

Aus der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und
Stoffwechsel

Direktor: Prof. Dr. Thomas Mathias Gress

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg



Untersuchungen zur differentiellen
Plasmaproteinexpression bei Diabetikern unter
Glitazontherapie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Susanne Heipel

aus Gießen

Marburg, 2009

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität
Marburg am 26.02.2009

Gedruckt mit
Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent: Apl. Prof. Dr. B. Lankat-Buttgereit
Korreferent: PD Dr. K. Ehlenz

Meinen Eltern
Gerda und Bernd

1	Einleitung	1
1.1.	Der Diabetes mellitus Typ II – Ein Überblick über die Volkskrankheit	1
1.2.	Pioglitazon – Medikament mit Zukunft?	3
1.3.	Das Studiendesign	5
1.4.	Das Proteom und wieso es in Zukunft immer wichtiger sein wird	6
1.5.	Die 2D-Gelelektrophorese	7
1.6.	Das menschliche Plasma – ein hochinteressantes Gemisch	8
1.7.	Zielstellungen	8
2	Material und Methoden	10
2.1.	Material	10
2.1.1.	Chemikalien	10
2.1.2.	Antikörper	12
2.1.3.	Verwendete Kits	12
2.1.4.	Apparaturen	12
2.1.5.	Untersuchungsmaterialien	13
2.1.6.	Medien	13
2.1.7.	Benutzte Datenbanken	14
2.2.	Methoden	14
2.2.1.	Entfernen von Albumin und IgG aus den Proben	14
2.2.2.	Proteinbestimmung der Plasmaproben in Doppelbestimmung (nach Bradford)	15
2.2.3.	SDS-Polyacrylamidgele	16
2.2.4.	IEF-Polyacrylamidgele	18
2.2.5.	Die isoelektrische Fokussierung (IEF)	18
2.2.6.	Die Silberfärbung	22
2.2.7.	Die kolloidale Coomassie Färbung	23
2.2.8.	Ausschneiden der Protein-Spots	24
2.2.9.	Trypsin Verdauung der Gelproteine	24
2.2.10.	Western Blot	26
2.2.11.	2D-Western Blot	30
2.2.12.	Immunhistochemische Färbung (Arbeitsgruppe von Prof. (apl.) Dr. P. Barth)	31

Inhaltsverzeichnis

2.2.13.	Präparation der HUVEC Zellen (Arbeitsgruppe von PD Dr. med. L.C. Hofbauer)	33
2.2.14.	Kultivierung der Zellen	34
2.2.15.	Behandlungen der Zellen	36
2.2.16.	Zellernte und Herstellung eines Gesamtproteinextraktes	36
2.2.17.	Acetonfällung der Überstände	37
3	Ergebnisse	38
3.1.	Die Studie	38
3.2.	Die 2D-Gelelektrophoresen der Plasmaproteine	38
3.2.1.	Der Vergleich von ungereinigten, einfach und zweifach gereinigten Plasmaproben	38
3.2.2.	Die Coomassie Färbungen	41
3.3.	Die Identifizierung interessanter Proteine	42
3.3.1.	Der Vergleich zwischen Gesunden und unbehandelten Diabetikern	42
3.3.2.	Das Proteom der Diabetiker unter sich im Vergleich	44
3.3.3.	Der Vergleich der Diabetiker vor und nach der Behandlung mit Pioglitazon – Durch die Pioglitazontherapie veränderte Proteine	46
3.3.4.	Vergleich der Diabeteskomplikationen mit dem Proteomen der Diabetiker untereinander	52
3.3.5.	Die erweiterte Gelserie: Bis 7 kDa, pH 3-10 mit 20 %igen Gelen	52
3.3.5.1.	Unterschiede zwischen Gesunden und Diabetiker in den 20 %igen Gelen: Die Identifizierung des Profilins	53
3.4.	Western Blot mit dem Profilin-1 Antikörper	55
3.4.1.	Profilin wird im Plasma von Gesunden und Diabetikern nachgewiesen	55
3.4.2.	Ergebnisse der Patienten 1-10 als Western Blots mit Profilinantikörpern	57
3.5.	Proben von 50 Patienten, an welchen eine Herzkatheter-Untersuchung durchgeführt wurde	58
3.5.1.	Western Blot mit Profilin, ECL Advanced, von 50 Patienten des Herzkatheterlabors	59
3.5.2.	Statistische Auswertung der Ergebnisse	59
3.6.	Profilinvorkommen im menschlichem Endothel: Der immunhistochemische Nachweis	60

Inhaltsverzeichnis

3.6.1. Der Vergleich zwischen Diabetikern und Gesunden	62
3.7. Versuche mit Pioglitazon und HUVEC Zellen	63
3.7.1. Vorversuche zur Bestimmung der geeigneten Konzentrationen und Inkubationszeiten	63
3.7.2. Versuche mit Ketocholesterol, Hydroxycholesterol, Interleukin-6, Metformin, Gliclazid und Pioglitazon	66
3.7.2.1. Ergebnisse der Gesamtproteinextrakte	67
3.7.2.2. Pioglitazon in Kombination, im Gesamtproteinextrakt	68
3.7.2.3. Ergebnisse der Versuche mit den Zellüberständen	69
3.7.2.4. Pioglitazon in Kombination, im Zellüberstand	70
4 Diskussion	72
4.1. Zum Studiendesign	72
4.2. Die 2D-Gelelektrophoresen des Plasmas der Diabetiker	73
4.3. Besprechung der identifizierten Proteine und deren Bedeutung im Zusammenhang mit Diabetes Mellitus und der Pioglitazontherapie	73
4.3.1. Veränderte Parameter im Vergleich zwischen Gesunden und Diabetikern	73
4.3.2. Vergleich der Diabetikerproteome vor und nach der Behandlung	75
4.4. Die Proben aus dem Herzkatheterlabor	80
4.5. Profilin im menschlichem Endothel: Der immunhistochemische Nachweis	80
4.6. Diskussion der Ergebnisse der Zellkultur-Versuche	82
4.6.1. Versuche mit Ketocholesterol, Hydroxycholesterol, Interleukin-6, Metformin, Gliclazid und Pioglitazon	83
4.6.1.1. Diskussion der Wirkung der Stoffe auf die HUVEC Zellen – Die Gesamtproteinextrakte	83
4.6.1.2. Diskussion der Wirkung der Stoffe auf die HUVEC Zellen – Die Überstände	86
4.7. Profilin: Ein Rückblick auf die Ergebnisse und ein Blick in die Zukunft	88
4.8. Pioglitazon: Ein Blick in die Zukunft	91
4.9. Was hat das alles für eine zukünftige Therapie des Diabetes Mellitus Typ 2 zu bedeuten?	93

Inhaltsverzeichnis

5	Zusammenfassung	95
6	Literatur	96

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
AcN	Acetonitril
APP	Akute Phase Protein
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
ca.	Circa
CHAPS	(3-(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propansulfat)
d	day(s), (Tage)
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco´s Modifikation Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GPE	Gesamtproteinextrakt
HCl	Salzsäure
HEPES	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid
HRP	Horse-Radish-Preoxidase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IEF	isoelektrische Fokussierung
IL-6	Interleukin-6
ISP	inflammationssensitives Plasmaprotein
KHK	Koronare Herzkrankheit
kDa	Kilodalton
l	Liter
m	milli, 10^{-3}
M	Molar, mol/l
μ	Mikro
mA	Miliampere
MALDI/ TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionisation/ Time Of Flight
max.	maximal
min	Minute
NaOH	Natronlauge
o.Ä.	oder Ähnliches
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PPAR	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepuffertes Natriumchlorid (phosphate buffered saline)
cm ²	Quadratcentimeter
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s, sec	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAA	SDS-Polyacrylamid-Gel
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TBS	mit Tris gepufferte NaCl-Lösung
TBST	mit Tris gepufferte NaCl-Lösung plus 5 % Triton X-100
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TFA	Trifluoressigsäure
z.T.	zum Teil

Einleitung

1.1. Der Diabetes mellitus Typ II – Ein Überblick über die Volkskrankheit

Den Pathomechanismus des Diabetes mellitus Typ 2 genauer zu untersuchen ist eine Herausforderung an die medizinische Forschung. Gerade diese vielschichtige Krankheit erfordert eine genaue Analyse der bestehenden und ein Ergründen neuer Therapieansätze.

