

Aus dem Forschungslabor der Universitäts- Kinder- und Jugendklinik
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. habil. D. Haffner

**Die Metabolisierung ¹⁵N-markierter
Hefenukleinsäuren beim gesunden
Erwachsenen**

Eine experimentelle Studie

Inauguraldissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

vorgelegt der
Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock



von

Rebekka Wichmann

Rostock, März 2009

Dekan: Herr Prof. Dr. med. E. C. Reisinger

Gutachter:

1. Dr. W. Meier-Augenstein, Senior Lecturer in Stable Isotope Forensics, University of Dundee, United Kingdom
2. Prof. Dr. K.-D. Wutzke, Forschungslabor der Universitäts- Kinder- und Jugendklinik
3. Dr. K.-J. Petzke, Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam-Rehbrücke

Für meine Eltern

1 Einleitung 6

- 1.1 *Nukleinsäuren* 7
 - 1.1.1 Allgemeines 7
 - 1.1.2 Aufbau der Nukleinsäuren 8
 - 1.1.3 Nukleinsäuren – Bestandteil unserer Nahrung 9
 - 1.1.4 Nukleinsäuren – Verdauung 11
 - 1.1.5 Synthese, Wiederverwertung und Abbau von Purinen und Pyrimidinen 12
 - 1.1.5.1 De-novo-Synthese der Purine 12
 - 1.1.5.2 De-novo-Synthese der Pyrimidine 13
 - 1.1.5.3 Wiederverwertung von Purinen 14
 - 1.1.5.4 Wiederverwertung von Pyrimidinen 15
 - 1.1.5.5 Abbau von Purinen 16
 - 1.1.5.6 Abbau von Pyrimidinen 17
 - 1.1.5.7 Pathophysiologie des Purinstoffwechsels 17
 - 1.1.6 Hefenukleinsäuren 18
- 1.2 *Stabile Isotope* 19
- 1.3 ^{15}N -Tracertechnik 20

2 Zielstellung 22

3 Material und Methoden 23

- 3.1 *Herstellung des Tracers* 23
- 3.2 *Herstellung der Trockenhefe* 26
- 3.3 *Probandenkollektiv* 26
 - 3.3.1 Einschlusskriterien 28
 - 3.3.2 Ausschlusskriterien 28
 - 3.3.3 Probandenanzahl 29
- 3.4 *Studiendesign und Versuchsdurchführung* 29
- 3.5 *Messmethode Massenspektrometrie* 33
- 3.6 *Probenentnahme und -bearbeitung* 34
 - 3.6.1 Harnproben 34
 - 3.6.2 Stuhlproben 35
 - 3.6.2.1 Blutproben 36
 - 3.6.2.2 Fibrinogen 36
 - 3.6.2.3 Überstand (proteinfrei) / Albumine und Globuline (Sediment) 37
- 3.7 *Auswertung und Statistik* 37
 - 3.7.1 Probandenkollektiv 37
 - 3.7.1.1 Statistische Auswertung des Probandenkollektives 38
 - 3.7.2 Statistische Verfahren 38

4 Ergebnisse 39

- 4.1 *Harnproben* 39

| | |
|---|-----------|
| 4.1.1 Absolute ^{15}N -Markierung | 39 |
| 4.1.2 Kumulative prozentuale renale ^{15}N -Exkretion | 41 |
| 4.2 <i>Stuhlproben</i> | 42 |
| 4.2.1 Kumulative prozentuale ^{15}N -Exkretion im Stuhl | 42 |
| 4.3 <i>Blutproben</i> | 44 |
| 4.3.1 ^{15}N -Markierung des Überstandes | 44 |
| 4.3.2 ^{15}N -Markierung des Sedimentes | 44 |
| 4.3.3 ^{15}N -Markierung des Fibrinogens | 44 |
| 4.4 <i>Gesamtbilanz</i> | 46 |
| 4.4.1 Versuchsabschnitt 1 | 46 |
| 4.4.2 Versuchsabschnitt 2 | 47 |
| 5 Diskussion | 49 |
| 5.1 <i>Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung</i> | 49 |
| 5.1.1 Rahmenbedingungen | 49 |
| 5.1.2 Probenentnahmen | 51 |
| 5.1.2.1 Blutproben | 51 |
| 5.1.2.2 Harnproben | 52 |
| 5.1.2.3 Stuhlproben | 52 |
| 5.2 <i>Diskussion der Ergebnisse</i> | 53 |
| 5.2.1 Ergebnisse der Blutuntersuchungen | 53 |
| 5.2.2 Verlauf der ^{15}N -Markierungen im Harn | 54 |
| 5.2.3 ^{15}N -Exkretion im Stuhl | 59 |
| 5.2.4 Gesamtexkretion | 60 |
| 5.3 <i>Reabsorption und Utilisation von Nukleinsäuren</i> | 61 |
| 5.4 <i>Verbleib des nicht erfassten ^{15}N-Isotopes</i> | 62 |
| 6 Zusammenfassung | 65 |
| 7 Literaturverzeichnis | 66 |
| 8 Thesen | 77 |
| 9 Anhang | 79 |
| 9.1 <i>Abbildungsverzeichnis</i> | 79 |
| 9.2 <i>Formelverzeichnis</i> | 79 |
| 9.3 <i>Tabellenverzeichnis</i> | 80 |
| 9.4 <i>Rohdaten</i> | 81 |
| 10 Erklärung | 84 |
| 11 Danksagung | 85 |

1 Einleitung

„Zwei müssen sein, wenn das Leben glücken soll: Proteine und Nukleinsäuren.“ Diese Aussage, getroffen von Arthur Kornberg 1959 im Rahmen seines Nobelvortrages, verdeutlicht die Schlüsselstellung dieser beiden Zellbausteine. Ihre Anwesenheit ist Voraussetzung für jegliche Leistung einer lebenden Zelle.

Während die funktionelle Bedeutung der Proteine im Zellstoffwechsel schon lange bekannt ist, wurde die Rolle der Nukleinsäuren erst in den letzten Jahrzehnten nach und nach entschlüsselt. Der Metabolismus der Nukleinsäuren ist Gegenstand aktueller Forschung. Nukleinsäuren in den Zellen werden ständig aufgebaut, abgebaut und wiederverwertet. Der Körperrnukleinsäurenpool speist sich aus drei potentiellen Quellen:

- *De-novo*-Synthese
- *Salvage* (Wiederverwertung präformierter Bestandteile)
- Ernährung

Studien der letzten 15 Jahre schätzen Nukleinsäuren als semiessentielle Nahrungsbestandteile ein [1]. Sie werden nach vorheriger Spaltung enteral resorbiert, im Körper reutilisiert oder ausgeschieden. Welche quantitative Rolle die enterale Aufnahme von Nukleinsäuren und ihre Reutilisation sowohl beim gesunden Menschen als auch unter metabolischen Stresssituationen spielt, ist weitgehend ungeklärt [2]. Bei erhöhter Aufnahme von Nukleinsäuren durch den Verzehr zellreicher Nahrungsmittel, wie zum Beispiel tierischer Innereien und von Hefeprodukten, wird vermehrt Harnsäure gebildet. Die Akkumulation von Harnsäure, beispielsweise bei gestörter Exkretion, kann zu Gicht führen [3]. Für den Menschen ist daher unter anderem die renale und fäkale Exkretion von Nukleinsäuren und deren Abbauprodukten beziehungsweise ihre Inkorporation in einzelne Fraktionen des Blutplasmas von großem Interesse.

Die „Wohlstandserkrankung“ Gicht zeigt eine steigende Inzidenz, welche hauptsächlich durch ein Überangebot alimentärer Nukleinsäuren verursacht wird [4]. In den letzten Jahren konnte andererseits gezeigt werden, dass diätetisch zugeführte Nukleinsäuren in Situationen metabolischen Stresses zu einem verbesserten Outcome

der Patienten führten [1]. Vor diesem Hintergrund wäre ein besseres Verständnis der Nukleinsäureaufnahme und -verwertung und ihres Einflusses auf den endogenen Nukleinsäurestoffwechsel von großem Wert [5].

1.1 Nukleinsäuren

1.1.1 Allgemeines

Die Entdeckung der Nukleinsäuren geht auf den Schweizer Mediziner und späteren Physiologieprofessor Friedrich Miescher (1844-95) zurück. Er isolierte als Mitarbeiter des Labors von Felix Hoppe-Seyler in Tübingen aus eitrigen Wundverbänden einen bis dahin unbekanntem Stoff, den er „Nuclein“ nannte. Dieses „Nuclein“ enthielt nach Mieschers Erkenntnissen große Mengen Phosphor, hatte Säurecharakter, war im alkalischen Milieu löslich und fiel in saurem aus [6]. Altmann führte 1889 die Bezeichnung „Nucleinsäure“ ein [7]. Zuerst ging man davon aus, dass sich Ribonukleinsäure (RNS) lediglich in pflanzlichen und Desoxyribonukleinsäure (DNS) nur in tierischen Zellen findet. Die Verfeinerung der Nachweisverfahren brachte aber in der folgenden Zeit die Erkenntnis, dass sich RNS und DNS in allen intakten Zellen nachweisen lassen.

Die intensive Arbeit zahlreicher Forschungsgruppen enthüllte nach und nach die Funktionen der Nukleinsäuren. Zunächst erschien es unwahrscheinlich, dass die DNS in den Chromosomen das Material der Gene darstellen sollte, aber letztlich mehrten sich in den 1940-er Jahren experimentell erhobene Befunde, die für die DNS als Trägerin der Erbinformation sprachen. Außerdem zeigte sich die enge Verknüpfung der RNS mit der Proteinbiosynthese [8, 9].

Aufgrund der Befunde des österreichisch-amerikanischen Biochemikers Erwin Chargaff über die Basenzusammensetzung der DNS [10] und aus physikalischen Daten über die „Raumerfüllung“ des Moleküls [11] entwickelten die englischen Biochemiker James Watson und Francis Crick 1953 das bis heute gültige Modell der DNS-Struktur [12]. Es gelang ihnen damit eines der großen Geheimnisse des Lebens zu enthüllen und sie erhielten 1962 für ihre Forschungsergebnisse den Nobelpreis. Das Modell wurde durch die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchung der DNS mittels

Röntgenstrahlen durch die englische Biochemikerin Rosalind Franklin gestützt [11]. Ihr Modell hat folgende zentrale Eigenschaften:

Zwei helikale Polynukleotidstränge sind um eine gemeinsame Achse gewunden, wobei die Stränge in entgegengesetzte Richtungen verlaufen. Die Purin- und Pyrimidinbasen sind zum Inneren der Helix gekehrt, während sich die Phosphat und Desoxyribosesterreste außen befinden. Die beiden Ketten werden durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren zusammengehalten und die Reihenfolge der Basen ist auf einem Polynukleotidstrang in keiner Weise beschränkt. In der Basensequenz liegt die genetische Information [12].

1.1.2 Aufbau der Nukleinsäuren

Nukleinsäuren sind hochmolekulare Verbindungen, so genannte Polymere, welche aus Ketten von Mononukleotiden bestehen. Diese wiederum setzen sich jeweils aus einer homo- oder heterozyklischen Base, einer Pentose als Kohlenhydrat und Phosphorsäure zusammen. Die einzelnen Nukleotide sind durch die Phosphorsäure über Phosphodiesterbrücken miteinander verbunden. Spaltet man von einem Nukleotid den Phosphatrest ab, so entsteht ein Nukleosid, Nukleoside bestehen folglich aus einer Base und einer Pentose.

Je nach Kohlenhydratkomponente unterscheidet man die Ribonukleinsäure (RNS) mit D-Ribose und die Desoxyribonukleinsäure (DNS) mit 2-Desoxy-D-Ribose als Kohlenhydrat. Die Nukleotide der DNS enthalten als heterozyklische Basen Adenin und Guanin (Purinbasen) und als homozyklische Basen Cytosin und Thymin (Pyrimidinbasen). Im Falle der RNS tritt an die Stelle des Thymins die Pyrimidinbase Uracil. Die DNS dient der Speicherung der genetischen Information und ist zum allergrößten Teil im Zellkern lokalisiert, außerdem findet man sie in den Mitochondrien.

Die RNS, von der drei Haupttypen unterschieden werden, Boten-RNS, ribosomale RNS und Transfer-RNS, dient der Übermittlung der genetischen Information an die Orte der Proteinbiosynthese in der Zelle.

Die räumliche Struktur der DNS entspricht zwei Ketten aus Nukleotiden, die zu einem Doppelstrang zusammengefasst sind. Der Zusammenhalt der DNS-Einzelstränge

erfolgt über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen. Zwischen Adenin und Thymin sind es zwei, zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen. Auf Grund dieses Bindungscharakters stehen sich immer nur Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin gegenüber. Man spricht von sich ergänzenden, komplementären Basenpaaren. Der DNS-Doppelstrang ist um eine gedachte Achse verdrillt und gleicht einer Wendeltreppe. Man bezeichnet ihn als Doppelhelix [12]. Organisiert ist die DNS in der eukaryotischen Zelle in Form von Chromatinfäden, genannt Chromosomen, die im Zellkern liegen. Ein einzelnes Chromosom enthält jeweils einen langen, kontinuierlichen DNS-Doppelstrang. Da ein solcher DNS-Faden im Durchschnitt beim Menschen 5 cm lang ist, ein Zellkern aber nur wenige Mikrometer Durchmesser hat, muss die DNS zusätzlich komprimiert bzw. „gepackt“ werden. Dies geschieht bei Eukaryoten mit speziellen Chromatinproteinen, den Histonen. Sie werden in fünf unterschiedliche Typen unterteilt und mit H1, H2A, H2B, H3 und H4 bezeichnet. Der amerikanische Biochemiker Roger Kornberg entwickelte 1974 ein Modell wonach Chromatin aus sich wiederholenden Einheiten besteht [13, 14]. Diese setzen sich aus den unterschiedlichen Histonen zusammen und werden Nukleosomen genannt. Um diese Nukleosomen ist der größte Teil der DNS herumgewickelt. Die übrige DNS verbindet als *Linker* benachbarte Nukleosomen und trägt zur Flexibilität der Chromatinfaser bei. Während der Kernteilung wird jedes Chromosom zu einer kompakten Form kondensiert. Dadurch werden sie lichtmikroskopisch bereits bei geringer Vergrößerung sichtbar.

Die Boten-RNS, die als Abschrift der DNS für die Proteinbiosynthese verwendet wird, liegt vorwiegend einsträngig vor. Abschnittsweise kann es auch innerhalb des RNS-Moleküls zur Paarung komplementärer Basen kommen. Dies ist bei der Transfer-RNS der Fall, die als Überträgermolekül für die Aminosäuren bei der Proteinbiosynthese benötigt wird.

1.1.3 Nukleinsäuren – Bestandteil unserer Nahrung

Pflanzliche und tierische Nahrungsmittel enthalten von Natur aus Nukleinsäuren in unterschiedlichen Mengen. Bei der Literaturrecherche fällt auf, dass es zwar viele Angaben zum Gesamtpuringehalt von Lebensmitteln gibt, jedoch nur sehr wenige Untersuchungen, welche Aufschluss über die genaue Menge der Nukleinsäuren in

Lebensmitteln geben. Die hier exemplarisch aufgeführten Werte (Tabelle 1) stammen aus Publikationen der Abteilung für Lebensmittelchemie des Institutes für Biochemie und Lebensmittelchemie der Universität Hamburg [15, 16]. Die höchsten Nukleinsäuregehalte in der Gruppe der kohlenhydratreichen Lebensmittel wurden in Kohlgemüsen festgestellt. Einen hohen Anteil zeigten außerdem Spinat, Porree und Petersilienblätter sowie Speisepilze. In der Gruppe der proteinreichen Lebensmittel wiesen tierische Innereien wie Leber, Bries und Lunge hohe Nukleinsäuregehalte auf, wohingegen Muskelfleisch einen vergleichsweise niedrigeren Gehalt zeigte. Bemerkenswerter Weise enthält beispielsweise tiefgefrorener Broccoli den mehr als vierfachen Gehalt an Nukleinsäuren verglichen mit rohem Schweinefleisch (Tabelle 1).

| Nahrungsmittel | NS-Gehalt | DNS-Gehalt | RNS-Gehalt |
|--|------------------|-------------------|-------------------|
| Kalbsleber | 40,2 | 17,3 | 22,9 |
| Rinderleber | 41,6 | 19,5 | 22,1 |
| Schweineleber | 46,9 | 14,8 | 32,1 |
| Schweinefleisch, roh | 6,3 | 2,7 | 3,6 |
| Schweinefleisch, gekocht | 4,5 | 1,6 | 2,9 |
| Schweinefleisch, gebraten | 5,4 | 2,4 | 3,0 |
| Seelachsfilet | 3,6 | 0,7 | 2,9 |
| Thunfisch | 2,5 | 0,8 | 1,7 |
| Geräucherte Rebenbogenforelle ^{ohne Haut} | 5,7 | 1,0 | 4,7 |
| Geräucherte Regenbogenforelle ^{mit Haut} | 7,3 | 1,4 | 5,9 |
| Bäckerhefe | 72,2 | 6,0 | 66,2 |
| Roggen | 2,0 | 0,7 | 1,3 |
| Weizen | 1,7 | 0,6 | 1,1 |
| Linsen | 4,7 | 0,8 | 3,9 |
| Broccoli, tiefgefroren | 25,65 | 5,05 | 20,6 |
| Chinakohl, frisch | 16,6 | 2,0 | 14,6 |
| Blumenkohl, frisch | 17,3 | 14,5 | 2,8 |
| Petersilie Blätter, frisch | 10,82 | 8,1 | 2,72 |
| Kartoffel, frisch | 2,38 | 1,0 | 1,38 |
| Zwiebel, frisch | 3,31 | 0,72 | 2,59 |
| Austernpilze, frisch | 25,5 | 1,42 | 24,08 |
| Champignons, frisch | 21,44 | 0,93 | 20,51 |
| Erbsensuppe, Dose | 5,3 | 1,5 | 3,8 |
| Linseneintopf, Dose | 4,71 | 1,11 | 3,6 |
| Bohneneintopf, Dose | 3,0 | 0,8 | 2,2 |
| Tomatensuppe, Tüte | 4,5 | - | 4,5 |

Tabelle 1: Nukleinsäuregehalt ausgewählter Lebensmittel

Nukleinsäuregehalt ausgewählter Lebensmittel in mg je 1 g Trockenmasse. Aus Publikationen von Herbel et al. und Lassek et al. [15, 16].

Der höchste Anteil an Nukleinsäuren bezogen auf die Trockenmasse wurde für Bäckerhefe ermittelt. Er liegt bei 72,2 mg Nukleinsäuren auf 100 g, wobei auf RNS 66,2 mg und auf DNS 6 mg entfallen (Tabelle 1).

Der Gesamtbedarf aus allen Quellen (*de-novo*-Synthese, *salvage*, Nahrung) für Purine und Pyrimidine eines gesunden Erwachsenen ist auf 450-700 mg pro Tag geschätzt worden [2, 17]. Es wird angenommen, dass der metabolische Bedarf an den entsprechenden Nukleosiden bei gesunden Individuen durch die *de-novo*-Synthese gedeckt werden kann, obwohl es einen Mangel an quantitativen *in vivo* Daten zu dieser Fragestellung gibt [2, 18]. In den letzten Jahren mehrten sich Studien mit dem Ergebnis, dass Nukleinsäuren, beziehungsweise ihre Bestandteile, unter bestimmten Voraussetzungen metabolischen Stresses (Infektionen, Chemotherapie, schnelles Wachstum, etc.) vermehrt über die Nahrung aufgenommen beziehungsweise reutilisiert werden. Sie gelten auf Grund dieser Ergebnisse als semiessentielle Nahrungstoffe. Diese Studien beschränken sich aber auf *in vitro*-Experimente, Tierexperimente und Untersuchungen von Säuglingen [1, 19, 20].

Splitter, Manhart und Roth geben in ihrem Lehrbuch „Ernährungsmedizin“ für Erwachsene ebenfalls einen Purin- und Pyrimidinbedarf von 450-700 mg pro Tag an und leiten daraus eine Mindestzufuhr von 4 g Nukleinsäuren pro Tag ab [21]. Quantitative Daten, die diese Berechnung stützen, sind jedoch nicht publiziert worden.

1.1.4 Nukleinsäuren – Verdauung

Die mit der Nahrung aufgenommenen Nukleinsäuren werden durch die spezifischen Pankreasenzyme Ribonuklease und Desoxyribonuklease in Oligonukleotide gespalten. Im Bereich der Bürstensaummembran werden diese Spaltprodukte wiederum durch Exonukleasen, Mononukleasen, Glycosidasen und Phosphorylasen bis auf die Stufe von Nukleosiden, Purinen und Pyrimidinen sowie Phosphat und Pentosen abgebaut. Nukleoside, im Wesentlichen Inosin und Guanosin bzw. d-Inosin und d-Guanosin, können in der Folge durch Natrium-abhängige aktive Absorptionvorgänge aus dem Darm resorbiert werden [22]. In den Geweben können diese Nukleinsäurebausteine dem Aufbau körpereigener Nukleinsäuren dienen. In Tierexperimenten hat sich gezeigt, dass gerade Gewebe mit einem schnellen Zellumsatz, wie zum Bei-

spiel die Darmepithelien, sich dieser präformierten Nukleoside bedienen, um Nukleinsäuren zu synthetisieren [19, 20, 23].

Außerdem haben Nukleinsäurebausteine eine entscheidende Funktion im Energiestoffwechsel, in der intrazellulären Signaltransduktion und als Koenzyme. Adenosintriphosphat (ATP) ist das wichtigste energiereiche Substrat des Körpers [24, 25]. Andere Nukleotide wie Uridindiphosphat-Glucose und Cytidindiphosphat-Diacylglycerin sind Zwischenprodukte der Glycerin- und Phosphatglyceridsynthese. Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Guanosinmonophosphat (cGMP) dienen als Mediatoren für die Wirkung verschiedener Hormone. Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD), NAD-Phosphat (NAD-P) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) sind wichtige Koenzyme.

1.1.5 Synthese, Wiederverwertung und Abbau von Purinen und Pyrimidinen

1.1.5.1 De-novo-Synthese der Purine

Purine werden ausschließlich als Ribonukleotide synthetisiert. Ihre Biosynthese verläuft in 10 Einzelschritten (Abbildung 1). Die initiale Reaktion zwischen 5-Phosphoribosyl-1- α -Pyrophosphat (PRPP) und Glutamin wird durch die PRPP-Aminotransferase katalysiert und ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die PRPP-Aminotransferase wird im Sinne eines negativen Feedback durch AMP und GMP inhibiert [26]. Insgesamt handelt es sich um einen sehr energieintensiven Vorgang. Für die *de-novo*-Synthese von AMP und GMP werden sieben beziehungsweise acht energiereiche Bindungen gebraucht, dies entspricht 210 kJ/mol beziehungsweise 240 kJ/mol [27].

