	368,0	347,8	2,39
	12	64,0	82,5	104,5	137,5	388,5	367,2	2,44
	13	65,0	82,0	104,4	138,6	389,9	368,5	2,27
	14	65,6	82,6	104,6	143,3	396,1	374,3	2,24
	15	64,5	82,0	104,2	139,3	390,1	368,7	2,19
	M	64,9	81,6	104,1	132,8	383,5	362,5	2,33
SD	0,6	1,8	0,7	11,3	12,7	12,0	0,10	
III	17	62,5	71,6	87,5	113,4	335,0	317,2	2,29
	18	52,0	53,6	60,4	83,4	249,5	236,2	2,32
	19	56,4	58,4	71,7	97,1	283,6	268,5	2,32
	20	53,6	64,8	74,6	98,8	291,7	276,3	2,11
	21	48,0	51,4	60,2	86,6	246,1	233,1	2,47
	22	47,3	57,3	62,0	95,4	262,0	248,1	2,44
	23	56,9	62,8	80,1	90,8	290,6	275,2	2,23
	M	53,8	60,0	70,9	95,1	279,8	265,0	2,31
SD	5,3	6,9	10,6	9,9	30,8	29,2	0,12	
IV	25	53,8	57,3	68,1	102,2	281,4	267,3	1,99
	26	53,6	57,3	68,1	102,1	281,1	267,1	2,06
	27	55,2	57,2	64,4	102,1	278,9	265,0	2,17
	28	55,0	57,3	67,9	102,1	282,2	268,2	2,16
	29	55,1	57,1	67,9	102,1	282,2	268,1	2,05
	30	48,2	57,2	67,9	102,2	275,6	261,8	2,18
	31	44,2	57,2	67,8	101,2	270,4	256,9	2,19
	M	52,2	57,2	67,4	102,0	278,8	264,9	2,12
SD	4,3	0,1	1,4	0,4	4,4	4,2	0,08	
V	33	76,6	103,1	115,2	139,7	434,6	412,9	2,12
	34	72,3	98,8	111,8	143,6	426,5	405,2	2,19
	35	68,1	98,5	127,0	147,3	440,8	418,9	2,16
	36	79,0	85,3	114,1	147,0	425,4	404,2	2,23
	37	74,1	103,7	114,0	145,1	436,8	415,0	2,17
	38	73,6	100,0	118,4	132,9	424,9	403,7	2,10
	39	73,8	103,4	118,2	138,2	433,5	411,9	2,14
	M	73,9	98,9	116,9	142,0	431,8	410,3	2,16
SD	3,4	6,4	5,0	5,3	6,2	5,9	0,04	

Bei Tier 8, 16, 24, 32 und 40 konnte haltungsbedingt die Futteraufnahme nicht exakt erfasst werden. Der Unterschied der FA in Woche 4 resultiert aus unterschiedlichem Fressverhalten am letzten Versuchstag. Bis zur Nüchterung nahmen die Tiere der Gruppe IV das angebotene Futter vollständig, die Tiere der Gruppe II fast vollständig auf.

Tabelle A 3: Frischgewichte von Leber, Herz, Nieren, Testes, rechtem Femur (g) sowie relatives Lebergewicht (g/100 g Lebendmasse)

Gruppe	Tier	Leber (g)	Leber relativ (g/100g)	Herz (g)	Nieren (g)	Testes (g)	Femur (g)
I	1	7,29	3,39	0,87	1,73	2,44	0,63
	2	7,85	3,46	0,97	1,87	2,43	0,71
	3	6,29	3,16	0,78	1,42	2,21	0,57
	4	6,04	3,23	0,73	1,45	2,59	0,47
	5	6,79	3,49	1,12	1,58	2,37	0,53
	6	7,28	3,68	0,76	1,62	2,05	0,56
	7	8,12	4,09	0,87	1,64	2,52	0,55
	8	7,76	3,45	0,93	1,91	2,35	0,62
	M	7,18	3,50	0,88	1,65	2,37	0,58
SD	0,75	0,29	0,13	0,18	0,17	0,07	
II	9	7,36	3,47	0,91	1,63	2,43	0,63
	10	6,03	3,10	0,71	1,30	2,17	0,53
	11	6,91	3,47	0,75	1,51	2,19	0,50
	12	7,82	3,86	0,79	1,67	2,54	0,47
	13	7,73	3,64	0,84	1,62	2,64	0,58
	14	9,12	4,21	0,94	1,81	2,55	0,58
	15	8,61	4,01	0,83	1,84	2,35	0,52
	16	6,84	3,71	0,87	1,56	2,58	0,54
	M	7,55	3,68	0,83	1,62	2,43	0,54
SD	1,00	0,35	0,08	0,17	0,18	0,05	
III	17	7,15	3,69	0,97	1,60	2,67	0,64
	18	5,05	3,24	0,55	1,10	2,43	0,53
	19	6,13	3,63	0,77	1,67	2,26	0,45
	20	6,00	3,28	0,85	1,42	2,93	0,54
	21	4,93	3,41	0,67	1,21	2,23	0,47
	22	5,47	3,63	0,62	1,24	2,35	0,44
	23	6,13	3,60	0,78	1,27	2,47	0,52
	24	5,07	3,51	0,63	1,27	2,38	0,45
	M	5,74	3,50	0,73	1,35	2,47	0,51
SD	0,76	0,17	0,14	0,20	0,23	0,07	
IV	25	7,22	3,80	0,69	1,41	2,45	0,55
	26	6,95	3,79	0,67	1,41	2,47	0,51
	27	6,53	3,72	0,75	1,42	2,53	0,52
	28	6,97	3,97	0,66	1,32	2,49	0,49
	29	6,40	3,52	0,68	1,59	2,56	0,54
	30	6,38	3,78	0,52	1,36	2,40	0,43
	31	6,01	3,64	0,75	1,37	2,09	0,43
	32	5,77	3,60	0,63	1,39	2,20	0,45
	M	6,53	3,73	0,67	1,41	2,40	0,49
SD	0,50	0,14	0,07	0,08	0,17	0,05	
V	33	10,90	4,33	0,85	1,98	2,74	0,65
	34	10,09	4,23	0,82	1,87	2,51	0,57
	35	9,21	3,73	1,07	2,07	2,71	0,65
	36	9,13	3,93	1,01	1,71	2,47	0,59
	37	10,37	4,29	1,02	2,06	2,42	0,60
	38	8,83	3,67	1,05	1,93	2,73	0,62
	39	9,54	3,96	1,05	1,81	2,88	0,58
	40	7,69	3,72	0,92	1,90	2,32	0,54
	M	9,47	3,98	0,97	1,92	2,60	0,60
SD	1,00	0,27	0,10	0,12	0,19	0,04	

Tabelle A 4: Hämoglobingehalt und Hämatokrit im Vollblut; Faecesfettgehalt (% TM), Fettbilanz (Aufnahme minus Ausscheidung) und Fettverdaulichkeit im Bilanzzeitraum

Gruppe	Tier	Hb (g/dl)	Hk (%)	XL-Faeces (% TM)	XL-Bilanz (g/14d)	DXL (%)
I	1	14,29	45,3	13,89	46,39	80,4
	2	12,71	41,7	15,11	47,77	79,0
	3	14,03	42,0	15,03	42,15	78,9
	4	13,41	44,0	16,30	39,31	77,3
	5	12,60	41,0	15,89	42,76	77,9
	6	12,42	40,7	11,33	46,23	84,0
	7	12,56	43,0	12,82	47,58	82,0
	8	14,18	45,3	13,14	49,79	79,5
		M	13,27	42,9	14,19	45,25
	SD	0,80	1,9	1,70	3,50	2,2
II	9	14,29	45,0	12,37	50,59	84,1
	10	14,17	44,0	14,56	43,49	81,0
	11	13,97	41,7	15,15	44,94	80,3
	12	13,36	44,3	15,98	47,93	79,6
	13	13,72	43,0	16,64	47,45	78,5
	14	13,48	43,3	13,55	50,83	82,5
	15	12,56	41,3	14,23	49,61	81,9
	16	14,32	45,7	13,18	46,64	81,4
		M	13,73	43,5	14,46	47,68
	SD	0,59	1,5	1,44	2,63	1,7
III	17	12,49	42,0	1,35	50,05	98,5
	18	14,38	45,0	2,73	35,28	97,0
	19	14,51	45,0	0,90	42,28	99,0
	20	13,75	41,3	0,28	43,69	99,7
	21	13,60	41,0	0,63	36,85	99,3
	22	14,21	42,0	1,45	39,22	98,5
	23	12,93	43,0	1,54	42,46	98,2
	24	13,81	44,3	1,22	40,66	98,7
		M	13,71	43,0	1,26	41,31
	SD	0,70	1,6	0,73	4,56	0,8
IV	25	13,09	42,0	1,20	41,77	98,7
	26	12,92	42,0	0,99	41,85	99,0
	27	12,07	40,7	1,27	40,79	98,6
	28	13,42	40,3	0,84	41,87	99,1
	29	14,45	41,0	1,52	41,54	98,3
	30	14,10	43,0	1,53	41,57	98,3
	31	12,49	42,7	1,27	41,42	98,6
	32	12,92	43,0	1,19	40,97	98,5
		M	13,18	41,8	1,23	41,47
	SD	0,79	1,1	0,24	0,40	0,3
V	33	12,63	40,3	1,24	62,45	98,6
	34	14,27	45,0	2,36	61,91	97,6
	35	12,87	43,3	1,78	66,66	97,8
	36	13,51	42,0	1,71	63,62	98,1
	37	13,20	41,0	1,53	63,24	98,3
	38	13,57	44,0	1,48	61,38	98,3
	39	12,88	47,7	1,60	62,57	98,2
	40	13,21	43,3	1,80	57,62	97,7
		M	13,27	43,3	1,69	62,43
	SD	0,52	2,3	0,33	2,52	0,4

Tabelle A 5: Zinkkonzentrationen in Plasma und Femur; Zinkkonzentration, Gesamtzinkgehalt und Eisenkonzentration der Leber

Gruppe	Tier	Plasma-Zn (µg/mL)	Femur-Zn (µg/g FM)	Leber-Zn (µg/g FM)	Gesamtleber (µg Zn)	Leber-Fe (µg/g FM)
I	1	1,120	55,73	26,39	192,4	148,35
	2	0,841	42,65	24,42	191,7	153,51
	3	0,980	67,89	26,88	169,1	178,69
	4	1,140	55,82	31,50	190,2	145,84
	5	1,020	48,50	30,75	208,8	154,43
	6	0,910	52,18	27,32	198,9	150,78
	7	0,950	40,86	26,48	215,0	330,10*
	8	0,813	47,57	27,74	215,3	211,79
		M	0,972	51,40	27,68	197,7
	SD	0,119	8,63	2,35	15,5	23,97
II	9	1,400	141,24	30,15	221,9	152,31
	10	1,435	136,78	32,70	197,2	173,11
	11	1,455	142,06	32,10	221,8	110,91
	12	1,350	145,18	32,10	251,0	173,12
	13	1,530	144,47	27,97	216,2	143,42
	14	1,410	120,13	24,81	226,2	174,22
	15	1,410	139,15	28,28	243,5	98,07
	16	1,313	129,61	30,17	206,4	189,42
		M	1,413	137,33	29,79	223,0
	SD	0,065	8,53	2,67	17,8	32,64
III	17	0,630	39,15	25,63	183,3	115,60
	18	0,610	36,82	23,67	119,6	125,72
	19	0,670	124,06*	25,10	153,9	157,95
	20	0,640	37,78	28,54	171,2	115,09
	21	0,660	41,73	27,94	137,7	119,42
	22	0,560	43,07	25,15	137,6	88,56
	23	0,580	38,96	27,56	169,0	98,94
	24	0,687	38,76	34,90	176,9	129,61
		M	0,630	39,47	27,31	156,1
	SD	0,044	2,19	3,49	22,6	20,81
IV	25	1,220	99,12	26,67	192,5	82,49
	26	1,250	123,67	25,75	179,0	111,57
	27	1,230	118,33	27,10	177,0	167,75
	28	1,225	122,47	26,84	187,1	69,00
	29	1,100	110,51	29,62	189,5	81,16
	30	1,340	168,79*	30,26	193,1	90,65
	31	1,160	118,84	27,82	167,2	137,40
	32	0,950	125,28	31,67	182,8	99,86
		M	1,184	116,89	28,22	183,5
	SD	0,117	9,22	2,06	8,9	33,02
V	33	1,390	133,41	29,19	318,2	61,61
	34	1,040	133,17	29,62	298,9	78,15
	35	1,085	123,49	30,83	283,9	93,10
	36	1,060	124,27	26,80	244,7	89,04
	37	1,020	130,84	29,15	302,3	57,84
	38	1,010	121,02	30,11	265,9	79,93
	39	1,030	119,92	28,26	269,6	72,10
	40	0,987	133,47	29,42	226,2	127,76
		M	1,078	127,45	29,17	276,2
	SD	0,130	5,85	1,21	30,8	21,98

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 6: Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Plasma sowie Metallothionein-Konzentration der Leber (ng/mg Protein, µg/g Leber-Frischmasse, Gesamtmenge Leber-MT)