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist in der Bundesrepublik Deutschland eine der häufigsten Erkrankungen. Rund acht Millionen Menschen leiden hier bereits an dieser Stoffwechselerkrankung, was etwa einem Zehntel der Gesellschaft entspricht¹. In Deutschland erkranken jährlich mehr als 350.000 Personen an Diabetes mellitus². Die internationale Diabetesföderation hält die Erkrankung für eine der größten Herausforderungen des Gesundheitsbereichs im 21. Jahrhundert³.

Immer mehr Menschen in den Industrienationen sind übergewichtig, bewegen sich wenig, rauchen und nehmen eine stark fett- und kohlenhydrathaltige Ernährung zu sich. Das alles sind Faktoren, die die Entstehung eines metabolischen Syndroms begünstigen. Dessen Symptome sind Adipositas, Dyslipoproteinämie, essentielle Hypertonie und die Glukosetoleranzstörung. Der Diabetes mellitus selbst entwickelt sich zu einem großen Prozentsatz aus dem metabolischen Syndrom. Danach führt ein zu hoher Blutzuckergehalt und Fettstoffwechselstörungen zu weiteren fatalen Auswirkungen auf verschiedenste Systeme des Körpers (Herold G, 2005). Wer an Diabetes Mellitus leidet, hat wegen der Entstehung einer endothelialen Dysfunktion ein erhöhtes Risiko, an Gefäßmikro- und Makroangiopathien zu erkranken. Die endotheliale Dysfunktion gilt als eine Vorstufe von Arteriosklerose. Die Arteriosklerose wiederum ist der Verursacher der schlimmsten Folgen des Diabetes. Als gefürchtete Beispiele wären hier der Herz- und Hirninfarkt zu nennen, die in Deutschland die häufigsten Todesursachen darstellen⁴. Herz- und Kreislauferkrankungen sind auch bei Diabetikern die häufigsten Todesursachen⁵. Oft ist eine Angina pectoris als Warnsignal eines drohenden Herzinfarktes nicht vorhanden, da wegen der diabetisch bedingten Neuropathie Schmerzen nicht wahrgenommen werden. Daher sterben rund 55 % der Diabetiker an einem Herzinfarkt (Herold G, 2005).

Das Auge wird ebenfalls von der Gefäßangiopathie betroffen. Es droht im schlimmsten Fall die Erblindung⁶. Rund 30 % aller Erblindungen in Europa entstehen wegen Diabetes mellitus (Herold G, 2005). Auch können sich die Gefäße in den Beinen verschließen. Es entsteht eine

sogenannte periphere arterielle Verschlusskrankheit. Diese kann dazu führen, dass die unterhalb des Verschlusses liegenden Gebiete nicht mehr durchblutet werden und absterben. Im schlimmsten Fall folgt dann eine Amputation der Zehen, Füße oder Beine. In Deutschland müssen 28.000 Diabetikern pro Jahr⁷ aus diesem Grund Gliedmaßen amputiert werden.

Des Weiteren steigt das Risiko für den Diabetiker, eine diabetischen Nephropathie zu bekommen und wegen Nierenversagen den Rest des Lebens dialysiert zu werden. Zusätzlich schwächt der Diabetes das Immunsystem. Die Anfälligkeit für bakterielle Infekte steigt (Herold G, 2005).

15 % der Diabetiker leiden an einem diabetischen Fußsyndrom. Wegen unbemerkten, schmerzlosen Traumen (diabetische Neuropathie, s.u.) und der schlechten Durchblutung (wegen der pAVK) bilden sich schlecht heilende Wunden. Diese können sich noch zusätzlich bei einer schlechten Abwehrlage infizieren und zum Absterben des betroffenen Abschnittes beitragen.

Ein zu hoher Blutzucker schädigt das Nervensystem ebenfalls. Das kann zu Sensibilitätsverlusten in den Extremitäten führen. Häufig erkrankt der Diabetiker auch an einer autonomen Neuropathie. Diese kann zu ventrikulären Arrhythmien oder zum plötzlichen Herztod führen. Die zirkadiane Blutdruckregulation kann gestört sein. Wegen einer diabetogenen Schädigung des Parasympathikus können Gastroparese, Obstipation, Inkontinenz, Blasenatonie und Impotenz folgen (Herold G, 2005).

Wie man sehen kann, ist der Diabetes mellitus eine Krankheit, die schlimme Folgen auf verschiedensten Gebieten haben kann. In Deutschland werden ca. 15 Milliarden Euro pro Jahr in die Behandlung des Diabetes gesteckt⁸. Bei Diabetespatienten mit Spätfolgen können die Kosten pro Person um mehr als das Dreifache darüber liegen⁹. Jedoch existiert noch keine Medikation, die diese schlimmen Folgen verhindern kann.

Im Jahr 2003 gab es weltweit ca. 194 Millionen Menschen mit Diabetes mellitus¹⁰. In 20 Jahren werden rund 330 Millionen Menschen laut Statistiken an Diabetes mellitus Typ 2 erkranken¹¹. So wird es immer wichtiger, eine geeignete Pharmakotherapie anzubieten, um die Schäden dieser Krankheit zu verhindern. Es gibt zwar viele Medikamente, die gegen Diabetes eingesetzt werden, doch weiterhin fehlen überzeugende Therapieansätze, die eine langfristige, qualitativ hochwertige Behandlung anbieten, bei der die verheerenden Spätschäden umgangen werden. Doch beschränkt sich die Wirkung der herkömmlichen Antidiabetika meistens nur auf die unmittelbare Senkung des Blutzuckers. Im Gegensatz dazu gibt es eine interessante, neue Medikamentenklasse, die verspricht, die Entwicklung der

Arteriosklerose zu verzögern (Staels B, 2005) und die Lipide zu senken (Parhofer KG et al., 2005), um damit eine längere Erhaltung der Lebensqualität durch eine Herauszögerung der Spätschäden zu erwirken. Eine Medikamentengruppe, die man bereits in der Behandlung des metabolischen Syndroms zur Prävention des Diabetes und anderer Krankheitsfolgen einsetzen kann. Die Rede ist hier von den Glitazonen.

1.2. Pioglitazon – Medikament mit Zukunft?

Pioglitazon ist ein relativ neues Medikament. Es wurde Ende des Jahres 2000 zugelassen und gehört zur Klasse der Thiazolidindione bzw. der Glitazone, die Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Agonisten (PPAR-gamma-Agonisten) sind. Dieser nukleäre Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Glukose- und Lipidstoffwechsels¹² und übt einen positiven Effekt auf die Insulinwirkung aus. Ein durch Glitazone aktiviertes PPAR-Gamma bindet mit dem nukleären RXR-Rezeptor an die DNA und wirkt als Transkriptionsfaktor. Nun werden Proteine gebildet, die für die Übertragung des Insulinsignals innerhalb der Zelle und für das Einschleusen von Glukose in die Zelle verantwortlich sind. Die Glitazone entfalten ihre blutzuckersenkende Wirkung auch über die Steigerung der muskulären Glukoseaufnahme. Es gibt Hinweise, dass neben einer Verbesserung der intrazellulären Signaltransduktion von Insulin in der Skelettmuskelzelle zusätzlich eine Art kommunikativer Austausch zwischen Muskulatur und Fettgewebe stattfindet¹³. Die freien Fettsäuren werden in die Adipozyten aufgenommen, was eine Absenkung der Plasmawerte bewirkt. Pioglitazon verbessert die hepatische und periphere Insulinsensitivität, indem es die hepatische Gluconeogenese senkt und die periphere Glukoseaufnahme steigert¹⁴. Neben einer Verbesserung der Insulinresistenz scheint PPAR-Gamma auch an der Differenzierung verschiedener Zelllinien beteiligt zu sein. In weiteren Studien fanden sich Hinweise, dass über eine Aktivierung von PPAR-Gamma durch Glitazon Differenzierungsprozesse gefördert, die Zellproliferation gehemmt und die Apoptoserate einiger Zelltypen erhöht werden (Frohlich E, 2005).