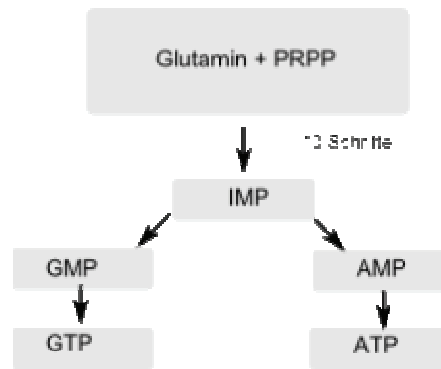


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Purinbiosynthese

PRPP = Phosphoribosylpyrophosphat, IMP = Inosinmonophosphat, GMP = Guanosinmonophosphat, AMP = Adenosinmonophosphat, ATP = Adenosintriphosphat, GTP = Guanosintriphosphat

1.1.5.2 De-novo-Synthese der Pyrimidine

Das Pyrimidingerüst wird aus Aspartat und Carbamoylphosphat aufgebaut. Durch Wasserabspaltung wird Dihydroorotat gebildet, womit das Grundskelett der Pyrimidine synthetisiert ist. In einem weiteren Schritt entsteht durch die Dihydroorotat-Dehydrogenase Orotat. Dieses wiederum reagiert mit PRPP zu Orotidin-5'-monophosphat (OMP). Im Gegensatz zur Purinbiosynthese (Kapitel 1.1.5.1), welche von Anfang an in Form des entsprechenden Nukleotids erfolgt, kommt es also bei der Pyrimidinbiosynthese erst relativ spät zur Anlagerung eines Ribosephosphates. OMP wird zu Uridinmonophosphat (UMP) decarboxyliert, welches wiederum als Grundbaustein für die anderen Nukleotide der Pyrimidinreihe fungiert (Abbildung 2) [27].

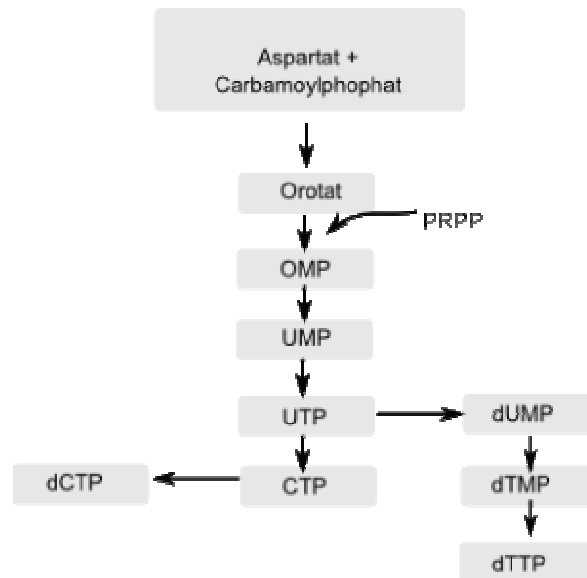


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pyrimidinbiosynthese

PRPP = Phosphoribosylpyrophosphat, OMP = Orotidinmonophosphat, UMP = Uridinmonophosphat, UTP = Uridintriphosphat, CTP = Cytidintriphosphat, d steht für die jeweiligen Desoxyribonukleotide

1.1.5.3 Wiederverwertung von Purinen

Purin- und Pyrimidinbasen und ihre Nukleoside fallen im Stoffwechsel nicht nur durch die oben geschilderte intestinale Reabsorption an, sondern auch durch den intrazellulären Abbau von Nucleinsäuren. Wiederverwertungsreaktionen gewährleisten, dass diese unter hohem Energieaufwand synthetisierten Verbindungen dem Organismus nicht verloren gehen. Durch den *salvage pathway* können Purinbasen, Purinnukleoside und Purinnukleotide über ein 15 Enzyme umfassendes System vollständig ineinander überführt werden. Im Rahmen dieser Reaktionen werden zum Beispiel Guanin und Hypoxanthin wiederverwertet, indem sie durch Adenin-Phosphoribosyltransferase bzw. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase zu AMP, IMP bzw. GMP zurückverwandelt werden. Auf diese Weise ist eine gewisse Unabhängigkeit von der Biosynthesegeschwindigkeit der Purinnukleotidneubildung aus den Grundbausteinen gewährleistet.

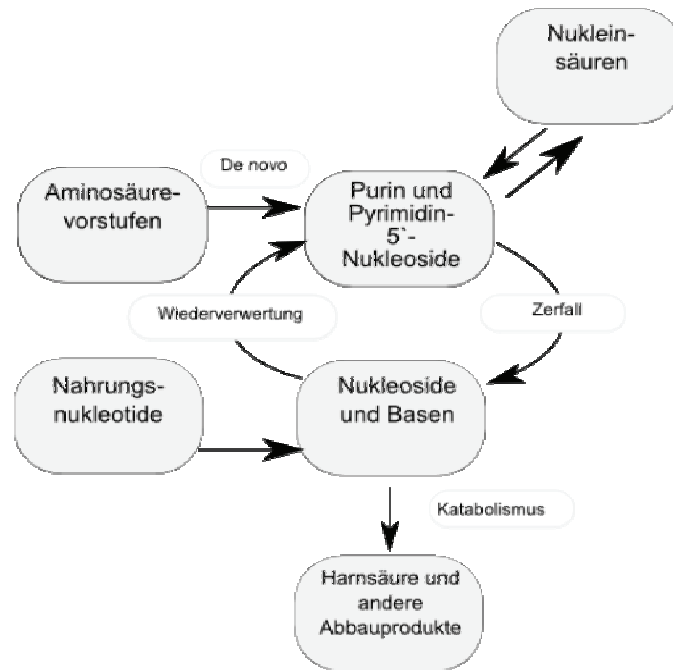


Abbildung 3: Verknüpfungen des Nucleinsäurestoffwechsels

1.1.5.4 Wiederverwertung von Pyrimidinen

Pyrimidinnucleotide kommen in den Nucleinsäuren in etwa der gleichen Menge vor wie Purinnucleotide. Sie können aber nur auf der Stufe der Nucleoside wiederverwertet werden. Uridin, Cytidin, Desoxycytidin und Thymidin werden unter Verstoffwechslung von ATP durch Kinasen zu den entsprechenden Mononucleotiden umgesetzt und auf diese Weise dem Zellstoffwechsel wieder verfügbar gemacht.

Für die Wiederverwertung von Purinen und Pyrimidinen spielen Nucleosidtransporter eine große Rolle, da sie den Import und Export der Nucleoside aus und in die Zellen regulieren. Es werden zwei Transportsysteme in Plasmamembranen unterschieden:

- Transport durch erleichterte Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten. Derartige Transporter finden sich in allen Zellen.
- Transport durch sekundär aktiven, natriumabhängigen Transport gegen einen Konzentrationsgradienten. Transporter dieses Typs finden sich vor allen Dingen im Intestinaltrakt, in renalen Epithelien und in der Leber.

Der Abbau von Purinnukleotiden führt über eine Reihe von Reaktionen zur Harnsäure, die bei Primaten und somit auch beim Menschen das Endprodukt des Purinabbaus darstellt [26]. Pyrimidinnukleotide werden zu CO_2 und Ammoniak abgebaut.

1.1.5.5 Abbau von Purinen

Durch entsprechende Nukleotidasen werden die Purinmononukleotide in die entsprechenden Nukleoside überführt. Adenosin wird durch die Adenosin-Desaminase in Inosin überführt. Die Purinnukleoside Inosin, Xanthosin und Guanosin werden unter Katalyse von Nukleosid-Phosphorylasen gespalten. Dadurch werden die Purinbasen Hypoxanthin aus Inosin, Xanthin aus Xanthosin und Guanin aus Guanosin gebildet. Außerdem entsteht Ribose-1-Phosphat. Unter Abspaltung von NH_3 wird Guanin durch die Guanase in Xanthin überführt. Die Xanthin-Oxidoreduktase wandelt Hypoxanthin in Xanthin und dieses in Harnsäure um. Das Endprodukt des Purinstoffwechsels ist die Harnsäure, derer sich der menschliche Körper nur entledigen kann indem er sie ausscheidet. Allerdings werden normalerweise 90% der anfallenden Nukleotidmetabolite Adenin, Guanin und Hypoxanthin im Rahmen des oben beschriebenen *salvage pathway* wiederverwertet (Kapitel 1.1.5.3). Hauptorte der Harnsäurebildung sind die Leber und der Darm. In der Leber werden eher die im Stoffwechsel entstehenden Purine abgebaut, wohingegen die Enterozyten in der Lage sind, die mit der Nahrung aufgenommen Purine zur Harnsäure umzusetzen. Diese wiederum gelangt dann über das Blut in die Leber, um anschließend durch die Niere ausgeschieden zu werden. Die von den Hepatozyten an das Blut abgegebene Harnsäure wird zunächst glomerulär filtriert. Anschließend erfolgt jedoch durch ein spezifisches Anionen-Austauschprotein, das so genannte Urat-Protein, eine tubuläre Reabsorption der Harnsäure, so dass schließlich weniger als 10 % der filtrierten Menge ausgeschieden werden. Von der täglich gebildeten Harnsäure, beim Menschen etwa 4-6 mmol, werden ca. 70 % renal ausgeschieden. Die restlichen 30 % werden in den Darm sezerniert und unterliegen dort der bakteriellen Uricolyse.

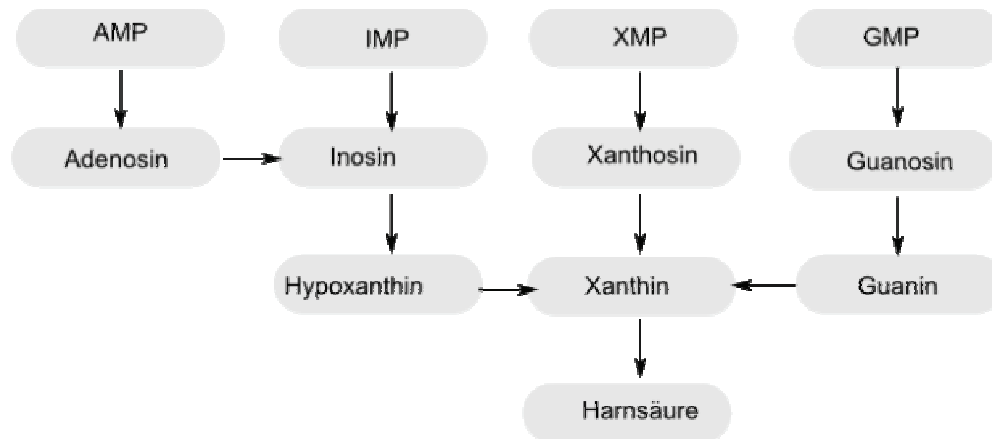


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Purinstoffwechsels des Menschen

1.1.5.6 Abbau von Pyrimidinen

Der Pyrimidinabbau erfolgt im Wesentlichen in der Leber und in den Nieren. Cytidin wird zu Uridin desaminiert. Durch Phosphorolyse entstehen aus Thymidin und Uridin Thymin und Uracil sowie Ribose-1-Phosphat. In einem zweistufigen Mechanismus erfolgt die Ringspaltung der Pyrimidinbasen durch Reduktion und anschließende Hydrolysierung. Von den entstehenden Verbindungen können CO_2 und NH_3 abgespalten werden, die wiederum zu Malonyl-CoA beziehungsweise Methylmalonyl-CoA abgebaut werden. Die Entsorgung des Ammoniaks erfolgt durch die Harnstoffbiosynthese in der Leber. Die Eingangsreaktion dieses mehrschrittigen Zyklus stellt die ATP-abhängige Verknüpfung der Ammonium-Ionen mit Hydrogencarbonat-Ionen zu Carbamylphosphat dar.

1.1.5.7 Pathophysiologie des Purinstoffwechsels

Harnsäure als Endprodukt des Purinabbaus ist relativ schlecht wasserlöslich. Schon der normale Serumharnsäurespiegel ($380 \mu\text{mol/l}$; $6,4 \text{ mg/dl}$) ist nur deshalb möglich, weil ein beträchtlicher Teil der Serumharnsäure proteingebunden ist. Jede Erhöhung des Harnsäurespiegels über diesen Grenzwert hinaus wird als Hyperurikämie be-

zeichnet und stellt mit einer Prävalenz von 20-25 % die häufigste Stoffwechselstörung der Überflussgesellschaft dar. Die Ausfällung von Uratkristallen in der mit Harnsäure übersättigten Synovialflüssigkeit bezeichnet man als akuten Gichtanfall. Die Uratkristalle werden von Granulozyten phagozytiert, woraufhin Entzündungsmediatoren freigesetzt werden und zu einer kristallinduzierten Synovitis führen. Zumeist ist das Großzehengrundgelenk betroffen. In der Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III, 1988 - 1994) fand sich eine Prävalenz der manifesten Gicht größer als 2 % bei Männern über dem 30. Lebensjahr und bei den über 50-jährigen Frauen. Die Prävalenz steigt laut dieser Studie mit zunehmendem Alter auf über 9 % bei den über 80-jährigen Männern und über 6 % bei den über 80-jährigen Frauen [28].

1.1.6 Hefenukleinsäuren

Backhefen werden in der Backwarenindustrie als Teiglockerungsmittel und bei der Herstellung von gesäuerten Teigen verwendet. Sie sind meist diploide oder polyploide Reinzuchtsstämme der obergärigen Spezies *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen, welche zur Familie der Saccharomycetaceae gehört. Backhefe hat, wie der lateinische Name besagt (*cerevisiae*, lat. vom Bier), ihren Ursprung in obergärigen Bierhefen. *Saccharomyces* kommt aus dem griechischen und bedeutet „Zuckerpilz“. Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* sind rund bis oval und haben einen Durchmesser von 5 – 10 µm. Sie vermehren sich durch den Prozess der Knospung. Beim Einzeller versteht man darunter im Gegensatz zur Spaltung, bei der sich die Zelle in zwei Hälften teilt, eine Zellteilung in verschieden große Tochterzellen, wobei die kleinere als „Knospe“ bezeichnet wird.

Das Chromatin von Hefen ist wie bei höheren Eukaryoten mit Histonen assoziiert und liegt als Nukleosomenstruktur vor, die durch DNS-Methylierung modifiziert wird. Jedes Chromosom enthält ein einziges DNS-Molekül. *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen enthält im haploiden Chromosomensatz 16 Chromosomen, wobei ihre Größe von 260 Kb im Chromosom I bis 1500 Kb im Chromosom XII variiert [29].

1.2 Stabile Isotope

Isotope nennt man die unterschiedlichen Atomarten des gleichen chemischen Elementes, die die gleiche Anzahl an Protonen und Elektronen haben, sich aber in ihrer Neutronenzahl und damit auch in ihrer Masse unterscheiden. Sie können sowohl stabiler als auch instabiler Natur sein – wobei die natürlich vorkommenden stabilen Isotope im Gegensatz zu den natürlichen oder künstlich hergestellten instabilen Isotopen nicht radioaktiv sind. Stabile Isotope werden durch die Angabe der Massenzahl ihrer Kerne am chemischen Symbol unterschieden. Stickstoff hat zum Beispiel zwei stabile Isotope: ^{14}N mit einem Anteil von 99,63 At-% und ^{15}N mit 0,37 At-%. Die wichtigsten Isotope des Kohlenstoffes sind zwei stabile, natürliche Isotope mit den Massenzahlen 12 und 13. ^{12}C hat einen Anteil von 98,9 At-% und ^{13}C von 1,1 At-% [30].

Auf Grund der unterschiedlichen Massen der Isotope lässt sich die Isotopenhäufigkeit mittels Isotopenverhältnismassenspektrometrie oder Infrarotspektroskopie bestimmen. Die eingesetzten Massenspektrometer bzw. Infrarotspektrometer besitzen eine sehr hohe Messgenauigkeit. Eine detaillierte Beschreibung der Messmethode folgt im Kapitel 3.5.

In den letzten Jahrzehnten ist es mehr und mehr zu einem Einsatz von stabilen Isotopen in der klinischen Diagnostik und Forschung gekommen. ^{13}C -markierte stoffwechselrepräsentative Tracersubstanzen ermöglichen mittels $^{13}\text{CO}_2$ -Atemgastests zum Beispiel die Erschließung komplizierter Stoffwechselforgänge. Sie werden unter anderem eingesetzt:

- im ^{13}C -Harnstoffatemgastest, zum Nachweis oder Ausschluß einer *Helicobacter-pylori*-Infektion [31-33]
- im Rahmen von Leberfunktionstests (metabolische Funktion bei Leberzirrhose [34], Kontrolle nach Lebertransplantation, vor und nach Leberresektionen [35])
- zur Dünndarmfunktionsdiagnostik (^{13}C -Laktose-Atemtest [36], ^{13}C -Glykocholat-Test bei bakterieller Überbesiedlung oder beim Gallensäureverlustsyndrom [37])
- zur Pankreasfunktionsdiagnostik (Testung der Amylaseaktivität [36, 38] und Lipaseaktivität [39])

- zur Diagnostik der cystischen Fibrose [40]
- zur Ermittlung der orozökalen Transitzeit durch den Laktose-[¹³C]ureid-Atemgastest [41]

1.3 ¹⁵N-Tracertechnik

Begründer der ¹⁵N-Tracertechnik war der 1932 aus Freiburg nach New York City emigrierte Forscher Rudolf Schoenheimer. Im Jahre 1933 begann er seine Tätigkeit als Mitarbeiter des Department of Biochemistry der Columbia University. Dort hatte ein Jahr zuvor Harold Urey das schwere Wasserstoffisotop Deuterium (²H) entdeckt [42], wofür er sechs Jahre später den Nobelpreis erhielt. Diese Entdeckung veranlasste Schoenheimer, unterstützt von Harold Urey und Hans T. Clark, und in Zusammenarbeit mit David Rittenberg eine Reihe von Versuchen durchzuführen, in welchen dieser Tracer zur Erforschung des intermediären Stoffwechsels eingesetzt wurde [43].

Die ersten Versuche Schoenheimers und Rittenbergs mit ¹⁵N waren 1938 möglich, nachdem Urey et al. 1937 die Anreicherung von ¹⁵N gelungen war [44, 45]. Die in den darauf folgenden Jahren durchgeführten Studien verlangten die vorherige Entwicklung effizienter Methoden zur Synthese und sensitiven Analyse ¹⁵N-markierter Aminosäuren. Dies gelang binnen zweier Jahre, so dass 1939 die erste *in vivo* Studie mit ¹⁵N-markierten Aminosäuren durchgeführt wurde [46, 47]. Ihr Ziel war es herauszufinden, ob exogen zugeführtes oder endogenes Glyzin aus den Körpergeweben zur Synthese der Hippursäure genutzt wird [48]. Die nachfolgenden Studien Schoenheimers widerlegten die Hypothese des in Schweden geborenen, amerikanischen Chemikers Otto Folin. Dieser vermutete, dass mit der Nahrung zugeführter Stickstoff in großen Mengen wieder ausgeschieden würde und nur ein kleiner Teil in den endogenen Proteinstoffwechsel gelange [49]. Schoenheimer konnte zeigen, dass zum Beispiel nur 50 % des ¹⁵N-Tyrosin, welches einer Ratte mit der Nahrung gegeben worden war, wieder ausgeschieden wurde [43, 50]. Er schuf damit die bis heute gültige Vorstellung des Körper-Protein-Turnover und somit die Grundlage der Erforschung der metabolischen und zellulären Mechanismen, welche ursächlich die

Synthese und den Abbau der Proteine unter physiologischen Bedingungen verbinden.

Die verschiedenen ^{15}N -Tracer-Studien Schoenheimers veränderten somit fundamental das Verständnis des Protein- und Aminosäurestoffwechsels der Säugetiere. Trotzdem kam es nach seinem Tod zu einem Rückgang der Nutzung von stabilen Isotopen als Tracer in der Stoffwechsel- und Ernährungsforschung. Laut Young and Ajami kam es erst 1969 durch die Arbeiten von Waterlow und seinen Kollegen in Jamaica [51, 52] wieder zu einem sprunghaften Anstieg der Nutzung von stabilen Isotopen in der Stoffwechselforschung [43].

Die von uns weiterentwickelte Untersuchung des Nukleinsäuremetabolismus mit ^{15}N -markierten Hefenukleinsäuren stellt einen Ansatz dar, die Metabolisierung von Nukleinsäuren zu quantifizieren, mit der ^{15}N -Tracertechnik zu verknüpfen und damit besser zu verstehen. Die Ergebnisse von gesunden Probanden sollen einen ersten Einblick geben.

2 Zielstellung

Zielstellung der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, inwiefern eine Verstoffwechslung von mit der Nahrung zugeführten Nucleinsäuren beim Menschen stattfindet und festzustellen, ob sich für derartige Untersuchungen der Einsatz ^{15}N -markierter Nucleinsäuren eignet. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob sich Unterschiede in der Verstoffwechslung von ^{15}N -markierten Nucleinsäuren bei normaler Kost im Vergleich zu zusätzlich nucleinsäureangereicherter Kost in Form von Trockenhefe ergeben.

Um den Verbleib der Nucleinsäuren im Körper untersuchen zu können, sollen diese mit dem für den Menschen gesundheitlich unbedenklichen schweren Stickstoffisotop ^{15}N markiert bzw. biotechnologisch synthetisiert werden.

Des Weiteren sollen Aussagen gemacht werden, in welchem Maße die ^{15}N -markierten Nucleinsäuren beziehungsweise deren Abbauprodukte ohne Resorption durch den Darm wieder ausgeschieden werden (Nachweis in Stuhlproben), ob sie im Darm resorbiert, anschließend utilized, das heißt in körpereigene Aminosäuren, Eiweiße und Nucleinsäuren eingebaut (Nachweis in einer Blutprobe) und über die Nieren (Nachweis in Harnproben) ausgeschieden werden.

Die Ergebnisse der Studie lassen neue Erkenntnisse über die Wirkung von nucleinsäurereicher Kost auf die Metabolisierung beziehungsweise über die Metabolisierung von Nucleinsäuren erwarten.

3 Material und Methoden

Vor Beginn der Studie im Sinne biomedizinischer Forschung am Menschen lag das nach § 15 der Berufsordnung der Ärztinnen und Ärzte in Mecklenburg-Vorpommern geforderte positive Votum der Ethikkommission Rostock vor.

3.1 Herstellung des Tracers

Die Herstellung der ^{15}N -markierten Nukleinsäuren erfolgte im Forschungslabor der Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock. Sie konnten bei der primären Entwicklung, Herstellung und Testung neuer ^{15}N -markierter Tracersubstanzen, wie ^{15}N -Hefeprotein und ^{15}N -Hefeprotein-Thermitasehydrolysat, die es ermöglichen sollten neue Erkenntnisse über den Proteinturnover bei Neugeborenen und Frühgeborenen zu erlangen, als Nebenprodukt gewonnen werden.

Grundlage der Herstellung der ^{15}N -Nukleinsäuren war dementsprechend die Fermentierung ^{15}N -markierter Hefe, da Hefen alle stickstoffhaltigen Zellkomponenten (z.B. Proteine und Nukleinsäuren) aus anorganischem Stickstoff synthetisieren können.

Sacharomyces cerevisiae-Zellen wurden in Form von Bäckerhefe in einem synthetischen Nährmedium fermentiert, welches neben Glukose, Mineralsalzen und einer Reihe Wuchsstoffe ^{15}N -Ammoniumchlorid ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) mit einer Markierung von 95,7 Atom-% (At.-%), Campro Scientific, Berlin, als alleinige Stickstoffquelle enthielt (Tabelle 2) [53, 54]. Die Anzucht erfolgte unter aeroben Bedingungen in einem Fermentator (Biostad B, B. Braun, Melsungen) (Abbildung 5) bei 30 °C über einen Zeitraum von 72 h. Anschließend wurde die Hefe durch Zentrifugieren vom Nährmedium getrennt und mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Isolierung des ^{15}N -Hefeprotein wurden die Zellwände mittels eines Ultraschallgenerators (Labsonic U, B. Braun, Melsungen) (Abbildung 6) zerstört und danach das abzentrifugierte Zellhomogenat einige Stunden im alkalischen Milieu bei pH 9 behandelt. Das Hefeprotein und die Nukleinsäuren gehen dadurch in Lösung, wohingegen Hefegummi und andere Kohlenhydrate ungelöst bleiben [55-58]. Nach Abzentrifugieren unaufgeschlossener He-

fezellen und der unlöslichen Restbestandteile erfolgte die Proteinfällung mit 20%iger Trichloressigsäure bei pH 1,5 für 15 min bei 90 °C [54].

| Inhaltsstoff | Menge | Maßeinheit |
|---|-------|------------|
| Glukose | 20 | g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,5 | g |
| Milchsäure | 1,7 | ml |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 0,5 | g |
| CaCl ₂ · 6 H ₂ O | 0,25 | g |
| FeSO ₄ · 7 H ₂ O | 1 | mg |
| ZnSO ₄ · 7 H ₂ O | 1 | mg |
| MnCl ₂ · 7 H ₂ O | 1 | mg |
| Thiamin | 2 | mg |
| Pyridoxin | 2 | mg |
| Inositol | 20 | mg |
| Nikotinamid | 5 | mg |
| Kalzium-D-Pantothenat | 4 | mg |
| D-Biotin | 5 | µg |
| ¹⁵ NH ₄ Cl (95,7 At.-%) | 2,39 | g |

Tabelle 2: Zusammensetzung des Hefenährmediums pro Liter

Nach Abzentrifugieren des ¹⁵N-Hefeproteins wurden im Überstand die ¹⁵N-Nukleinsäuren mit Aceton im Volumenverhältnis von 1:1 bei pH 9 versetzt und im Kühlschrank als klebrige, zähe Masse ausgefällt. Nach dem Abzentrifugieren erfolgte die Trocknung bei 50 °C auf einer Wärmeplatte. Für die für acht Probanden erforderliche ¹⁵N-Nukleinsäuren-Menge waren insgesamt fünf 10-Liter-Hefeansätze nötig.