Gruppe	Tier	AP (mU/mL)	Leber-MT (ng/mg)	Leber-MT (µg/g FM)	Gesamtleber-MT (µg MT)
I	1	576,0	23,05	2,90	21,16
	2	393,3	29,48	3,76	29,53
	3	429,5	36,39	5,10	32,07
	4	439,7	27,17	3,67	22,16
	5	383,3	36,34	4,05	27,48
	6	491,8	22,90	2,84	20,70
	7	436,3	21,85	2,94	23,85
	8	396,9	77,85*	9,30*	72,19*
	M	443,4	28,17	3,61	25,28
SD	63,8	6,20	0,81	4,45	
II	9	645,6	119,73	14,90	109,68
	10	544,7	73,59	10,55	63,63
	11	408,4	117,53	15,12	104,49
	12	431,5	122,79	15,48	121,02
	13	625,4	72,81	10,62	82,06
	14	618,5	41,34	5,42	49,40
	15	631,2	34,40	5,27	38,93
	16	637,8	94,93	11,82	80,82
	M	567,9	84,64	11,15	81,25
SD	96,6	34,92	4,09	29,39	
III	17	383,8	26,25	3,40	24,32
	18	438,7	21,24	2,92	14,77
	19	432,5	20,33	2,88	17,64
	20	352,5	30,85	4,44	26,62
	21	329,3	87,53*	11,82*	58,25*
	22	380,8	48,66	6,34	34,70
	23	443,8	39,31	5,39	33,06
	24	407,2	38,58	4,80	24,32
	M	396,1	32,17	4,31	25,06
SD	41,9	10,49	1,31	7,32	
IV	25	658,5	84,01	11,93	72,90
	26	767,1	110,92	13,14	91,34
	27	723,1	126,41	16,85	110,03
	28	848,5	102,33	13,41	93,44
	29	684,3	97,99	12,40	79,35
	30	756,7	104,13	13,46	85,90
	31	784,5	113,64	16,68	100,27
	32	514,7	173,61	19,88	114,70
	M	717,2	114,13	14,72	93,49
SD	101,0	27,01	2,78	14,42	
V	33	660,6	95,17	15,91	135,91
	34	538,3	167,99	22,34	225,44
	35	450,9	258,49	31,92	293,95
	36	553,8	193,98	24,30	221,82
	37	517,5	190,25	22,92	237,70
	38	603,8	178,10	24,21	213,75
	39	487,5	196,86	26,13	249,25
	40	533,8	269,29	32,18	247,44
	M	543,3	193,77	24,99	228,16
SD	65,4	54,18	5,29	44,72	

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 7: Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase der Leber und der Niere (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U)

Gruppe	Tier	ECI Leber (U/mg)	SDH Leber (U/mg)	ECI/SDH Leber (U/U)	ECI Niere (U/mg)	SDH Niere (U/mg)	ECI/SDH Niere (U/U)
I	1	1,337	0,132	10,13	13,34	0,440	30,32
	2	1,743	0,114	15,25	9,38	0,420	22,33
	3	2,413	0,176	13,70	11,19	0,440	25,44
	4	2,609	0,164	15,88	12,41	0,415	29,94
	5	2,097	0,160	13,07	11,56	0,457	25,27
	6	3,065	0,157	19,49	10,24	0,419	24,42
	7	2,934	0,179	16,43	11,54	0,447	25,80
	8	2,899	0,150	19,27	13,01	0,398	32,67
		M	2,387	0,154	15,40	11,58	0,430
	SD	0,618	0,022	3,14	1,34	0,020	3,53
II	9	2,681	0,120	22,37	11,14	0,475	23,47
	10	2,901	0,142	20,50	9,62	0,450	21,37
	11	2,920	0,140	20,78	12,40	0,381	32,54
	12	2,954	0,146	20,20	9,63	0,353	27,27
	13	2,197	0,142	15,43	9,11	0,368	24,80
	14	2,660	0,156	17,03	11,75	0,419	28,05
	15	3,827	0,150	25,52	9,58	0,476	20,12
	16	2,153	0,163	13,20	8,43	0,361	23,37
		M	2,787	0,145	19,38	10,21	0,410
	SD	0,523	0,013	3,96	1,39	0,052	4,02
III	17	5,523	0,146	37,81	11,49	0,396	29,03
	18	6,037	0,161	37,40	17,10*	0,384	44,58*
	19	5,100	0,156	32,61	14,04	0,405	34,67
	20	4,883	0,132	37,08	12,42	0,458	27,14
	21	7,317	0,179	40,88	11,31	0,385	29,36
	22	6,393	0,157	40,82	14,09	0,401	35,16
	23	6,011	0,139	43,35	10,09	0,453	22,29
	24	5,721	0,169	33,88	11,43	0,461	24,78
		M	5,873	0,155	37,98	12,12	0,418
	SD	0,768	0,016	3,63	1,49	0,033	4,77
IV	25	10,286*	0,115	89,70*	12,67	0,402	31,49
	26	8,602	0,139	61,75	10,76	0,346	31,06
	27	7,895	0,121	65,28	10,88	0,403	27,01
	28	9,818	0,150	65,61	8,52	0,369	23,07
	29	7,140	0,129	55,55	10,23	0,389	26,27
	30	7,949	0,137	57,95	9,67	0,400	24,14
	31	5,591*	0,148	37,71*	9,86	0,418	23,60
	32	7,540	0,124	60,93	11,20	0,375	29,88
		M	8,157	0,133	61,18	10,47	0,388
	SD	0,947	0,013	3,97	1,22	0,023	3,39
V	33	17,064*	0,116	147,18*	14,11	0,366	38,52
	34	7,453	0,101	74,12	11,23	0,377	29,81
	35	7,313	0,135	54,16	12,07	0,349	34,64
	36	6,715	0,144	46,77	8,74	0,391	22,35
	37	11,230	0,122	92,06	9,95	0,401	24,78
	38	11,474	0,146	78,71	12,25	0,437	28,04
	39	5,763	0,143	40,40	11,36	0,450	25,24
	40	5,579	0,152	36,60	12,39	0,459	27,01
		M	7,932	0,132	60,40	11,51	0,404
	SD	2,441	0,018	21,28	1,63	0,041	5,39

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 8: Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase der Herz- und der Skelettmuskulatur (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U)

Gruppe	Tier	ECI Herz (U/mg)	SDH Herz (U/mg)	ECI/SDH Herz (U/U)	ECI Muskel (U/mg)	SDH Muskel (U/mg)	ECI/SDH Muskel (U/U)
I	1	7,36	0,712	10,34	1,815	0,476	3,81
	2	7,45	0,663	11,24	1,465	0,336	4,36
	3	7,90	0,745	10,60	3,041	0,535	5,68
	4	7,35	0,754	9,75	2,999	0,587	5,11
	5	9,18	0,715	12,84	3,593	0,441	8,14
	6	8,85	0,666	13,29	2,099	0,623	3,37
	7	9,95	0,666	14,94	1,407	0,476	2,96
	8	9,52	0,736	12,94	1,734	0,325	5,33
		M	8,44	0,707	11,99	2,269	0,475
	SD	1,05	0,038	1,78	0,827	0,108	1,65
II	9	7,63	0,702	10,88	1,661	0,292	5,69
	10	9,61	0,694	13,85	3,076	0,622	4,95
	11	6,91	0,680	10,16	2,967	0,556	5,34
	12	7,66	0,680	11,27	2,436	0,504	4,83
	13	8,96	0,638	14,05	1,517	0,456	3,33
	14	8,11	0,586	13,84	2,092	0,477	4,39
	15	10,57	0,676	15,65	1,944	0,464	4,19
	16	11,57	0,673	17,19	2,558	0,497	5,15
		M	8,88	0,666	13,36	2,281	0,483
	SD	1,61	0,037	2,44	0,576	0,095	0,75
III	17	5,24	0,776	6,76	1,515	0,334	4,54
	18	8,33	0,732	11,37	1,316	0,265	4,97
	19	8,60	0,614	14,00	3,448	0,418	8,26
	20	10,74	0,611	17,59	2,090	0,472	4,43
	21	7,84	0,708	11,08	1,188	0,320	3,71
	22	6,79	0,728	9,33	1,560	0,302	5,17
	23	9,24	0,704	13,13	1,624	0,357	4,55
	24	9,17	0,747	12,29	2,698	0,480	5,62
		M	8,24	0,702	11,94	1,930	0,368
	SD	1,67	0,060	3,22	0,779	0,080	1,37
IV	25	7,86	0,720	10,91	1,521	0,447	3,40
	26	7,20	0,687	10,49	3,447	0,422	8,17
	27	8,37	0,576	14,54	2,676	0,532	5,03
	28	8,58	0,616	13,92	2,194	0,383	5,74
	29	5,39	0,699	7,70	3,192	0,417	7,66
	30	4,86	0,627	7,75	2,765	0,477	5,80
	31	8,09	0,663	12,21	2,180	0,432	5,05
	32	6,79	0,660	10,28	2,935	0,431	6,82
		M	7,14	0,656	10,98	2,614	0,442
	SD	1,39	0,047	2,53	0,623	0,045	1,55
V	33	7,64	0,767	9,96	1,292*	0,152*	8,53*
	34	13,21	0,643	20,55	1,597	0,288	5,54
	35	10,59	0,623	16,98	3,149	0,658	4,79
	36	9,10	0,737	12,35	3,646	0,482	7,56
	37	8,36	0,651	12,84	1,638	0,431	3,80
	38	7,84	0,699	11,21	3,108	0,450	6,91
	39	9,60	0,691	13,89	3,272	0,501	6,53
	40	12,75	0,636	20,04	1,663	0,497	3,35
		M	9,88	0,681	14,73	2,582	0,472
	SD	2,14	0,052	4,00	0,905	0,110	1,60

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 9: Aktivität der Enoyl-CoA-Isomerase und der Succinatdehydrogenase des Testis und des Fettgewebes (U/mg Protein) sowie ECI-SDH-Relation (U/U)

Gruppe	Tier	ECI Testis (U/mg)	SDH Testis (U/mg)	ECI/SDH Testis (U/U)	ECI Fettgew. (U/mg)	SDH Fettgew. (mU/mg)	ECI/SDH Fett. (U/U)
I	1	1,375	0,090	15,21	0,223	11,92	18,69
	2	1,339	0,102	13,18	0,410	7,60	54,02
	3	1,322	0,099	13,37	0,324	8,62	37,56
	4	1,532	0,086	17,85	0,247	12,60	19,60
	5	1,198	0,091	13,21	0,374	12,49	29,92
	6	1,704	0,100	16,98	0,485	9,05	53,65
	7	1,410	0,087	16,20	0,256	10,88	23,53
	8	1,313	0,092	14,20	0,262	10,13	25,85
		M	1,399	0,093	15,03	0,323	10,41
	SD	0,155	0,006	1,83	0,093	1,88	14,26
II	9	1,782	0,081	21,94	0,345	9,12	37,78
	10	1,439	0,087	16,60	1,138*	13,04*	87,25*
	11	1,247	0,089	14,05	0,280	10,56	26,49
	12	1,683	0,085	19,83	0,358	7,88	45,47
	13	1,349	0,080	16,88	0,356	9,33	38,16
	14	1,784	0,097	18,30	0,580	12,75	45,49
	15	1,627	0,107	15,23	0,418	8,62	48,50
	16	1,381	0,082	16,77	0,341	9,95	34,26
		M	1,537	0,089	17,45	0,383	9,75
	SD	0,208	0,009	2,52	0,096	1,58	7,68
III	17	1,674	0,094	17,75	0,453	10,37	43,64
	18	1,347	0,081	16,54	0,366	10,63	34,46
	19	1,629	0,077	21,04	0,375	7,72	48,60
	20	1,419	0,087	16,36	0,390	9,27	42,09
	21	1,258	0,104	12,15	0,242	11,51	21,01
	22	1,661	0,087	19,13	0,384	10,10	38,01
	23	1,366	0,087	15,67	0,426	7,83	54,38
	24	1,304	0,089	14,64	0,614	11,88	51,66
		M	1,457	0,088	16,66	0,406	9,91
	SD	0,170	0,008	2,72	0,104	1,55	10,73
IV	25	1,456	0,081	17,92	0,348	5,90	59,08
	26	1,641	0,089	18,48	0,439	6,00	73,12
	27	1,218	0,079	15,48	0,222	9,47	23,40
	28	1,514	0,090	16,77	0,806	12,26	65,77
	29	1,507	0,093	16,20	0,668	8,63	77,41
	30	1,416	0,099	14,27	0,313	9,57	32,73
	31	1,507	0,096	15,64	0,840	10,37	81,06
	32	1,322	0,098	13,45	1,452*	14,81*	98,01*
		M	1,448	0,091	16,03	0,520	8,89
	SD	0,130	0,008	1,71	0,250	2,30	22,46
V	33	1,332	0,086	15,55	1,863*	13,90*	134,04*
	34	1,577	0,082	19,21	0,435	6,39	67,97
	35	1,525	0,088	17,38	0,280	6,08	46,05
	36	1,342	0,088	15,27	0,349	8,60	40,51
	37	1,645	0,097	16,91	0,254	9,05	28,04
	38	1,392	0,093	15,00	0,267	11,21	23,85
	39	1,512	0,085	17,83	0,325	5,32	61,05
	40	1,542	0,093	16,50	0,458	6,91	66,34
		M	1,483	0,089	16,71	0,338	7,65
	SD	0,115	0,005	1,43	0,081	2,07	18,01

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 10: Relative mRNA-Expression von Enoyl-CoA-Isomerase, PPAR γ und PPAR α der Leber (niedrigster Gruppenmittelwert = 1)