Die häufigsten Nebenwirkungen sind Ödeme und Gewichtszunahme. Ein Vorteil ist, dass Pioglitazon normalerweise gut vertragen wird. Es bestehen keine bekannten Interaktionen zu anderen Medikamenten. Pioglitazon kann in Mono- oder Kombinationstherapie gute Erfolge in der Blutzuckerkontrolle und in der Verbesserung des Lipidprofils vorweisen (Waugh J et al., 2006). Es senkt signifikant den HbA1c und den Nüchternglukosewert und steigert das HDL (Johansen OE and Jorgensen AP, 2006). Zusätzlich scheint es das Ausmaß von

kardiovaskulären Krankheiten und Arteriosklerose zu senken (Waugh J et al., 2006) und kann sogar antithrombotisch wirken (Staels B, 2005). Sogar bei Gesunden hat es HDL steigernde und Lipoproteinspiegel verbessernde Effekte (Szapary PO et al., 2006). Pioglitazon besitzt darüber hinaus zellschützende Effekte: Es moduliert Entzündungswege (Chen J et al., 2004), verändert Interleukinspiegel (Gumieniczek A et al., 2006) und vermindert oxidativen Stress und die Apoptose (Deplanque D, 2004).

Die bei Diabetes mellitus bestehende Dyslipoproteinämie und Endotheldysfunktion sind vermutlich nicht nur Folge der Blutzuckererhöhung sondern auch Ausdruck der Insulinresistenz¹⁵. Pioglitazon kann der diabetisch bedingten endothelialen Dysfunktion entgegenwirken, die der erste Defekt in der vaskulären Homöostase ist und letztendlich zur Arteriosklerose führt (Federici M and Lauro R, 2005). Die auf das Endothel antiapoptotisch (Artwohl M, 2005; Wang CH, 2006), antioxidativ und antiinflammatorisch wirkenden Fähigkeiten des Pioglitazons können es schützen (Chen J et al., 2004 und Hetzel J et al., 2005). Schon eine kurze Therapie mit dem Medikament kann die endotheliale Dysfunktion unabhängig von der Stoffwechsellage des Diabetikers verbessern (Martens FM et al., 2005). Das könnte der Schlüssel in der Therapie der vaskulären Komplikationen des Diabetes mellitus sein.

Auch wenn Pioglitazon mit oralen Antidiabetika kombiniert wird, wird es gut vertragen. Bei Langzeitstudien in Kombination mit anderen oralen Antidiabetika behält Pioglitazon seine Wirkung bei und verbessert das Lipidprofil sogar noch stärker (Hanefeld M and Göke B, 2000). Im Vergleich zu anderen Mitteln der Diabetestherapie konnten folgende Vorteile von Pioglitazon gefunden werden:

- Obwohl Pioglitazon gleich gute Effekte wie Metformin auf die Blutzuckereinstellung hat, verbessert es die Insulinsensitivität deutlich mehr als Metformin (Roden M et al., 2005).
- In Kombination mit Sulfonylharnstoffen kann es den Blutzucker, die Lipide und zusätzlich die Homozysteinämie verbessern. Die Homozysteinämie gilt als Risikofaktor für die Koronarsklerose und thromboembolische Erkrankungen (Wald DS et al., 2002) Das Lipoprotein (a) wurde besser von Pioglitazon als von Rosiglitazon gesenkt (Derosa G et al., 2006).

Pioglitazon scheint somit den anderen auf dem Markt befindlichen oralen Antidiabetika einige Wirkungen im Voraus zu haben: Es ist antiarteriogen, antiinflammatorisch und verbessert das Lipidprofil. Wie oben bereits erwähnt sind die vier Säulen des metabolischen Syndroms Adipositas, Dyslipoproteinämie, essentielle Hypertonie und die Glukosetoleranzstörung. Wegen des speziellen Wirkungsprofils von Pioglitazon könnten zwei der vier Symptome des

metabolischen Syndroms behandelt werden. Aufgrund der vielversprechenden Pharmakologie dieses Medikaments wurde diese Studie begonnen.

1.3. Das Studiendesign

In dieser Studie wurde ein neuer Weg zur Erkundung der Therapie von Diabetes mellitus Typ 2 mit Pioglitazon und die dadurch bedingte Veränderung des Proteoms des menschlichen Plasmas untersucht. Hierzu wurden zehn Typ 2 Diabetiker für 12 Wochen mit 30 mg Pioglitazon pro Tag behandelt. Vor und nach dieser Behandlungszeit wurde Blut in EDTA-Röhrchen entnommen. Dieses Plasma wurde auch für die Studie "Einfluss von Pioglitazon auf Lipidstatus, rheologische Parameter und Endothelfunktion bei Patienten mit stabil eingestelltem Diabetes mellitus Typ 2", von PD Dr. K. G. Parhofer, Medizinische Klinik II, in Großhadern benutzt.

Eine antidiabetische Begleittherapie wurde währenddessen auf das Nötigste reduziert. Alle Patienten waren jedoch mit Sulfonylharnstoffen stabil eingestellt, die während der Studie zusätzlich weiter eingenommen wurden, da in Deutschland die Monotherapie mit Thiazolidindionen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zugelassen war. Der HbA1c wurde auf +/- 10 % gleich gehalten. Die Studie lief von April 2001 bis April 2002 und wurde erfolgreich abgeschlossen.

Einschlusskriterien:

- Alter: 20-70 Jahre
- Gesicherte Diagnose eines Diabetes mellitus Typ 2 (Behandlung mit Diät und Sulfonylharnstoff)
- Stabile Blutzuckereinstellung (HbA1c 6,0-7,0 %) ohne Veränderung der Therapie über mindestens 3 Monate
- Triglyceridkonzentration > 150 mg/ dl
- Männliche Probanden und weibliche Probanden, die folgende Kriterien erfüllen: Menopause oder Stand nach chirurgischer Sterilisation, Frauen im gebärfähigen Alter mit geeigneter Kontrazeptionsmethode (orale Kontrazeptiva, IUD)

Ausschlusskriterien:

- Einnahme von Lipidsenkern (bei Vorbehandlung müssen Medikamente mindestens 6 Wochen vor Einschluß in die Studie abgesetzt werden)
- regelmäßiger Alkoholkonsum von mehr als 30 g/ Tag
- Kontraindikation gegen Insulinsensitizer
- Konsumierende Erkrankung
- andere sekundäre Dyslipoproteinämie

Es wurden noch weitere Ergebnisse aus diesen Proben in folgenden Studien gewonnen:

- Parhofer KG, Otto C, Geiss HC, Laubach E, Göke B (2005), “Effect of pioglitazone on lipids in well controlled patients with diabetes mellitus type 2 - results of a pilot study”, *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2005 Jan;113(1):49-52.
- Otto C, Otto B, Goke B, Pfeiffer AF, Lehrke M, Vogeser M, Spranger J, Parhofer KG (2006), “Increase in adiponectin levels during pioglitazone therapy in relation to glucose control, insulin resistance as well as ghrelin and resistin levels”, *J Endocrinol Invest*. 2006 Mar;29(3):231-6.

1.4. Das Proteom und wieso es in Zukunft immer wichtiger sein wird

Nachdem das menschliche Genom vollständig entschlüsselt wurde, ist das Proteom in das Blickfeld der Forschung gerückt. Das Proteom stellt den Gesamtbestand der Proteine einer Zelle dar. Es zeigt den tatsächlich in Proteine übersetzten und somit den benutzten Teil des Genoms. Die Namensgebung stammt von M. Wilkins et al.. Die Abkürzung Proteom steht für “PROTEins expressed by the genOME“ (Wilkins M et al., 1997). Das Proteom wird dabei gut zehn Mal größer als das Genom geschätzt, da Proteine, die zwar aus dem gleichen Gen entstehen, durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen noch zusätzlich verändert werden können (Lottspeich and Zorbas, 1998).

Viele Pathomechanismen spielen sich auf der Ebene von veränderten Proteinen oder Proteinmengen ab. Die Analyse der Proteine wurde deshalb als Mittel der Wahl zur Identifizierung von Veränderungen in Zellen durch Pioglitazon benutzt. Jeder Zelltyp eines Organismus hat die gleiche Erbsubstanz, obwohl jeder Zelltyp ein anderes Proteom, d.h. eine andere Proteinexpression, bildet.

Das Proteom spiegelt den zu einem bestimmten Zeitpunkt als Proteine exprimierten Teil des Genoms eines untersuchten Organismus dar. Es zeigt somit die dynamische Reaktion der Zelle auf einwirkenden Reize, die durch mannigfache Parameter beeinflusst wird und sich stark verändern kann. Mit Hilfe der Proteomanalyse könnten letztendlich die für spezielle Krankheiten verantwortlichen Gene identifiziert werden.