Die Stickstoffbestimmung der Hefe-NS erfolgte durch den Elementaranalysator Automated-Nitrogen-Carbon-Analysier-Solid-Liquid (ANCA-SL) und die massenspektrometrische ¹⁵N-Bestimmung mit dem Tracermass 20-20, beide SerCon, Crewe, U.K. [59, 60].

Der Gesamtstickstoffgehalt, der auf diese Art und Weise gewonnenen ¹⁵N-Nukleinsäuren, betrug 1,46 mg/100 mg. Der Anteil an ¹⁵N lag bei 1,31 mg/100 mg. Dies entspricht einer ¹⁵N-Häufigkeit von 89,9 At.-%. Empirisch hat sich für eine sichere Markierung aller Körperkompartimente die Notwendigkeit von 0,2 mg ¹⁵N pro kg/KG zur Markierung der Stickstoffkompartimente gezeigt [61, 62]. Daraus leitet sich eine Dosierung der ¹⁵N-Nukleinsäuren von 15, 27 mg je kg KG ab.

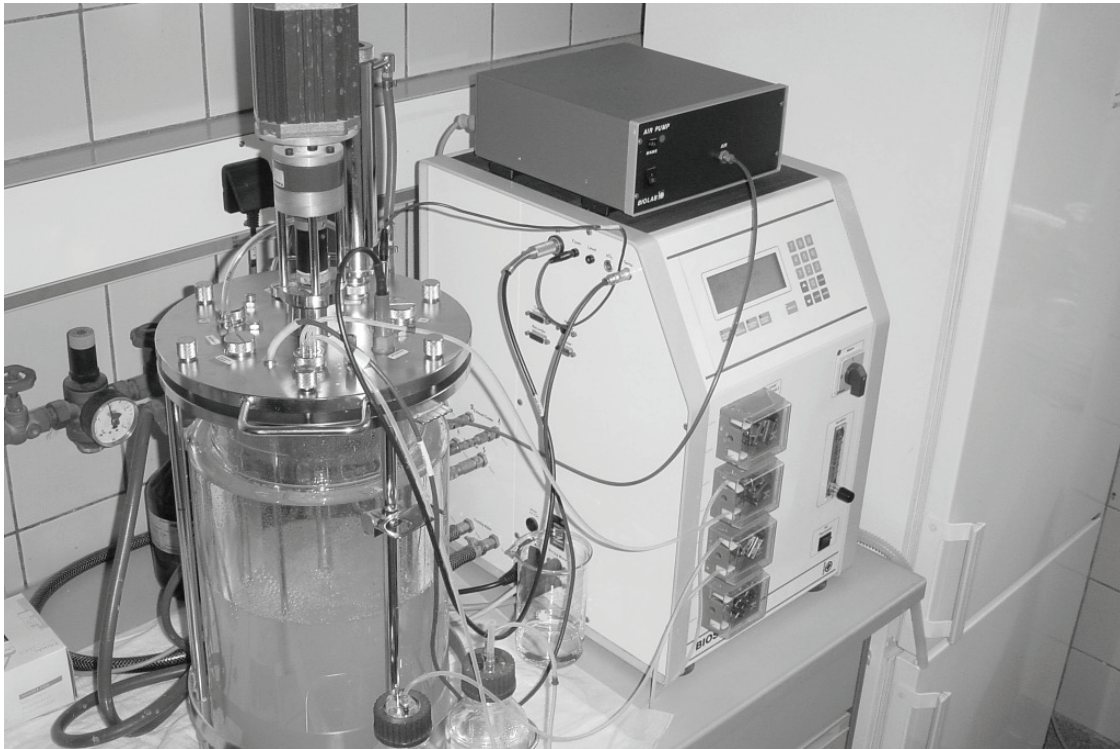


Abbildung 5: Fermentor Biostad B, B. Braun, Melsungen



Abbildung 6: Ultraschallgenerator Labsonic U, B. Braun, Melsungen

3.2 Herstellung der Trockenhefe

Die Herstellung der zur Simulation einer zusätzlich nukleinsäureangereicherten Kost benötigten Trockenhefe erfolgte aus handelsüblicher Feuchtbackhefe. Dazu wurden jeweils 2-3 Hefewürfel in einem großen Mörser (Ø 16 cm) 60 Minuten bei 170 °C geröstet und anschließend grob zerstoßen. Nach dem Erkalten wurde die geröstete Hefe in einer elektrischen Kaffeemühle gemahlen. Die Trockenhefe wurde in Portionen zu jeweils 2 g eingewogen und abgefüllt.

Zur Simulation einer nukleinsäureangereicherten Kost aßen die Probanden im zweiten Teil des Versuches im Rahmen der gewohnten Mahlzeiten morgens, mittags und abends je 2 g dieser Trockenhefe.

3.3 Probandenkollektiv

Für die Rekrutierung der Probanden galten die im Folgenden aufgeführten, zuvor definierten Ein- und Ausschlusskriterien. Insgesamt wurden acht gesunde erwachsene Probanden zwischen 22 und 30 Jahren aufgenommen. Das mittlere Alter der fünf weiblichen und drei männlichen Probanden betrug 25,3 Jahre und der mittlere BMI 23,26 kg/m².

| Geschlecht | Merkmal | Mittelwert | Std.-abw. | Min. | Max. |
|---------------------|--------------------------|-------------------|------------------|-------------|-------------|
| Männlich (n = 3) | Alter [Jahre] | 26,0 | 3,6 | 23,0 | 30,0 |
| | Gewicht [kg] | 80,7 | 21,7 | 62,5 | 104,7 |
| | Größe [m] | 1,80 | 0,04 | 1,76 | 1,84 |
| | BMI [kg/m ²] | 24,8 | 5,6 | 20,17 | 30,9 |
| Weiblich (n = 5) | Alter [Jahre] | 24,8 | 2,9 | 22 | 29,0 |
| | Gewicht [kg] | 63,7 | 4,8 | 59,4 | 71,1 |
| | Größe [m] | 1,69 | 0,04 | 1,63 | 1,74 |
| | BMI [kg/m ²] | 22,4 | 0,8 | 21,7 | 23,5 |
| Gesamt (n = 8) | Alter [Jahre] | 25,3 | 3,0 | 22 | 30,0 |
| | Gewicht [kg] | 70,1 | 15,0 | 59,4 | 104,7 |
| | Größe [m] | 1,73 | 0,07 | 1,63 | 1,84 |
| | BMI [kg/m ²] | 23,3 | 3,3 | 21,7 | 30,9 |

Tabelle 3: Daten der Probanden

Der Body-Mass-Index [63] wurde ermittelt, um einen Überblick über den Ernährungszustand der Probanden zu erhalten, welcher möglicherweise einen Einfluss auf die Metabolisierung von Nukleinsäuren haben könnte. Ein BMI ≥ 25 und $\leq 18,49$ galt als Ausschlusskriterium.

$$\text{BMI} = \frac{\text{Körpergewicht in kg}}{[\text{Körperlänge in m}]^2}$$

Formel 1: Berechnung des BMI

3.3.1 Einschlusskriterien

- gesunde Personen im Alter zwischen 20 und 35 Jahren
- regelmäßige vollwertige Ernährung
- vermutete Fähigkeit, den vorgeschriebenen Ernährungs- und Zeitplan zuverlässig durchzuführen
- schriftliche Einwilligung der Probanden zur Teilnahme an der Studie

3.3.2 Ausschlusskriterien

- rein vegetarische oder vegane Ernährung
- Über- oder Untergewicht nach der Definition der WHO (BMI ≥ 25 oder $\leq 18,49$) [63]
- anamnestisch Hyperurikämie und Gicht
- geschwächtes Immunsystem
- akute und chronische Erkrankungen
- Antibiotikaeinnahme in den letzten vier Wochen vor Beginn der Untersuchung
- Einnahme von Medikamenten, die den Magen-Darm-Trakt beeinflussen (Hemmung oder Förderung der intestinalen Motilität), z.B.:
 - Sedativa
 - Anticholinergika
 - Kalziumkanalblocker
 - Laxantien
- Obstipation
- mangelnde Kooperationsfähigkeit

3.3.3 Probandenanzahl

Die Probandenanzahl war durch die im Untersuchungszeitraum verfügbare Menge an ^{15}N -markierten Nukleinsäuren limitiert. Zur Evaluierung von Verfahren der Stoffwechseluntersuchung mittels stabiler Isotope sind kleine Probandenkollektive ausreichend. In mehreren Publikationen des Forschungslabors der Universitäts- Kinder- und Jugendklinik Rostock zur Verstoffwechslung von stabil isotopt markierten Nahrungsmitteln lieferten auch geringe Fallzahlen signifikante Ergebnisse [64-66]. Insgesamt wurden acht gesunde Probanden in die Studie aufgenommen.

Jeder Proband erhielt eine Anleitung zur Versuchsdurchführung sowie Protokolle zur Dokumentation des genauen Zeitpunktes der Probenentnahme und der Harnvolumina und Stuhlmassen. Sämtliche Utensilien, welche die Probanden zur Sammlung der einzelnen Proben benötigten, wurden in ausreichender Zahl zur Verfügung gestellt. Die Probenröhrchen wurden im Vorfeld beschriftet. Außerdem erfolgte einen Tag vor Versuchsbeginn im Forschungslabor der Universitäts- Kinder- und Jugendklinik Rostock die Gewichtsbestimmung mit einer Personenwaage.

3.4 Studiendesign und Versuchsdurchführung

Die Studie wurde als offene Interventionsstudie, deren Messphasen sich über 2 x 48 h erstreckten, an 8 gesunden Probanden durchgeführt. Die Studienbedingungen konnten nicht verblindet werden. Eine Übersicht des Versuchsablaufes findet sich in Tabelle 4.

Der gesamte Versuch erstreckte sich über eine Dauer von 20 Tagen und war unterteilt in zwei Versuchsabschnitte von jeweils 10 Tagen. Versuchsabschnitt 1 (Tag 1–10) diente der Untersuchung des Nukleinsäurestoffwechsels bei normaler Kost, Versuchsabschnitt 2 (Tag 11–20) der Erfassung der Daten bei nukleinsäureangereicherter Kost. Jeweils der 9. und 10. Tag sowie der 19. und 20. Tag dienten als Messtage.

Über die gesamte Dauer des Versuches wurden die Probanden dazu angehalten, sich in gewohnter Weise regelmäßig und vollwertig zu ernähren. Dies beinhaltete mindestens drei Mahlzeiten pro Tag und keine rein vegane oder vegetarische Ernäh-

rung oder Diät. Im Versuchsabschnitt 1 wurde am 8. Tag die Leerwertprobe für Stuhl gewonnen. Nach der Bestimmung von Gewicht und Körpergröße des Probanden erfolgte die Berechnung und das Einwiegen der Tracermenge von ^{15}N -markierten Nukleinsäuren mit 15,27 mg je kg KG.

Die Leerwertproben für Blut und Harn wurden am 9. Tag vor Beginn des Frühstückes gewonnen. Die Zusammensetzung des Frühstückes beeinflusst die oroökale Transitzeit und den enteralen Metabolismus [67]. Um für alle Probanden gleiche Voraussetzungen bei der Traceraufnahme zu schaffen, wurde das Frühstück daher standardisiert. Die Probanden erhielten ab 7.50 Uhr ein Standardfrühstück, welches aus einem Roggenbrötchen mit Butter und Marmelade, sowie einem Glas Schwarztee bestand. Nach dem Verzehr der ersten Hälfte des Brötchens erfolgte um 8 Uhr die Einnahme einer gewichtsadaptierten Menge ^{15}N -markierter Nukleinsäuren, die zuvor in vier Teelöffeln Naturjoghurt eingerührt wurden. Danach verzehrten die Probanden die zweite Hälfte des Brötchens.

| | | | |
|---|------------------|---|--|
| Versuchsabschnitt 1 ausgewogene Mischkost | Tag 1-7 | | Ernährung mit ausgewogener Mischkost, nur leichte körperliche Aktivität |
| | Tag 8 | Vortag der Tracergabe | 0-Wert Stuhlprobe (Bestimmung der individuellen physiologischen ^{15}N -Häufigkeit), Bestimmung des Gewichtes und der Größe des Probanden Berechnung und Einwiegen der individuellen Menge an ^{15}N -Nukleinsäuren |
| | Tag 9 | vor Beginn des Frühstücks | 0-Wert Harnprobe 0-Wert Blutprobe |
| | | ab 7:50 Uhr | Standardisiertes Frühstück |
| | 8:00 Uhr | Berechnete Menge an ^{15}N -Nukleinsäuren wird, eingerührt in Naturjoghurt, in der Mitte des Frühstücks eingenommen Probenentnahmen Blut, Harn, Stuhl nach festem Schema | |
| Tag 10 | | Probenentnahmen Harn und Stuhl | |
| Versuchsabschnitt 2 nukleinsäureangereicherte Kost | Tag 11-17 | | Zu den Mahlzeiten werden morgens, mittags und abends je 2 g Trockenhefe verzehrt. |
| | Tag 18 | Vortag der Tracergabe | 0-Wert Stuhlprobe |
| | Tag 19 | vor Beginn des Frühstücks | 0-Wert Blutprobe 0-Wert Harnprobe |
| | | ab 7:50 | Standardisiertes Frühstück + 2 g Trockenhefe |
| | 8:00 Uhr | Berechnete Menge an ^{15}N -Nukleinsäuren wird, eingerührt in Naturjoghurt, in der Mitte des Frühstücks eingenommen. Probenentnahmen Blut, Harn, Stuhl nach festem Schema | |
| Tag 20 | | Zu den Mahlzeiten werden morgens, mittags und abends je 2 g Trockenhefe verzehrt. Probenentnahme Harn und Stuhl | |

Tabelle 4: Versuchsaufbau

Die Probenentnahme erfolgte für die nächsten 48 h nach einem festen Zeitschema bzw. quantitativ (Tabelle 4):

- Blutprobe:
 - nach 2 Stunden
- Harnproben:
 - in den ersten 8 Stunden zweistündlich
 - danach bis zur 48. Stunde vierstündlich
- Stuhlproben:
 - quantitativ bis zur 48. Stunde

| Zeit nach Tracergabe in h | Harn | Blut | Stuhl |
|---------------------------|------|------|-----------------------|
| 2 | X | X | Quantitative Sammlung |
| 4 | X | | |
| 6 | X | | |
| 8 | X | | |
| 12 | X | | |
| 16 | X | | |
| 20 | X | | |
| 24 | X | | |
| 28 | X | | |
| 32 | X | | |
| 36 | X | | |
| 40 | X | | |
| 44 | X | | |
| 48 | X | | |

Tabelle 5: Schema der Probenentnahme

Im Versuchsabschnitt 2 aßen die Probanden zusätzlich zu den normalen Mahlzeiten morgens, mittags und abends je 2 g Trockenhefe. Analog zum ersten Versuchsabschnitt wurden die Leerproben entnommen, die ^{15}N -markierten Nukleinsäuren mit einem Standardfrühstück eingenommen und die Proben von Stuhl, Harn und Blut nach gleichem Zeitschema gewonnen (Tabellen 3 und 4).

3.5 Messmethode Massenspektrometrie

Aufgrund der unterschiedlichen Massen lassen sich stabil markierte und nicht markierte Ionen in einem Massenspektrometer trennen. Damit die ^{15}N -Exkretion der Stuhl, Harn- und Blutproben massenspektrometrisch bestimmt werden kann, müssen diese aus ihrem festen bzw. flüssigen Aggregatzustand in den gasförmigen überführt werden. Dazu werden sie im Verbrennungsofen des Elementaranalysators zu gasförmigen Oxiden ihrer elementaren Bestandteile (CO_2 , N_2 und H_2O) verbrannt. Diese gasförmigen Moleküle werden dann in der Ionenquelle des Massenspektrometers beispielsweise durch Ionenstrahlung ionisiert. Die entstandenen Ionen werden durch eine angelegte Spannung (U) auf eine Geschwindigkeit (v) beschleunigt. Diese wiederum hängt von der Ladung (q) und der Masse (m) des Ions ab:

$$q \cdot U = \frac{m \cdot v^2}{2}$$

Formel 2: Berechnung der Teilchengeschwindigkeit

Nach Fokussierung zu einem Ionenstrahl werden die Ionen in ein Magnetfeld geleitet, in welchem die Lorentzkraft ($F = q \cdot v \cdot B$) sie entsprechend ihrer Geschwindigkeit und ihrer Ladung ablenkt. Somit beschreiben die langsameren, schweren Ionen, in diesem Fall die $^{15}\text{N}_2^+$ -Ionen, eine Kurve mit größerem Radius im Magnetfeld; die schnellen, leichten $^{14}\text{N}_2^+$ -Ionen werden stärker von ihrer ursprünglichen Bahn abgelenkt, der Radius im Magnetfeld ist entsprechend kleiner. Nach Austritt aus dem Magnetfeld erzeugen die nach Massen getrennten Ionen beim Aufprallen auf selektiv aufgestellte Kollektoren einen Strom, der mit einem Verstärkersystem zu einem Signal verarbeitet wird [68]. Das Intensitätsverhältnis des schweren zum leichten Isotop ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) wird aus den Signalen ermittelt [68].

In dieser Studie erfolgte die Ermittlung der ^{15}N -Exkretion mittels Isotopenverhältnis-massenspektrometrie an einem Massenspektrometer der Bezeichnung Tracermass 20-20 (SerCon, Crewe, U.K.) im Forschungslabor der Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock. Es arbeitet nach dem CF-IRMS-Verfahren (Continuous Flow Isotop Ratio Mass Spectrometry) [30, 69]. Dieses beinhaltet die oben beschriebene Methodik, in welcher die Aufbereitung der Proben mittels Elementaranalysator und Massenspektrometer kombiniert ist, so dass man feste bzw. flüssige Proben direkt messen kann [30]. Im Elementaranalysator ANCA-SL werden die Proben bei 900 °C zu N_2 , CO_2 und H_2O verbrannt

3.6 Probenentnahme und -bearbeitung

3.6.1 Harnproben

Der Harn wurde in einem großen Messbecher aufgefangen. Anschließend erfolgte die Volumenbestimmung mit Hilfe eines schlanken Messzylinders. Das ermittelte Volumen wurde von den Probanden mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme in eine Protokolltabelle eingetragen. Je Probenentnahme wurde ein Harnröhrchen befüllt und sofort bei -20 °C eingefroren.

Zur Bearbeitung der Proben wurden diese aufgetaut und jeweils 25 μl Harn auf Zinnscheiben mit einem Durchmesser von 21 mm pipettiert. Diese wurden bei 60 °C zwei Stunden getrocknet, anschließend gefaltet und zu Kügelchen gerollt. Die Kügelchen wurden bei 900 °C im Elementaranalysator verbrannt und anschließend erfolgte die massenspektrometrische Bestimmung der ^{15}N -Häufigkeiten in At.-%-exz.

Die absolute renale ^{15}N -Exkretion errechnet sich aus folgender Formel:

$$^{15}\text{N}[\text{mg}] = \frac{15 \cdot b' \cdot c_{\text{N}}}{1400 + b} \cdot V[\text{ml}]$$

Formel 3: Berechnung der absoluten renalen ^{15}N -Exkretion

Konstanten: 15: Ordnungszahl des Stickstoffisotops ^{15}N , c_{N} : Stickstoffkonzentration in der Probe, 1400: Molekulargewicht des Stickstoffes $\times 100$, b' : ^{15}N [At.-%-exz.], b : ^{15}N [At.-%] (= ^{15}N [At.-%-exz.] + natürliche Häufigkeit von ^{15}N), V : Harnvolumen in [ml]

Zur Berechnung der kumulativen prozentualen renalen ^{15}N -Exkretion werden die in den Proben vorhandenen absoluten Mengen des Isotops zu der individuell verabreichten Menge des Isotops in Beziehung gesetzt:

$$x \% = \frac{\text{Menge der kumulativen Exkretion des Isotops [mg]} \cdot 100\%}{\text{Verabreichte Dosis des Isotops [mg]}}$$

Formel 4: Berechnung der kumulativen prozentualen renalen ^{15}N -Exkretion

3.6.2 Stuhlproben

Der Stuhl wurde von den Probanden auf einer handelsüblichen Mülltüte (Eigengewicht 2 g) aufgefangen, anschließend mit einer zur Verfügung gestellten Waage gewogen und das ermittelte Gewicht mit dem Zeitpunkt der Probenentnahme in eine Protokolltabelle eingetragen. Vor der Befüllung eines Stuhlröhrchens wurde der Stuhl durch kräftiges Kneten der Mülltüte homogenisiert. Das Probenröhrchen wurde anschließend sofort eingefroren. Zur Bearbeitung der Proben wurden diese aufgetaut und jeweils 8 mg des Stuhls auf Zinnscheiben mit einem Durchmesser von 21 mm eingewogen. Für jede einzelne Stuhlprobe erfolgten zwei Einwaagen. Anschließend wurden die Zinnscheiben bei 60 °C für eine Stunde getrocknet. Nach der Trocknung wurden sie mit Hilfe einer Pinzette gefaltet und zu kleinen Kügelchen gerollt. Nach Verbrennen bei 900 °C im Elementaranalysator erfolgte die massenspektrometrische Messung der ^{15}N -Häufigkeiten in At.-%. Die absolute fäkale ^{15}N -Exkretion errechnet sich nach den gleichen Formeln wie die renale ^{15}N -Exkretion. Statt des Volumens [ml] wird die Stuhlmasse [g] eingesetzt.

$$^{15}\text{N [mg]} = \frac{15 \cdot b' \cdot c_{\text{N}}}{1400 + b} \cdot m \text{ [g]}$$

Formel 5: Berechnung der absoluten fäkalen Exkretion

Konstanten: 15: Ordnungszahl des Stickstoffes, c_{N} : Stickstoffkonzentration in der Probe, 1400: Molekulargewicht des Stickstoffes $\times 100$, b' : ^{15}N [At.-%-exz.], b : ^{15}N [At.-%] (= ^{15}N [At.-%-exz.] + natürliche Häufigkeit von ^{15}N), m : Stuhlmasse in g

$$x \% = \frac{\text{Menge der kumulativen Exkretion des Isotops [mg]} \cdot 100\%}{\text{Verabreichte Dosis des Isotops [mg]}}$$

Formel 6: Berechnung der kumulativen prozentualen fäkalen ^{15}N -Exkretion

3.6.2.1 Blutproben

Das Blut wurde in zwei Citratmonovetten à 10 ml entnommen. Anschließend wurden die Monovetten für 15 min bei 6500 rpm zentrifugiert. Der so gewonnene Plasmaüberstand wurde abpipettiert und eingefroren. Zur Bearbeitung der Proben wurden diese aufgetaut.