Gruppe	Tiere	ECI		PPAR γ		PPAR α	
		A	B	A	B	A	B
I	1/2	0,767	1,023	0,684	0,681	0,936	1,221
	3/5	0,946	0,946	1,097	0,655	0,761	1,081
	6/7	1,287	1,031	1,218	1,665	1,302	0,698
	M	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	SD	0,264	0,047	0,280	0,576	0,276	0,270
II	9/13	1,345	1,036	1,848	2,071	1,972	1,980
	11/12	1,595	1,269	1,312	1,462	1,862	2,605
	14/15	1,249	1,352	1,009	1,120	2,546	2,549
	M	1,396	1,219	1,390	1,551	2,127	2,378
	SD	0,178	0,164	0,425	0,482	0,367	0,346
III	17/20	1,520	1,464	1,568	1,174	0,965	1,440
	18/22	1,332	1,387	2,129	2,385	1,528	1,769
	21/23	1,337	-	1,097	0,775	0,589	1,142
	M	1,396	1,425	1,598	1,445	1,027	1,450
	SD	0,107	0,054	0,517	0,839	0,473	0,314
IV	25/28	1,701	1,216	1,664	2,180	3,510	1,937
	26/29	1,231	1,661	1,678	0,541	2,487	3,130
	30/31	1,264	1,071	2,000	1,036	2,238	2,805
	M	1,399	1,316	1,781	1,252	2,745	2,624
	SD	0,262	0,307	0,190	0,841	0,674	0,617
V	33/35	1,691	1,758	1,794	0,611	1,380	0,881
	34/38	1,544	0,836	1,598	1,393	1,067	1,154
	37/39	1,598	2,188	1,398	2,473	1,374	1,600
	M	1,611	1,594	1,596	1,493	1,273	1,212
	SD	0,074	0,691	0,198	0,935	0,179	0,363

Tabelle A 11: Gesamtlipid-, Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidgehalte der Leber (mg/g Leber-FM) sowie Anteile an der GL-Fraktion (%)

Gruppe	Tier	Leber-GL (mg/g)	Leber-Chol (mg/g)	Leber-TG (mg/g)	Leber-PL (mg/g)	Chol (% GL)	TG (% GL)	PL (% GL)
I	1	58,46	2,20	23,03	35,77	3,8	39,4	61,2
	2	52,60	2,34	19,05	32,37	4,4	36,2	61,5
	3	46,52	1,97	10,34	33,35	4,2	22,2	71,7
	4	47,40	2,07	7,13*	34,04	4,4	15,0*	71,8
	5	58,41	2,72	22,41	31,47	4,7	38,4	53,9
	6	57,83	2,22	20,94	31,27	3,8	36,2	54,1
	7	45,65	1,84	10,46	31,03	4,0	22,9	68,0
	8	59,61	2,49	19,67	36,03	4,2	33,0	60,4
		M	53,31	2,23	17,99	33,17	4,2	32,6
	SD	6,01	0,29	5,37	1,98	0,3	7,2	7,1
II	9	57,86	2,48	14,75	37,59	4,3	25,5	65,0
	10	43,92	1,88	10,29	32,65	4,3	23,4	74,3
	11	59,09	1,94	19,79	35,21	3,3	33,5	59,6
	12	72,16	2,00	23,89	37,27	2,8	33,1	51,6
	13	49,71	2,02	17,05	32,90	4,1	34,3	66,2
	14	52,01	1,73	16,26	31,78	3,3	31,3	61,1
	15	68,71	2,02	29,40	27,67*	2,9	42,8	40,3*
	16	54,05	2,06	16,43	31,89	3,8	30,4	59,0
		M	57,19	2,02	18,48	34,18	3,6	31,8
	SD	9,48	0,21	5,88	2,49	0,6	5,9	7,1
III	17	77,19	5,27*	35,21	31,42	6,8*	45,6	40,7
	18	61,28	4,30	17,45	30,95	7,0	28,5	50,5
	19	67,51	3,70	30,66	28,79	5,5	45,4	42,6
	20	88,49	4,79	40,50	33,36	5,4	45,8	37,7
	21	51,73	4,32	16,64	29,78	8,4	32,2	57,6
	22	52,33	3,37	18,24	26,54	6,4	34,8	50,7
	23	64,74	4,15	26,38	31,42	6,4	40,7	48,5
	24	43,97*	2,79*	10,70*	29,81*	6,3*	24,3*	67,8*
		M	66,18	4,11	26,44	30,32	6,5	39,0
	SD	13,21	0,50	9,45	2,20	1,1	7,2	6,9
IV	25	60,15	3,20	23,73	28,56	5,3	39,4	47,5
	26	73,55	4,01	34,16	29,66	5,4	46,4	40,3
	27	64,95	3,45	29,74	28,52	5,3	45,8	43,9
	28	77,63	3,38	40,70	30,31	4,4	52,4	39,0
	29	64,42	3,69	27,64	30,47	5,7	42,9	47,3
	30	67,11	3,48	27,91	29,92	5,2	41,6	44,6
	31	70,00	4,24	31,09	29,28	6,1	44,4	41,8
	32	76,79	4,33	35,96	33,72	5,6	46,8	43,9
		M	69,32	3,72	31,37	30,06	5,4	45,0
	SD	6,27	0,42	5,38	1,65	0,5	3,9	3,0
V	33	94,98	3,55	56,09	31,02	3,7	59,1	32,7
	34	104,58	4,42	69,60	32,17	4,2	66,6	30,8
	35	86,44	3,85	48,24	29,09	4,5	55,8	33,6
	36	92,87	4,81	36,27	29,47	5,2	39,0	31,7
	37	97,06	2,85	52,39	29,86	2,9	54,0	30,8
	38	78,20	3,88	30,83	31,22	5,0	39,4	39,9
	39	133,97*	3,26*	92,08*	26,94*	2,4*	68,7*	20,1*
	40	78,69	5,20	33,88	32,09	6,6	43,1	40,8
		M	90,40	4,08	46,76	30,71	4,6	51,0
	SD	9,78	0,80	13,98	1,25	1,2	10,6	4,2

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 12: Cholesterin- und Triglyceridgehalte des Plasmas; Cholesterin-, Triglycerid- und Phospholipidgehalte der Gesamtleber pro 100 g Lebendmasse

Gruppe	Tier	Plasma-Chol (mg/dL)	Plasma-TG (mg/dL)	Leber-GL (mg/100 g)	Leber-Chol (mg/100 g)	Leber-TG (mg/100 g)	Leber-PL (mg/100 g)
I	1	89,73	117,84	198,4	7,46	78,1	121,4
	2	69,70	56,03	182,2	8,11	66,0	112,1
	3	116,00	62,14	147,0	6,22	32,7	105,4
	4	113,92	122,30	153,2	6,70	23,1*	110,0
	5	96,23	142,96	204,1	9,51	78,3	110,0
	6	101,34	95,69	213,0	8,16	77,1	115,1
	7	131,76	67,60	186,8	7,52	42,8	127,0
	8	74,38	71,89	205,8	8,61	67,9	124,4
		M	99,13	92,06	186,3	7,79	63,3
	SD	21,21	32,47	24,5	1,05	18,4	7,7
II	9	113,92	83,63	200,5	8,58	51,1	130,3
	10	114,06	116,85	136,3	5,83	31,9	101,3
	11	93,46	229,89	205,3	6,73	68,8	122,3
	12	94,29	99,99	278,7	7,72	92,3	143,9
	13	102,15	138,50	180,9	7,36	62,0	119,7
	14	111,99	265,26	219,0	7,28	68,5	133,8
	15	103,67	93,05	275,3	8,10	117,8	111,2*
	16	103,28	101,97	200,7	7,67	61,0	118,4
		M	104,60	141,14	212,1	7,41	69,2
	SD	8,19	68,38	47,1	0,84	26,0	13,5
III	17	75,07	39,83	284,5	19,42*	129,8	115,8
	18	84,75	62,97	198,4	13,91	56,5	100,2
	19	74,80	54,54	244,9	13,44	111,2	104,4
	20	96,09	29,25	290,3	15,71	132,9	109,4
	21	85,58	28,92	176,2	14,72	56,7	101,4
	22	83,09	27,77	189,8	12,23	66,2	96,3
	23	84,20	37,02	233,0	14,95	95,0	113,1
	24	68,58	27,44	154,5*	9,81*	37,6*	104,8*
		M	81,52	38,47	231,0	14,16	92,6
	SD	8,48	13,50	45,3	1,24	33,3	7,2
IV	25	92,91	98,67	228,6	12,15	90,2	108,5
	26	106,60	62,80	279,0	15,20	129,6	112,5
	27	116,83	79,00	241,5	12,83	110,6	106,1
	28	98,99	89,08	308,3	13,44	161,6	120,4
	29	99,13	34,38	227,0	12,99	97,4	107,4
	30	100,93	37,19	253,3	13,14	105,4	112,9
	31	104,94	38,34	255,0	15,46	113,3	106,7
	32	91,25	22,97	276,2	15,57	129,3	121,3
		M	101,45	57,80	258,6	13,85	117,2
	SD	8,14	28,51	27,8	1,35	22,7	6,0
V	33	109,09	44,46	411,0	15,37	242,7	134,2
	34	108,39	46,28	441,9	18,66	294,1	135,9
	35	73,41	28,26	322,2	14,35	179,8	108,4
	36	120,84	61,32	365,2	18,92	142,6	115,9
	37	101,48	44,13	416,6	12,21	224,9	128,2
	38	91,80	40,99	286,7	14,22	113,0	114,4
	39	92,63	49,25	530,8*	12,90*	364,8*	106,7*
	40	77,42	32,39	292,5	19,32	125,9	119,3
		M	96,88	43,38	362,3	16,15	189,0
	SD	16,26	10,15	63,1	2,80	67,3	10,6

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 13: Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (g/100g FS), Teil 1

Gruppe	Tier	C 14:0	C 15:0	C 16:0	C 16:1 n7	C 18:0	C 18:1 n9	C 18:2 n6
I	1	0,200	0,095	16,283	0,145	17,349	19,659	13,458
	2	0,196	0,086	16,246	0,154	17,394	20,367	11,024
	3	0,164	0,075	14,841	0,113	19,692	15,700	9,885
	4	0,186	0,101	13,444	0,171	19,571	15,552	11,161
	5	0,267	0,091	17,936	0,231	15,605	24,835	10,358
	6	0,225	0,097	16,844	0,176	16,336	24,890	8,873
	7	0,207	0,084	15,725	0,222	18,950	19,924	8,150
	8	0,211	0,099	16,664	0,167	17,394	21,153	10,407
	M	0,207	0,091	15,998	0,172	17,786	20,260	10,414
SD	0,030	0,009	1,362	0,039	1,490	3,517	1,603	
II	9	0,225	0,088	16,543	0,186	17,412	24,977	9,321
	10	0,210	0,109	15,790	0,132	18,267	14,179	12,581
	11	0,220	0,093	18,454	0,191	16,326	23,062	9,143
	12	0,194	0,069	18,228	0,338	15,880	25,180	9,481
	13	0,211	0,104	15,518	0,224	18,360	21,723	8,913
	14	0,225	0,105	15,853	0,249	17,713	23,234	10,792
	15	0,257	0,111	18,715	0,308	15,495	28,507	8,132
	16	0,217	0,089	16,311	0,168	17,500	20,944	10,558
	M	0,220	0,096	16,927	0,224	17,119	22,726	9,865
SD	0,018	0,014	1,319	0,071	1,085	4,177	1,393	
III	17	0,123	0,083	8,687	0,079	8,942	6,116	42,009
	18	0,128	0,092	9,526	0,093	12,170	5,710	34,911
	19	0,140	0,088	9,284	0,073	8,849	6,175	40,885
	20	0,120	0,085	8,837	0,072	8,186	6,308	42,018
	21	0,108	0,077	9,694	0,080	13,429*	4,476	32,886
	22	0,117	0,079	9,368	0,083	11,345	5,919	31,525
	23	0,160	0,113	10,640	0,105	9,809	6,212	42,051
	24	0,060*	0,064*	10,621*	0,079*	13,656*	4,810*	32,643*
	M	0,128	0,088	9,434	0,084	9,884	5,845	38,040
SD	0,017	0,012	0,642	0,012	1,563	0,637	4,736	
IV	25	0,118	0,091	8,769	0,055	9,986	5,677	38,013
	26	0,114	0,102	8,808	0,053	9,654	5,905	37,682
	27	0,118	0,098	8,146	0,052	8,279	5,774	40,758
	28	0,115	0,087	8,821	0,076	7,502	7,247	39,698
	29	0,119	0,103	9,167	0,059	10,080	5,855	39,376
	30	0,122	0,100	9,603	0,082	8,765	7,225	39,594
	31	0,175	0,106	10,528	0,125	9,580	7,700	42,693
	32	0,108	0,088	8,711	0,059	9,379	6,265	36,118
	M	0,124	0,097	9,069	0,070	9,153	6,456	39,241
SD	0,021	0,007	0,720	0,025	0,901	0,805	2,009	
V	33	0,155	0,100	10,970	0,154	6,584	9,997	45,573
	34	0,131	0,091	9,276	0,106	5,579	8,995	44,763
	35	0,117	0,101	8,453	0,069	5,835	7,769	45,274
	36	0,151	0,095	10,109	0,154	7,576	8,682	42,547
	37	0,159	0,087	11,858	0,208	7,112	10,189	44,229
	38	0,115	0,089	9,293	0,091	9,138	7,825	39,803
	39	0,140	0,090	8,101	0,078	4,711	8,038	48,764
	40	0,112	0,097	9,465	0,055	9,105	6,127	38,675
	M	0,135	0,094	9,690	0,115	6,955	8,453	43,704
SD	0,019	0,005	1,251	0,053	1,609	1,320	3,269	

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 14: Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (g/100g FS), Teil 2