Die Untersuchung des Proteoms ist der Untersuchung des Genoms bei der Analyse der Arzneimittelwirkungen und Stoffwechselprodukte überlegen, da sich die Proteinexpression in pathologisch veränderten Zuständen ebenfalls verändert: Das Genom des Menschen ändert sich nicht zwingend bei dem Auftreten von Krankheiten, jedoch kann sich das Proteom dadurch akut oder chronisch verändern. Die meisten Medikamente des aktuellen Marktes wirken auf Proteine (Drews 2000), was die Untersuchung des Proteoms während Medikamenteneinwirkung noch spannender macht. Das Proteom könnte in Zukunft Auskunft geben, ob ein Medikament bei vorhandenem Proteinstatus eines Patienten wirken kann. Daher könnte die Proteomforschung die Möglichkeit zur individuellen medikamentösen Therapie verbessern¹⁶.

1.5. Die 2D-Gelelektrophorese

Die 2D-Gelelektrophorese ist die derzeit beste Methode zur Auftrennung komplexer Proteingemische wie etwa dem Plasma (Görg et al., 2000). Durch die 2D-Gelelektrophorese werden die Proteine erst nach den isoelektrischen Punkten und anschließend nach dem Molekulargewicht aufgetrennt (Klose, 1995). Dabei kann man durch die Wahl des pH-Bereichs der Röhrengelle, der Prozentzahl und dem Vernetzungsgrad des Gels festlegen, welchen Bereich des Proteoms man betrachten möchte. In dieser Arbeit wurden selbstgegossene 15 % und 20 % Gele (bezogen auf den Acrylamidanteil) benutzt, die Proteine mit einer Größe von ca. 100-7 kDa abbilden. Das untersuchte pH-Spektrum reichte von pH 4 bis 8 und von pH 3 bis 9.

Danach können die Proteine, die sich in dem Gel befinden, direkt oder nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran durch verschiedene Methoden angefärbt werden. Für die Coloration des Polyacrylamidgels wurde eine Silberfärbung benutzt, die sehr sensitiv ist und schon kleine Proteinmengen anzeigt. Die Identifizierung der Proteine erfolgte jedoch nicht nach Silberfärbung, da mit diesem Verfahren schlechte Erfahrungen in der Arbeitsgruppe gemacht worden sind. Stattdessen wurde die weniger empfindliche Coomassie-Blau Färbung zur optischen Darstellung der Proteine eines präparativen Gels benutzt. Diese Färbung hat den

Vorteil, dass sie reversibel ist und mit den Proteinen weitere Untersuchungen stattfinden können. Von dem präparativen Gel ausgehend wurden ausgeschnittene Proteinpunkte mit der Massenspektrometrie identifiziert (Burlingame AL et al., 1998).

1.6. Das menschliche Plasma – ein hochinteressantes Gemisch

Viele Einflüsse wirken auf die Konzentration oder Modifikationen von Proteinen im Plasma.

Als solche kann man erwähnen: Genetische Faktoren, Medikamentöse Faktoren, Umweltfaktoren, Stoffwechsellage des Organismus und Faktoren, die mit der Behandlung der Proben zusammenhängen.

Das Proteom von Blutplasma wurde analysiert, weil Plasma mehr Proteine enthält als Serum. Unter anderem sind die Gerinnungsfaktoren, die während der Blutgerinnung verbraucht werden würden, noch enthalten. Zelluläre Bestandteile des Blutes, wie etwa die Leukozyten, geben eigene Proteine ins Blut ab und würden das Proteom verändern, wenn sie zerkleinert und mitanalysiert werden würden. Somit wurden sie durch vorsichtige Zentrifugation unter Kühlung aus dem Plasma entfernt.

Das Blutplasma enthält Stoffe, die im Körper zirkulieren. Sobald ein Protein aus einem Organ ins Blut übertritt, kann dieser vom Blut aus auf den ganzen Körper wirken (z.B. Hormone). Auch finden sich im Blut Abbauprodukte oder Stoffe, die aus pathologisch veränderten Zellen stammen. Ebenso kann die Behandlung mit Medikamenten zu einer Veränderung der Proteinzusammensetzung führen. Da das Blut einen Transportweg für viele Stoffe darstellt und es alle Körperabschnitte miteinander verbindet und mit Nährstoffen versorgt, zeigt es quasi die Summe aller größeren metabolischen Prozesse auf, die im Körper ablaufen. Somit wurde das hier zu untersuchende Medium Plasma als für diese Fragestellung geeignet angesehen.

1.7. Zielstellungen

Der Diabetes Mellitus Typ 2 ist eine weltweit immer häufiger vorkommende Krankheit. Noch sind keine Therapien zur Heilung oder zur Vermeidung der schweren Folgeschäden bekannt. Es fließen jährlich große Summen von Geld in die Therapie des Diabetes und seiner Folgen. Dabei weisen die konventionellen Medikamente in der Diabetestherapie allerdings bezüglich

der Verhinderung der Spätschäden starke Einschränkungen auf. Zwar kann der aktuelle Blutzucker relativ gut mit ihnen eingestellt werden, doch scheinen sie kaum Schutz vor den makro- und mikrovaskulären Spätfolgen zu bieten. Deswegen ist es von großer Wichtigkeit, die Forschung auf diesem Gebiet zu intensivieren.

Diese Arbeit soll zum weiteren Verständnis der besonderen Wirkung von Pioglitazon auf den menschlichen Organismus beitragen. Das untersuchte orale Antidiabetikum Pioglitazon ist ein relativ neues Medikament mit vielversprechendem Wirkungsprinzip. Zum Beispiel ist die Verbesserung des Lipidprofils, die gute Einstellbarkeit des HbA1c und vor allem die Verhinderung der endothelialen Dysfunktion und somit eine Verlangsamung der Entstehung der Arteriosklerose von entscheidendem Vorteil für den Diabetiker. Gerade diese Wirktrias könnte eine deutliche Verbesserung in der Diabetestherapie darstellen. Darüber hinaus könnte das Pioglitazon wegen dieser besonderen Eigenschaften in der Behandlung des metabolischen Syndroms eine führende Stellung einnehmen.

In der folgenden Arbeit sollten die Effekte einer Pioglitazonbehandlung auf das Plasma-proteom von Patienten anhand der 2D-Gelelektrophorese untersucht werden und verändert exprimierte Proteine durch Peptidmassen-Fingerprinting mit dem Massenspektrometer identifiziert werden. Proteine, die durch die Pioglitazonbehandlung reguliert werden, sind vielfältig interessant. Zum Ersten ist es wichtig, welche Proteine speziell durch das Medikament verändert werden. Auf der anderen Seite könnten Veränderungen im Proteom der Diabetiker im Vergleich zum Gesunden erkannt werden, die durch das Pioglitazon wieder in Richtung des Normalzustandes verschoben werden. Die Proteomanalyse kann im Generellen so auch zur genaueren Analyse des Pathomechanismus der Volkskrankheit Diabetes beitragen oder bereits bekannte Veränderungen auf diese Weise verifizieren.

Damit die Veränderungen trotz der gut etablierten Methode der 2D-Gelelektrophorese zusätzlich mit einer sehr großen Sicherheit bestätigt werden können, wurden die gefundenen Veränderungen noch zusätzlich mit dem bekannten Verfahren des Western Blots der jeweiligen Patientenproben bestätigt. Danach wurde die Regulation der gefundenen Proteine am Zellmodell weiter untersucht.