3.6.2.2 Fibrinogen

Zur Separation von Fibrinogen aus dem Plasma wurden 3,0 ml Citratplasma, 2,5 ml Kochsalzlösung und 2,5 ml CaCl₂-Lösung [22,5 mmol/l (1,23 g CaCl₂-Hexahydrat gelöst in 250 ml destilliertem Wasser)] in ein 10-ml-Glasröhrchen gegeben. Die Lösungen wurden gemischt, für eine Stunde im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und anschließend für 10 Minuten in der Tiefkühltruhe abgekühlt. Danach wurde das Fibrinogen mit Hilfe eines Spatels und einer Impfschlinge verdichtet, in Eppendorfröhrchen separiert und darin für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Plasmaüberstände abgegossen, das Fibrinogen erneut mit einem Spatel und einer Impfschlinge verdichtet und zentrifugiert. Der entstandene Plasmaüberstand wurde abgehebert, das Fibrinogensediment im Eppendorfröhrchen mit Kochsalzlösung gewaschen und zentrifugiert. Anschließend wurde das Fibrinogensediment mittels Zellstoff von der restlichen Kochsalzlösung befreit, 2 × 10 mg auf 21mm Zinnscheiben gebracht, bei 60 °C zwei Stunden getrocknet, danach gefaltet und zu Kügelchen gerollt. Diese wurden im Elementaranalysator bei 900 °C verbrannt und die ¹⁵N-Häufigkeiten in At.-% gemessen.

3.6.2.3 Überstand (proteinfrei) / Albumine und Globuline (Sediment)

Nach der Fibrinogenseparation wurden 4 ml Restplasma, 0,5 ml $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (10 g Na-Wolframat in 100 ml destilliertem Wasser) und tropfenweise unter ständigem Schütteln 0,5 ml $\frac{2}{3} \text{ n H}_2\text{SO}_4$ (2 Teile H_2SO_4 + 1 Teil H_2O) in ein Röhrchen gegeben. Nach der Fällung wurde die Lösung fünf min stehengelassen und anschließend für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Danach wurden jeweils 750 μl des proteinfreien Überstandes in drei Arbeitsschritten (3 x 250 μl auf doppelte 31mm Zinnscheiben pipettiert. Das Sediment wurde mit dem zurückgelaufenen Überstand resuspendiert und jeweils 25 μl auf 21mm Zinnscheiben pipettiert. Nach dem Trocknen wurden die Zinnscheiben gerollt, verbrannt und die ^{15}N -Häufigkeiten in At.-% gemessen.

3.7 Auswertung und Statistik

3.7.1 Probandenkollektiv

Bei der Versuchsdurchführung wurde auf eine genaue Einhaltung des Studienprotokolls geachtet. Im Verlauf dieser Studie musste keiner der Probanden ausgeschlossen werden. Es wären jedoch Probanden ausgeschlossen worden, die

- nicht die vorhergesehene Menge an ^{15}N -markierten Nukleinsäuren eingenommen haben
- nicht die vorhergesehene Menge an Trockenhefe zu sich genommen haben
- die Proben nicht ordnungsgemäß gelagert haben
- die Versuche vorzeitig abgebrochen haben
- eine Harnprobe trotz Wasserlassens verworfen haben
- weniger als 2 Stuhlproben pro Versuch abgegeben haben

3.7.1.1 Statistische Auswertung des Probandenkollektives

Das Probandenkollektiv setzte sich in der vorliegenden Studie aus insgesamt 8 gesunden Probanden zusammen. Von diesen waren 5 weiblich und 3 männlich. Die Altersverteilung lag zwischen 22 und 31 Jahren, wobei das mittlere Alter 25,3 Jahre und der mittlere BMI 23,3 betrug (Tabelle 3).

3.7.2 Statistische Verfahren

Die statistische Endauswertung erfolgte nach Abschluss aller Untersuchungen mit den statistischen Programmpaketen SPSS[®] (SPSS GmbH Software, München, Deutschland), Sigma Plot[®] (Systat Software, Inc., Chicago, USA) und dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel[®] (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland). Dabei erfolgte die Auswertung der Verteilung der Isotopenmengen in Harn, Blut und Stuhl (quantitative Messwerte). Zur Signifikanzbestimmung beider Versuchsabschnitte untereinander wurde auf Grund der kleinen Probandenzahl der Mann-Whitney- und Wilcoxon-Test herangezogen. Bei den statistischen Berechnungen wurde Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant bewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Harnproben

4.1.1 Absolute ¹⁵N-Markierung

Die ¹⁵N-Markierung im Harn ist Marker für die renale Ausscheidung des Purinstoffwechselendproduktes Harnsäure, des Pyrimidinstoffwechselendproduktes Harnstoff und anderer Nukleinsäurenabbauprodukte. Angegeben in At.-%-exz. stellt sie die Isotopenhäufigkeit über der natürlichen ¹⁵N-Häufigkeit dar, welche vor Tracergabe als Nullwert ermittelt wurde. Sie zeigte eine von der Menge der zugeführten Nukleinsäuren unabhängige Kinetik (Abbildung 7). Die ¹⁵N-Markierung stieg rasch nach der oralen Verabreichung der markierten Nukleinsäuren an und erreichte ihr Maximum in beiden Versuchsabschnitten nach 4 h. Im Versuchsabschnitt 1 lag die ¹⁵N-Markierung nach 4 h im Mittel bei 0,0304 At.-%-exz. ($\pm 0,0125$), wobei der kleinste Wert 0,0131 At.-%-exz. und der größte Wert 0,0496 At.-%-exz. betrug. Im Versuchsabschnitt 2 lag sie nach 4 h im Durchschnitt bei 0,0333 At.-%-exz. ($\pm 0,0117$). Der hierbei kleinste ermittelte Wert betrug 0,0134 At.-%-exz., der größte 0,0473 At.-%-exz. Die Unterschiede zwischen den Versuchsabschnitten waren zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant. Die Nullwerte wurden in beiden Untersuchungsgruppen innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 48 h nicht wieder erreicht.

Nach einer Zeitspanne von 9 Tagen ließ sich jedoch keine messbare ¹⁵N-Häufigkeit mehr nachweisen. Die am Tag 18, dem Tag vor der Messphase des zweiten Versuchsabschnittes, erneut ermittelten Nullwerte lagen im Bereich der am Tag 8 vor der ersten Gabe ¹⁵N-markierter Nukleinsäuren ermittelten Werte (Tabelle 6)

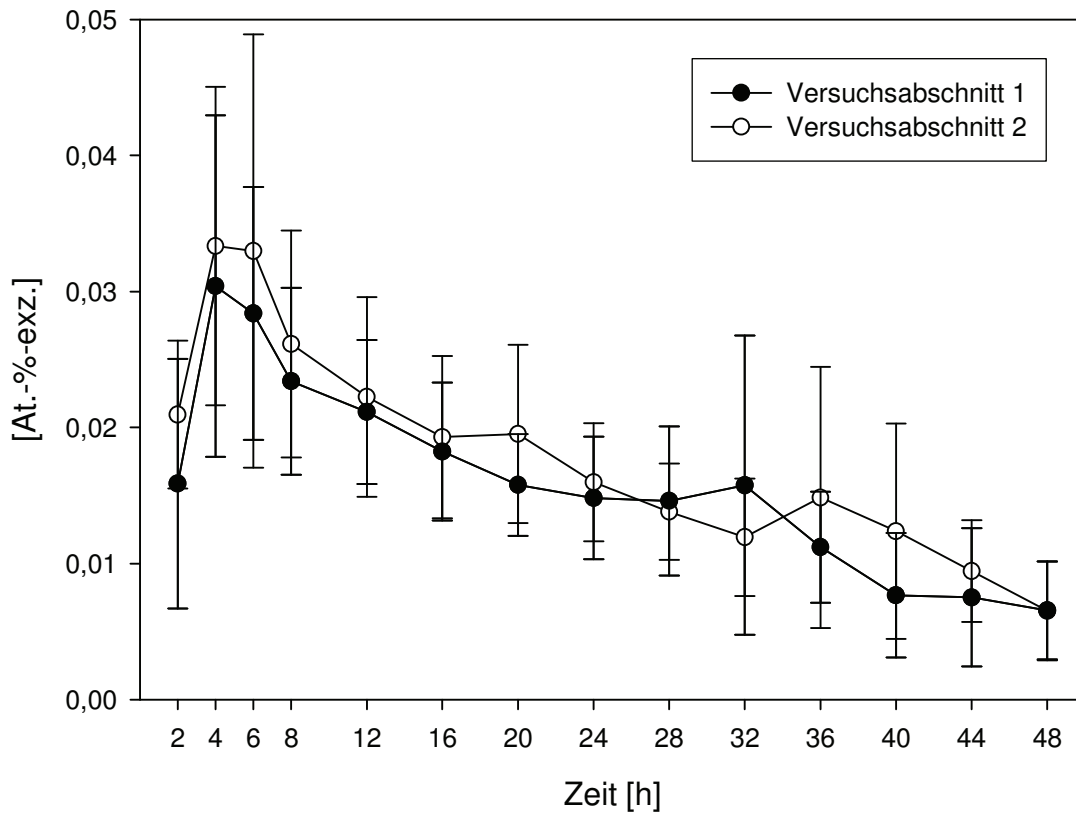


Abbildung 7: Mittlere renale ^{15}N -Häufigkeit über die Zeit

Mittlere renale ^{15}N -Häufigkeit des Versuchsabschnittes 1 (schwarze Punkte) und 2 (weiße Punkte) über die Zeit in At.-%-exz. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung; Mann-Whitney-Rangsummentest: $p > 0,05$ zu allen Zeitpunkten.

| Probanden | Versuchs- abschnitt 1 | Versuchs- abschnitt 2 |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| DC | 0,3678 | 0,3693 |
| SL | 0,3684 | 0,3681 |
| HS | 0,3697 | 0,3687 |
| NT | 0,3676 | 0,3683 |
| MW | 0,3681 | 0,3687 |
| BF | 0,3711 | 0,3692 |
| AK | 0,3674 | 0,3683 |
| RW | 0,3787 | 0,3714 |
| Mittelwert | 0,3699 | 0,3690 |
| Standar- dabw. | 0,0038 | 0,0011 |

Tabelle 6: Natürliche ^{15}N -Häufigkeit im Harn in At.-%

Natürliche ^{15}N -Häufigkeit im Harn in At.-% jeweils vor Tracergabe in Versuchsabschnitt 1 und 2. Ermittelt als Nullwert zur Berechnung der ^{15}N -Häufigkeit in At.-%-exz. nach Tracergabe. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit Abschnittsmittelwert und Standardabweichung. Mann-Whitney-Rangsummentest: $p > 0,05$ für alle Probanden.

4.1.2 Kumulative prozentuale renale ^{15}N -Exkretion

Zur Berechnung der kumulativen prozentualen renalen ^{15}N -Exkretion wurde der prozentuale Gewichtsanteil des Tracers, der zu jedem Messzeitpunkt über die Nieren ausgeschiedenen worden war, aufaddiert. Die ^{15}N -Exkretion zeigte eine Plateauwertcharakteristik (Abbildung 8). Bis zum Ende des Messzeitraumes nach 48 h war ein Plateauwert noch nicht erreicht. Die prozentuale renale ^{15}N -Exkretion betrug im Mittel nach 48 h im Versuchsabschnitt 1 27,30 % ($\pm 8,21$). Im Versuchsabschnitt 2 waren es 25,80 % ($\pm 5,17$). Der Maximalwert des 1. Versuchsabschnittes lag bei 35,78 %, der Minimalwert betrug 14,40 %. Im Versuchsabschnitt 2 wurden ein Maximalwert von 32,27 % und ein Minimalwert von 15,42 % ermittelt.

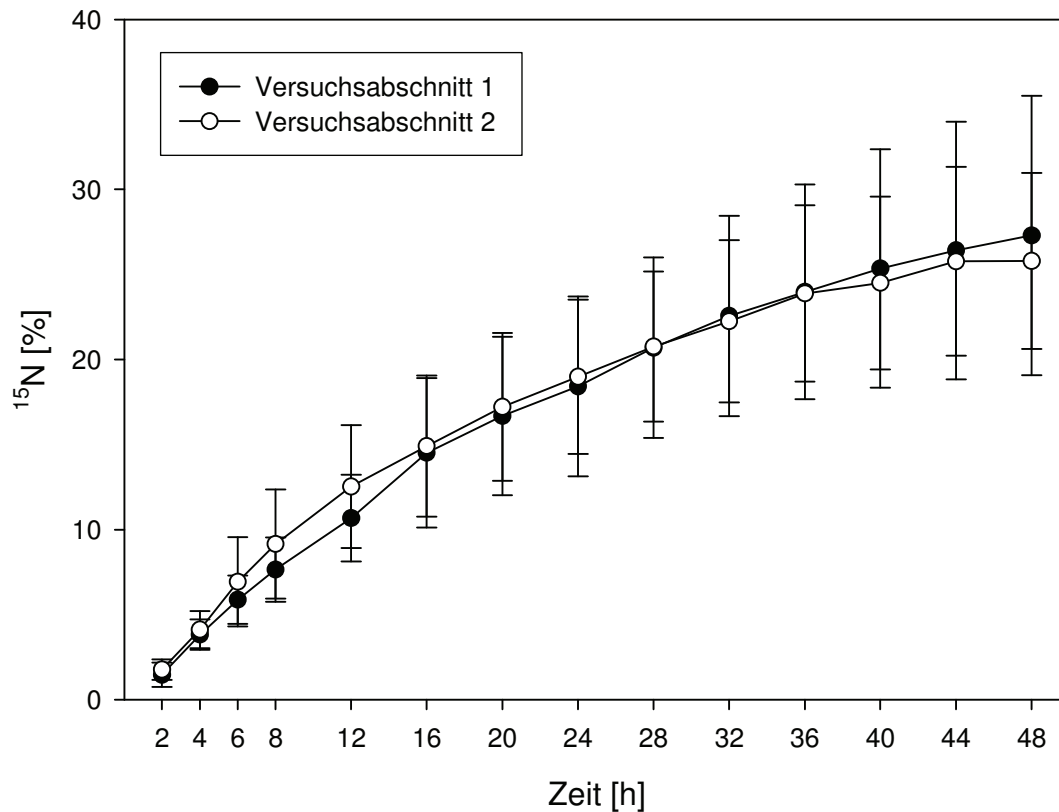


Abbildung 8: Kumulative prozentuale renale ^{15}N -Exkretion

Kumulative prozentuale renale ^{15}N -Exkretion in % der verabreichten ^{15}N -Masse im Tracer in Versuchsabschnitt 1 und 2. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung; Mann-Whitney-Rangsummentest: $p > 0,05$ zu allen Zeitpunkten.

4.2 Stuhlproben

4.2.1 Kumulative prozentuale ^{15}N -Exkretion im Stuhl

Die ^{15}N -Exkretion im Stuhl ergibt sich aus dem enteral nicht resorbierten Tracer sowie enteral sekretierter und durch bakterielle Uricolyse gesplattener Harnsäure. Die kumulative prozentuale ^{15}N -Exkretion stellt den prozentualen Massenanteil des gesamten im Messzeitraum fäkal ausgeschiedenen ^{15}N dar. In den Stuhlproben ergab sich im Versuchsabschnitt 1 eine mittlere ^{15}N -Gesamtexkretion von 30,27 % ($\pm 1,87$) (Abbildung 9). Im Versuchsabschnitt 2 konnte eine mittlere ^{15}N -Gesamtexkretion von 33,90% ($\pm 1,20$) ermittelt werden. Im Versuchsabschnitt 1 lag der Maximalwert bei

51,70 %, der Minimalwert betrug 9,07 %. Im Versuchsabschnitt 2 wurde ein Maximalwert von 55,71 % erreicht, der Minimalwert lag bei 22,85 %. Die Unterschiede in den Versuchsabschnitten waren statistisch nicht signifikant.

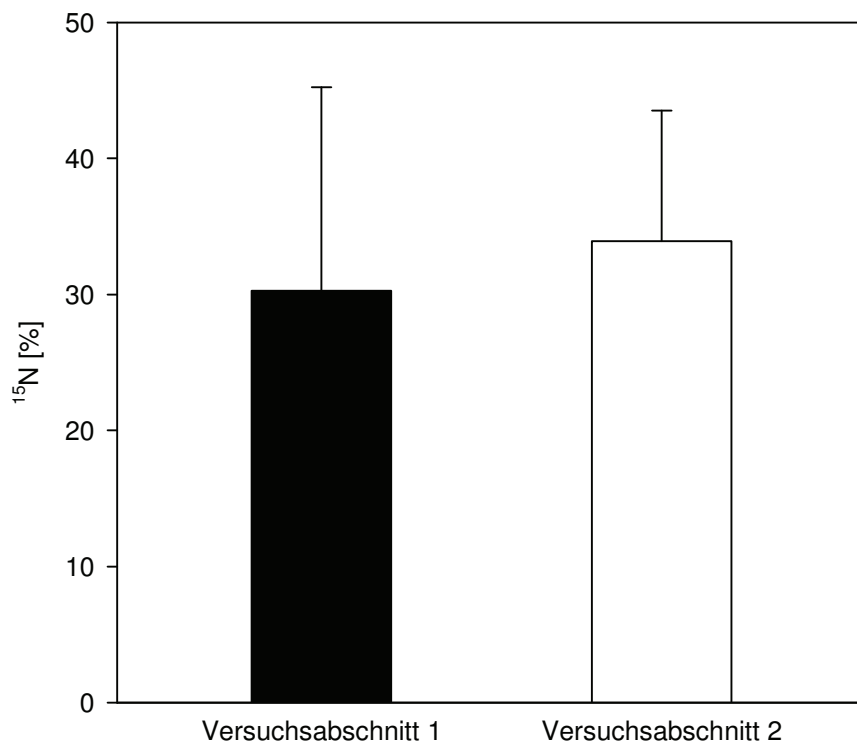


Abbildung 9: Kumulative prozentuale fäkale ^{15}N -Exkretion

Kumulative fäkale ^{15}N -Exkretion in % der verabreichten ^{15}N -Masse im Tracer in Versuchsabschnitt 1 und 2. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung; Mann-Whitney-Rangsummentest: $p > 0,05$.

4.3 Blutproben

4.3.1 ¹⁵N-Markierung des Überstandes

Im Überstand des Blutserums, in dem sich die Fraktionen der freien Aminosäuren, des Harnstoffs sowie der Harnsäure und des Kreatinins befinden, konnte sowohl im Versuchsabschnitt 1 als auch im Versuchsabschnitt 2 eine deutliche ¹⁵N-Markierung ermittelt werden. Sie betrug im Versuchsabschnitt 1 im Mittel 0,0470 At.-%-exz. ($\pm 0,0314$). Im Versuchsabschnitt 2 wurden mit 0,0288 At.-%-exz. ($\pm 0,0283$) nur knapp $\frac{2}{3}$ der ¹⁵N-Markierung des Versuchsabschnittes 1 erreicht. Auf Grund der hohen Standardabweichungen waren die Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant (Tabelle 7, Abbildung 10).

4.3.2 ¹⁵N-Markierung des Sedimentes

Im Sediment, der Fraktion der Plasmaproteine, konnte nach 2 h nur eine geringe Isotopenmarkierung festgestellt werden. Sie betrug im Mittel im ersten Versuchsabschnitt 0,0014 At.-%-exz. ($\pm 0,0002$). Im zweiten Versuchsabschnitt wurde ein Mittelwert von 0,0006 At.-%-exz. ($\pm 0,00008$) erreicht. Die Unterschiede stellten sich als nicht statistisch signifikant heraus (Tabelle 7, Abbildung 10).

4.3.3 ¹⁵N-Markierung des Fibrinogens

Die ¹⁵N-Markierung des Fibrinogens unterlag Schwankungen um die Messgenauigkeitsgrenze des Massenspektrometers von 10^{-4} At.-%. Die nicht normal verteilten Messergebnisse lagen im Versuchsabschnitt 1 mit einem Median von 0,0027 At.-%-exz. (75 % Konfidenzintervall 0,0102) noch über der Messgenauigkeit. Im Versuchsabschnitt 2 wurde mit einem Median $< 10^{-4}$ At.-%-exz. (75 % Konfidenzintervall 0,000) ein Wert innerhalb der Messgenauigkeitsgrenze ermittelt. Die Unterschiede der beiden Versuchsabschnitte waren statistisch nicht signifikant (Tabelle 7, Abbildung 10).

| Probanden | Versuchsabschnitt | | | | | |
|--------------------|-------------------|--------|----------|---------|------------|--------|
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| | Überstand | | Sediment | | Fibrinogen | |
| DC | 0,0348 | 0,0393 | 0,0006 | 0,0011 | 0,0027 | 0,0005 |
| SL | 0,0597 | 0,0024 | 0,0008 | 0,0002 | 0 | 0 |
| HS | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0037 | 0 |
| NT | 0,042 | 0,0105 | 0,005 | 0 | 0 | 0 |
| MW | 0,1051 | 0 | 0,002 | 0,0018 | 0,0124 | 0 |
| BF | 0,0693 | 0,0597 | 0,0003 | 0,0007 | (0,1477) | 0 |
| AK | 0,0264 | 0,0605 | 0 | 0,0006 | 0,0468 | 0 |
| RW | 0,039 | 0,0578 | 0,0021 | 0 | 0 | 0 |
| Mittelwert | 0,0470 | 0,0288 | 0,0014 | 0,0006 | - | - |
| Standardabweichung | 0,0314 | 0,0283 | 0,0002 | 0,00008 | - | - |

Tabelle 7: ^{15}N -Markierung ausgewählter Blutplasmafraktionen beider Versuchsabschnitte in At.-%-exz.

Ermittelte ^{15}N -Markierung der einzelnen Blutfraktionen 2 h nach oraler Tracergabe des Versuchsabschnittes 1 und 2. Der Wert in Klammern wurde als Ausreißer wert nicht in der statistischen Auswertung berücksichtigt.

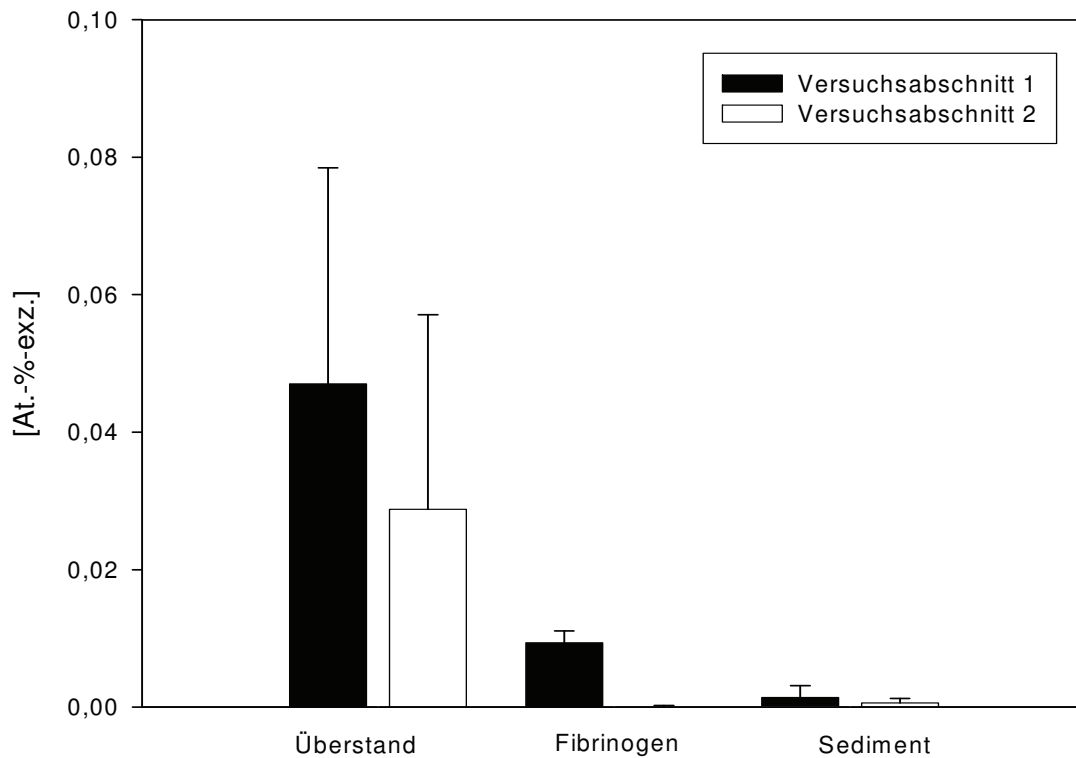


Abbildung 10: ^{15}N -Markierung der einzelnen Blutplasmafraktionen nach 2h

^{15}N -Markierung der einzelnen Blutfraktionen nach 2 h in Versuchsabschnitt 1 und 2. Die Daten sind angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung; Mann-Whitney-Rangsummentest: $p > 0,05$.