Gruppe	Tier	C 18:3 n6	C 18:3 n3	C 20:1 n9	C 20:2 n6	C 21:0	C 20:3 n6	C 20:4 n6
I	1	0,271	0,336*	0,393	0,287	0,185*	0,639	21,540
	2	0,315	0,263	0,298	0,220	0,111	0,340	21,788
	3	0,241	0,157	0,311	0,202	0,115	0,491	25,910
	4	0,186	0,246	0,239	0,182	0,155	0,491	26,869
	5	0,281	0,253	0,333	0,171	0,069	0,377	19,126
	6	0,254	0,182	0,366	0,159	0,077	0,328	20,621
	7	0,196	0,162	0,264	0,178	0,111	0,349	23,487
	8	0,359	0,196	0,247	0,195	0,077	0,321	22,379
	M	0,263	0,208	0,306	0,199	0,102	0,417	22,715
SD	0,058	0,045	0,056	0,040	0,030	0,113	2,610	
II	9	0,248	0,214	0,435	0,184	0,111	0,329	19,698
	10	0,377	0,277	0,209	0,205	0,163	0,485	25,349
	11	0,232	0,198	0,248	0,189	0,071	0,405	20,833
	12	0,179	0,216	0,283	0,174	0,073	0,460	20,817
	13	0,233	0,190	0,302	0,161	0,110	0,401	22,696
	14	0,262	0,253	0,334	0,210	0,128	0,500	21,412
	15	0,184	0,159	0,378	0,191	0,068	0,362	18,068
	16	0,248	0,244	0,308	0,190	0,100	0,446	22,860
	M	0,245	0,219	0,312	0,188	0,103	0,424	21,467
SD	0,061	0,038	0,071	0,015	0,033	0,060	2,205	
III	17	1,150	0,284	0,245	1,441	0,167	1,233	21,608
	18	1,429	0,231	0,238	1,036	0,135	1,008	25,067
	19	1,327	0,276	0,252	1,296	0,140	1,319	22,893
	20	1,470	0,333	0,232	1,124	0,141	1,259	22,261
	21	0,664	0,248	0,227	1,178	0,159	0,753	27,273
	22	1,507	0,179	0,233	1,016	0,112	1,410	28,112
	23	1,119	0,329	0,234	1,205	0,117	1,052	20,762
	24	0,670*	0,199*	0,339*	1,473*	0,128*	0,939*	25,948*
	M	1,238	0,269	0,237	1,185	0,139	1,148	23,997
SD	0,295	0,055	0,008	0,149	0,020	0,225	2,864	
IV	25	1,431	0,279	0,269	1,268	0,161	1,352	25,411
	26	1,226	0,244	0,298	1,742	0,173	1,660	25,090
	27	1,392	0,283	0,275	1,535	0,184	1,501	24,464
	28	1,655	0,271	0,282	1,485	0,158	1,834	23,916
	29	1,381	0,270	0,266	1,383	0,151	1,668	23,568
	30	1,742	0,258	0,259	1,287	0,133	1,667	22,949
	31	1,096	0,332	0,266	1,094	0,103	1,189	19,425
	32	1,538	0,219	0,249	1,291	0,148	1,689	26,445
	M	1,433	0,270	0,270	1,386	0,152	1,570	23,908
SD	0,213	0,033	0,015	0,199	0,025	0,210	2,123	
V	33	1,255	0,359	0,224	1,024	0,126	1,074	16,903
	34	1,589	0,304	0,259	1,283	0,139	1,958	18,829
	35	1,403	0,326	0,246	1,281	0,176	1,535	19,839
	36	1,056	0,324	0,270	1,332	0,141	1,493	18,938
	37	1,074	0,329	0,230	1,047	0,093	1,318	16,116
	38	1,037	0,285	0,251	1,106	0,125	1,110	21,694
	39	1,596	0,387	0,234	1,075	0,144	1,942	17,997
	40	1,074	0,262	0,239	1,282	0,135	1,296	23,483
	M	1,260	0,322	0,244	1,179	0,135	1,466	19,225
SD	0,240	0,040	0,016	0,127	0,023	0,339	2,432	

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 15: Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (g/100g FS), Teil 3

Gruppe	Tier	C 20:5 n3	C 22:1 n9	C 22:4 n6	C 22:5 n3	C 22:6 n3
I	1	0,157	0,133	0,712	0,703	7,455
	2	0,109	0,160	0,557	0,577	9,795
	3	0,080	0,261	0,711	0,748	10,303
	4	0,143	0,215	0,446	0,673	9,969
	5	0,089	0,158	0,593	0,600	8,629
	6	0,073	0,153	0,626	0,612	9,125
	7	0,037	0,255	0,648	0,511	10,534
	8	0,080	0,117	0,632	0,256	9,057
	M	0,096	0,182	0,616	0,585	9,358
SD	0,039	0,055	0,087	0,153	1,010	
II	9	0,106	0,165	0,835	0,912	8,010
	10	0,153	0,199	0,657	0,936	9,722
	11	0,061	0,091	0,681	0,580	8,921
	12	0,074	0,113	0,726	0,523	6,991
	13	0,069	0,160	0,567	0,508	9,550
	14	0,127	0,149	0,537	0,575	7,343
	15	0,039	0,115	0,595	0,431	7,883
	16	0,142	0,147	0,592	0,605	8,331
	M	0,096	0,142	0,649	0,634	8,344
SD	0,041	0,034	0,098	0,187	0,989	
III	17	0,061	0,122	3,451	0,451	3,708
	18	0,042	0,341	3,301	0,580	3,972
	19	0,056	0,137	2,981	0,379	3,451
	20	0,048	0,120	3,368	0,403	3,613
	21	0,035	0,290	2,651	0,438	5,334
	22	0,049	0,338	2,890	0,550	5,167
	23	0,055	0,118	2,451	0,365	3,242
	24	n.b.	0,370*	3,359*	0,527*	4,115*
	M	0,049	0,209	3,013	0,452	4,069
SD	0,009	0,108	0,379	0,083	0,839	
IV	25	0,052	0,260	2,531	0,392	3,883
	26	0,056	0,198	3,122	0,355	3,525
	27	0,062	0,204	2,729	0,436	3,710
	28	0,070	0,077	3,079	0,383	3,268
	29	0,055	0,232	2,577	0,403	3,286
	30	0,053	0,192	2,378	0,315	3,276
	31	0,033	0,237	1,906	0,292	3,120
	32	0,060	0,189	3,180	0,448	3,817
	M	0,055	0,199	2,688	0,378	3,486
SD	0,011	0,055	0,436	0,055	0,289	
V	33	0,039	0,063	1,921	0,214	3,256
	34	0,061	0,060	3,153	0,301	3,122
	35	0,062	0,070	3,384	0,358	3,701
	36	0,044	0,115	2,794	0,281	3,896
	37	0,035	0,072	1,844	0,241	3,759
	38	0,033	0,166	2,402	0,344	5,092
	39	0,077	0,042	3,845	0,341	2,399
	40	0,049	0,158	3,406	0,471	4,509
	M	0,050	0,093	2,844	0,319	3,717
SD	0,015	0,047	0,733	0,080	0,833	

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 16: Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (mg/g FM), Teil 1

Gruppe	Tier	C 14:0	C 15:0	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1 n9	C 18:2 n6
I	1	0,118	0,056	9,621	0,086	10,269	11,599	7,965
	2	0,086	0,038	7,081	0,067	7,581	8,876	4,805
	3	0,058	0,027	5,266	0,040	6,986	5,570	3,507
	4	0,082	0,044	5,927	0,075	8,629	6,856	4,921
	5	0,150	0,051	10,029	0,129	8,752	13,755	5,784
	6	0,109	0,047	8,182	0,086	7,936	12,090	4,311
	7	0,081	0,033	6,129	0,087	7,387	7,767	3,177
	8	0,102	0,048	8,010	0,080	8,361	10,168	5,002
	M	0,098	0,043	7,531	0,081	8,238	9,585	4,934
SD	0,028	0,010	1,737	0,025	1,026	2,814	1,485	
II	9	0,092	0,036	6,786	0,076	7,164	10,265	3,825
	10	0,095	0,049	7,159	0,060	8,284	6,427	5,705
	11	0,129	0,054	10,786	0,112	9,548	13,476	5,347
	12	0,083	0,030	7,787	0,145	6,784	10,757	4,051
	13	0,111	0,055	8,168	0,118	9,668	11,434	4,693
	14	0,105	0,049	7,392	0,116	8,259	10,833	5,032
	15	0,186*	0,080	13,540*	0,222*	11,247*	20,593*	5,889
	16	0,102	0,042	7,657	0,079	8,216	9,832	4,957
	M	0,102	0,049	7,962	0,101	8,275	10,432	4,937
SD	0,015	0,015	1,322	0,030	1,082	2,120	0,732	
III	17	0,113	0,057	5,998	0,055	6,174	4,223	29,010
	18	0,057	0,041	4,256	0,042	5,420	2,546	15,612
	19	0,084	0,052	5,529	0,043	5,270	3,678	24,349
	20	0,096	0,068	7,059	0,058	6,539	5,039	33,563
	21	0,043	0,031	3,869	0,032	5,360	1,786	13,123
	22	0,048	0,033	3,855	0,034	4,668	2,435	12,972
	23	0,105	0,074	6,869	0,068	6,425	4,069	27,555
	24	0,013*	0,014*	2,274*	0,017*	2,924*	1,030*	6,990*
	M	0,078	0,051	5,348	0,047	5,694	3,397	22,312
SD	0,028	0,017	1,373	0,013	0,695	1,166	8,363	
IV	25	0,074	0,056	5,457	0,034	6,215	3,533	23,657
	26	0,071	0,064	5,486	0,033	6,015	3,676	23,461
	27	0,129	0,107	8,853	0,056	8,980	6,268	44,330
	28	0,093	0,071	7,152	0,062	6,087	5,872	32,175
	29	0,072	0,062	5,523	0,036	6,074	3,528	23,725
	30	0,072	0,059	5,652	0,048	5,158	4,253	23,306
	31	0,164	0,099	9,876	0,117	8,989	7,220	40,034
	32	0,082	0,067	6,607	0,044	7,114	4,751	27,394
	M	0,094	0,073	6,826	0,054	6,829	4,888	29,760
SD	0,034	0,019	1,704	0,028	1,431	1,408	8,317	
V	33	0,154	0,099	10,904	0,153	6,539	9,933	45,301
	34	0,181	0,126	12,887	0,148	7,748	12,492	62,197
	35	0,138	0,119	9,983	0,081	6,889	9,176	53,489
	36	0,135	0,086	9,068	0,138	6,797	7,787	38,164
	37	0,159	0,087	11,840	0,208	7,102	10,175	44,168
	38	0,081	0,062	6,483	0,064	6,373	5,458	27,772
	39	0,197	0,126	11,344	0,109	6,596	11,255	68,285
	40	0,078	0,068	6,625	0,039	6,373	4,289	27,073
	M	0,140	0,097	9,892	0,118	6,802	8,820	45,806
SD	0,043	0,025	2,357	0,055	0,459	2,816	14,978	

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 17: Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (mg/g FM), Teil 2

Gruppe	Tier	C 18:3 n6	C 18:3 n3	C 20:1 n9	C 20:2 n6	C 21:0	C 20:3 n6	C 20:4 n6
I	1	0,160	0,199	0,234	0,170	0,110	0,379	12,772
	2	0,137	0,115	0,130	0,096	0,048	0,148	9,497
	3	0,085	0,056	0,110	0,072	0,041	0,174	9,194
	4	0,082	0,108	0,106	0,080	0,068	0,217	11,849
	5	0,156	0,141	0,182	0,096	0,038	0,212	10,755
	6	0,124	0,088	0,178	0,077	0,034	0,159	10,020
	7	0,078	0,063	0,103	0,070	0,043	0,136	9,158
	8	0,168	0,094	0,119	0,094	0,037	0,154	10,758
	M	0,124	0,108	0,145	0,094	0,053	0,197	10,500
SD	0,037	0,046	0,047	0,032	0,026	0,079	1,302	
II	9	0,102	0,088	0,179	0,076	0,045	0,135	8,090
	10	0,171	0,126	0,095	0,093	0,074	0,220	11,496
	11	0,136	0,116	0,145	0,111	0,042	0,237	12,187
	12	0,076	0,092	0,121	0,075	0,031	0,197	8,894
	13	0,123	0,100	0,159	0,085	0,058	0,212	11,957
	14	0,122	0,118	0,156	0,098	0,060	0,233	9,985
	15	0,133	0,115	0,274	0,139	0,049	0,263	13,141
	16	0,116	0,115	0,145	0,089	0,047	0,209	10,733
	M	0,122	0,109	0,159	0,096	0,051	0,213	10,810
SD	0,027	0,014	0,053	0,021	0,013	0,037	1,727	
III	17	0,794	0,196	0,169	0,995	0,115	0,852	14,924
	18	0,640	0,103	0,107	0,463	0,055	0,451	11,225
	19	0,790	0,165	0,150	0,772	0,083	0,785	13,634
	20	1,174	0,266	0,186	0,898	0,113	1,006	17,782
	21	0,265	0,099	0,091	0,470	0,063	0,300	10,886
	22	0,620	0,074	0,096	0,418	0,046	0,580	11,568
	23	0,733	0,220	0,154	0,791	0,082	0,692	13,644
	24	0,144*	0,043*	0,072*	0,315*	0,028*	0,201*	5,557*
	M	0,717	0,160	0,136	0,687	0,080	0,667	13,380
SD	0,271	0,071	0,038	0,233	0,027	0,242	2,451	
IV	25	0,891	0,174	0,167	0,789	0,100	0,842	15,815
	26	0,763	0,152	0,185	1,085	0,103	1,033	15,627
	27	1,517	0,309	0,298	1,667	0,200	1,632	26,637*
	28	1,342	0,229	0,229	1,204	0,128	1,486	19,400
	29	0,832	0,163	0,160	0,833	0,091	1,005	14,201
	30	1,025	0,152	0,152	0,757	0,078	0,981	13,508
	31	1,027	0,311	0,250	1,026	0,097	1,115	18,221
	32	1,166	0,166	0,189	0,979	0,113	1,281	20,059
	M	1,070	0,207	0,204	1,043	0,114	1,172	16,690
SD	0,259	0,068	0,051	0,296	0,038	0,272	2,558	
V	33	1,248	0,367	0,222	1,018	0,125	1,067	16,804
	34	2,208	0,422	0,360	1,782	0,193	2,721	26,173
	35	1,657	0,385	0,291	1,513	0,208	1,814	23,445
	36	0,947	0,291	0,242	1,195	0,126	1,339	16,989
	37	1,072	0,328	0,229	1,045	0,093	1,317	16,095
	38	0,723	0,199	0,175	0,771	0,088	0,775	15,139
	39	2,235	0,542	0,328	1,505	0,202	2,720	25,202
	40	0,752	0,183	0,167	0,898	0,094	0,907	16,440
	M	1,355	0,340	0,252	1,216	0,141	1,582	19,536
SD	0,611	0,118	0,069	0,351	0,052	0,770	4,569	