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

6-Well Platten, Nunc, Wiesbaden

7-beta-Hydroxycholesterol, Sigma, Deisenhofen

7-Ketocholesterol, Sigma, Deisenhofen

Acrylamid, Amersham Biosciences, UK

Acrylamid-Bis 37,5 : 1, Amersham Biosciences, UK

Agarose, low melting point, Sigma, Deisenhofen

Ammoniumhydrogencarbonat, Fluka BioChemica, Buchs, CH

Ammoniumpersulfat (APS), Serva, Heidelberg

Ampholyte pH 3 - 10, Servalyt, analytical grade 40 %, Serva, Heidelberg

Ampholyte pH 4 - 7 Servalyt, analytical grade 40 %, Serva, Heidelberg

Bio Rad Proteine Assay, Bio Rad, München

Biotinylated Anti-Mouse, Vector, Stuttgart

Bisacrylamid, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Bovines Serum Albumin, Sigma, Deisenhofen

Bromphenolblau, Sigma, Deisenhofen

Calciumchlorid, Merck, Darmstadt

CHAPS (3-(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio-1-propansulfat), MP Biomedicals,
Eschwege

Chem Mate Antibody diluent, Dako, Glostrup, Denmark

Conical Tube, disposable, Nunc, Wiesbaden

DAB + Chromogen (x50), Dako, Glostrup, Denmark

Detection Reagent 1 + 2, ECL, ECL Plus, ECL Advanced, Amersham Biosciences, UK

Dimethylsulfoxid (DMSO), Roth, Karlsruhe

Dithiothreitol (DTT), Serva, Heidelberg

DMEM Medium, low glucose, Bio West, Nuaille, Frankreich

Endothelial Cell Basal Medium, EBM Clonetics, Cambrex Bioscience, Walkersville

Endothelial Cell Growth Medium 2, Supplement Pack, EBM Clonetics, Cambrex Bioscience,
Walkersville

Endothelial Cell Growth Factor, R & D Systems, Wiesbaden

Entellan, Merck, Darmstadt

Fetales Kälber-Serum (FKS) Sera Plus, PAN Biotech GmbH, Germany

Gellösung Rotiphorese 30, Roth, Karlsruhe
Gentamycin, PAA Laboratories, Linz
Gliclazid, Sigma Aldrich, Steinheim
Glutamin, Biochrom Ag, Berlin
HRP Substrate Puffer, Dako, Glostrup, Denmark
Iodacetamid, Merck, Darmstadt
Interleukin-6, Sigma, Deisenhofen
Kollagenase A 0,2 % (0,2g/ dl), Roche, Mannheim
Mayers Hämalun, Merck, Darmstadt
Medium 199, Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Metformin, Sigma, Deisenhofen
Methylenbisacrylamid, Amersham Biosciences, UK
Milchpulver, blotting grade, granuliert, Roth, Karlsruhe
Paraffin: Histo Comp tissue embeddiung medium, Vogel, Giessen
Penicillin, Streptomycin, Biochrom Ag, Berlin
Peroxidase blocking reagent (ready to use), Dako, Glostrup, Denmark
Pioglitazon, Sigma, Deisenhofen
Ponceau S, Sigma, Deisenhofen
Prestained protein marker, broad range, premixed format, New England Bio Labs Inc.,
Frankfurt
Proteinaseinhibitor "Proteinase Arrest" 100x, GBioscience, USA
Roti®-Blue, colloidale Coomassie Färbung, Roth, Karlsruhe
Streptavidin Peroxidase, Dako, Glostrup, Denmark
TEMED, Sigma, Deisenhofen
Tri-Na-Citrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt
Trypsin/ EDTA Clonetics, Cambrex Bio Science Walkersville, Inc., USA
Trypsin Gold, mass spectrometry grade, Promega Corporation, Madison, USA
Wash Buffer DakoCytomation, Dako, Glostrup, Denmark
Xylol für Immunhistochemie, Schmidt, Dillenburg

Die restlichen, nicht aufgeführten Chemikalien, stammten von Sigma oder Merck.

2.1.2. Antikörper

Antikörper	Firma		Verdünnung
Anti-Aktin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California	Maus	1 : 5 000
Anti-Profilin	Transduction Laboratories, Lexington, USA	Maus	1 : 10 000
Anti Mouse IgG, HRP linked Antibody I	Cell Signaling Inc.	Kaninchen	1 : 10 000

2.1.3. Verwendete Kits

Serum Aurum Proteine Kit, Bio Rad, München

2.1.4. Apparaturen

2D-Gelelektrophorese, Scie Plas, UK

6cm Durchmesser Schalen, Nunc, Wiesbaden

6-Well-Makroplatten, Nunc, Wiesbaden

Blot Paper (extrathick), Protean XL size, Bio Rad, München

Blotting Kammern, Bio Rad, München

Curix 60 Entwicklerapparat, Agfa-Gevaert, Mortsel- Belgium

Dako Autostainer plus, Dako, Glostrup, Denmark

Dialysemembran, Medicell International Ltd., London

Gel Dryer Modell 543, Bio-Rad, München

Heizblock Dri Block DB-2A, Techne

Mikrotom, Leica, Solms

Nitrocellulose-Membran (0,2 µm), Schleicher und Schuell Bioscience, Dassel

Reaktionsgefäße, verschiedene Größen, Eppendorf, Hamburg

Röntgenfilme „Hyperfilm“, Amersham Bioscience, UK

Semi-Dry Blotting Kammer, Bio Rad, München

SuperFrost Plus Objektträger, Menzel Gläser, Braunschweig

Ultraschall Gerät „Labsonic“, Braun

Western Blot Apparatur, Bio Rad, München

Zellkulturmaterialien: Greiner, Frickenhausen und Nunc, Wiesbaden

2.1.5. Untersuchungsmaterialien

Alle Plasmaproben (Nüchternplasma) von Diabetes mellitus Typ 2 Patienten aus der Studie: “Einfluss von Pioglitazone auf Lipidstatus, rheologische Parameter und Endothelfunktion bei Patienten mit stabil eingestelltem Diabetes mellitus Typ 2.“ Studienverantwortlicher: PD Dr. K. G. Parhofer, Medizinische Klinik II, Großhadern, Klinikum der Universität München, Marchioninstr. 15, 81366 München.

Das Blut der sechs gesunden Probanden wurde in EDTA-Röhrchen entnommen und 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde vorsichtig abgenommen, mit einem großen Sicherheitsabstand zu den Blutbestandteilen.

HUVEC, Quellen:

- Dr. Ansgar Schmidt vom Institut für Pathologie in Marburg für die ersten Versuche zum Konstruieren des Versuchsaufbaus
- Arbeitsgruppe von Privatdozent Dr. med. L. C. Hofbauer, Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel in Marburg, frische Kultur direkt aus der Nabelschnur (für alle anderen Versuche)

2.1.6. Medien

Endothelial Cell Basal Medium, EBM Clonetics, Cambrex Bio Science, Walkersville

Mit Endothelial Cell Growth Medium 2, Supplement Pack, EBM Clonetics, Cambrex Bioscience, Walkersville

Dieses Medium wurde nur während der ersten Versuche, die zur Erarbeitung des routinierten Ablaufs dienten, benutzt.

Medium 199

+5 ml Glutamin, Biochrom Ag, Berlin

+2 ml Penicillin, Streptomycin, Biochrom Ag, Berlin

angesetzt als: 40 ml Medium 199+10 ml FKS, Sera Plus, Biotech GmbH

auf die Platten geben, dazu pro 1 ml Medium 10 µl ECGF, R & D

PBS-Puffer:

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Natriumhydrogenphosphat
0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat
pH auf 7,4 einstellen, mit Aqua dest. auffüllen.

2.1.7. Benutzte Datenbanken:

ExPasy: ExPASy Molecular Biology Server, Swiss Institute of Bioinformatics (SIB),
http://www.expasy.org/cgi-bin/map2/def?PLASMA_HUMAN
Release 18.6, September 2006 and updates up to 31-January-2008

2.2. Methoden

2.2.1. Entfernen von Albumin und IgG aus den Proben

Diese müssen entfernt werden, da sie einen Großteil der Plasmaproteine ausmachen und so die 2D-Gelelektrophorese erschweren, da die anderen Proteinspots vom Albumin und IgG überlagert werden würden. Das Gel wäre dann viel dunkler und man könnte viele Proteine nicht erkennen.

Es wurde das Aurum Serum Protein Mini Kit gemäß dessen Gebrauchsanweisung mit einer kleinen Modifikation benutzt.

Bestandteile:

- Aurum Serum Protein Säulen (gefüllt mit Resinkügelchen und Flüssigkeit)
 - Plastik Teströhrchen
 - 2 ml Sammelröhrchen mit Verschluss
 - Stöpsel für die Säulenspitzen
 - Serum Protein bindender Puffer
- (Alles bei 4 °C 12 Monate haltbar.)

Vorbereitung der Serum Protein Säulen:

1. Serum Protein Säule in ein Teströhrchen stellen und 5 min ruhen lassen.
2. Entfernen der Kappe und der Spitze der Säulen. Jetzt beginnt die Flüssigkeit, die in den Säulen enthalten ist, in das Teströhrchen zu tropfen. Warten, bis die Säule leergetropft ist.
3. 1 ml Serum Protein bindenden Puffer darauf geben und warten, bis er aus der Säule herausgeflossen ist. Das Ganze wird wiederholt.