4.4 Gesamtbilanz

Vorbehaltlich einer im Messzeitraum von 48 h noch nicht vollständig erfassten renalen und enteralen ^{15}N -Exkretion lässt sich die prozentuale ^{15}N -Inkorporation als der Anteil des weder renal noch enteral exkretierten ^{15}N bestimmen.

4.4.1 Versuchsabschnitt 1

Im Versuchsabschnitt 1 ergibt sich in der ^{15}N -Gesamtbilanz eine Ausscheidung von 27,30 % ($\pm 8,21$) über die Niere und eine Exkretion von 30,27 % ($\pm 1,87$) über den

Darm. Insgesamt werden innerhalb des Untersuchungszeitraumes 57,57 % des in den markierten Nukleinsäuren enthaltenen Isotops ^{15}N ausgeschieden. Daraus ergibt sich ein Verbleib von 42,43 % des stabilen Isotops im menschlichen Körper.

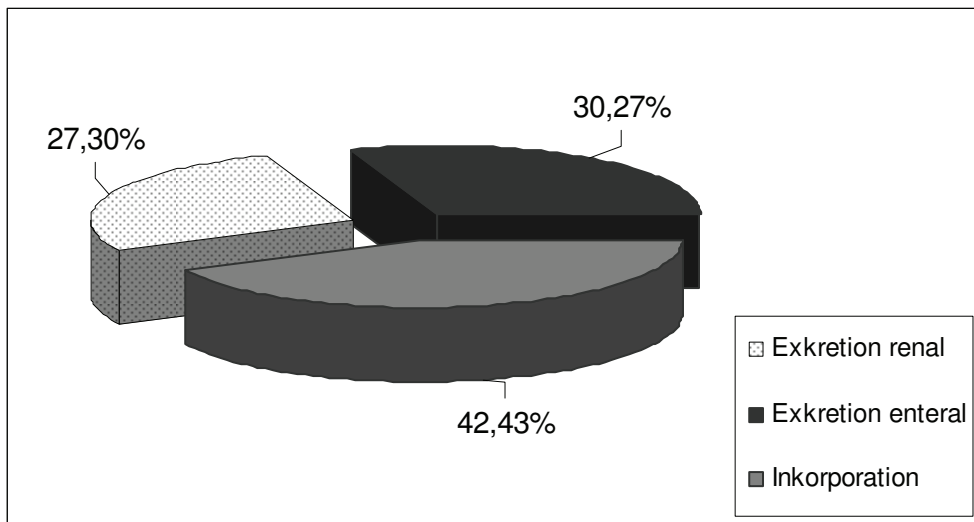


Abbildung 11: Gesamtbilanz des ^{15}N -Verbleibs im Versuchsabschnitt 1

Kumulative enterale und renale ^{15}N -Exkretion in % der Masse an verabreichtem Tracer in Versuchsabschnitt 1. Nicht ausgeschiedener Tracer wurde als inkorporiert gewertet. Die Daten sind angegeben als Mittelwert.

4.4.2 Versuchsabschnitt 2

Im Versuchsabschnitt 2 ergibt sich in der ^{15}N -Gesamtbilanz eine Ausscheidung von 25,8 % ($\pm 5,17$) über die Niere und eine Exkretion von 33,9 % ($\pm 1,20$) über den Darm. Insgesamt werden innerhalb des Untersuchungszeitraumes 59,7 % des in den markierten Nukleinsäuren enthaltenen Isotops ^{15}N ausgeschieden. Daraus ergibt sich ein Verbleib von 40,3 % des stabilen Isotops im menschlichen Körper.

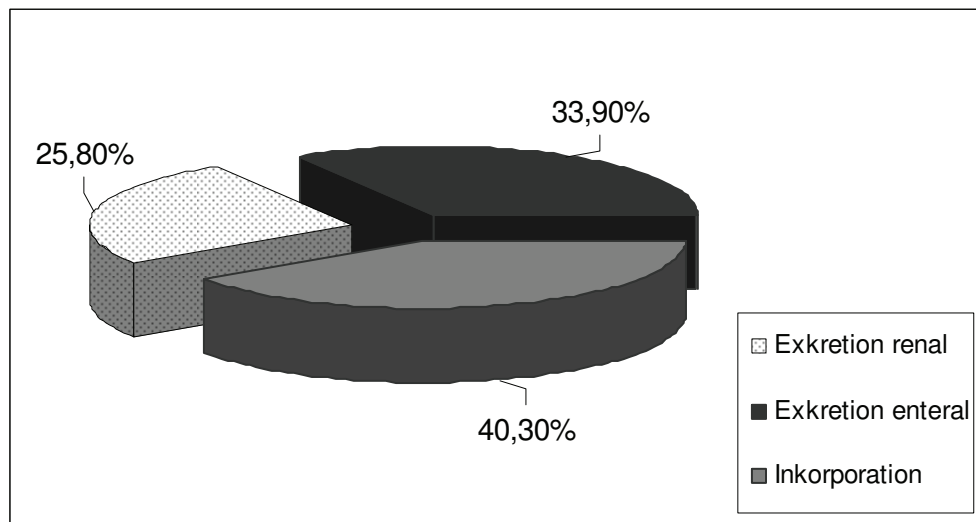


Abbildung 12: Gesamtbilanz der ^{15}N -Ausscheidung im Versuchsabschnitt 2

Kumulative enterale und renale ^{15}N -Exkretion in % der Masse an verabreichtem Tracer in Versuchsabschnitt 2. Nicht ausgeschiedener Tracer wurde als inkorporiert gewertet. Die Daten sind angegeben als Mittelwert.

5 Diskussion

5.1 Versuchsaufbau und Versuchsdurchführung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, anhand ^{15}N -markierter Nukleinsäuren die Verstoffwechslung alimentärer Nukleinsäuren im menschlichen Körper zu untersuchen. Ferner sollte geklärt werden, welchen Einfluss zusätzlich nukleinsäureangereicherte Kost in Form von Trockenhefe auf die Metabolisierung von Nukleinsäuren beim Menschen hat. Es handelt sich um Grundlagenforschung, bei der die Rahmenbedingungen so gestellt wurden, dass die Untersuchung auf eine möglichst große Grundgesamtheit anwendbar ist. Es wurden nur volljährige und gesunde Probanden in die Studie aufgenommen, welche in Körpergröße, Gewicht und Ernährungsgewohnheiten dem Durchschnitt der Bevölkerung westlicher Industrieländer entsprechen.

5.1.1 Rahmenbedingungen

Die Anzahl der Probanden war durch die Menge der ^{15}N -markierten Hefenukleinsäuren begrenzt. Zur Etablierung eines Tracerverfahrens ist die Gruppengröße von acht Probanden ausreichend. In mehreren Tracerstudien des Forschungslabors der Universitätskinder- und Jugendklinik Rostock zur oroökalen Transitzeit und zur Verstoffwechslung mit stabilen Isotopen gekennzeichneter Verbindungen wurden signifikante Ergebnisse mit ähnlichen Fallzahlen (5 bis 12 Probanden) erreicht [40, 64, 65, 70]. Es gibt nur zwei Publikationen von Golden & Waterlow sowie Wilson et al., welche im angewandten Verfahren mit der vorliegenden Studie vergleichbar sind. In diesen beiden Studien sind jedoch jeweils nur drei Probanden unter Normalbedingungen untersucht worden [71, 72]. Mit einer Anzahl von acht Probanden und einem zweigeteilten Versuchsaufbau mit ^{15}N -Nukleinsäuren und mit zusätzlich nukleinsäureangereicherter Kost in Form von Trockenhefe konnten wir erwarten, erstmals mit dem ^{15}N -Tracerverfahren quantitative, statistisch auswertbare Daten zum Nukleinsäurestoffwechsel beim Menschen zu erhalten. Falls es nur sehr geringe Unterschiede in der Metabolisierung von Nukleinsäuren bei normaler Ernährung und nuklein-

säurereicher Kost gibt, bedarf es gegebenenfalls einer Untersuchung einer größeren Gruppe von Individuen um diese nachzuweisen.

Der Ernährungszustand der Probanden wurde durch die Ermittlung des BMI und anamnestisch über das Hinterfragen der Ernährungsgewohnheiten erfasst. Unausgewogene Über- oder Unterernährung beeinflusst die Verdauung und den Stoffwechsel [73, 74]. Mit einem BMI innerhalb der von der WHO definierten Grenzen zur Normalgewichtigkeit steht ein Parameter zur Verfügung, um größere Unterschiede der Probanden in Ernährungszustand und Stoffwechsel weitgehend auszuschließen [63]. Ausgewogene Vollkost als Versuchsvoraussetzung beinhaltete Unterschiede in der Menge und Art der zugeführten Nahrungsmittel auf Grund der unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten der Probanden. Wichtig war jedoch, dass die Probanden keine extremen Ernährungsgewohnheiten (Kapitel 3.4) hatten und ihre Ernährung während des Versuches nicht umstellten.

Die zusätzlich nukleinsäureangereicherte Ernährung wurde im Versuchsabschnitt 2 durch die Gabe von 6 g Trockenhefe pro Tag zusätzlich zur normalen Vollkost simuliert. Die enthaltenen 433 mg Hefenukleinsäuren entsprechen einer Erhöhung der Nukleinsäurezufuhr um circa 25 % [15, 16] beziehungsweise einer zusätzlichen täglichen Portion von circa 200 g gebratenem Schweinefleisch (Kapitel 3.4). Laut Edozien et al. gilt eine Aufnahme von Nukleinsäuren in Form von RNS bis zu 2 g täglich als sicher und nicht gesundheitsschädigend [75]. In leitlinienorientierten Therapieempfehlungen zur Behandlung der Hyperurikämie und Prävention der manifesten Gicht wird eine Beschränkung der Purinzufuhr auf maximal 167 mg pro Tag [76, 77] empfohlen. Mit den 6 g Trockenhefe wurden im Versuchsabschnitt 2 pro Tag etwa 24 mg zusätzliches Purin zugeführt. Die Menge an zugeführten Nukleinsäuren aus Nahrung plus Trockenhefe lag knapp über den genannten Schwellen und muss daher als Stoffwechselbelastung im Sinne einer nukleinsäurereichen Ernährung angesehen werden.

Die Tracergabe bedeutete in beiden Versuchsabschnitten jeweils eine einmalige zusätzliche Nukleinsäurenbelastung zwischen 900 mg und 1600 mg (Kapitel 3.4). Eine niedrigere Dosis des Tracers war nicht möglich, da eine sichere Markierung aller Körperkompartimente erreicht werden sollte und sich empirisch die Notwendigkeit

von 0,2 mg ^{15}N pro kg/KG zur Markierung der Stickstoffkompartimente gezeigt hat [61, 62].

Außer den Ernährungsgewohnheiten kann auch eine Änderung der körperlichen Aktivität den Stoffwechsel beeinflussen. Muskelumbauprozesse verändern die Genexpression und DNS-Synthese und haben somit Einfluss auf den Nukleinsäurestoffwechsel [78, 79]. Die Probanden wurden deshalb darauf hingewiesen, ihre gewohnte körperliche Aktivität beizubehalten, während der Versuchsdurchführung aber auf ungewohnt schwere, körperliche Anstrengung zu verzichten.

Aufgrund der apparativen und finanziellen Ausstattung des Forschungslabors der Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock war es nicht möglich ^{15}N -markierte Harnsäure und ^{15}N -Harnstoff im Harn zu bestimmen sondern lediglich die Gesamt- ^{15}N -Exkretion. Dadurch können die gewonnenen Ergebnisse nur punktuell mit anderen Studien verglichen werden [80-83].

5.1.2 Probenentnahmen

5.1.2.1 Blutproben

In vorhergegangenen Publikationen des Forschungslabors der Universitäts- Kinder- und Jugendklinik der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock wurde der Zeitpunkt der Blutentnahme 2 Stunden nach Tracergabe als optimal herausgestellt, da zu diesem Zeitpunkt die größte Anflutung an stabil isotop markierten Metaboliten in den untersuchten Kompartimenten nachgewiesen werden konnte [64-66].

Der für die Blutentnahme gewählte Zeitpunkt nach 2 h hat sich auch in der vorliegenden Studie als optimal erwiesen, um das stabile Isotop ^{15}N nachzuweisen. Die maximale Markierung im Harn findet sich in beiden Versuchsabschnitten nach 4 h. Dass zu diesem Zeitpunkt die maximale Markierung des Isotops im bereits ausgeschiedenen Harn zu finden ist, lässt den Rückschluss zu, dass die größte Anflutung im Blut kurz vor diesem Zeitpunkt zu erwarten ist. Die einzeitige Blutentnahme beweist, dass sich ^{15}N -markierte Metabolite im Blut bei einer Dosierung von 0,2 mg ^{15}N bzw. 15,27

mg ^{15}N -Nukleinsäuren je Kilogramm Körpergewicht nachweisen lassen und bestätigt das angewandte Verfahren. Aussagen über die Kinetik können jedoch nicht getroffen werden. Vor dem Hintergrund einer Analyse der mutmaßlichen Veränderung der Nukleinsäureaufnahmen bei unterschiedlicher Kost wären in kommenden Studien mehrere Blutentnahmen in einem frühen Zeitintervall der beiden Versuchsabschnitte sinnvoll.

5.1.2.2 Harnproben

Das angewendete Zeitschema der Harnprobenentnahme ist Standard bei Tracerstudien im Forschungslabor der Universitäts- Kinder- und Jugendklinik Rostock und hat sich auch in dieser Studie als sinnvoll erwiesen. Die Hefenukleinsäuren werden in den ersten Stunden nach Applikation schnell resorbiert, verstoffwechselt und wieder ausgeschieden. Somit konnte das Erreichen eines ^{15}N -Plateauwertes im Harn mit den gewählten Zeitpunkten abgebildet werden.

5.1.2.3 Stuhlproben

Anders als bei den Harnproben ließ sich die Stuhlprobengewinnung nicht nach einem festen Zeitschema organisieren sondern wurde ad libitum durchgeführt. Mit den Stuhlproben wurde die Menge an nicht resorbierten ^{15}N -Nukleinsäuren sowie in den Darm sezernierter Abbauprodukte über 48 h kumulativ erfasst. Wurde nach 48 h noch keine 2. Stuhlprobe gewonnen, definierten wir die nächste Stuhlprobe als zu diesem Zeitpunkt zugehörig. Die Probenentnahme und Aufbereitung, insbesondere die Homogenisierung des Stuhls, erforderte eine hohe Selbstdisziplin der Probanden und fand ohne Kontrolle statt. Obwohl die Probanden den Stuhl vor Probenentnahme kneteten, ist eine vollständige Homogenisierung unwahrscheinlich. Infolge dessen ist es möglich, dass die entnommene Stuhlprobe eine punktuell zu hohe oder zu niedrige ^{15}N -Isotopenkonzentration aufwies. Eine vergleichsweise genauere Methode zur Homogenisierung wäre den Probanden nicht zuzumuten gewesen.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Ergebnisse der Blutuntersuchungen

Von allen drei Blutplasmafraktionen konnte die deutlichste ^{15}N -Markierung in beiden Versuchsabschnitten im Überstand nachgewiesen werden. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsabschnitten. Im Überstand befinden sich hauptsächlich die Harnsäure (120 – 340 $\mu\text{mol/l}$), Harnstoff (2 – 8 mmol/l), Kreatinin (44 – 120 mmol/l) und die freien Aminosäuren sowie zu einem sehr geringen Anteil Nukleoside (0,4 – 0,5 $\mu\text{mol/l}$). In welchen dieser Verbindungen sich das stabile Isotop ^{15}N befindet, konnte auf Grund der fehlenden labortechnischen Voraussetzungen nicht bestimmt werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich die höchsten Markierungen im Harnstoff, als Endprodukt des Pyrimidinabbaus, und in der Harnsäure als Endprodukt des Purinabbaus nachweisen lassen würden. Die Plasmakonzentrationen von Harnsäure und Harnstoff liegen bis zu vier Zehnerpotenzen über der Plasmakonzentration freier Nukleoside [84]. Dadurch ist es unwahrscheinlich, dass die deutliche Markierung des Überstandes durch freie Nukleoside verursacht wird. Kreatinin eliminiert Stickstoff aus Muskel- und Nervengewebe. Es ist davon auszugehen, dass der durch die ^{15}N -Nukleinsäuren zugeführte markierte Stickstoff nach 2 h nicht den gesamten Metabolismus des Muskel- und Nervengewebes durchlaufen hat und in nennenswerter Menge im Kreatinin nachweisbar ist. Eine Markierung der freien Aminosäuren ist durch den Nachweis markierter Plasmaproteine bewiesen. Da nur bis zu einem Fünftel des Nukleinsäurestickstoffs in den freien Ammoniumpool eingeht und für den Aminosäurestoffwechsel zur Verfügung steht [26], wird die Markierung der freien Aminosäuren gering sein. Für die hauptsächliche Markierung von Harnsäure und Harnstoff spricht außerdem der nach vier Stunden maximale ^{15}N -Nachweis im Harn, der vorrangig diesen beiden Substanzen zuzuschreiben ist (Kapitel 5.2.2).

In der Fraktion der Plasmaproteine ließ sich eine geringe ^{15}N -Markierung nachweisen, welche zwischen beiden Versuchen keine signifikanten Unterschiede zeigte. Die gemessenen ^{15}N -Markierungen waren zwar gering, lagen aber zum Teil um drei Zehnerpotenzen über der Messgenauigkeitsgrenze von 0,0001 At.-%. Dies belegt, dass es bereits nach 2 h zu einer Inkorporation des alimentären Nukleinsäurestickstoffs in

den Körperproteinpool kommt. Anhand der vorliegenden Ergebnisse gibt es aber keinen Hinweis darauf, dass die Menge der oral zugeführten Nucleinsäuren einen Einfluss auf die Inkorporation in den Körperproteinpool hat.

Die ^{15}N -Markierung des kurzlebigen Fibrinogens ist im Versuchsabschnitt 1 deutlicher ausgefallen. Im Versuchsabschnitt 2 liegen die ermittelten Werte um die Messgenauigkeitsgrenze. Trotz der Unterschiede in beiden Abschnitten ergab sich keine statistische Signifikanz. Ob es sich hierbei um einen methodischen Fehler während der Präparation handelt oder wirklich ein Unterschied besteht, der auf Grund der Gruppengröße nicht signifikant ist, bleibt ungeklärt. Die Fibrinogenmarkierung kann daher an dieser Stelle nicht interpretiert werden.

Zusammenfassend kann eine klare Aussage darüber getroffen werden, dass mit der Nahrung zugeführte ^{15}N -Nucleinsäurenbestandteile beziehungsweise deren Abbauprodukte bereits innerhalb von 2 Stunden in die Blutbahn aufgenommen werden. Außerdem fand der ^{15}N -Nucleinsäurestickstoff Eingang in den Plasmaproteinpool und damit auch in den Aminosäurepool. Nach unseren Ergebnissen gibt es keinen Unterschied in der Aufnahme- beziehungsweise Verstoffwechslungsgeschwindigkeit bei normaler und zusätzlich nucleinsäureangereicherter Kost. Um eine Kinetik nachzuweisen, wären aber wie schon erwähnt mehrere Blutentnahmen in engeren Zeitabständen für die Erhebung vonnöten gewesen.

5.2.2 Verlauf der ^{15}N -Markierungen im Harn

Die ^{15}N -Markierung im Harn ist Marker für die renale Ausscheidung des Purinstoffwechselendproduktes Harnsäure und des Pyrimidinstoffwechselendproduktes Harnstoff. Harnstoff und Harnsäure stellen zusammen über 90 % des Harnstickstoffs [27]. Die Kinetik der ^{15}N -Ausscheidung im Harn zeigt sich von der Menge der zugeführten Nucleinsäuren unabhängig. Die ^{15}N -Markierung steigt rasch nach der oralen Verabreichung der ^{15}N -markierten Nucleinsäuren an und erreicht ihr Maximum in beiden Versuchsabschnitten nach 4 h. Die Unterschiede sind nicht signifikant. Die kumulative renale ^{15}N -Exkretion hat Sättigungscharakter, erreicht nach 48 h in beiden Versuchsabschnitten jedoch noch nicht vollständig die Plateauphase. Die vor der Messphase des Versuchsabschnitts 2 (Tag 19) im Nullwert des Harns gemessene

natürliche ^{15}N -Häufigkeit von 0,366 At.-% beweist, dass neun Tage nach oraler Tracergabe keine renale Ausscheidung des Tracerstickstoff mehr stattfindet.

Im Versuchsabschnitt 1 werden im Messzeitraum im Mittel insgesamt 27,3 % des zugeführten stabilen Stickstoffisotopes renal ausgeschieden. Im Versuchsabschnitt 2 sind es 25,8 %. Wilson et al. dagegen ermittelten in einem Zeitraum von 9 Tagen in einer Studie mit zwei männlichen Probanden nach Gabe von annähernd 1 g ^{15}N -markierter Nukleinsäure eine renale Exkretion von 73 und 61 % [71]. Geht man nach der Anflutungsphase von 4 h (Abbildung 7) von einem linearen Abfall der absoluten renalen ^{15}N -Exkretion aus und berechnet eine lineare Regression, so ist der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Abszisse der Zeitpunkt, an welchem im Harn wieder die natürliche ^{15}N -Häufigkeit von circa 0,366 At.-% gemessen werden kann, also das Ende der Ausscheidung des ^{15}N -Tracerstickstoffs erreicht ist. In beiden Versuchsabschnitten der vorliegenden Studie liegt dieser Zeitpunkt bei circa 60 h. Im Versuchsabschnitt 1 ist die Tracerstickstoffausscheidung nach 58,25 h (95 % Konfidenzintervall (KI) 51,91 – 70,32) erreicht, im Versuchsabschnitt 2 nach 58,91 h (95 % KI 51,52 – 67,01) (Abbildung 13). Laut den Daten dieser Studie ist also die renale ^{15}N -Ausscheidung über die natürliche Häufigkeit hinaus circa nach spätestens 70 h beendet.