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 18: Fettsäuren der Gesamtlipidfraktion der Leber (mg/g FM), Teil 3

Gruppe	Tier	C 20:5 n3	C 22:1 n9	C 22:4 n6	C 22:5 n3	C 22:6 n3
I	1	0,093*	0,079	0,421	0,417	4,415
	2	0,048	0,070	0,243	0,252	4,270
	3	0,028	0,093	0,252	0,265	3,657
	4	0,064	0,095	0,197	0,298	4,397
	5	0,049	0,090	0,330	0,333	4,829
	6	0,036	0,070	0,304	0,297	4,434
	7	0,015	0,100	0,253	0,199	4,108
	8	0,038	0,056	0,304	0,123	4,354
	M	0,040	0,081	0,288	0,273	4,308
	SD	0,016	0,015	0,068	0,088	0,333
II	9	0,043	0,068	0,339	0,367	3,290
	10	0,069	0,090	0,298	0,424	4,408
	11	0,035	0,053	0,398	0,339	5,219
	12	0,032	0,048	0,310	0,224	2,987*
	13	0,036	0,084	0,299	0,268	5,033
	14	0,059	0,070	0,250	0,268	3,424
	15	0,028	0,084	0,432	0,315	5,732*
	16	0,066	0,069	0,278	0,284	3,912
	M	0,046	0,071	0,325	0,311	4,214
	SD	0,016	0,015	0,061	0,064	0,811
III	17	0,042	0,084	2,383	0,312	2,561
	18	0,019	0,156	1,477	0,260	1,780
	19	0,033	0,081	1,775	0,226	2,055
	20	0,039	0,096	2,691	0,322	2,886
	21	0,014	0,116	1,058	0,175	2,130
	22	0,020	0,139	1,189	0,226	2,126
	23	0,036	0,078	1,616	0,240	2,138
	24	0,025*	0,079*	0,719*	0,113*	0,881*
	M	0,029	0,107	1,741	0,252	2,239
	SD	0,011	0,031	0,602	0,052	0,366
IV	25	0,033	0,162	1,575	0,244	2,417
	26	0,035	0,123	1,944	0,221	2,196
	27	0,068	0,223*	2,968	0,479	4,047
	28	0,056	0,063*	2,496	0,282	2,652
	29	0,033	0,140	1,553	0,243	1,980
	30	0,031	0,113	1,400	0,186	1,929
	31	0,031	0,222	1,787	0,275	2,927
	32	0,045	0,144	2,412	0,340	2,896
	M	0,042	0,151	2,017	0,284	2,630
	SD	0,014	0,039	0,553	0,091	0,688
V	33	0,039	0,062	1,908	0,213	3,237
	34	0,085	0,084	4,380	0,419	4,342
	35	0,073	0,083	3,999	0,423	4,375
	36	0,040	0,103	2,507	0,252	3,495
	37	0,035	0,072	1,841	0,241	3,755
	38	0,023	0,116	1,676	0,240	3,554
	39	0,108*	0,058	5,384*	0,478	3,359
	40	0,034	0,111	2,385	0,330	3,157
	M	0,047	0,086	2,671	0,324	3,659
	SD	0,023	0,022	1,084	0,103	0,470

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 19: Fettsäuren der Triglycerid-Fraktion der Leber (g/100g FS), Teil 1

Gruppe	Tier	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1 n9	C 18:2 n6	C 18:3 n6	C 18:3 n3	C 20:1 n9
I	1	23,027	0,282	8,328	41,415	17,481	0,358	0,647	1,319
	2	23,040	0,271	8,679	43,953	15,678	0,487	0,495	0,811
	3	22,361	0,290	9,281	43,560	14,534	0,458	0,394	1,341
	4	22,067	0,334	11,627	43,355	15,082	0,611	0,608	0,769
	5	23,297	0,410	10,048	45,000	13,296	0,370	0,475	1,317
	6	22,383	0,317	9,630	48,630	11,721	0,282	0,345	1,315
	7	22,380	0,511	10,789	46,455	11,332	0,334	0,542	1,212
	8	23,583	0,287	8,987	44,034	14,991	0,477	0,409	0,811
	M	22,767	0,338	9,671	44,550	14,264	0,422	0,489	1,112
SD	0,540	0,083	1,110	2,182	2,057	0,106	0,106	0,264	
II	9	25,747	0,408	10,304	43,788	12,568	0,477	0,410	1,215
	10	27,015	0,316	8,235	35,299*	18,807	0,613	0,759	1,131
	11	28,173	0,373	8,656	43,329	11,630	0,316	0,414	0,800
	12	26,693	0,502	7,264	48,120	11,433	0,309	0,359	0,679
	13	24,099	0,530	9,844	46,404	12,364	0,322	0,480	0,756
	14	24,024	0,522	8,076	46,305	13,684	0,289	0,522	0,882
	15	27,615	0,478	8,341	48,304	9,842	0,208	0,308	0,660
	16	25,066	0,333	8,374	43,090	14,426	0,309	0,561	0,791
	M	26,054	0,433	8,637	45,620	13,094	0,355	0,477	0,864
SD	1,571	0,086	0,982	2,219	2,700	0,128	0,141	0,204	
III	17	8,326	0,079	2,460	8,719	57,624	1,403	0,404	0,325
	18	8,639	0,092	2,868	8,743	53,831	2,418	0,409	0,258
	19	8,567	0,096	2,284	9,001	56,485	1,622	0,416	0,295
	20	8,163	0,066	2,115	8,724	56,146	1,730	0,408	0,293
	21	9,257	0,072	2,695	7,391	56,469	1,065	0,407	0,678
	22	8,922	0,082	2,572	9,829	50,333	2,384	0,267	0,506
	23	9,307	0,101	2,730	8,633	58,491	1,469	0,432	0,622
	24	9,392	0,053	2,338	8,795	56,239	2,004	0,436	0,400
	M	8,822	0,080	2,508	8,729	55,702	1,762	0,397	0,422
SD	0,469	0,016	0,255	0,664	2,549	0,478	0,054	0,161	
IV	25	9,612	0,066	2,440	8,800	56,094	2,049	0,418	0,469
	26	9,206	0,030	2,436	8,994	54,613	1,692	0,379	0,424
	27	8,677	0,059	2,377	9,345	56,395	1,888	0,374	0,375
	28	8,964	0,080	2,152	10,409	52,875	2,165	0,359	0,342
	29	9,302	0,042	2,266	8,856	56,717	2,148	0,397	0,460
	30	9,512	0,079	2,067	10,318	55,112	2,584	0,363	0,447
	31	9,986	0,141	2,761	10,734	58,931	1,524	0,463	0,542
	32	8,805	0,078	2,359	10,601	54,799	1,728	0,381	0,468
	M	9,258	0,072	2,357	9,757	55,692	1,972	0,392	0,441
SD	0,440	0,033	0,211	0,836	1,790	0,337	0,034	0,062	
V	33	11,306	0,170	2,541	13,549	57,391	1,362	0,432	0,355
	34	8,836	0,112	2,205	11,025	54,019	1,722	0,356	0,393
	35	8,215	0,138	2,595	10,072	57,097	1,356	0,457	0,423
	36	9,031	0,183	2,358	10,304	56,211	1,342	0,454	0,447
	37	9,774	0,241	2,351	10,689	58,142	1,557	0,579	0,515
	38	9,527	0,129	2,854	11,852	57,625	1,252	0,428	0,490
	39	7,482	0,091	2,036	9,167	56,176	1,775	0,450	0,285
	40	9,231	0,088	2,469	8,996	54,708	1,425	0,402	0,448
	M	9,175	0,144	2,426	10,707	56,421	1,474	0,445	0,420
SD	1,131	0,052	0,250	1,481	1,445	0,191	0,064	0,074	

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 20: Fettsäuren der Triglycerid-Fraktion der Leber (g/100g FS), Teil 2

Gruppe	Tier	C 20:2 n6	C 20:3 n6	C 20:4 n6	C 22:1 n9	C 22:4 n6	C 22:5 n3	C 22:6 n3
I	1	n.n.	n.n.	2,525	n.n.	1,182	1,787	1,687*
	2	n.n.	n.n.	3,427	n.n.	0,709	1,387	1,062
	3	n.n.	n.n.	3,866	n.n.	1,080	1,804	0,901
	4	n.n.	n.n.	2,884	n.n.	0,493	1,069	1,069*
	5	n.n.	n.n.	2,921	n.n.	0,645	1,601	0,749
	6	n.n.	n.n.	2,618	n.n.	0,579	1,526	0,654
	7	n.n.	n.n.	3,364	n.n.	0,798	1,368	0,996
	8	n.n.	n.n.	4,100	n.n.	0,732	0,856	0,692
	M			3,213			0,777	1,425
SD			0,574			0,239	0,332	0,169
II	9	n.n.	n.n.	2,105	n.n.	0,421	2,229	n.b.
	10	n.n.	n.n.	4,024	n.n.	1,380	1,894	0,486
	11	n.n.	n.n.	2,794	n.n.	0,935	1,526	0,605
	12	n.n.	n.n.	2,355	n.n.	0,712	0,787*	0,790
	13	n.n.	n.n.	2,085	n.n.	0,913	1,916	0,409
	14	n.n.	n.n.	2,088	n.n.	0,728	1,900	0,866
	15	n.n.	n.n.	1,510	n.n.	0,666	1,470	0,599
	16	n.n.	n.n.	3,383	n.n.	0,809	1,640	1,330*
	M			2,543			0,820	1,796
SD			0,817			0,277	0,266	0,175
III	17	1,401	1,635	10,895	0,234	5,417	0,604	0,461
	18	0,857	1,443	13,072	0,572	5,708	0,787	0,368
	19	1,034	2,075	11,473	0,350	5,025	0,751	0,529
	20	1,006	1,872	12,767	0,296	5,220	0,681	0,441
	21	1,173	1,812	11,500	0,588	5,439	0,842	0,512
	22	0,946	1,935	14,843*	0,367	5,670	0,775	0,585
	23	1,045	1,231	9,916	0,361	4,303	0,788	0,439
	24	0,926	2,181	11,039	0,284	4,787	0,661	0,491
	M	1,048	1,773	11,523	0,381	5,196	0,736	0,478
SD	0,171	0,320	1,093	0,130	0,477	0,079	0,066	
IV	25	0,879	2,219	10,746	0,378	4,542	0,780	0,444
	26	1,286	2,250	11,729	0,280	5,596	0,563	0,523
	27	1,277	2,141	10,771	0,174	5,084	0,606	0,457
	28	1,031	2,364	12,893	0,209	5,078	0,657	0,423
	29	1,083	2,460	10,309	0,238	4,611	0,652	0,461
	30	0,902	2,305	10,823	0,251	3,889	0,865	0,432
	31	0,717	1,340	8,576	0,354	3,045	0,544	0,366
	32	0,998	1,862	12,085	0,271	4,484	0,585	0,531
	M	1,022	2,118	10,991	0,269	4,541	0,657	0,454
SD	0,195	0,361	1,298	0,069	0,790	0,112	0,053	
V	33	0,881	1,190	7,562*	0,096	2,537	0,290	0,365
	34	1,147	2,207	12,732	0,227	3,909	0,427	0,699
	35	1,147	1,365	12,013	0,347	3,680	0,450	0,713
	36	1,197	2,020	11,420	0,394	3,540	0,428	0,705
	37	0,879	2,053	9,589	0,376	2,365	0,303	0,617
	38	0,984	1,463	9,409	0,368	2,734	0,378	0,527
	39	0,962	2,209	13,953	0,175	4,238	0,351	0,706
	40	1,247	1,958	13,145	0,379	4,354	0,414	0,657
	M	1,055	1,808	11,752	0,295	3,420	0,380	0,624
SD	0,146	0,404	1,737	0,113	0,777	0,060	0,122	