4. Nach der letzten Waschung wird die Säule in ein leeres 2 ml Sammelröhrchen gestellt und für 20 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert, um das Resinbett zu trocknen. Das Sammelröhrchen kann nun verworfen werden.
5. Mit einem Stöpsel die Säulenspitzen verschließen. Jetzt stellt man die Säulen in ein neues 2 ml Sammelröhrchen.

Probenvorbereitung:

6. In einem 2 ml Sammelröhrchen 180 µl Serum Protein bindenden Puffer und 60 µl der Probe einfüllen, dann vortexen.
7. 200 µl der so vorbereiteten Probe in die Säule geben und mischen.
8. Vortexen nach 5 und 10 min wiederholen. Die Säule mit der Probe dann noch 5 min ruhig stehen lassen.

Fertigstellen der geklärten Proben:

9. Stöpsel der Säulenspitze entfernen und die Probe durch die Säule in das Sammleröhrchen durchlaufen lassen. Wieder für 20 sec bei 10.000 rpm zentrifugieren. Hierbei wird die geklärte Probe in dem Sammelröhrchen aufgefangen.
10. Fertig: Das Sammelröhrchen enthält die von IgG und Albumin befreiten Bestandteile des Plasmas und ist nun bereit für die Proteinbestimmung und die 2D-Gelelektrophorese.

(Ich habe den nach Schritt 9 von dem Hersteller vorgeschlagenen Schritt, in dem die Säule noch mal mit Serum Protein bindendem Puffer überschüttet und somit stark verdünnt würde, weggelassen.)

2.2.2. Proteinbestimmung der Plasmaproben in Doppelbestimmung (nach Bradford):

Benötigt wird:

- Bovines Serum Albumin (BSA) in der Konzentration von 1 µg/ µl
- Mikrotiterplatte
- Bio Rad Proteine Assay Reagenz (gekühlt aufbewahren)

Anleitung:

1. Es wird 1 ml des Bio Rad Proteine Assay Reagenzes mit 4 ml Aqua dest. verdünnt.

2. Davon werden 100 μl je in eine Vertiefung der Lochplatte gegeben. Es befinden sich je 2 Vertiefungen nebeneinander, die mit 100 μl gefüllt sind, und die die gleiche Lösung enthalten sollen.
3.
 1. Lochpaar wird zur Leerwertbestimmung genommen.
 2. Lochpaar wird mit 1 μl beschriftet und je 1 μl BSA zugegeben.
 3. Lochpaar wird mit 2 μl beschriftet und je 2 μl BSA zugegeben
 4. Lochpaar wird mit 4 μl beschriftet und je 4 μl BSA zugegeben
5. Lochpaar wird mit der Probennummer beschriftet und mit je 1 μl der vorbereiteten Probe gefüllt (falls die Probe zu verdünnt sein sollte, kann man auch mehr nehmen, man muss das allerdings bei der Konzentrationsberechnung am Ende beachten.).
4. Dann wird jede befüllte Vertiefung der Extinktionsmessplatte noch mit 100 μl des vorbereiteten Proteine Assay Reagenzes zum Mischen der Proben aufgefüllt.
5. Nach ca. 10 Minuten wird die Extinktion bei 570 nm gemessen. Anhand der Standardgerade kann die Proteinkonzentration bestimmt werden.

2.2.3. SDS-Polyacrylamidgele

Für je zwei 15 % bzw. 20 %:

Man spannt in einen Gelgießstand zwei Gelgießformen ein, wobei die schräge Kerbe in der Glasplatte nach innen zeigt, so dass sich eine Ablagetasche für die später hier aufgelegten IEF-Gele ergibt. Ein Taschenformer für den Proteingrößenstandard wird mit genügend Abstand (ca. 1-2 cm) an den Rand gesteckt.

Zusätzlich braucht man zum Bereitstellen:

- 3 Bechergläser
- TEMED
- 10 % APS
- 70 % Ethanol

Für das Trenngel (15 % AA):

- 25 ml Gellösung (hier: Rotiphorese 30, enthält 30 % Acrylamid)
- 20 ml 1M Tris HCl pH 8,8
- 5 ml Aqua dest.
- 400 μl 10 % SDS

Für andere Prozentzahlen verändert man nur die Verhältnisse von Acrylamid und Wasser, der Tris HCl Gehalt und der SDS Gehalt bleiben gleich: Da mit einer 30 %igen Stamm-Gellösung kein 20 %iges Gel gegossen werden kann, muss hier Acrylamid- und Bisacrylamid eingewogen werden.

Für das Trenngel (20 % AA):

- 9,74 g Acrylamid
- 0,26 g Bisacrylamid
- 30 ml H₂O
- 20 ml 1M Tris HCl pH 8,8
- 400 µl 10 % SDS

Für schnellpolymerisierendes Gel am Boden der Platten:

5 ml von der fertigen Trenngellösung nehmen, dann 200 µl 10 % APS und 20 µl TEMED zufügen. Ca. 2,5 ml in jede Gelform gießen.

Zu der restlichen Gellösung werden 500 µl 10 % APS und 50 µl TEMED zugefügt. Beide Gelformen damit gleich hoch füllen. Damit man den Luftkontakt der Oberfläche möglichst gering hält und restliche Luftblasen zerstört werden, beschichtet man die Oberfläche der Gele mit 70 % Ethanol (frisch ansetzen).

Für das Sammelgel (immer gleiche Rezeptur, auch bei verschiedenen Trenngelen):

- 1,1 ml 30 %ige Acrylamid Gellösung
- 1,4 ml 1 M Tris HCl pH 6,8
- 7,5 ml Aqua dest.
- 40 µl 10 % SDS

Die Taschenformer müssen vorher in die Gelformen gesteckt werden.

Zum Start der Polymerisation 200 µl 10 % APS und 20 µl TEMED hinzugeben. Platten bis zum Boden der Ablageschrägen für die Gel-Röhrchen füllen. Blasen müssen abgesaugt werden. Fertige Gele sind max. eine Woche im Kühlschrank in mit Aqua dest. befeuchteten Tüchern und Frischhaltefolie haltbar.

In der Gelmatrix findet laut Westermeier (1990) noch eine Nachpolymerisation statt. Daher sollten die SDS-PAA-Gele einen Tag vorher gegossen werden.

2.2.4. IEF-Polyacrylamidgele

Für 4 Röhrchen:

- Erlenmeyerkolben
- Pipette, die ein durch einen dünnen Schlauch verlängertes Ende hat
- 4 Röhrchen, die am unteren Ende mit Parafilm verschlossen sind

Für das Gel:

- 1,87 g Harnstoff
- 412,5 µl Ampholyte pH 4-7
- 104,5 µl Ampholyte pH 3-10
- 550 µl Acrylamid Lösung
- 412,5 µl 20 % CHAPS
- 1,375 ml Aqua dest.

Alle Substanzen in das Gefäß füllen und schwenken, bis der Harnstoff gelöst ist. Luftblasenbildung ist zu vermeiden.

Als Starter für die Polymerisierung fügt man hinzu:

- 4 µl TEMED (100 %)
- 30 µl 10 % APS (frisch angesetzt oder eingefrorenes zum einmaligen Gebrauch)

Lösung langsam und gleichmäßig auf 4 Röhrchen verteilen, Blasenbildung an der Oberfläche vermeiden. Dann 130 µl Gelüberschichtung auf jedes Röhrchen füllen, mit Parafilm verschließen und für mindestens einen Tag im Kühlschrank (am besten 2-3 Tage) auspolymerisieren lassen.

Die Gelröhrchen sind spätestens nach zwei Wochen unbrauchbar.