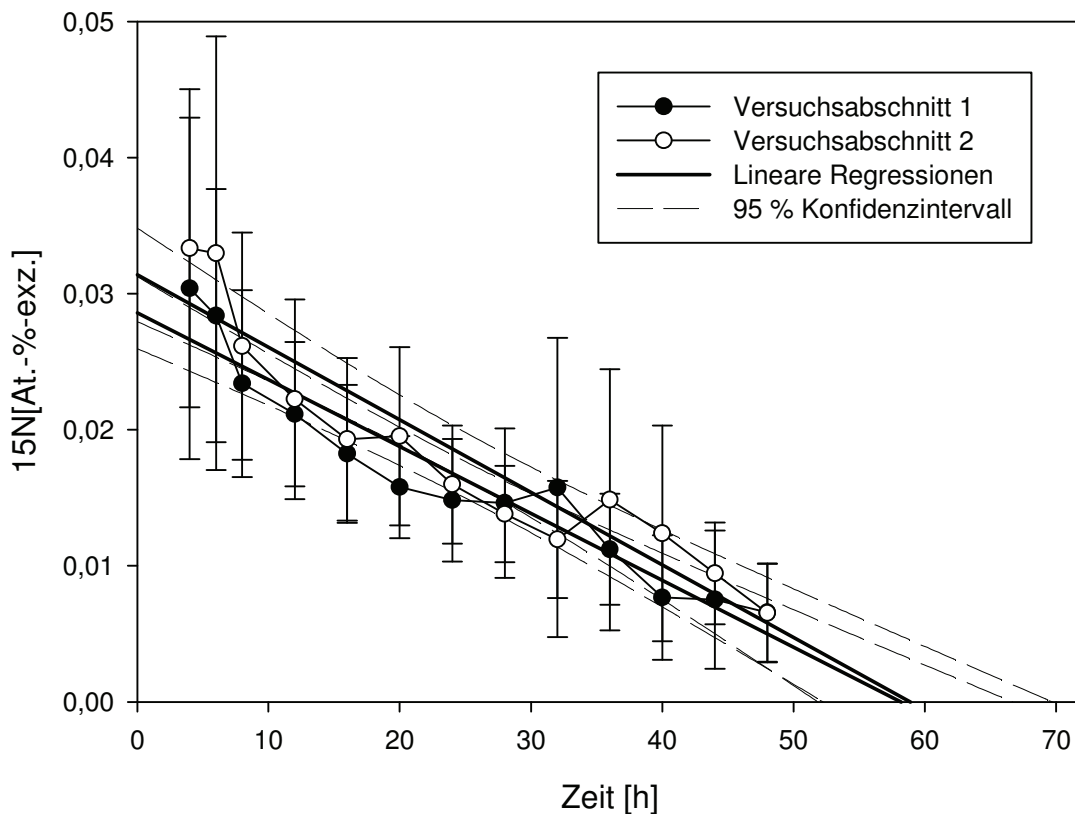


Abbildung 13: Lineare Regressionen der absoluten renalen ^{15}N -Exkretion

Lineare Regressionen der absoluten ^{15}N -Exkretion im Harn der Versuchsabschnitte 1 und 2 nach der Anflutungsphase von 4 h. Ende der ^{15}N -Tracerstickstoffausscheidung in Versuchsabschnitt 1 nach 58,25 h (95 % KI 51,91 – 70,32), in Versuchsabschnitt 2 nach 58,91 h (95 % KI 51,52 – 67,01)

Die nach Ende der Messdauer zwischen 48 und 70 h nicht erfasste Menge des Tracers kann anhand der kumulativen ^{15}N -Exkretion näherungsweise berechnet werden. Die exakteste Regression der kumulativen ^{15}N -Exkretion stellt eine beschränkte Wachstumsfunktion der Form $f(t) = a(1 - e^{-bt})$ dar (Abbildung 12 und 13). Für die Annahme eines logistischen Wachstums ist die Voraussetzung der um den Wendepunkt symmetrischen Verteilung der Daten nicht erfüllt. Für die Daten beider Versuchsabschnitte wurde eine Regressionsfunktion mit beschränktem Wachstum bestimmt. Die dabei ermittelte Grenze a entspricht dem zu erwartenden Maximalwert der kumulativen ^{15}N -Ausscheidung. Im Versuchsabschnitt 1 liegt dieser Maximalwert

näherungsweise bei 35,55 % ($\pm 0,86$) (Abbildung 14). Im Versuchsabschnitt 2 ergibt sich näherungsweise ein Maximalwert der kumulativen ^{15}N -Exkretion von 29,85 % ($\pm 0,56$) (Abbildung 15). Im Versuchsabschnitt 1 werden diesen Berechnungen zu folge nicht mehr als 36 % und im Versuchsabschnitt 2 nicht mehr als 30 % des gesamten oral applizierten Tracerstickstoffes renal ausgeschieden. Daraus folgt, dass in dieser Studie deutliche geringere prozentuale Werte der renalen ^{15}N -Ausscheidung der insgesamt applizierten ^{15}N -Menge gemessen worden wären, als die durch Wilson et al. ermittelten.

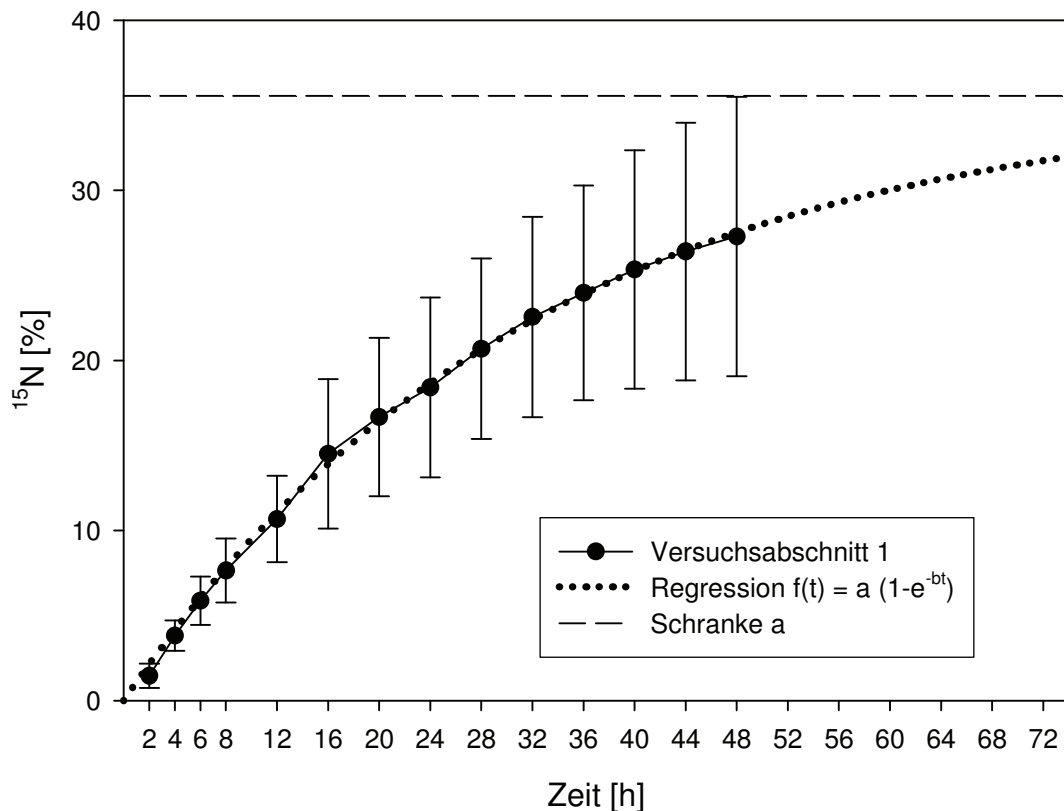


Abbildung 14: Regression der kumulativen prozentualen renalen ^{15}N -Exkretion des Versuchsabschnitts 1

Kumulative renale ^{15}N -Exkretion in % der verabreichten ^{15}N -Masse im Tracer und Regression in Form einer beschränkten Wachstumsfunktion in Versuchsabschnitt 1. Koeffizienten: Schranke $a = 35,55$; Wachstumskoeffizient $b = 0,03$. (e = Eulersche Zahl) Regressionsberechnung mit Sigma Plot®.

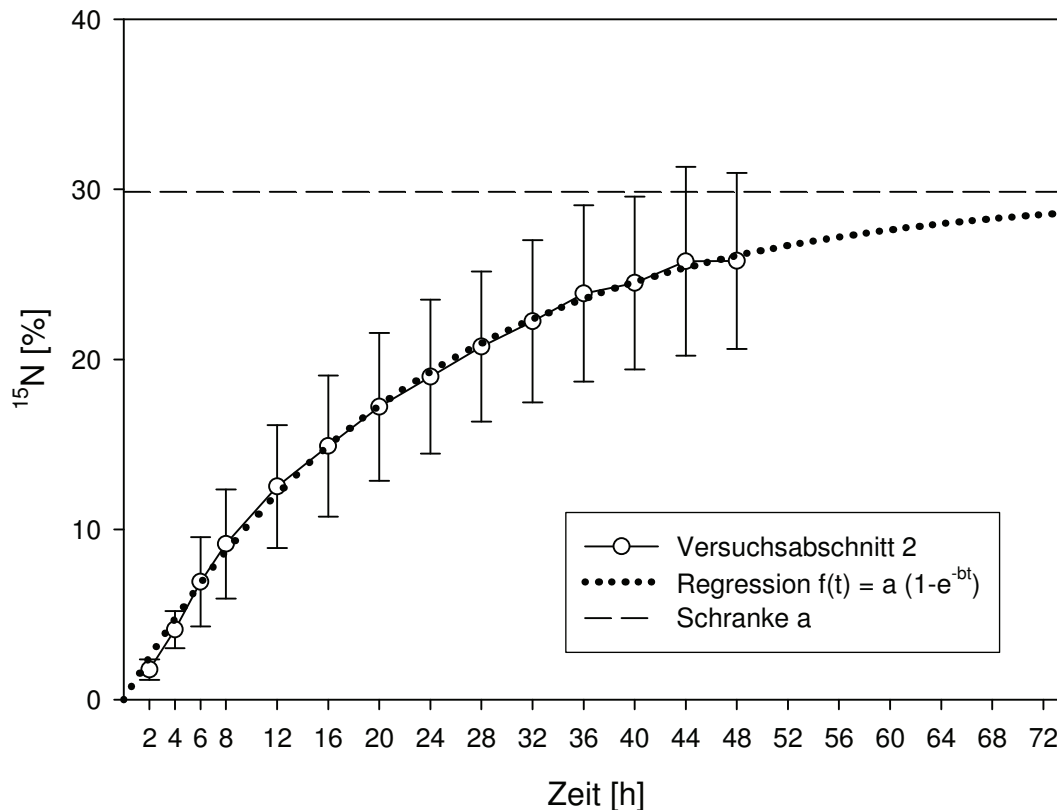


Abbildung 15: Regression der kumulativen renalen ¹⁵N-Exkretion des Versuchsabschnitts 2

Kumulative renale ¹⁵N-Exkretion in % der verabreichten ¹⁵N-Masse im Tracer und Regression in Form einer beschränkten Wachstumsfunktion in Versuchsabschnitt 2. Koeffizienten: Schranke $a = 29,85$; Wachstumskoeffizient $b = 0,04$. (e = Eulersche Zahl) Regressionsberechnung mit Sigma Plot®.

Golden & Waterlow ermittelten in einem Versuch mit drei Kindern, denen eine nicht genauer quantifizierte Menge an ¹⁵N-Nukleinsäuren als Einmaldosis oral verabreicht wurde, eine renale Ausscheidung innerhalb von 48 h von 45,2, 41,0 und 40,7 % der insgesamt verabreichten Menge [72]. Auch diese Ergebnisse liegen über den von uns ermittelten. Ein Grund könnte eine unterschiedliche Resorption und Utilisation von Nukleinsäuren und ihren Bestandteilen bei Kindern und Erwachsenen sein. Ursächlich kann unter anderem die altersabhängige Änderung der Darmflora des Menschen sein. Diese beeinflusst die Resorption von Nahrungsbestandteilen [85] und verändert sich im Laufe des Lebens deutlich [86]. Möglicherweise führt die veränderte intestinale Besiedlung bei Erwachsenen zu einer veränderten Resorption von Nukleinsäurebestandteilen. Eine verminderte intestinale Resorption bei Erwachsenen

könnte zu einer verminderten renalen Exkretion führen, jedoch einhergehend mit einer erhöhten fäkalen Ausscheidung. Die fäkale ^{15}N -Exkretion der Kinder wurde von Golden & Waterlow nicht erfasst. Die Unterschiede lassen sich daher nicht vollständig interpretieren. Möglicherweise kommt es bei Erwachsenen auch auf Grund der erhöhten Körpermasse zu einer absolut erhöhten Inkorporation von ^{15}N in den Körperprotein- und Nukleinsäurepool und damit zu einer prozentual verringerten renalen Ausscheidung.

Die Zusammenschau der erhobenen Daten legt nahe, dass die renale ^{15}N -Exkretion bereits innerhalb von 3 d abgeschlossen ist. Um diese postulierte Dauer des Nukleinsäureturnovers zu bestätigen, wäre für künftige Untersuchungen eine Verlängerung der Messphase von 48 h auf 72 h sinnvoll. Mit vertretbarem Mehraufwand ließe sich so die gesamte renale ^{15}N -Exkretion erfassen. Nach unseren Berechnungen übersteigt die gesamte renale ^{15}N -Exkretion nicht 36 % der Gesamtmenge des markierten ^{15}N -Tracerstickstoffs. Dieser Wert liegt unter den Angaben, die in der Literatur zu finden sind. Die Unterschiede lassen sich nicht endgültig interpretieren. Möglicherweise standen jedoch zum Zeitpunkt der Publikationen in den 1950- und 80er Jahren weniger effiziente Verfahren zur Tracerherstellung zur Verfügung, die zu größerer Verunreinigung mit ^{15}N -markiertem Aminosäure- und Proteinstickstoff führte. Zur besseren Differenzierung der erhobenen Werte in dieser Studie wäre eine Aufschlüsselung in die ^{15}N -Gesamtexkretion im Harn und den renalen Anteil an ^{15}N in Harnsäure und Harnstoff wünschenswert gewesen.

5.2.3 ^{15}N -Exkretion im Stuhl

Ein erheblicher Teil der ^{15}N -markierten Hefenukleinsäuren wurde fäkal ausgeschieden. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied der fäkalen Ausscheidung zwischen beiden Versuchsabschnitten feststellen. So beträgt der fäkal ausgeschiedene ^{15}N -Anteil nach Ende der Messphase im Versuchsabschnitt 1 im Mittel 30,27 % und im Versuchsabschnitt 2 33,90 %. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse der einzelnen Stuhlproben, so fällt eine große Schwankungsbreite auf. Dies zeigen die jeweiligen Minimum- und Maximumwerte. Die Werte liegen im Versuchsabschnitt 1 zwischen 7,77 und 51,70 % sowie im Versuchsabschnitt 2 zwischen 22,85 und 55,71 %.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die große Streuung berücksichtigt werden. Ein Grund für die Schwankungen ist sicher die unzureichende Homogenisierung des Stuhls. Obwohl die Probanden den Stuhl vor Probenentnahme kneteten, ist eine vollständige Homogenisierung unwahrscheinlich. Infolge dessen ist es möglich, dass die entnommene Stuhlprobe eine punktuell zu hohe oder zu niedrige Isotopenkonzentration aufwies. Eine vergleichsweise genauere Methode zur Homogenisierung stand jedoch nicht zur Verfügung. Die Ergebnisse machen auf Grund dieses anzunehmenden methodischen Fehlers Aussagen über die möglicherweise interindividuell sehr unterschiedliche Utilisation von oral zugeführten ^{15}N -Nukleinsäuren nur eingeschränkt möglich. Analog zur renalen Ausscheidung muss davon ausgegangen werden, dass es zu einer geringen Ausscheidung von ^{15}N im Stuhl über den Messzeitraum hinweg gekommen ist. Mit in der Regel nur zwei Probenentnahmen im Untersuchungszeitraum ließ sich aber keine Kinetik abschätzen und somit auch keine Regression bestimmen.

Inwieweit die ^{15}N -Nukleinsäuren in toto ohne vorangegangene Spaltung und Resorption im Stuhl ausgeschieden werden und welcher ^{15}N -Anteil in Form sezernierter Harnsäure in den Darm gelangt, ist nicht endgültig geklärt. Sorensen hat die intestinale Exkretion von Harnsäure beim Menschen mit 1,3 mmol/d beziffert [87], was circa einem Anteil von 30 % der täglichen Harnsäureausscheidung entspricht. Loffler et al. [88] haben beim Menschen für purinfreie und sehr purinreiche Ernährung Werte von 0,85 bzw. 2,38 mmol/d ermittelt. Laut tierexperimentellen Studien werden 90 % verabreichter Nukleotide absorbiert und nur 10 % ungenutzt ausgeschieden [82]. Überträgt man diese Ergebnisse auf die vorliegende Studie und geht von einem Anteil von circa 10 % ungenutzter Nukleinsäuren aus, die in der gemessenen enteralen Ausscheidung von 30 % enthalten sind, so ist es nahe liegend, dass die restlichen 20 % durch die Darmepithelien verstoffwechselt und anschließend in Form von Harnsäure zurücksezerniert wurden.

5.2.4 Gesamtexkretion

Im Versuchsabschnitt 1 werden innerhalb des Untersuchungszeitraumes in der Addition 57,57 % des in den markierten Nukleinsäuren enthaltenen Isotops ^{15}N ausgeschieden. Daraus ergibt sich ein Verbleib von 42,43 % des stabilen Isotops ^{15}N im

menschlichen Körper. Im Vergleich dazu werden im Versuchsabschnitt 2 insgesamt 59,7 % des in den markierten Nukleinsäuren enthaltenen Isotops ^{15}N ausgeschieden und es verbleiben 40,3 % des stabilen Isotops im menschlichen Körper. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich kein Unterschied in der Utilisation von oral zugeführten ^{15}N -Nukleinsäuren im Vergleich zu zusätzlich nukleinsäureangereicherter Kost feststellen. Die zusätzliche Gabe von 6 g Trockenhefe pro Tag und die damit verbundene Steigerung der Nukleinsäurezufuhr um 25 % hatte somit keine Auswirkungen. Noch höhere Nukleinsäuredosierungen wären aus ethischen und metabolischen Aspekten nicht zu vertreten gewesen.

5.3 Reabsorption und Utilisation von Nukleinsäuren

Nukleotide und deren zugehörige Stoffwechselprodukte spielen in vielen biologischen Prozessen eine Schlüsselrolle und es gibt einige wissenschaftliche Studien, die sich mit der Aufnahme und Verstoffwechslung von Nukleotiden beschäftigen. Die Daten für die Verstoffwechslung von Nukleinsäuren *in vivo* und insbesondere beim Menschen sind jedoch rar.

Es ist erwiesen, dass die orale Aufnahme von Nukleotiden, Nukleosiden und Nukleinsäuren den Anteil von Abbauprodukten sowohl im Serum als auch im Harn bei Tieren [80, 82, 89, 90] und bei Menschen [75, 91-94] erhöht. Außerdem hat sich gezeigt, dass diätetisch verabreichte Nukleinsäuren den höchsten Einfluss auf die Höhe des Serumharnsäurespiegels haben [75, 91, 93]. Diese Untersuchungen gelten als Beleg dafür, dass Nukleoproteine beziehungsweise ihre Abbauprodukte enteral absorbiert werden können. Untersuchungen an Mäusen und *in vitro*-Experimente an extrahierten Darmepithelien von Meerschweinchen legen nahe, dass Nukleinsäuren hauptsächlich in Form von Nukleosiden absorbiert werden [89, 95]. Über 90 % der Nukleoside und Basen werden durch die Enterozyten absorbiert [96, 97].

Der Transport der Nukleoside in die Enterozyten erfolgt sowohl durch erleichterte Diffusion als auch durch spezifische Na^+ -abhängige Transporter [22, 98, 99].

Im Dünndarm dominieren katabole Enzyme des Purin- und Pyrimidinstoffwechsels gegenüber anabolen Enzymen, was für einen extrarenalen Weg der Eliminierung von Harnsäure beim Menschen spricht [87, 100, 101]. Die höchste Rate an katabolen Enzymen des Purinstoffwechsels wurde im oberen Anteil des Verdauungstraktes gefunden [87]. Witte et al. schließen aus dem Überwiegen des Purinkatabolismus im Verdauungstrakt darauf, dass alimentär zugeführte Nucleinsäuren und ihre Bausteine wahrscheinlich keine ernährungsrelevante Bedeutung haben [102]. In der vorliegenden Studie konnte jedoch gezeigt werden, dass es zu einer deutlichen Aufnahme von oral zugeführten Nucleinsäuren mit nachfolgender systemischer Verstoffwechsellung kommt. Diese Aussage wird durch Untersuchungen gestützt, welche zeigten, dass eine purin- und pyrimidinfreie Nahrung bei Ratten zu einem signifikanten Abfall der totalen Menge an RNS und Proteinen im Dünndarm und Kolon führt [103]. Die Resorption zeigte sich nach unseren Ergebnissen unbeeinflusst von der Gesamtzufuhr an Nucleinsäuren, was ein Hinweis darauf ist, dass die anabole und katabole Enzymausstattung des Intestinums weder induziert noch supprimiert wurde. Diese Unbeeinflussbarkeit der anabolen und katabolen Enzymausstattung des Darmes stützt die Aussage, dass nucleinsäurereiche Ernährung durch eine absolut vermehrte, jedoch nicht prozentual vermehrte Aufnahme von Nucleinsäurebestandteilen zu einem Mehrangebot des Purinstoffwechselendproduktes Harnsäure im Blut führt und damit eventuell zu einem höheren Gichtisiko.

5.4 Verbleib des nicht erfassten ^{15}N -Isotopes

Der Verbleib der nicht erfassten ^{15}N -markierten Nucleinsäuren beziehungsweise ihrer Abbauprodukte kann nicht mit Gewissheit geklärt werden. Wie schon in den oberen Abschnitten beschrieben muss zunächst davon ausgegangen werden, dass eine weitere Ausscheidung über den Untersuchungszeitraum hinaus, sowohl fäkal als auch renal, stattgefunden haben wird.

Ein Fünftel des Purinstickstoffs geht bei der Konversion von Adenin und Guanin zu Xanthin beziehungsweise Hypoxanthin in den freien Ammonium-Pool ein (Kapitel 1.1.5.5.).

Die aus den Nukleinsäuren gebildete Harnsäure unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf, so dass im Durchschnitt bei Erwachsenen nur 68% einer injizierten Dosis im Harn erscheinen. Das restliche Drittel wird in den Darm ausgeschieden, wo es durch bakterielle Uricolyse zu freiem Ammonium abgebaut wird [87, 104].

Harnstoff wird ebenfalls nicht vollständig ausgeschieden. Circa ein Drittel des im Körper produzierten Harnstoffs wird beim Transport durch den Darm zerlegt und wieder resorbiert, so dass der Stickstoff als Ammonium-Ion wieder in die Leber gelangt [105].

Es gibt Tracerstudien an Tieren, die besagen, dass bei einer diätetischen Zufuhr von Nukleotiden 2 – 5 % Eingang in den Gewebepool finden, hauptsächlich in den Dünndarm, in die Leber und die Skelettmuskulatur [96, 106, 107]. Bezieht man diese Ergebnisse auf die vorliegende Studie so ist davon auszugehen, dass der markierte ¹⁵N-Stickstoff zum Beispiel über die *salvage-pathways* der Nukleinsäuresynthese Eingang in den Körpergewebepool beziehungsweise Körpernukleinsäurepool gefunden hat. Die Synthese von Nukleinsäuren mit Hilfe präformierter Nahrungsnukleoside und -basen stellt eine wesentlich energieeffizientere Methode im Vergleich zur *de-novo*-Synthese dar. Der menschliche Körper macht sich diesen energiesparenden Effekt zunutze. In Situationen metabolischen Stresses, ist ein positiver Effekt von Nahrungsnukleotiden auf das Immunsystem nachgewiesen [108].