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen, n.n. nicht nachweisbar

Tabelle A 21: Fettsäuren der Phospholipid-Fraktion der Leber (g/100g FS), Teil 1

Gruppe	Tier	C 16:0	C 16:1	C 18:0	C 18:1 n9	C 18:2 n6	C 20:1 n9	C 20:2 n6
I	1	12,897	0,048	28,224	3,746	6,739	0,140	0,096
	2	14,000	0,067	26,645	3,763	4,534	0,149	0,070
	3	14,019	0,052	26,403	3,743	4,362	0,165	0,086
	4	13,730	0,116*	27,915	4,495	5,856	0,183	0,081
	5	13,792	0,058	26,784	3,671	4,170	0,146	0,050
	6	14,409	0,102	25,364	4,263	3,688	0,844*	0,025
	7	13,561	0,070	26,110	3,776	3,552	0,193	0,064
	8	13,248	0,057	26,564	3,090	3,729	0,142	0,031
	M	13,707	0,065	26,751	3,818	4,579	0,160	0,063
SD	0,474	0,018	0,928	0,418	1,139	0,021	0,026	
II	9	12,710	0,058	28,024	3,355	3,904	0,201	n.b.
	10	14,717	0,080	26,444	3,736	6,161	0,198	n.b.
	11	13,994	0,063	27,562	3,389	3,576	0,128	n.b.
	12	13,676	0,045	27,438	3,727	3,778	0,121	0,051
	13	12,793	0,065	29,016	3,641	3,985	0,146	0,051
	14	11,793	0,065	27,826	4,066	5,363	0,170	0,059
	15	11,717	0,048	26,554	2,941	2,798	0,180	0,083
	16	13,008	0,065	26,723	3,815	4,617	0,116	0,033
	M	13,051	0,061	27,448	3,584	4,273	0,157	0,055
SD	1,042	0,011	0,868	0,346	1,069	0,034	0,018	
III	17	13,751	0,052	24,183	1,618	10,535	0,275	1,535
	18	14,054	0,088	23,269	2,226	11,640	0,307	1,270
	19	13,399	0,069	20,570	2,028	11,015	0,381	1,803
	20	14,246	0,055	24,158	1,682	9,038	0,282	1,304
	21	13,982	0,085	24,161	1,524	10,368	0,195	0,914
	22	14,923	0,067	24,790	1,888	8,704	0,234	1,056
	23	13,687	0,069	23,997	1,628	10,347	0,299	1,481
	24	14,373	0,064	24,304	2,275	10,926	0,290	1,259
	M	14,052	0,068	23,679	1,859	10,322	0,283	1,328
SD	0,471	0,013	1,324	0,291	0,993	0,054	0,279	
IV	25	12,198	0,056	21,077	1,942	11,033	0,385	1,813
	26	12,362	0,066	22,248	2,207	9,821	0,412	2,395
	27	12,806	0,046	24,824	2,119	10,557	0,364	2,189
	28	13,393	0,063	20,520	2,170	9,454	0,404	2,471
	29	12,851	0,043	23,912	1,996	10,820	0,329	1,743
	30	14,343	0,053	24,202	2,512	10,999	0,343	1,872
	31	13,248	0,060	25,116	1,763	9,498	0,281	1,441
	32	13,604	0,039	22,637	1,977	9,044	0,323	1,639
	M	13,100	0,053	23,067	2,086	10,153	0,355	1,945
SD	0,698	0,010	1,715	0,223	0,789	0,045	0,368	
V	33	15,357	0,074	25,735	1,975	6,583	0,259	1,468
	34	14,233	0,058	24,099	1,873	6,952	0,344	1,986
	35	14,512	0,056	26,399	1,803	7,332	0,249	1,414
	36	13,880	0,063	24,580	1,625	7,232	0,255	1,251
	37	15,038	0,065	25,668	1,445	5,677	0,181	1,015
	38	13,509	0,058	23,654	1,745	6,814	0,255	0,889
	39	14,009	0,057	23,349	1,735	8,348	0,291	1,378
	40	14,302	0,046	24,164	1,424	8,189	0,229	1,140
	M	14,355	0,060	24,706	1,703	7,141	0,258	1,318
SD	0,606	0,008	1,101	0,195	0,862	0,047	0,337	

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen.

C 18:3 n-6 konnte aufgrund von Matrixeffekten nicht quantifiziert werden.

Tabelle A 22: Fettsäuren der Phospholipid-Fraktion der Leber (g/100g FS), Teil 2

Gruppe	Tier	C 20:3 n6	C 20:4 n6	C 22:1 n9	C 22:4 n6	C 22:5 n3	C 22:6 n3
I	1	0,698*	35,267	0,219	0,472	0,851	10,603
	2	0,306	35,079	0,152	0,505	0,802	13,927
	3	0,380	35,861	0,194	0,588	0,994	13,153
	4	0,525	35,321	0,343	0,394	0,666	10,376
	5	0,336	35,070	0,289	0,585	1,018	14,032
	6	0,283	33,640	0,180	0,629	0,866	15,656
	7	0,324	35,170	0,271	0,673	0,690	15,545
	8	0,253	35,914	0,155	0,701	0,900	15,215
	M	0,344	35,165	0,225	0,568	0,849	13,563
SD	0,089	0,699	0,069	0,105	0,127	2,087	
II	9	0,374	36,190	0,236	0,552	0,736	13,640
	10	0,490	34,461	0,428	0,461	1,256	11,555
	11	0,397	35,022	0,267	0,643	0,847	13,972
	12	0,445	36,326	0,085	0,588	0,836	12,772
	13	0,424	34,808	0,258	0,560	0,692	13,418
	14	0,602	36,817	0,234	0,474	0,778	11,690
	15	0,371	37,546	n.b.	0,644	0,503	16,484
	16	0,428	36,573	0,192	0,548	0,938	12,851
	M	0,442	35,968	0,243	0,559	0,823	13,298
SD	0,076	1,087	0,102	0,068	0,217	1,551	
III	17	0,308	36,364	0,155	1,992	0,787	8,446
	18	0,303	35,761	0,139	2,318	0,929	7,698
	19	0,410	40,109	0,352	1,507	0,573	7,783
	20	0,290	37,652	0,262	1,832	0,648	8,553
	21	0,287	37,615	0,416	1,689	0,648	8,117
	22	0,396	36,738	0,180	1,873	0,844	8,309
	23	0,381	38,192	0,458	1,470	0,585	7,405
	24	0,327	35,621	0,538	2,046	0,941	7,034
	M	0,338	37,256	0,313	1,841	0,744	7,918
SD	0,050	1,477	0,151	0,284	0,150	0,532	
IV	25	0,486	40,862	0,380	1,565	0,652	7,552
	26	0,520	40,444	0,263	1,589	0,588	7,084
	27	0,539	37,491	0,110	1,750	0,648	6,559
	28	0,700	40,155	0,245	1,962	0,678	7,783
	29	0,567	38,569	0,110	1,665	0,683	6,713
	30	0,665	36,064	0,073	1,759	0,597	6,518
	31	0,455	38,130	0,173	1,600	0,691	7,543
	32	0,406	39,312	0,098	1,994	0,900	8,026
	M	0,542	38,878	0,181	1,736	0,680	7,222
SD	0,100	1,635	0,106	0,166	0,097	0,584	
V	33	0,385	38,052	0,106	1,364	0,310	8,333
	34	0,476	38,458	0,119	1,541	0,480	9,382
	35	0,289	36,280	0,069	1,726	0,534	9,337
	36	0,351	38,386	0,211	1,446	0,482	10,238
	37	0,368	38,405	0,181	1,300	0,426	10,232
	38	0,286	39,479	0,405	1,584	0,479	10,845
	39	0,351	38,648	0,322	1,756	0,658	9,098
	40	0,247	38,018	0,226	1,724	0,811	9,479
	M	0,344	38,216	0,205	1,555	0,522	9,618
SD	0,071	0,904	0,114	0,174	0,152	0,788	

* als Ausreißer aus der Auswertung ausgeschlossen

Tabelle A 23: 3-Hydroxybutyrat-Konzentrationen in Plasma und im Urin der Sammelperiode

Gruppe	Tier	3-HB Plasma ($\mu\text{mol/L}$)	3-HB Urin ($\mu\text{mol/L}$)	3-HB Urin (nmol/d)
I	1	799	10,8	109,5
	2	1347	19,5	164,7
	3	1365	12,4	182,5
	5	1340	9,0	112,0
	6	1057	16,7	98,0
	M	1182	13,7	133,4
	SD	249	4,3	37,6
II	9	645	11,3	131,9
	12	981	15,0	143,7
	13	430	10,9	89,0
	14	529	16,5	179,0
	15	357	17,0	97,4
	M	588	14,1	128,2
	SD	245	2,9	36,5
III	18	1210	19,9	173,7
	19	1237	16,9	171,2
	21	1611	24,8	248,1
	22	1756	26,1	115,5
	23	1277	4,7	101,5
	M	1418	18,5	162,0
	SD	249	8,6	58,0
IV	25	607	20,9	158,4
	26	643	15,4	125,4
	27	670	7,5	122,8
	29	894	19,8	158,6
	30	657	14,2	140,1
	M	694	15,6	141,0
	SD	114	5,3	17,3
V	33	1185	6,4	90,5
	34	1331	6,3	112,4
	35	1922	22,5	77,1
	36	1830	6,7	99,7
	37	1896	21,4	134,4
	M	1633	12,7	102,8
	SD	348	8,5	21,9

Tabelle A 24: FS-Methylester im FAME-Mix C4-C24 (18919, Sigma)

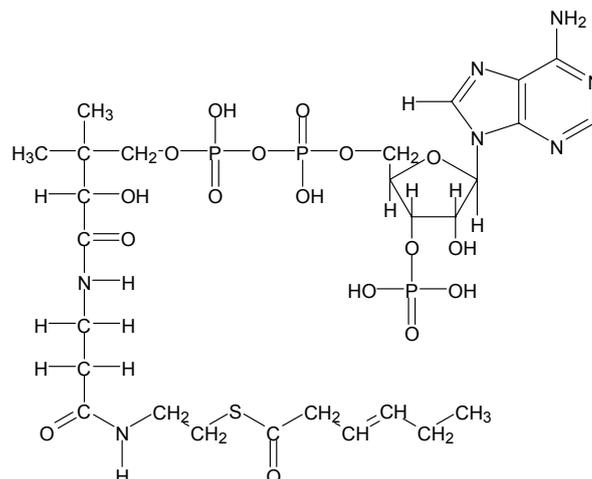
FS	Chemische Bezeichnung	Trivialname
C 4:0	Butansäure	Buttersäure
C 6:0	Hexansäure	Capronsäure
C 8:0	Octansäure	Caprylsäure
C 10:0	Decansäure	Caprinsäure
C 11:0	Undecansäure	
C 12:0	Dodecansäure	Laurinsäure
C 13:0	Tridecansäure	
C 14:0	Tetradecansäure	Myristinsäure
C 14:1	cis-9-Tetradecensäure	Myristoleinsäure
C 15:0	Pentadecansäure	
C 15:1	cis-10-Pentadecensäure	
C 16:0	Hexadecansäure	Palmitinsäure
C 16:1	cis-9-Hexadecensäure	Palmitoleinsäure
C 17:0	Heptadecansäure	Margarinsäure
C 17:1	cis-10-Heptadecensäure	
C 18:0	Octadecansäure	Stearinsäure
C 18:1 n9	cis-9-Octadecensäure	Ölsäure
C 18:1 n9	trans-9-Octadecensäure	Elaidinsäure
C 18:2 n6	cis-9, 12-Octadecadiensäure	Linolsäure
C 18:2 n6	trans-9, 12-Octadecadiensäure	Linolaidinsäure
C 18:3 n3	cis-9, 12, 15-Octadecatriensäure	alpha-Linolensäure
C 18:3 n6	cis-6, 9, 12-Octadecatriensäure	gamma-Linolensäure
C 20:0	Eicosansäure	Arachinsäure
C 20:1 n9	cis-11-Eicosensäure	Gondosäure
C 20:2 n6	cis-11, 14-Eicosadiensäure	
C 20:3 n3	cis-11, 14, 17-Eicosatriensäure	
C 20:3 n6	cis-8, 11, 14-Eicosatriensäure	
C 20:4 n6	cis-5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure	Arachidonsäure
C 20:5 n3	cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaensäure	
C 21:0	Heneicosansäure	
C 22:0	Docosansäure	Behensäure
C 22:1 n9	cis-13-Docosensäure	Erucasäure
C 22:2 n6	cis-13, 16-Docosadiensäure	
C 22:6 n3	cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-Docosahexaensäure	
C 23:0	Tricosansäure	
C 24:0	Tetracosansäure	Lignocerinsäure
C 24:1 n9	cis-15-Tetracosensäure	Nervonsäure

Elektrosprayionisierungs-Ion-Trap-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Es wurde ein Elektrosprayionisierungs-Ion-Trap-Massenspektrometer (ESI-MS) vom Typ LCQ (Thermo Finnigan MAT) verwendet.