2.2.5. Die isoelektrische Fokussierung (IEF)

Acrylamid Lösung:

28,4 % (w/ v) Acrylamid	2,84 g/ 10 ml
1,6 % (w/ v) N [^] ,N [^] -methylen Bisacrylamid	0,16 g/ 10 ml

Röhrchen Überschichtung:

6,5 M Harnstoff	3,9 g/ 10 ml
-----------------	--------------

Lösungen:

Proben Übersichtung:

7 M Harnstoff	2,1 g/ 5 ml
0,8 % Ampholyte pH 4-7 (hier: Servalyt, analytical grade 40 %)	40 µl/ 5ml
0,2 % Ampholyte pH 3-10 (hier: Servalyt, analytical grade 40 %)	10 µl/ 5ml

Lysispuffer:

9,5 M Harnstoff	5,71 g/ 10 ml
2 % CHAPS	0,2 g/ 10 ml
10 mM DTT	0,015 g/ 10 ml
4 % Ampholyte pH 4-7	400 µl/ 10 ml
1 % Ampholyte pH 3-10	100 µl/ 10 ml

Equilibrationspuffer 1:

0,05 M Tris- HCl, pH 6,8	50 ml/ 1 l
0,25 M DTT	2,5 g/ 1 l
4 % SDS	40 g/ 1 l
15 % Glycerin	150 ml/ 1 l

Equilibrationspuffer 2:

0,05 M Tris- HCl, pH 6,8	50 ml/ 1 l
25 mM Iod Acetamid	4,6 g/ 1 l
30 % Glycerol	300 ml/ 1 l
6 M Harnstoff	360 g/ 1 l

100 % TEMED, gebrauchsfertig

1. Tag: Isoelektrische Fokussierung der Proteine

Durchführung:

Ca. 1. Stunde vor der Verwendung der Gele wird die Gelüberschichtung entfernt und durch je 100 µl Lysispuffer zum Equilibrieren ersetzt und noch mit 20 µl Aqua dest. überschichtet.

Zur Probenvorbereitung werden 30 µg Probe in 3-10 µl mit 100 µl Lysispuffer für 1 h bei gelegentlichem Vortexen und Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der unlösliche Teil durch Zentrifugieren (3 min bei 12.000 rpm) abgetrennt.

Kathoden und Anodenelektrolyte werden angesetzt:

Kathodenelektrolyt: 0,02 M NaOH (0,4 g auf 500 ml)

Anodenelektrolyt: 0,01 M Phosphorsäure (0,67 ml 85 % auf 1 l)

Das Anodenelektrolyt kann man auch direkt in der unteren Pufferkammer ansetzen.

Nach ca. einer Stunde:

Parafilm von Gel- Röhren entfernen. Dialysemembranstückchen zurechtschneiden, in Anodenelektrolyt einlegen und blasenfrei (wichtig!) mit einem Gummiring am unteren Ende der fertigen Gel-Röhren befestigen. Untere Pufferkammer mit Anodenelektrolyt füllen. Röhren in die Halterung schieben und an oberem Ende Lysispuffer absaugen.

Ca. 100 µl Probe in ein Röhren füllen, darüber 20 µl Probenüberschichtung. Das Ganze dann noch mit Kathodenelektrolyt vorsichtig auffüllen. Jetzt kann auch die obere Pufferkammer mit Kathodenelektrolyt gefüllt werden.

Fokussierung bei 4 °C im Kühlschrank mit folgendem Elektrophorese-Programm starten:

	Dauer	Spannung
1.	0,5 h	200 V
2.	17,5 h	750 V
3.	1 h	850 V
4.	1,5 h	1000 V
5.	Bis zur Herausnahme	750 V

2. Tag: Equilibrierung und SDS-Page

Die Gele werden mit einer wassergefüllten Spritze aus dem Röhren in eine mit dem Probenamen gekennzeichnete Plastikschaale gespült. Das basische, obere Ende wird mit Bromphenolblaulösung markiert.

Equilibrierung:

Vor der zweiten Dimension werden die Gele je 20 min in Equilibrierungspuffer 1 und 2 im 37 °C warmen Wärmeschrank auf dem Schüttler inkubiert.

SDS Page:

Agarose (für 10 ml): 1,4 ml Tris HCl pH 6,8

40 µl 10 % SDS

0,5 % low melting Agarose (0,05 g/ 10 ml)

Agaroselösung bei 70 °C im Wasserbad schmelzen, falls sie nicht gerade frisch hergestellt wurde.

SDS Lauf-Puffer (5-fach konzentriert):

- 125 mM Tris-Base (15 g/l)
- 2 M Glycin (94 g/l)
- 0,5 % SDS (5 g/l)

Protein-Standard: Prestained protein marker, broad range, premixed format.

10 µl werden bei 90 °C für 3 min erhitzt, dann gekühlt und kurz zentrifugiert. Für ein präparatives Gel 20 µl nehmen.

Um **einfachen SDS Lauf-Puffer** herzustellen, 200 ml des 5-fach konzentrierten SDS-Laufpuffers mit 800 ml Aqua dest. auffüllen.

Es wird in jede Vertiefung der Gelplatten je ca. 0,5 ml Agarose gegeben. Nun werden die Röhrchengele in die Kerbe gelegt, mit dem basischen, bromphenolblauen Ende entfernt vom Standard. Die Röhrchengele werden mit Agarose beschichtet. Blasenbildung ist zu vermeiden. Nachdem die Agarose fester geworden ist, werden die Platten in ihrer Halterung umgedreht, so dass die Kerben mit den Gelröhrchen nach innen zeigen. Dieses Behältnis wird dann mit dem einfachen SDS-Laufpuffer gefüllt. Dann wird der Protein Standard bereitet und nach Entfernen der Taschenformer luftblasenfrei in die Taschen gefüllt. Jetzt wird die Kammer mit genügend SDS-Laufpuffer gefüllt.

Nun folgt die Elektrophorese (bei Zimmertemperatur):

30 mA/ Gel	0,5 h
60 mA/ Gel	Bis Gel weit genug gelaufen ist, um noch in die Färbeschale zu passen: ~ 3,5 h

2.2.6. Die Silberfärbung

(Protokoll modifiziert von Arbeitsgruppe Hasilik, Institut für physiologische Chemie)

Alle Lösungen werden mit Aqua dest. angesetzt.

1. Fixierung, 15 min:

- 30 % Ethanol
- 10 % Essigsäure

2. Fixierung, 15 min:

- 30 % Ethanol
- 10 % Essigsäure

Thiosulfat-Lösung (über Nacht):

- 0,2 % Na-Thiosulfat (0,5 g/ 250 ml)
- 0,1 N Na-Acetat 13,6 g/ l
- 30 % Ethanol

3x je 5 min Waschen mit Aqua dest.

Silbernitrat-Lösung, 25 min:

- 0,1 % Silbernitrat (0,25 g/ 250 ml)
- 0,009 % Formaldehyd (62,5 µl/ 250 ml)

1x kurz waschen mit Aqua dest.

Entwickler:

- 2,5 % Natriumcarbonat (10 g/ 400 ml)
- 0,018 % Formaldehyd (200 µl/ 400 ml)

1x nur kurz mit 50 ml Entwickler spülen – hier reagiert das freie Silberreagenz ab.

-Absaugen der Lösung-

Dann in weiteren 50 ml schwenken, bis erste Proteinsignale sichtbar sind. In diesem Schritt reagiert das proteingebundene Silberreagenz.

-Absaugen der Lösung-

In 100 ml Entwickler lassen, bis die Proteine im Gel gut sichtbar sind.

Stoppen: Ca. 10 ml konzentrierte Essigsäure zum Gel geben → es bildet sich Kohlenstoffdioxid. Für 5 min so lassen.

-1x mit Aqua dest. waschen-

Gelfix (verkleinert die Gele), mindestens 20 min:

- 50 % Ethanol
- 2 % Glycerin

Danach werden die Gele eingescannt und im Gelrockner getrocknet.

2.2.7. Kolloidale Coomassie Färbung

Die Gele, die mit Coomassie gefärbt wurden, wurden mit ca. 200-300 µg Protein pro Gel hergestellt. Zu wenig Protein kann von dem Farbstoff nur ungenügend gefärbt werden und zu viel Protein überlädt das Gel. Um eine bessere Lösung der Proteine und ein gutes Einlaufen in das Gelröhrchen zu gewährleisten, wurde ein anderer Lysispuffer benutzt, der einen 1 molaren Harnstoffgehalt, sonst aber die gleiche Rezeptur hat.

Alle Lösungen werden auf 100 ml angesetzt. Das ist ausreichend für je ein Gel.

Fixierlösung (für 100 ml):

- 79 ml Aqua dest.
- 1 ml 85 %ige ortho-Phosphorsäure
- 20 ml Methanol

Roti-blue® Färbelösung (für 100 ml):

1. 60 ml Wasser mit 20 ml Methanol mischen.
2. 5x konzentrierte Roti-blue® Lösung gut schütteln, bis es gleichmäßig gefärbt ist, dann 20 ml abzapfen.
3. Unter Rühren zu Lösung 1. 20 ml Roti-blue® Lösung von 2. dazugeben.

Waschlösung (für 100 ml):

- 25 ml Methanol 99,8 %
- 75 ml Wasser

Vorinkubation der Gele, nachdem sie in der SDS Elektrophorese gelaufen sind:

Die Schalen müssen einwandfrei sauber sein, da sich evtl. Proteine aus der Schale in der Lösung anfärben. Hauptproblem hier ist das Keratin.