Berthold et al. untersuchten in einer Tracerstudie die Inkorporation von diätetisch zugeführten Nukleotiden in hepatische RNA von Hennen und Mäusen und fanden heraus, dass sich die Stoffwechselwege von Purinen und Pyrimidinen stark unterscheiden. Nach ihren Ergebnissen an vier Mäusen und einer Henne fand eine starke Reutilisierung der Pyrimidinnukleoside zwecks der Synthese hepatischer RNA statt, wogegen sich praktisch keine Purinnukleoside in der untersuchten RNA fanden [2]. Um diese Ergebnisse nachvollziehen zu können wäre eine Aufschlüsselung des renalen ¹⁵N-Gesamtstickstoffes in ¹⁵N-Harnsäure und ¹⁵N-Harnstoff wünschenswert gewesen.

In der vorliegenden Studie ergab sich nach einem Untersuchungszeitraum von 48 h eine Retention von 40,3 % bzw. 42,43 % des markierten Stickstoffes im Körper. Wie beschrieben, muss von einer weiteren Ausscheidung ausgegangen werden (Kapitel

5.2.2.). Dieser relativ hohe Prozentsatz lässt die Vermutung zu, dass es nicht nur zu einer Aufnahme, Umwandlung und schnellen Ausscheidung der Nukleinsäurebestandteile gekommen ist, sondern diese viel mehr auch Eingang in den Nukleinsäurepool der parenchymatösen Organe gefunden haben. Zum Beweis dieser These wären Folgeuntersuchungen möglich, die sich der vorgestellten Methodik bedienen und darüber hinaus Gewebeproben aus Leber, Darm und Skelettmuskulatur analysierten.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es grundsätzlich möglich ist, den Nukleinsäuremetabolismus des Menschen mittels ^{15}N -markierter Nukleinsäuren zu untersuchen. Die gewählte ^{15}N -Nukleinsäurendosis von 15,27 mg/kg bzw. 0,2 mg ^{15}N /kg Körpergewicht reicht aus, um massenspektrometrisch erfassbare Konzentrationen des ^{15}N im Blut, Harn und Stuhl zu erreichen. Das vorgestellte Untersuchungsverfahren kann also anhand weiterführender Untersuchungen dazu dienen, die Lücke der *in vivo*-Daten des Nukleinsäuremetabolismus und insbesondere des menschlichen Nukleinsäuremetabolismus zu schließen. Die gewonnenen Ergebnisse lassen erste quantitative Aussagen über den Verbleib oral zugeführter Nukleinsäuren zu. So zeigt sich, dass bei nukleinsäureangereicherter und zusätzlich mit Trockenhefe angereicherter Kost nach 48 h mehr als ein Viertel der Nukleinsäureabbauprodukte renal ausgeschieden werden und dass die fäkale Ausscheidung in beiden Versuchsabschnitten bei circa einem Drittel liegt. Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede der beiden Versuchsabschnitte, so dass man davon ausgehen kann, dass die prozentuale Aufnahme und Verstoffwechslung von Nukleinsäuren nicht von der Menge der zugeführten Nukleinsäuren abhängig ist. Die Retention im Körper lag in beiden Versuchsabschnitten nach 48 h bei ungefähr 40 % und es wurde in beiden Fällen eine deutliche ^{15}N -Markierung im Überstand des Blutplasmas festgestellt sowie eine geringe Markierung der Blutplasmaproteinfraktion. Eine Inkorporation der ^{15}N -Nukleinsäurebestandteile in den Körperproteinpool ist dadurch bewiesen. Außerdem legen die gewonnenen Ergebnisse die Vermutung nahe, dass es mittels der *salvage-pathways* zu einem Eingang der Nukleinsäurebestandteile in den Körpernukleinsäurepool gekommen ist.

Die vorliegende Studie, das Stoffwechselschicksal biotechnologisch synthetisierter ^{15}N -markierter Nukleinsäuren aus $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ohne und mit zusätzlicher Gabe von Trockenhefe anhand der renalen und fäkalen Exkretion bzw. der Inkorporation in ausgewählte Blutplasmafraktionen beim gesunden Menschen zu untersuchen, stellt in der internationalen Fachliteratur ein Novum dar.

7 Literaturverzeichnis

1. Rudolph FB, Van Buren CT, The metabolic effects of enterally administered ribonucleic acids. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1:527-30
2. Berthold HK, Crain PF, Gouni I, Reeds PJ, Klein PD, Evidence for incorporation of intact dietary pyrimidine (but not purine) nucleosides into hepatic RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:10123-7
3. Maseoud D, Rott K, Liu-Bryan R, Agudelo C, Overview of hyperuricaemia and gout. *Curr Pharm Des* 2005;11:4117-24
4. Arromdee E, Michet CJ, Crowson CS, O'Fallon WM, Gabriel SE, Epidemiology of gout: is the incidence rising? *J Rheumatol* 2002;29:2403-6
5. Colling M, Wolfram G, Zum Einfluß von DNS und RNS in Lebensmitteln auf die Harnsäurekonzentration im Serum des Menschen. *Z Ernährungswiss* 1987;26:171-8
6. Miescher F, Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. In: Hoppe-Seyler, F (ed.). *Hoppe-Seyler's Medicinisch-chemische Untersuchungen*. 1871:441-60
7. Altmann R, Über Nucleinsäuren. *Arch Anat Physiol* 1889:524-36
8. Brachet J, La localisation des acides pentosenucléiques dans les tissues animaux et les oeufs d'Amphibiens en voie développement. *Arch Biol Liège* 1942;53:207-57
9. Caspersson T, Studien über den Eiweißumsatz der Zelle. *Naturwissenschaften* 1941;29:33-43
10. Chargaff E, Structure and function of nucleic acids as cell constituents. *Fed Proc* 1951;10:654-9

11. Franklin RE, Gosling RG, Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature* 1953;172:156-7
12. Watson JD, Crick FH, Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953;171:737-8
13. Kornberg RD, Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 1974;184:868-71
14. Kornberg RD, Thomas JO, Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science* 1974;184:865-8
15. Lassek E, Montag A, Nucleic acid components in carbohydrate-rich food. *Z Lebensm Unters Forsch* 1990;190:17-21
16. Herbel W, Montag A, Nucleo-compounds in protein-rich food. *Z Lebensm Unters Forsch* 1987;185:119-22
17. Smith LH, Jr., Pyrimidine metabolism in man. *N Engl J Med* 1973;288:764-71
18. Boza J, Nucleotides in infant nutrition. *Monatsschr Kinderheilkd* 1998;[Suppl 1] 146:39-48
19. Carver JD, Dietary nucleotides: effects on the immune and gastrointestinal systems. *Acta Paediatr Suppl* 1999;88:83-8
20. Carver JD, Walker W, The role of nucleotides in human nutrition. *J Nutr Biochem* 1995;6:58-72
21. Splitter A, Manhart N, Roth E, Ernährungsmedizin - Nach dem Curriculum Ernährungsmedizin der Bundesärztekammer. 2 ed, Stuttgart: Georg Thieme, 1999
22. Ngo LY, Patil SD, Unadkat JD, Ontogenic and longitudinal activity of Na(+)-nucleoside transporters in the human intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;280:G475-81

23. Uauy R, Stringel G, Thomas R, Quan R, Effect of dietary nucleosides on growth and maturation of the developing gut in the rat. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990;10:497-503
24. Langen P, Hucho F, Karl Lohmann and the discovery of ATP. *Angew Chem Int Ed Engl* 2008;47:1824-7
25. Lohmann K, Über die Phosphatfraktion im Muskel. *Naturwissenschaften* 1929;17:624-25
26. Rudolph FB, The biochemistry and physiology of nucleotides. *J Nutr* 1994;124 [Suppl]1:124S-27S
27. Löffler G, Heinrich C, Petrides P, *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol. 8, Heidelberg: Springer, 2007:1263
28. Kramer HM, Curhan G, The association between gout and nephrolithiasis: the National Health and Nutrition Examination Survey III, 1988-1994. *Am J Kidney Dis* 2002;40:37-42
29. Weber H, *Allgemeine Mykologie*, Stuttgart: Gustav Fischer, 1993:541
30. Barrie A, Davies JE, Park AJ, Workmann CT, Continuous flow stable isotope analysis for biologists. *Spectroscopy* 1989;4:42-52
31. Cooreman M, Hengels J, Strohmeyer G, ^{13}C -Harnstoff-Atemtest als nicht-invasive Methode zum Nachweis von *Helicobacter pylori*. *Dtsch Med Wochenschr* 1990;115:367-71
32. Graham DY, Klein PD, Evans jr. DJ, Evans DJ, Alpert AR, Opekun AR, Boutton TW, *Campylobacter pylori* detected noninvasively by the ^{13}C -urea breath test. *Lancet* 1987;i:1174-7
33. Graham DY, Klein PD, Opekun AR, Smith R, Polasani D, Evans jr. DJ, Evans DJ, Alpert LC, Michaletz PA, Yoshimura HH, Adam E, In vivo susceptibility of *Campylobacter pylori*. *Am J Gastroenterol* 1989;84:233-8

34. Shreeve WW, Shoop JD, Ott DG, McInteer BB, Test for alcoholic cirrhosis by conversion of ^{14}C or ^{13}C to expired CO_2 . *Gastroenterology* 1976;71:98-101
35. Irving CS, Schoeller DA, Nakamura K, Baker AL, Klein PD, The aminopyrine breath test as a measure of liver function. *J Lab Clin Med* 1982;100:356-73
36. Hiele M, Ghos Y, Rutgeers P, Vantrappen G, Carchon H, Eggermont E, $^{13}\text{CO}_2$ breath test using naturally ^{13}C -enriched lactose for detection of lactase deficiency in patients with gastrointestinal symptoms. *J Lab Clin Med* 1988;112:193-200
37. Solomons NW, Schoeller DA, Wagonfeld JB, Ott DG, Rosenberg IH, Klein PD, Application of stable isotope ^{13}C -labeled glycocholate breath test to diagnosis of bacterial overgrowth and ileal dysfunction. *J Lab Clin Med* 1977;90:431-37
38. Hiele M, Ghos Y, Rutgeers P, Vantrappen G, Starch digestion in normal subjects and patients with pancreatic disease, using a $^{13}\text{CO}_2$ breath test. *Gastroenterology* 1989;96:503-9
39. Watkins JB, Klein PD, Schoeller DA, Kirschner BS, Park R, Perman JA, Diagnosis and differentiation of fat malabsorption in children using ^{13}C -labeled lipids. Trioctanonin, triolein, and palmitic acid breath test. *Gastroenterology* 1982;82:911-7
40. Wutzke KD, Radke M, Breuel K, Gurk S, Lafrenz JD, Heine WE, Triglyceride oxidation in cystic fibrosis: a comparison between different ^{13}C -labeled tracer substances. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:148-54
41. Heine WE, Berthold HK, Klein PD, A novel stable isotope breath test: ^{13}C -labeled glycosyl ureides used as noninvasive markers of intestinal transit time. *Am J Gastroenterol* 1995;90:93-8
42. Urey HC, Brickwedde FG, Murphy GM, A hydrogen isotope of mass 2. *Physical Rev* 1932;40:1-15
43. Young VR, Ajami A, The Rudolf Schoenheimer Centenary Lecture. Isotopes in nutrition research. *Proc Nutr Soc* 1999;58:15-32

44. Schoenheimer R, Rittenberg D, Foster GL, Keston AS, Ratner S, The application of the nitrogen isotope N¹⁵ for the study of protein metabolism. *Science* 1938;88:599-600
45. Schoenheimer R, Rittenberg D, The application of isotopes to the study of intermediary metabolism. *Science* 1938;87:221-6
46. Schoenheimer R, Ratner s, Studies in protein metabolism. III. Synthesis of amino acids containing isotopic nitrogen. *J Biol Chem* 1939;127:301-13
47. Rittenberg D, Keston AS, Rosebury F, Schoenheimer R, Studies in protein metabolism. II. The determination of nitrogen isooopes in organic compounds. *J Biol Chem* 1939;127:291-9
48. Rittenberg D, Schoenheimer R, Studies in protein metabolism. VI. Hippuric acid formation studied with the aid of the nitrogen isotope. *J Biol Chem* 1939;127:329-31
49. Folin O, *The American Journal of Physiology* Volume XIII: 117-138, 1905. A theory of protein metabolism. *Nutr Rev* 1975;33:141-3
50. Ratner S, Rittenberg D, Keston AS, Schoenheimer R, *The Journal of Biological Chemistry*, Volume 134, June 1940: Studies in protein metabolism. XIV. The chemical interaction of dietary glycine and body proteins in rats. By S. Ratner, D. Rittenberg, Albert S. Keston, and Rudolf Schoenheimer. *Nutr Rev* 1987;45:310-2
51. Picou D, Taylor-Roberts T, The measurement of total protein synthesis and catabolism and nitrogen turnover in infants in different nutritional states and receiving different amounts of dietary protein. *Clin Sci* 1969;36:283-96
52. Picou D, Taylor-Roberts T, Waterlow JC, The measurement of total protein synthesis and nitrogen flux in man by constant infusion of ¹⁵N-glycine. *J Physiol* 1969;200:52P-3P
53. Crane CW, Neuberger A, The digestion and absorption of protein by normal man. *Biochem J* 1960;74:313-23

54. Wutzke KD, Heine W, Völker T, Kreyenbrink F, Krawielitzki K, Präparative Darstellung von hochangereichertem ^{15}N -markiertem Hefeprotein. Isotopenpraxis 1984;20:90-3
55. Fleischmann F, Riederle K, Verfahren zum Gewinnen der Eiweißbestandteile aus Mikroorganismen, DDR-Patentschrift Nr. 1078 (1953) Kl.: 6 a 22/06, IPK: C12C 11/18
56. Fleischmann F, Riederle K, Verfahren zur Isolierung von verschiedenen Eiweißstoffen aus Extrakten von Mikroorganismen, DDR-Patentschrift Nr. 3199 (1953) Kl.: 6 a 22/06, IPK: C12C 11/18
57. Rabald E, Hagedorn A, Böhringer C, Verfahren zur Gewinnung aller wesentlichen Bestandteile der Hefe, DR-Patentschrift Nr. 734 336 (1943) Kl.: 6 a 22/06, IPK: C12C 11/18
58. Rabald E, Hagedorn A, Böhringer C, Verfahren zur Herstellung von schlagfähigem Eiweiß aus Hefe, DR-Patentschrift Nr. 749 134 (1952) Kl.: 6 a 22/06, IPK: C12C 11/18
59. Faust H, Bornhak H, Hirschberg K, Jung K, Junghans P, Krumbiegel P, Reinhard R, Klinisch-chemische und isopenanalytische Methoden zur Untersuchung des Stickstoffstoffwechsels mit N-15 beim Menschen. In: Akad Wiss DDR (ed.). Methoden-katalog. Leipzig: Zfl-Mitteilungen. 1981:1-210
60. Faust H, Müller G, Störl HJ, Zur Isotopenverdünnungsanalyse von Stickstoff mit dem automatischen ^{15}N -Analysator NA-5A. Isotopenpraxis 1976;12:205
61. Wutzke KD, Zhukova TP, Sorokina EG, Plath C, Richter I, Heine W, Friedrich M, [The dose dependence of ^{15}N -incorporation in organ proteins of newborn rats after pulse labeling with different tracers]. Arch Tierernahr 1987;37:551-7
62. Plath C, Heine W, Wutzke KD, Krienke L, Towe J, Massute G, Windischmann C, ^{15}N tracer kinetic studies on the validity of various ^{15}N tracer substances for determining whole-body protein parameters in very small preterm infants. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1987;6:400-8

63. WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. In: WHO Technical Report, 2000
64. Wutzke KD, Oetjens I, ^{13}C - and ^{15}N -incorporation of doubly stable isotope labelled *Lactobacillus johnsonii* in humans. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:1167-72
65. Wutzke KD, Sattinger V, ^{15}N -excretion of heat-killed *Lactobacillus casei* in humans. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:847-52
66. Wutzke KD, Berg D, Haffner D, The metabolic fate of doubly stable isotope labelled heat-killed *Lactobacillus johnsonii* in humans. *Eur J Clin Nutr* 2008;62:197-202
67. Leitzmann P, Heine W, Wutzke KD, von Bismarck P, Dorlochter L, Miera O, Buhrlen M, Cornelissen BW, Hocker C, [Comparison of gastric emptying, blood glucose, and oro-cecal transit times after a conventional morning meal and a Kollath breakfast]. *Z Ernährungswiss* 1998;37:31-7
68. Braden B, Lembcke B, Caspary WF, [Stable isotopes in diagnosis and research. New possibilities of noninvasive gastroenterology and metabolism research]. *Dtsch Med Wochenschr* 1991;116:1721-7
69. Wutzke KD, Heine W, Plath C, Leitzmann P, Radke M, Mohr C, Richter I, Gülzow HU, Hobusch D, Evaluation of oro-coecal transit time: a comparison of the lactose- ^{13}C , ^{15}N]ureide $^{13}\text{CO}_2$ - and the lactulose H_2 -breath test in humans. *Eur J Clin Nutr* 1997;51:11-9
70. Glasenapp B, Metabolisierung von ^{13}C -markierten Glykosylureiden und die Bestimmung der orozökalen Transitzeit mit Hilfe einer dynamischen ^{13}C -Atemgasanalyse. Med Dissertation, Universität Rostock, 2001
71. Wilson D, Beyer A, Bishop C, Talbott JH, Urinary uric acid excretion after the ingestion of isotopic yeast nucleic acid in the normal and gouty human. *J Biol Chem* 1954;209:227-32
72. Golden MHN, Waterlow JC, Picou D, Metabolism of ^{15}N Nucleic Acids in Children. In: Waterlow, JC and JML Stephen (eds.). Nitrogen metabolism in man. London and New Jersey: Applied Science Publishers; 1981:269-73

73. Devries MC, The influence of sex, menstrual cycle phase, estrogen, obesity, and endurance training on carbohydrate and lipid metabolism at rest and during moderate-intensity endurance exercise. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008;33:808-9
74. Santosa S, Hensrud DD, Votruba SB, Jensen MD, The influence of sex and obesity phenotype on meal fatty acid metabolism before and after weight loss. *Am J Clin Nutr* 2008;88:1134-41
75. Edozien JC, Udo UU, Young VR, Scrimshaw NS, Effects of high levels of yeast feeding on uric acid metabolism of young man. *Nature* 1970;228:180
76. Zhang W, Doherty M, Bardin T, Pascual E, Barskova V, Conaghan P, Gerster J, Jacobs J, Leeb B, Liote F, McCarthy G, Netter P, Nuki G, Perez-Ruiz F, Pignone A, Pimentao J, Punzi L, Roddy E, Uhlig T, Zimmermann-Gorska I, EULAR evidence based recommendations for gout. Part II: Management. Report of a task force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 2006;65:1312-24
77. Zhang W, Doherty M, Pascual E, Bardin T, Barskova V, Conaghan P, Gerster J, Jacobs J, Leeb B, Liote F, McCarthy G, Netter P, Nuki G, Perez-Ruiz F, Pignone A, Pimentao J, Punzi L, Roddy E, Uhlig T, Zimmermann-Gorska I, EULAR evidence based recommendations for gout. Part I: Diagnosis. Report of a task force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics (ESCISIT). *Ann Rheum Dis* 2006;65:1301-11
78. Joseph AM, Pilegaard H, Litvintsev A, Leick L, Hood DA, Control of gene expression and mitochondrial biogenesis in the muscular adaptation to endurance exercise. *Essays Biochem* 2006;42:13-29
79. Farrell PA, Protein metabolism and age: influence of insulin and resistance exercise. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2001;11 [Suppl]:S150-63
80. Clifford AJ, Story DL, Levels of purines in foods and their metabolic effects in rats. *J Nutr* 1976;106:435-42

81. Schlesinger N, Purine-rich foods and the risk of gout in men. *N Engl J Med* 2004;350:2520-1; author reply 20-1
82. Savaiano DA, Ho CY, Chu V, Clifford AJ, Metabolism of orally and intravenously administered purines in rats. *J Nutr* 1980;110:1793-804
83. Roll P, Brown G, Di Carlo F, Schultz A, The metabolism of yeast nucleic acid in the rat. *J Biol Chem* 1949;180:333-40
84. Ganten D, Ruckpaul C, *Handbuch der molekularen Medizin*. Vol. 1, Berlin: Springer, 1999
85. Wolowczuk I, Verwaerde C, Viltart O, Delanoye A, Delacre M, Pot B, Granette C, Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clin Dev Immunol* 2008;2008:639803
86. Hebuterne X, Gut changes attributed to ageing: effects on intestinal microflora. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:49-54
87. Sorensen LB, Levinson DJ, Origin and extrarenal elimination of uric acid in man. *Nephron* 1975;14:7-20
88. Loffler W, Grobner W, Medina R, Zollner N, Influence of dietary purines on pool size, turnover, and excretion of uric acid during balance conditions. Isotope studies using ¹⁵N-uric acid. *Res Exp Med (Berl)* 1982;181:113-23
89. Sonoda T, Tatibana M, Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *Biochim Biophys Acta* 1978;521:55-66
90. Simmonds HA, Hatfield PJ, Cameron JS, Jones AS, Cadenhead A, Metabolic studies of purine metabolism in the pig during the oral administration of guanine and allopurinol. *Biochem Pharmacol* 1973;22:2537-51
91. Griebisch A, Zollner N, Effect of ribomononucleotides given orally on uric acid production in man. *Adv Exp Med Biol* 1974;41:443-9
92. Zollner N, Griebisch A, Diet and gout. *Adv Exp Med Biol* 1974;41:435-42

93. Waslien CI, Calloway DH, Margen S, Uric acid production of men fed graded amounts of egg protein and yeast nucleic acid. *Am J Clin Nutr* 1968;21:892-7
94. Griebisch A, Zöllner N, Verhalten der Harnsäurespiegel im Plasma unter dosierter Zufuhr von Nucleinsäuren. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin* 1970;76:849-53
95. Kolassa N, Stengg R, Turnheim K, Adenosine uptake by the isolated epithelium of guine pig jejunum. *Can J Physiol Pharmacol* 1977;55:1033-8
96. Ho CY, Miller KV, Savaiano DA, Crane RT, Ericson KA, Clifford AJ, Absorption and metabolism of orally administered purines in fed and fasted rats. *J Nutr* 1979;109:1377-82
97. Salati LM, Gross CJ, Henderson LM, Savaiano DA, Absorption and metabolism of adenine, adenosine-5'-monophosphate, adenosine and hypoxanthine by the isolated vascularly perfused rat small intestine. *J Nutr* 1984;114:753-60
98. Jarvis SM, Characterization of sodium-dependent nucleoside transport in rabbit intestinal brush-border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1989;979:132-8
99. Jarvis SM, Williams TC, Lee CW, Cheeseman CI, Active transport of nucleosides and nucleoside drugs. *Biochem Soc Trans* 1989;17:448-50
100. Berlin RD, Hawkins RA, Secretion of purines by the small intestine: transport mechanism. *Am J Physiol* 1968;215:942-50
101. Berlin RD, Hawkins RA, Secretion of purines by the small intestine: general characteristics. *Am J Physiol* 1968;215:932-41
102. Witte DP, Wiginton DA, Hutton JJ, Aronow BJ, Coordinate developmental regulation of purine catabolic enzyme expression in gastrointestinal and postimplantation reproductive tracts. *J Cell Biol* 1991;115:179-90
103. LeLeiko NS, Martin BA, Walsh M, Kazlow P, Rabinowitz S, Sterling K, Tissue-specific gene expression results from a purine- and pyrimidine-free diet and 6-

mercaptapurine in the rat small intestine and colon. *Gastroenterology* 1987;93:1014-20

104. Geren W, Bendich A, Bodansky O, Brown G, The fat of uric acid in man. *J Biol Chem* 1950;183:21-31

105. Picou D, Phillips M, Urea metabolism in malnourished and recovered children receiving a high or low protein diet. *Am J Clin Nutr* 1972;25:1261-6

106. Savaiano DA, Clifford AJ, Absorption, tissue incorporation and excretion of free purines bases in the rat. *Nutr Rep Int* 1978;17:551-6

107. Burrige PW, Woods RA, Henderson JF, Utilization of dietary nucleic acid purines for nucleotide and nucleic acid synthesis in the mouse. *Can J Biochem* 1976;54:500-6

108. Van Buren CT, Kulkarni AD, Rudolph FB, The role of nucleotides in adult nutrition. *J Nutr* 1994;124 [Suppl]1:S160-4

8 Thesen

1. Die Utilisation alimentärer Nucleinsäuren allgemein wird in der vorliegenden Dissertation stellvertretend durch ^{15}N -markierte Hefenucleinsäuren untersucht.
2. Die ^{15}N -Markierung der Hefenucleinsäuren erfolgt durch Fermentation von *Saccharomyces cerevisiae* in einem Nährmedium, welches als alleinige Stickstoffquelle ^{15}N -Ammoniumchlorid enthält.
3. Nucleinsäureangereicherte Kost lässt sich durch die Gabe von 3 x 2 g Trockenhefe/Tag zusätzlich zur normalen Vollkost simulieren.
4. Der Verbleib der ^{15}N -markierten Nucleinsäuren beziehungsweise ihrer Abbauprodukte wird durch massenspektrometrische Messung der ^{15}N -Isotopenhäufigkeiten in Harn-, Blut- und Stuhlproben ermittelt.
5. Nucleinsäuren werden im Darm in ihre Abbauprodukte gespalten und resorbiert.
6. Es findet eine schnelle Aufnahme der Abbauprodukte der ^{15}N -Nucleinsäuren in die Blutbahn statt.
7. Ein Anteil des zugeführten ^{15}N -Nucleinsäurestickstoffs wird im Körperproteinpool inkorporiert.
8. Die ^{15}N -Nucleinsäuren werden innerhalb von 48 h sowohl ohne als auch mit zusätzlich nucleinsäureangereicherter Kost in Form von Trockenhefe zu mehr als einem Viertel des Nucleinsäurestickstoffs renal ausgeschieden.
9. Die fäkale ^{15}N -Ausscheidung beträgt in beiden Gruppen ca. ein Drittel.