Tabelle A 25: LCQ-Daten

Sheath Gas, Aux Gas	N ₂
Collision Gas	Helium 5.0
Sheath Gas Flow Rate	50
Aux Gas Flow Rate	5
Relative CID Energy	Off
ESI-Source	
Capillary Voltage [V]	3.0 (-3.0 neg. mode)
Spray Voltage [kV]	4.0
Capillary Temperature [°C]	230.0
Tube Lens Offset [V]	30.0 V (-30.0 V neg mode)

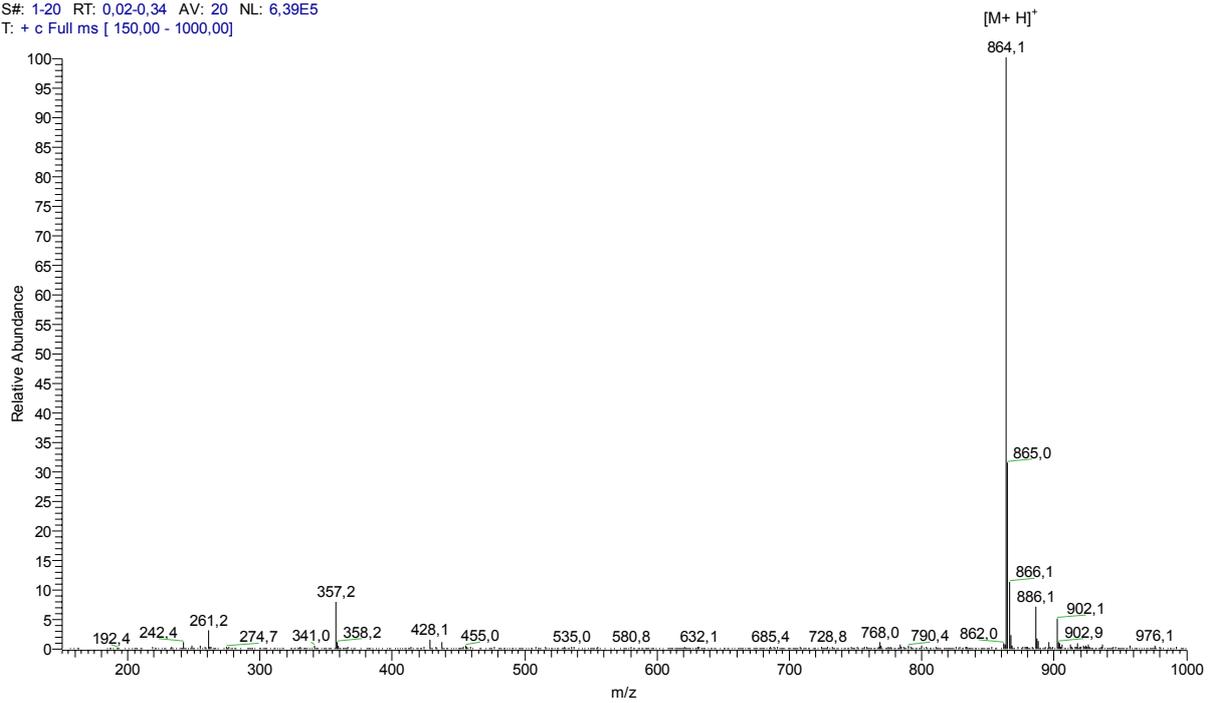


Hexenoyl-CoA (Freie Säure) C₂₇H₄₄N₇O₁₇P₃S

MW (¹H, ¹²C, ¹⁴N, ¹⁶O, ³¹P, ³²S) = 863,1

Abbildung A 1: Molekülstruktur und Molekulargewicht von *trans*-3-Hexenoyl-CoA

S#: 1-20 RT: 0,02-0,34 AV: 20 NL: 6,39E5
T: + c Full ms [150,00 - 1000,00]



S#: 1-20 RT: 0,02-0,33 AV: 20 NL: 2,30E6
T: - c Full ms [150,00 - 1000,00]

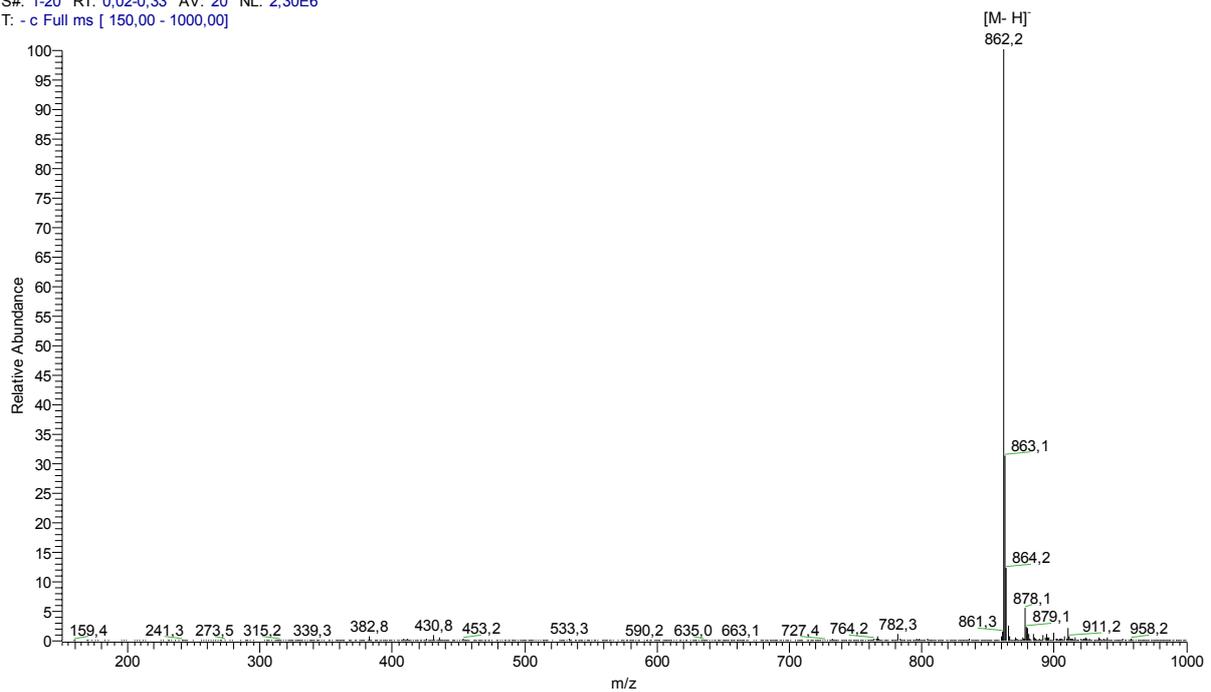


Abbildung A 2: Massenspektren des aufgereinigten *trans*-3-Hexenoyl-CoA, **oben** positiver Modus, **unten** negativer Modus

Abbildung A 3: Protokoll des Autokit 3-HB (Wako Chemicals)

Wako

Autokit 3-HB

Zyklisch-Enzymatische Methode
Für die quantitative Bestimmung von 3-Hydroxybutyrat (3-HB) in Serum oder Plasma

Zweckbestimmung

Autokit 3-HB Test ist ein Reagenz zur quantitativen *in-vitro*-Bestimmung von 3-Hydroxybutyrat (3-HB) in Serum oder Plasma.

Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Tests auf Ketonkörper sollten eigentlich die Analyten Aceton, Acetessigsäure (AcAc) und 3-Hydroxybuttersäure (3-HB) einschließen. Jedoch ist es im klinischen Labor allgemein üblich Gesamtketonkörper als Summe von AcAc und 3-HB zu quantifizieren. Ketonkörper sind Verbindungen, die in der Leber metabolisch aus Fettsäuren produziert werden. Ketonkörper finden Anwendung zur Diagnose von Diabetes, da ihre Konzentration im Blut infolge einer Hyperlipolyse wegen der Störung des Zuckermetabolismus zunimmt. Auch bei chirurgischen Eingriffen wie der Lebertransplantation finden sie Anwendung, da der Ketonkörperquotient (AcAc/3-HB) im arteriellen Blut die Leberreservkapazität reflektiert. Autokit 3-HB ist ein Reagenz zur hochempfindlichen und hochspezifischen Messung von 3-HB, unter Verwendung des Reaktionsprinzips „zyklische enzymatische Reaktion“.

Reagenzien**Autokit 3-HB R1 Set**

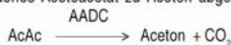
R1a: Puffer	2 x 27 ml	Lagern bei 2-10°C (Nicht einfrieren)
	20 mmol/l Phosphat Puffer, pH7,0	
	enthält 5 IU/ml Acetoacetatdecarboxylase (AADC) aus <i>Bacillus</i> und 0,018% Natriumazid	
R1b: Thio-NAD	2 x für 27 ml	Lagern bei 2-10°C
	4,27 mmol/l β-Thio-nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidierte Form (Thio-NAD), nach Rekonstitution	

Autokit 3-HB R2 Set

R2a: Diluent	2 x 9 ml	Lagern bei 2-10°C
	0,2 mol/l Good's-Puffer, pH9,0; enthält 0,053% Natriumazid	
R2b: Enzyme	2 x für 9 ml	Lagern bei 2-10°C
	3200 IU/ml 3-Hydroxybutyratdehydrogenase (3-HBDH) aus <i>Alcaligenes</i> und 2,65 mmol/l β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduzierte Form (NADH), Dinatriumsalz, nach Rekonstitution	

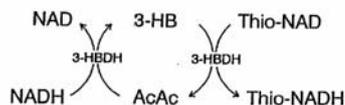
Testprinzip

Nach Zugabe der Probe zu R1 wird in Gegenwart von Acetoacetatdecarboxylase vorhandenes Acetoacetat zu Aceton abgebaut.



Mit Zugabe von R2 wird dann eine zyklische Reaktion in Gang gesetzt. In Gegenwart von 3-HBDH wird in dem ersten Schritt vorhandenes 3-Hydroxybutyrat (3-HB) in Acetessigsäure (AcAc), unter Bildung von Thio-NADH.

Im weiteren Reaktionsverlauf werden die Spezies 3-HB und AcAc kontinuierlich ineinander umgewandelt, unter fortlaufendem Verbrauch von NADH und Bildung von Thio-NADH. Durch photometrische Messung der Bildungsgeschwindigkeit von Thio-NADH kann die Konzentration des 3-HB in der Probe ermittelt werden.

**Herstellung der Reagenzlösungen**

R1: Den Inhalt einer Flasche R1b mit dem Inhalt einer Flasche R1a lösen. Die Reagenzlösung ist bei 2-10°C 3 Wochen haltbar.

R2: Den Inhalt einer Flasche R2b mit dem Inhalt einer Flasche R2a lösen. Die Reagenzlösung ist bei 2-10°C 3 Wochen haltbar.

Physikalische und chemische Anzeichen von Instabilität

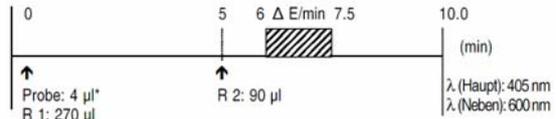
Das Vorhandensein eines Niederschlags im Reagenz oder Wiederfindung in Kontrollseren außerhalb des vom Hersteller angegebenen Bereichs sind ein Hinweis auf die Instabilität des Reagenzes.

Geräte

Das Reagenz ist zur Verwendung auf kommerziell erhältlichen Analysenautomaten vorgesehen. Bezüglich einer Beschreibung der Gerätebedienung und -spezifikation verweisen wir auf das Handbuch des Geräteherstellers. Eine praktische Validierung des Verfahrens vom Anwender am Einsatzort durch Bestimmung einer ausreichenden Anzahl adäquater Kontroll- und Patientenseren ist unerlässlich.

Standard-Verfahren

Temperatur: 37°C



*Hochsensitive Methode: Probenvolumen 17 µl.

Applikationen für weitere Analysengeräte sind auf Anfrage erhältlich. Geeignete Standards zur Kalibration, vgl. Bestellinformation.

Ergebnisse

Die Endergebnisse werden automatisch berechnet und in Konzentrationseinheiten µmol/l ausgedrückt.

Referenzbereich

0-74 µmol/l in Serum oder Plasma².

Grenze der Methode

Wenn die 3-HB - Konzentration in der Probe an der oberen Linearitätsgrenze liegt, ist das Probenmaterial mit Kochsalzlösung zu verdünnen und die Messung zu wiederholen.

Probenmaterial

- 1) Probenmaterial
 - (a) Führen Sie die 3-Hydroxybutyratbestimmung sofort nach der Gewinnung des Serums bzw. Plasmas durch. Wenn eine sofortige Bestimmung nicht erfolgen kann, sind die Proben im Kühlschrank oder gefroren aufzubewahren. Hämolyse führt zu einer geringen Erniedrigung der Werte in Richtung auf falsch-negative Ergebnisse.
 - (c) Ascorbinsäure und Bilirubin führen zu keiner signifikanten Beeinträchtigung des Ergebnisses.
- 2) Interferierende Substanzen:

Heparin, Citrat, Oxalat, EDTA und Natriumfluorid führen zu keiner Beeinträchtigung des Meßergebnisses, wenn sie in ihren jeweiligen üblichen Mengen eingesetzt werden.

Leistungsdaten des Tests**Empfindlichkeit**

a) Wenn gereinigtes Wasser als Probe verwendet wird, ist die Absorptionsänderung (ΔE/min) 0,03 oder kleiner.

b) Wenn eine Standardlösung (200 µmol/l 3-HB) als Probe eingesetzt wird, ist die Absorptionsänderung (ΔE/min) gegenüber dem Leerwert 0,02-0,40.

Spezifität

Wenn eine Probe bekannter Konzentration geprüft wird, ist der Meßwert innerhalb ± 10% der bekannten Konzentration.

Präzision

Wenn eine Probe 5mal in Serie getestet wird, ist der Variationskoeffizient innerhalb 5%.

Messbereich

3-HB Konzentration:
Standardmethode: 3-1000 µmol/l.
Hochsensitive Methode: 0,2-200 µmol/l.