10. In wie weit sich der Anteil des fäkalen ^{15}N -Stickstoffs aus nicht resorbierten ^{15}N -Nukleinsäuren einerseits und aus in den Darm sezernierten ^{15}N -Abbauprodukten andererseits zusammensetzt, kann nicht endgültig geklärt werden.
11. Insgesamt werden in beiden Gruppen knapp 60 % des in den Nukleinsäuren enthaltenen ^{15}N renal und fäkal ausgeschieden und gut 40 % im menschlichen Körper retiniert.
12. Die Inkorporation des ^{15}N -Nukleinsäurestickstoffes in den Körperrnukleinsäurepool ist bei einer Retention von gut 40 % und durch die nachgewiesene Inkorporation in den Körperproteinpool zwar nicht formell nachgewiesen aber wahrscheinlich.
13. Die Ausscheidung ^{15}N -markierter Abbauprodukte ist nicht nach 48 h sondern innerhalb von 72 h beendet, wobei der Anteil in den letzten 24 h unter 10 % liegt.
14. Die angewendete Methode ist dazu geeignet, quantitative Aussagen zum Nukleinsäurestoffwechsel zu machen.
15. Auf Grund der Daten der vorliegenden Studie scheint es keinen Unterschied in der Verstoffwechslung von Nukleinsäuren bei nukleinsäurereicher Kost zu geben.
16. Die vorliegende Studie, das Stoffwechselschicksal biotechnologisch synthetisierter ^{15}N -markierter Nukleinsäuren aus $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ohne und mit zusätzlicher Gabe von Trockenhefe anhand der renalen und fäkalen Exkretion bzw. der Inkorporation in ausgewählte Blutplasmafraktionen beim gesunden Menschen zu untersuchen, stellt in der internationalen Fachliteratur ein Novum dar.

9 Anhang

9.1 Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung der Purinbiosynthese | 13 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung der Pyrimidinbiosynthese | 14 |
| Abbildung 3: Verknüpfungen des Nukleinsäurestoffwechsels | 15 |
| Abbildung 4: Schematische Darstellung des Purinstoffwechsels des Menschen | 17 |
| Abbildung 5: Fermentor Biostad B, B. Braun, Melsungen | 25 |
| Abbildung 6: Ultraschallgenerator Labsonic U, B. Braun, Melsungen | 25 |
| Abbildung 7: Mittlere renale ^{15}N -Häufigkeit über die Zeit | 40 |
| Abbildung 8: Kumulative prozentuale renale ^{15}N -Exkretion | 42 |
| Abbildung 9: Kumulative prozentuale fäkale ^{15}N -Exkretion | 43 |
| Abbildung 10: ^{15}N -Markierung der einzelnen Blutplasmafraktionen nach 2h | 46 |
| Abbildung 11: Gesamtbilanz des ^{15}N -Verbleibs im Versuchsabschnitt 1 | 47 |
| Abbildung 12: Gesamtbilanz der ^{15}N -Ausscheidung im Versuchsabschnitt 2 | 48 |
| Abbildung 13: Lineare Regressionen der absoluten renalen ^{15}N -Exkretion | 56 |
| Abbildung 14: Regression der kumulativen prozentualen renalen ^{15}N -Exkretion des Versuchsabschnitts 1 | 57 |
| Abbildung 15: Regression der kumulativen renalen ^{15}N -Exkretion des Versuchsabschnitts 2 | 58 |

9.2 Formelverzeichnis

| | |
|--|----|
| Formel 1: Berechnung des BMI | 27 |
| Formel 2: Berechnung der Teilchengeschwindigkeit | 33 |
| Formel 3: Berechnung der absoluten renalen ^{15}N -Exkretion | 34 |
| Formel 4: Berechnung der kumulativen prozentualen renalen ^{15}N -Exkretion | 35 |
| Formel 5: Berechnung der absoluten fäkalen ^{15}N -Exkretion | 35 |
| Formel 6: Berechnung der kumulativen prozentualen fäkalen ^{15}N -Exkretion | 35 |

9.3 Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Nukleinsäuregehalt ausgewählter Lebensmittel | 10 |
| Tabelle 2: Zusammensetzung des Hefenährmediums pro Liter | 24 |
| Tabelle 3: Daten der Probanden | 27 |
| Tabelle 4: Versuchsaufbau | 31 |
| Tabelle 5: Schema der Probenentnahme | 32 |
| Tabelle 6: ^{15}N -Häufigkeit im Harn in At.-% | 41 |
| Tabelle 7: ^{15}N -Markierung ausgewählter Blutplasmafraktionen beider Versuchsschnitte in At.-%-exz. | 45 |
| Tabelle 8: Absolute renale ^{15}N -Markierung in At.-%-exz. des Versuchsabschnitts 1 | 81 |
| Tabelle 9: Absolute renale ^{15}N -Markierung in At.-%-exz. des Versuchsabschnitts 2 | 81 |
| Tabelle 10: Kum. prozentuale renale ^{15}N -Exkretion des Versuchsabschnitts 1 | 82 |
| Tabelle 11: Kum. prozentuale renale ^{15}N -Exkretion des Versuchsabschnitts 2 | 82 |
| Tabelle 12: Absolute fäkale ^{15}N -Markierung in At.-%-exz. im Versuchsabschnitt 1 | 82 |
| Tabelle 13: Absolute fäkale ^{15}N -Markierung in At.-%-exz. im Versuchsabschnitt 2 | 83 |
| Tabelle 14: Kumulative prozentuale fäkale ^{15}N -Exkretion im Versuchsabschnitt 1 | 83 |
| Tabelle 15: Kumulative prozentuale fäkale ^{15}N -Exkretion im Versuchsabschnitt 2 | 83 |

9.4 Rohdaten

| Zeit[h] | DC | SL | HS | NT | MW | BF | AK | RW | MW | SD |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 2 | 0,0093 | 0,0061 | 0,0154 | 0,0189 | 0,0264 | 0,0091 | 0,0317 | 0,0102 | 0,0159 | 0,0092 |
| 4 | 0,0305 | 0,0131 | 0,0220 | 0,0496 | 0,0222 | 0,0318 | 0,0472 | 0,0268 | 0,0304 | 0,0125 |
| 6 | 0,0259 | 0,0107 | 0,0252 | 0,0381 | 0,0311 | 0,0295 | 0,0412 | 0,0254 | 0,0284 | 0,0093 |
| 8 | 0,0234 | 0,0103 | 0,0207 | 0,0303 | 0,0227 | 0,0232 | 0,0336 | 0,0231 | 0,0234 | 0,0069 |
| 10 | | | 0,0169 | | | | | | 0,0169 | |
| 12 | 0,0264 | 0,0112 | 0,0182 | 0,0251 | 0,0206 | 0,0216 | 0,0274 | 0,0187 | 0,0211 | 0,0053 |
| 14 | | | 0,0149 | 0,0550 | | | | | 0,0216 | 0,0283 |
| 16 | 0,0187 | 0,0079 | 0,0140 | 0,0221 | 0,0197 | 0,0237 | 0,0209 | 0,0190 | 0,0182 | 0,0051 |
| 20 | 0,0171 | 0,0080 | 0,0135 | 0,0206 | 0,0169 | 0,0182 | 0,0153 | 0,0166 | 0,0158 | 0,0037 |
| 24 | 0,0192 | 0,0079 | 0,0136 | 0,0196 | 0,0187 | 0,0153 | 0,0155 | 0,0089 | 0,0148 | 0,0045 |
| 28 | 0,0209 | 0,0063 | 0,0146 | 0,0167 | 0,0168 | 0,0127 | 0,0212 | 0,0079 | 0,0146 | 0,0055 |
| 30 | | | | | | 0,0113 | | | 0,0113 | |
| 32 | 0,0167 | 0,0056 | 0,0095 | 0,0120 | 0,0111 | 0,0131 | 0,0167 | 0,0414 | 0,0158 | 0,0110 |
| 35 | | | 0,0119 | | | | | | 0,0119 | |
| 36 | 0,0121 | 0,0057 | 0,0080 | 0,0089 | 0,0158 | 0,0138 | 0,0170 | 0,0085 | 0,0112 | 0,0041 |
| 40 | | | 0,0041 | | | | | | 0,0041 | |
| 44 | 0,0101 | 0,0039 | 0,0047 | 0,0079 | 0,0134 | 0,0089 | 0,0126 | 0,0000 | 0,0077 | 0,0046 |
| 48 | 0,0097 | 0,0029 | ∅Probe | 0,0081 | 0,0161 | 0,0058 | 0,0095 | 0,0006 | 0,0075 | 0,0051 |

Tabelle 8: Absolute renale ¹⁵N-Markierung in At.-%-exz. des Versuchsabschnitts 1

| Zeit[h] | DC | SL | HS | NT | MW | BF | AK | RW | MW | SD |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 2 | 0,0150 | 0,0134 | 0,0201 | 0,0289 | 0,0249 | 0,0258 | 0,0216 | 0,0178 | 0,0209 | 0,0054 |
| 4 | 0,0246 | 0,0134 | 0,0269 | 0,0459 | 0,0336 | 0,0473 | 0,0324 | 0,0427 | 0,0333 | 0,0117 |
| 6 | 0,0216 | 0,0109 | 0,0238 | 0,0368 | 0,0396 | 0,0338 | 0,0324 | 0,0649 | 0,0330 | 0,0159 |
| 8 | 0,0210 | 0,0104 | 0,0219 | 0,0334 | 0,0284 | 0,0262 | 0,0311 | 0,0367 | 0,0261 | 0,0083 |
| 10 | | 0,0093 | 0,0211 | | | 0,0254 | 0,0274 | 0,0305 | 0,0227 | 0,0082 |
| 12 | 0,0189 | 0,0091 | 0,0194 | 0,0286 | 0,0225 | 0,0266 | 0,0307 | | 0,0223 | 0,0073 |
| 14 | | 0,0085 | | | | 0,0208 | | 0,0282 | 0,0192 | 0,0100 |
| 16 | 0,0139 | 0,0085 | 0,0195 | 0,0200 | 0,0223 | 0,0197 | 0,0287 | 0,0217 | 0,0193 | 0,0060 |
| 20 | 0,0128 | 0,0089 | 0,0247 | 0,0189 | 0,0231 | 0,0214 | 0,0270 | | 0,0195 | 0,0065 |
| 24 | 0,0137 | 0,0078 | 0,0180 | 0,0153 | 0,0208 | 0,0163 | 0,0215 | 0,0146 | 0,0160 | 0,0043 |
| 28 | 0,0145 | 0,0070 | 0,0135 | 0,0139 | 0,0171 | 0,0167 | 0,0172 | 0,0107 | 0,0138 | 0,0035 |
| 30 | | | | 0,0135 | | | | | 0,0135 | |
| 32 | 0,0138 | 0,0058 | 0,0109 | 0,0110 | 0,0131 | 0,0165 | 0,0179 | 0,0065 | 0,0119 | 0,0043 |
| 35 | | | 0,5000 | | | | | 0,0086 | 0,2543 | 0,3475 |
| 36 | | 0,0036 | 0,0339 | 0,0091 | 0,0115 | 0,0122 | 0,0182 | 0,0154 | 0,0149 | 0,0096 |
| 40 | 0,0131 | 0,0035 | ∅Probe | 0,0097 | 0,0102 | 0,0106 | 0,0272 | | 0,0124 | 0,0079 |
| 44 | 0,0119 | 0,0030 | ∅Probe | 0,0083 | 0,0089 | | 0,0107 | 0,0139 | 0,0094 | 0,0037 |
| 48 | 0,0103 | 0,0026 | ∅Probe | 0,0085 | 0,0066 | 0,0094 | ∅Probe | 0,0017 | 0,0065 | 0,0036 |

Tabelle 9: Absolute renale ¹⁵N-Markierung in At.-%-exz. des Versuchsabschnitts 2

| Zeit[h] | DC | SL | HS | NT | MW | BF | AK | RW | MW | SD |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 2 | 0,84 | 1,70 | 1,29 | 1,51 | 2,58 | 0,71 | 2,31 | 0,74 | 1,46 | 0,71 |
| 4 | 3,45 | 3,33 | 3,35 | 4,82 | 3,79 | 3,58 | 5,51 | 2,77 | 3,82 | 0,90 |
| 6 | 5,57 | 5,52 | 4,59 | 7,73 | 5,44 | 4,74 | 8,45 | 5,00 | 5,88 | 1,42 |
| 8 | 7,18 | 7,34 | 6,14 | 10,01 | 6,94 | 6,39 | 11,13 | 6,07 | 7,65 | 1,89 |
| 12 | 10,43 | 10,95 | 8,11 | 13,33 | 11,21 | 8,17 | 15,03 | 8,22 | 10,68 | 2,55 |
| 16 | 13,52 | 21,30 | 11,21 | 18,61 | 11,77 | 10,56 | 18,90 | 10,25 | 14,51 | 4,40 |
| 20 | 15,75 | 23,62 | 12,92 | 21,45 | 14,42 | 13,42 | 20,89 | 10,97 | 16,68 | 4,66 |
| 24 | 18,74 | 25,39 | 14,33 | 23,54 | 14,87 | 14,64 | 24,10 | 11,72 | 18,42 | 5,29 |
| 28 | 22,20 | 27,17 | 15,83 | 26,23 | 18,54 | 16,33 | 25,61 | 13,57 | 20,69 | 5,31 |
| 32 | 26,08 | 28,91 | 16,25 | 28,08 | 21,08 | 18,06 | 27,83 | 14,20 | 22,56 | 5,89 |
| 36 | 29,78 | 30,49 | 18,00 | 29,07 | 21,66 | 19,86 | 28,75 | 14,20 | 23,98 | 6,31 |
| 40 | 32,73 | 31,92 | 18,72 | 30,27 | 23,66 | 20,52 | 30,72 | 14,24 | 25,35 | 7,01 |
| 44 | 34,36 | 32,64 | 18,72 | 31,45 | 24,48 | 22,22 | 33,19 | 14,24 | 26,41 | 7,58 |

Tabelle 10: Kumulative prozentuale renale ¹⁵N-Exkretion des Versuchsabschnitts 1

| Zeit[h] | DC | SL | HS | NT | MW | BF | AK | RW | MW | SD |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| 2 | 1,49 | 2,45 | 1,83 | 2,70 | 0,87 | 1,90 | 1,63 | 1,28 | 1,77 | 0,60 |
| 4 | 3,98 | 3,66 | 4,30 | 6,42 | 2,73 | 3,87 | 4,63 | 3,32 | 4,11 | 1,10 |
| 6 | 5,42 | 5,94 | 5,87 | 8,94 | 4,46 | 6,01 | 12,62 | 6,17 | 6,93 | 2,63 |
| 8 | 7,01 | 7,99 | 8,86 | 12,43 | 5,43 | 7,72 | 15,37 | 8,42 | 9,15 | 3,21 |
| 12 | 9,81 | 12,10 | 11,87 | 15,60 | 7,41 | 10,38 | 18,89 | 14,17 | 12,53 | 3,61 |
| 16 | 12,76 | 14,68 | 14,70 | 19,21 | 8,67 | 11,95 | 21,93 | 15,42 | 14,91 | 4,15 |
| 20 | 14,70 | 19,73 | 18,94 | 22,02 | 10,11 | 14,11 | 22,68 | 15,42 | 17,21 | 4,34 |
| 24 | 16,38 | 21,39 | 20,16 | 23,87 | 10,71 | 15,82 | 24,20 | 19,34 | 18,98 | 4,53 |
| 28 | 19,14 | 22,29 | 22,01 | 26,34 | 12,57 | 17,35 | 25,26 | 21,09 | 20,76 | 4,42 |
| 32 | 21,32 | 23,78 | 22,66 | 28,74 | 13,34 | 18,54 | 26,79 | 22,82 | 22,25 | 4,77 |
| 36 | .0 | 25,54 | 25,54 | 29,21 | 13,74 | 20,90 | 27,80 | 24,48 | 23,89 | 5,19 |
| 40 | 23,14 | 26,73 | 25,54 | 30,22 | 13,99 | 22,34 | 29,55 | 24,48 | 24,50 | 5,09 |
| 44 | 25,11 | 27,43 | 25,54 | 31,44 | 14,50 | .0 | 30,51 | 25,88 | 25,77 | 5,55 |
| 48 | 26,63 | 27,59 | 25,54 | 32,27 | 15,42 | 22,36 | 30,51 | 26,03 | 25,80 | 5,18 |

Tabelle 11: Kumulative prozentuale renale ¹⁵N-Exkretion im Versuchsabschnitt 2

| Zeit[h] | DC | SL | HS | NT | MW | BF | AK | RW | MW | SD |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 0,0000 | 0,0012 | 0,0135 | 0,0000 | 0,0064 | 0,0014 | 0,0000 | 0,0144 | 0,0046 | 0,0061 |
| 2 | 0,0458 | 0,0018 | 0,2172 | 0,1291 | 0,1379 | 0,0000 | 0,1679 | 0,2105 | 0,1138 | 0,0878 |
| 3 | 0,0000 | 0,0673 | 0,1586 | 0,0272 | 0,0122 | 0,0092 | 0,2494 | 0,0291 | 0,0691 | 0,0890 |
| 4 | | 0,0672 | 0,0220 | | 0,0090 | 0,0888 | 0,0235 | 0,0136 | 0,0374 | 0,0327 |
| 5 | | 0,0636 | | | | | | | 0,0636 | |
| 6 | | 0,0168 | | | | | | | 0,0168 | |

Tabelle 12: Absolute fäkale ¹⁵N-Markierung in At.-%-exz. im Versuchsabschnitt 1

| Zeit[h] | DC | SL | HS | NT | MW | BF | AK | RW | MW | SD |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 | 0,0022 | 0,0021 | 0,0004 | 0,2198 | 0,3554 | 0,0266 | 0,0006 | 0,0425 | 0,0812 | 0,1333 |
| 2 | 0,1068 | 0,0949 | 0,1827 | 0,1137 | 0,0062 | 0,1823 | 0,0998 | 0,0499 | 0,1045 | 0,0598 |
| 3 | 0,019 | 0,0409 | 0,0195 | | | | 0,0911 | 0,0000 | 0,0341 | 0,0350 |
| 4 | | 0,0157 | | | | | 0,0208 | | 0,0183 | 0,0036 |
| 5 | | 0,0054 | | | | | | | 0,0054 | |
| 6 | | 0,0216 | | | | | | | 0,0216 | |

Tabelle 13: Absolute fäkale ¹⁵N-Markierung in At.-%-exz. im Versuchsabschnitt 2

| Zeit[h] | DC | SL | HS | NT | MW | BF | AK | RW | MW | SD |
|---------|------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0,00 | 0,16 | 0,49 | 0,00 | 1,54 | 0,13 | 0,00 | 1,82 | 0,52 | 0,74 |
| 2 | 7,77 | 0,38 | 21,79 | 31,85 | 31,31 | 0,13 | 38,37 | 22,98 | 19,32 | 14,85 |
| 3 | 7,77 | 11,38 | 33,97 | 7,61 | 33,27 | 1,14 | 47,31 | 32,49 | 21,87 | 16,81 |
| 4 | | 23,89 | 35,93 | 39,46 | 35,18 | 9,07 | 51,70 | 33,38 | 32,66 | 13,29 |
| 5 | | 27,36 | | | | | | | 27,36 | |
| 6 | | 29,68 | | | | | | | 29,68 | |

Tabelle 14: Kumulative prozentuale fäkale ¹⁵N-Exkretion im Versuchsabschnitt 1

| Zeit[h] | DC | SL | HS | NT | MW | BF | AK | RW | MW | SD |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | 0,53 | 0,73 | 0,06 | 41,84 | 33,28 | 3,26 | 0,07 | 6,38 | 10,77 | 16,83 |
| 2 | 27,20 | 17,78 | 31,20 | 55,71 | 34,87 | 27,69 | 15,63 | 22,85 | 29,12 | 12,54 |
| 3 | 31,00 | 26,12 | 33,43 | | | 30,95 | 23,26 | 22,85 | 27,94 | 4,46 |
| 4 | | 28,16 | | | | | 28,50 | | 28,33 | 0,24 |
| 5 | | 29,17 | | | | | | | 29,17 | |
| 6 | | 33,89 | | | | | | | 33,89 | |

Tabelle 15: Kumulative prozentuale fäkale ¹⁵N-Exkretion im Versuchsabschnitt 2

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Dissertation wurde bisher an keiner Hochschule vorgelegt.

Rostock, März 2009

Rebekka Wichmann

11 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Menschen bedanken, die mich während dieser Arbeit mental unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. habil. Klaus D. Wutzke für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, für seine Geduld und für die unkomplizierte Betreuung während der gesamten Arbeit.

Ohne meine Probanden und ihre Bereitschaft zu einer etwas unkonventionellen Probensammlung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen und deshalb danke ich ihnen für ihre wertvolle Mitarbeit.

Mein herzlicher Dank gilt auch Frau Marita Schläfke für all ihre Mühen bezüglich dieser Arbeit und Frau Helga Krentz, welche mich in der statistischen Auswertung der Daten unterstützt hat.

Ich möchte mich an dieser Stelle vor allem auch bei meiner Familie und insbesondere bei meinen Eltern für ihre liebevolle und unendliche Unterstützung während des gesamten Studiums und dieser Arbeit bedanken.

Daniel Cantré danke ich von ganzem Herzen für die liebevolle und hartnäckige Unterstützung.