Korrelation

Probe	Serum	Plasma
Korrelationskoeffizient	r= 0,999 (n=55)	r= 0,999 (n=52)
Regressionsgleichung	y= 1,02x - 3,2	y= 0,99 x - 6,3
y	Autokit 3-HB (Standardmethode, µmol/l)	
x	Produkt der Firma A (Enzymatische Methode, µmol/l)	

Hersteller:

Wako Chemicals GmbH
Nissanstrasse 2 , D-41468 Neuss
Telephon(e): +49-2131-311-0
Facsimile: +49-2131-311-100
URL: www.wako-chemicals.de

Wako**Autokit 3-HB****Zyklisch-Enzymatische Methode**

Für die quantitative Bestimmung von 3-Hydroxybutyrat (3-HB) in Serum oder Plasma

**Warnungen und Vorsichtsmaßnahmen**

- Nur für *in vitro*-Bestimmungen.
- Darf beim Menschen oder Tier nicht *in vivo* angewendet werden.
- Reagenzien nach dem auf der Packung angegeben Verfallsdatum nicht mehr verwenden.
- Reagenzien von Packungen mit verschiedenen Lot-Nummern nicht mischen.
- Die Erstellung einer klinischen Diagnose darf nur auf der Grundlage der klinischen Symptomatik in Verbindung mit weiteren Testergebnissen durch einen Arzt erfolgen.
- Die Reagenzien sind ausschließlich für die hier beschriebene Anwendung zu verwenden.
- Längere Aufbewahrung des angebrochenen Reagenzes wird nicht empfohlen. Nach dem Anbruch bitte wieder gut verschließen und bei der angegebenen Temperatur lagern.
- Nicht in die Augen oder an die Haut bringen! Bei Kontakt mit Haut oder Augen umgehend mit viel Wasser spülen. Wenn eine Hautreizung auftritt, einen Arzt hinzuziehen.
- Wako Ketone Body Calibrator zur Kalibration des Tests verwenden. Bitte die Packungsbeilage des Kalibrators beachten.
- Wako Autokit 3-HB Puffer und Antikörper enthalten Natriumazid als Stabilisator. Natriumazid kann mit Kupfer oder Blei explosive Gemische bilden. Auch wenn die Reagenzien nur minimale Mengen Natriumazid enthalten, sollten die Abflüsse ausgiebig mit Wasser gespült werden, wenn die Reagenzien entsorgt werden.
- Bei Entsorgung der Reagenzien sind die nationalen und örtlichen Vorschriften zu beachten.

Qualitätskontrolle

Ein Qualitätskontroll-Programm wird für alle klinischen Laboratorien empfohlen.

Literatur

1. Hirano, T. Modern Med. Lab., 19 (13), 1113-1117 (1991), in japanisch.
2. Hidaka, H. and Shigeta, Y., Jpn. J. Clin. Med., 53, supplementary issue, 603-605 (1995), in japanisch.
3. Fritzsche, I., Bührdel, P., Melcher, R., Böhme, H.-J. Stability of Ketone Bodies in Serum in Dependence on Storage Time and Storage Temperature, Clin. Lab. 47, 399-403 (2001)

Bestellinformation

Bestell-Nr.	Produkt	Packung
417-73501	Autokit 3-HB R1 Set	R1a: 2 x 27 ml R1b: 2 x für 27 ml
413-73601	Autokit 3-HB R2 Set	R2a: 2 x 9 ml R2b: 2 x für 9 ml
412-73791	Ketone Body Calibrator • 300 (3-HB: 300 µmol/l)	CAL: 4 x 5 ml

Hersteller:

Wako Chemicals GmbH
 Nissanstrasse 2 , D-41468 Neuss
 Telefon(e): +49-2131-311-0
 Facsimile: +49-2131-311-100
 URL: www.wako-chemicals.de

Einfluss von Zink- und Lipidalimentation auf die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase und ausgewählte Merkmale des Lipidstoffwechsels wachsender Ratten

Die meisten Veränderungen, von denen der Lipidstoffwechsel im Zinkmangel betroffen ist, werden auch vom Fettsäuremuster der Nahrungsfette beeinflusst. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer marginalen Zinkversorgung auf die Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase (ECI) als essentielles Enzym der beta-Oxidation ungesättigter Fettsäuren in Abhängigkeit vom Sättigungsgrad alimentärer Fettsäuren (FS) am Modelltier Ratte zu untersuchen. Gleichzeitig sollten zinkmangelbedingte Veränderungen im hepatischen FS-Muster und an charakteristischen Parametern des Lipidstoffwechsels bestimmt werden.

Fünf Gruppen junger männlicher Wistar-Ratten wurden 4 Wochen lang entweder mit einer zinkarmen (7 mg Zn/kg) oder zinkadäquaten (50 mg Zn/kg) Diät ernährt, die 22 % Kakao-butter (gesättigte FS, GFS-Diät) oder 22 % Distelöl (ungesättigte FS, UFS-Diät) plus jeweils 3 % Sojaöl enthielt. Die marginal zinkversorgten Gruppen 7Zn-GFS und 7Zn-UFS wurden ad libitum, die adäquat zinkversorgten Gruppen 50Zn-GFS und 50Zn-UFS entsprechend restriktiv ernährt (pair feeding). Zusätzlich wurde eine ad libitum-Kontrollgruppe (50Zn-UFS ad libitum) mitgeführt.

Beide 7Zn-Gruppen wiesen zu Versuchsende einen signifikant verminderten Zinkstatus auf. Im Vergleich zur 7Zn-GFS-Gruppe zeigte sich bei der 7Zn-UFS-Gruppe eine stärker reduzierte Futtermittelaufnahme, eine geringere Lebendmasse sowie stärker reduzierte Zinkkonzentrationen in Plasma und Femur der Tiere.

Die Aktivität der ECI wurde in mitochondrienreichen Fraktionen von Leber, Niere, Testis, Herz, Skelettmuskulatur und Fettgewebe mit trans-3-Hexenoyl-CoA bestimmt und zusätzlich auf die Aktivität der Succinatdehydrogenase (SDH) als mitochondrialen Marker bezogen. Die Aktivität der ECI der Leber war in den GFS-Gruppen niedriger als in den UFS-Gruppen (7Zn-GFS: 2,4 U/mg, 50Zn-GFS: 2,8 U/mg, 7Zn-UFS: 5,9 U/mg, 50Zn-UFS: 8,2 U/mg, 50Zn-UFS ad libitum: 8,0 U/mg Protein). Das ECI/SDH-Verhältnis war bei marginaler Zinkzufuhr der UFS-Tiere um 38 % niedriger als bei adäquater Zinkversorgung. Bezüglich der Höhe der mRNA-Expression der ECI in der Leber wurden keine Gruppenunterschiede beobachtet. In allen übrigen untersuchten Geweben wurde die Aktivität der ECI weder von der Zinkversorgung noch den alimentären FS beeinflusst. Die PPARalpha-Expression in der Leber war in beiden pair fed-Gruppen um mehr als den Faktor 2 höher als in den ad libitum-Gruppen und unabhängig von der alimentären Fettquelle.

Die GFS-Gruppen wiesen im Plasma höhere Cholesterin- und Triglyceridkonzentrationen und in der Leber niedrigere Gesamtfettgehalte, niedrigere Cholesterin- und Triglycerid- sowie höhere Phospholipid-Konzentrationen auf. Unterschiede zwischen den 7Zn- und 50Zn-Gruppen stellten in der Mehrzahl Effekte der restriktiven Fütterung dar. Erwartungsgemäß reflektierte das FS-Muster der Leberlipide deutlich das Muster der alimentären FS. Zwischen den Gruppen 7Zn-UFS und 50Zn-UFS fanden sich Unterschiede nur im Gehalt an C 20:1n-9, C 20:2n-6 und C 20:3n-6 der Gesamtlipide und Phospholipide. Das Linolsäure/ Arachidonsäure-Verhältnis war bei keiner der 7Zn-Gruppen gegenüber der pair fed-Gruppe erhöht und gab daher keinen Hinweis auf eine verminderte Desaturaseaktivität.

Die Ergebnisse zeigen, dass die hepatische Δ^3, Δ^2 -Enoyl-CoA-Isomerase, deren Aktivität in der Leber einer Regulation durch alimentäre FS unterliegt, bereits bei einer marginalen Zinkversorgung eine verminderte Aktivität aufweist. Dieser Aktivitätsverlust könnte einen geringeren Abbau ungesättigter FS im Zinkmangel signalisieren. Am FS-Muster der Leber, welches deutlich durch die Nahrungsfette beeinflusst wurde, ließ sich hingegen keine beeinträchtigte Degradation ungesättigter FS im marginalen Zinkmangel erkennen.

Effects of Zinc and Lipid Alimentation on Δ^3,Δ^2 -Enoyl-CoA Isomerase and Selected Aspects of Lipid Metabolism in Growing Rats

Most alterations of lipid metabolism observed in zinc deficiency are also influenced by the fatty acid profile of the diet. The aim of this study was to determine the effect of marginal zinc deficiency on Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase (ECI), a key enzyme of unsaturated fatty acid beta-oxidation, in response to dietary fats either rich in saturated or in unsaturated fatty acids in growing rats. Changes in liver fatty acid profile and in characteristic parameters of lipid metabolism were also examined.

Five groups of young male Wistar rats were fed either low-zinc (7 mg Zn/kg) or zinc-adequate (50 mg Zn/kg) diets containing 22 % cocoa butter (saturated fatty acids, GFS diet) or 22 % safflower oil (unsaturated fatty acids, UFS diet), each supplemented with 3 % soy bean oil for four weeks. The 7Zn-GFS and 7Zn-UFS diets were offered ad libitum, whereas intake of the 50Zn-GFS and 50Zn-UFS diets was restricted through pair feeding. Additionally, an ad libitum-fed control group was included (50Zn-UFS ad libitum).

At the end of the trial both 7Zn groups displayed a significantly impaired zinc status. Compared to the 7Zn-GFS group, the animals of the 7Zn-UFS group had a lower food intake, lower live weights and lower zinc concentrations in plasma and femur.

The ECI activity was assayed in mitochondrial fractions of liver, kidney, testis, heart, skeletal muscle and adipose tissue with *trans*-3-hexenoyl-CoA and was additionally related to succinate dehydrogenase (SDH) activity as a mitochondrial marker. The mean ECI activity in the liver of the GFS groups was lower than that in the UFS groups (7Zn-GFS: 2.4 U/mg, 50Zn-GFS: 2.8 U/mg, 7Zn-UFS: 5.9 U/mg, 50Zn-UFS: 8.2 U/mg, 50Zn-UFS ad libitum: 8.0 U/mg protein). The marginal zinc supply to the UFS-fed animals reduced the ECI/SDH ratio by 38 %. No group differences were found in the mRNA expression level of ECI in the liver. In the other tissues examined, the ECI activity was affected neither by the zinc supply nor by the alimentary fatty acids. mRNA expression of PPAR α in the liver of both pair-fed groups was more than twofold higher than in the ad libitum-fed groups, but was not influenced by the dietary fat.

The GFS groups showed higher cholesterol and triglyceride concentrations in plasma as well as lower total lipids, lower cholesterol, lower triglyceride and higher phospholipid concentrations in the liver. Differences observed between 7Zn and 50Zn zinc-supplied animals were mainly attributable to the effects of restrictive feeding. As expected, the fatty acid composition of the liver lipids essentially reflected the fatty acid profile of the dietary fats. Differences between the 7Zn-UFS and 50Zn-UFS groups were detected only in the case of C 20:1n-9, C 20:2n-6 and C 20:3n-6 in total lipids and phospholipids. In both 7Zn-groups the linoleic acid/arachidonic acid ratio was not increased and did not point towards a diminished desaturase activity, compared to their pair-fed controls.

These results suggest that the hepatic Δ^3,Δ^2 -enoyl-CoA isomerase activity, which is controlled by alimentary fatty acids in the liver, is impaired in marginal zinc deficiency. This loss of activity might indicate a reduced degradation of unsaturated fatty acids in zinc deficiency. Yet the fatty acid profile of the liver, mainly influenced by the dietary fat, did not show changes indicating a diminished degradation of unsaturated fatty acids in marginal zinc deficiency.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, den 13.11.2006

Jennifer Justus

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Edgar Weigand danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas, für seine Diskussionsbereitschaft und sein persönliches Engagement im Zusammenhang mit der Fertigstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Josef Pallauf bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferates, und für die Möglichkeit, an Geräten, Methoden und Kompetenzen des Instituts zu partizipieren.

Mein Dank gilt weiterhin dem gesamten Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie für die geleistete Mitarbeit. Insbesondere möchte ich mich bei Dr. Erika Most für die „apparativen Möglichkeiten“, bei Dr. Andreas Müller für seine Hilfestellung in Sachen PCR sowie bei Anja Marx und Nicole Krämer für ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima im HPLC/GC-Labor bedanken.

Ein weiteres Dankeschön geht an meine Diplomandin Esther Talmon für ihre Ausdauer bei der Umsetzung des ECI-Assays.

Auch allen "Büro-Kollegen/-innen" – Christine, Hannah, Burçu, Stefanie, Agnes, Christian und Susanne - sei hier nochmals für eine ausgesprochen abwechslungsreiche Zeit gedankt.

Den Mitarbeitern der Professur für Lebensmittelwissenschaft danke ich für die Erstellung der Massenspektren, dem Institut für Organische Chemie für den Versuch der *cis*-3-Octensäure-Synthese, Herrn Hollenhorst vom Hochschulrechenzentrum für die SAS-Auswertungen und der ZBB für die Nutzung des Chemi-Imagers.

Herzlich möchte ich mich ausserdem bei Dipl. oec. troph. Tanja Wolf für die Durchsicht des Manuskripts bedanken. Meinen Freunden, meinen Eltern Birgit und Erhard Justus und meinem Partner Sven Egenolf danke für den Rückhalt, den ihr mir während dieser Zeit gegebenen habt.

An Sven: Danke, dass es Dich gibt!

Lebenslauf

Name	Jennifer Justus
Geburtsdatum	12.07.1976
Geburtsort	Marburg
1982 - 1986	Grundschule Homberg/Ohm
1986 - 1992	Gymnasialzweig der Gesamtschule Homberg/Ohm
1992 - 1995	Gymnasiale Oberstufe der Gesamtschule Kirchhain
10/1995 – 04/2001	Studium der Ökotoxikologie Fachrichtung Ernährungswissenschaft an der Justus-Liebig-Universität Gießen
seit 12/2001	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Tierernährung und Ernährungsphysiologie am Interdisziplinären Forschungszentrum (IFZ) der Justus-Liebig- Universität Gießen