- 60 min in 100 ml Fixierlösung legen.
- ca. 2-15 h (auch über Nacht möglich) in 100 ml Roti-blue® Färbelösung geben.

Entfernung der kolloidalen Farbstoffkomplexe von der Geloberfläche:

- Gel in saubere, schon mit 100 ml der Waschlösung gefüllte Färbeschale legen.
- 5 min lang schütteln.
- Ausgefallene Farbstoffkomplexe werden durch ruckartiges Bewegen der Schale wieder in Lösung gebracht.

Da die Gele gleich weiterverwendet und sofort die Protein-Spots ausgeschnitten worden sind, wurde auf die vom Hersteller angebotene Stabilisierung und Trocknung der Gele verzichtet.

2.2.8. Ausschneiden der Protein-Spots

Die Punkte wurden unter sauberen, staubfreien Umständen mit einem Skalpell über einer Leuchtplatte ausgeschnitten. Keratin in Form von Hautschuppen könnte das ausgeschnittene Protein verunreinigen und überdecken, so dass man auf seine Haare achten (Haarband tragen) und Handschuhe tragen sollte.

Nachdem die sich noch in der Waschlösung befindlichen Gele eingescannt worden sind, werden die Proteine der Coomassie Färbung mit der vorher gemachten Silberfärbung verglichen und man sucht die Proteine, die man ausschneiden will.

1. Auf einem Ausdruck der Coomassie Färbung ausgewählte Proteine nummerieren.
2. Kleine 50 µl Reaktionsgefäße mit Nummern beschriftet bereitlegen.
3. Das Gel wird auf einen vorher gründlich mit Ethanol gewischtem Leuchttisch gelegt. Die gewünschten Protein-Spots werden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Man schneidet nur so wenig ungefärbtes Gel wie möglich mit aus.
4. Proteinstückchen klein schneiden und in ein nummeriertes Cap stecken. Die Nummer des Proteinstückchens auf dem Ausdruck der Coomassie Färbung notieren. Die Proteinstückchen werden jetzt im Gefrierschrank aufgehoben, bis sie mit Trypsin weiterbehandelt werden.

2.2.9. Trypsin Verdauung der Gelproteine

(Protokoll nach Dr. B. Schmidt, Institut für Biochemie II, Göttingen)

Reagenzien:

- 25 mM Ammoniumbicarbonat
- 50 % Acetonitril (AcN) mit 25 mM Ammoniumbicarbonat
- 100 % Acetonitril (AcN)
- Trypsin: Trypsin Gold, mass spectrometry grade, von Promega in 5 µg Portionen einfrieren. Bei Bedarf für 10 Proben ein 5 µg Trypsin Cap mit 200 µl Ammoniumbicarbonat verdünnen, so dass man jetzt eine Trypsinkonzentration von 500 ng (0,5 µg) in 20 µl Lösung hat.
- 1 % TFA (Trifluoressigsäure)
- 1 % TFA mit 50 % AcN

Procedere:

Die aus dem Gel ausgeschnittene Proteine werden aufgetaut.

Waschen: Proben +100 µl Wasser,

man schüttelt alles 30 min bei 37 °C.

Danach vorsichtig Lösung absaugen, indem man die Pipettenspitze neben die Gelstückchen an den Boden des Caps drückt und vorsichtig ansaugt.

+100 µl 25 mM Ammoniumbicarbonat,

man schüttelt alles 30 min bei 37 °C, danach Überstand absaugen.

2x +100 µl 50 % AcN/ 25 mM Ammoniumbicarbonat,

man schüttelt alles 30 min bei 37 °C, danach Überstand absaugen.

+100 µl 100 % AcN

man schüttelt alles 10 min bei 37 °C, danach Überstand absaugen.

Trocknen: Das Reaktionsgefäß für 5 min bei RT offen lassen.

Protein- Alle Reaktionsgefäße auf Eis stellen.

Verdauung: +500 ng eiskaltes Trypsin dazugeben,

15 min auf Eis lassen.

Wenn es nötig ist, weil Gelstücke über den „Wasserspiegel“ hinaus in die Luft ragen, wird mit 25 mM Ammoniumbicarbonat aufgefüllt.

Inkubation: Über Nacht (ca. 18 h) im 37 °C warmen Brutschrank inkubieren.

Je 2 Löcher in den Deckel (zuerst), ein Loch in die Spitze der Caps stechen.

Das angestochene Cap in ein neues stellen.

Für 2 min bei 2500 rpm zentrifugieren.

Lösung tropft in unteres Cap → nach jedem Schritt leeren.

Vorsicht: Deckel des angestochenen Caps nie schließen, wenn man die oberen Löcher zuhält. Löcher immer offen halten.

+20 µl 1 % TFA

Man schüttelt alles 30 min bei 37 °C.

Für 2 min bei 2500 rpm zentrifugieren.

+20 µl 1 % TFA/ 50 % AcN

Man schüttelt alles 30 min bei 37 °C.

Für 3 min bei 2500 rpm zentrifugieren.

Trocknen: **CAVE: Überstand ist wichtig!**

Man trocknet die fertig behandelten Lösungen im Speed Vac, bis nur noch klare bis milchig trübe Pellets übrig sind.

2.2.10. Western Blot

vierfacher SDS Ladepuffer:

- 2 g Tris HCL (253 mM)
- 25 mg Bromphenolblau
- 25 ml Aqua dest.
- mit Glycerol auf 45 ml auffüllen
- pH von 6,8 einstellen
- 5 ml 20 %ige SDS Lösung (2 %) dazugeben

10x Transferpuffer (auf 1 l auffüllen):

- 1,92 M (145 g) Glycin
- 250 mM (30 g) Tris Base

- pH auf 8,2 einstellen

1x Transferpuffer (1 l):

- 100 ml 10x Transferpuffer
- 200 ml Methanol
- 700 ml Aqua. dest.

10x TBS (auf 1 l auffüllen):

- 1,5 M Natriumchlorid
- 0,1 M Tris Base
- pH auf 7,5 einstellen

1x TBST (auf 1 l auffüllen):

- 5 ml 20 % Triton-X 100
- 100 ml 10x TBS-Lösung

5 % Magermilchlösung:

2,5 g Magermilchpulver (non fat dry milk) auf 50 ml mit 1x TBST auffüllen

1. Gießen der Gele:

Die Gele werden genau wie die großen Gele gegossen. Für zwei der kleinen Gele braucht man nur die Hälfte der Reagenzien. Es wird ca. 1 ml der Gellösung mit 2 µl TEMED und 20 µl APS als schnellpolymerisierendes Gel verwendet. Für die Profilin-Blots wurden 15 %ige Gele verwendet, da das Protein ca. 15 kDa groß ist. Die Gele müssen ca. 1 Stunde polymerisieren, können dann gleich verwendet werden.

2. Vorbereitung der Proben:

- In jeder der Geltaschen auf einem Blot sollte die gleiche Menge an Protein sein (vorher Proteinbestimmung der Proben und Errechnung des Probenvolumens). Man füllt alle Proben auf das größte Probenvolumen, das auf dieses Gel gegeben werden soll, mit Aqua dest. auf.
- Man mischt 60 µl der vierfachen SDS Lösung mit 40 µl DTT (1 M).
- Zu jeder Probe gibt man ca. 1/3 des Probenvolumens den SDS-DTT Puffer.

Nach dem Pipettieren der Proben werden diese und der Proteinstandart (10 µl/ Gel) zentrifugiert und dann 5 min bei 95 °C in den Heizblock gestellt.

Die Gele werden in eine Kammer gestellt, die mit normalem einfachem SDS-Laufpuffer aufgefüllt wird. Die angeschliffenen Seiten der Platten müssen hierbei nach innen zeigen und bis oben mit einfachem SDS-Laufpuffer bedeckt werden. Jetzt können die Taschenformer entfernt werden.

Die Proben werden nach 5 min aus dem Heizblock geholt, abgekühlt, zentrifugiert und in die Taschen pipettiert. Eventuell sollten die randständigen Taschen nicht oder nur mit dem Proteinstandard oder SDS Laufpuffer befüllt werden, da diese ein unregelmäßigeres Laufverhalten haben.

3. SDS Page:

Die Kammer wird an den Strom angeschlossen:

- 25 mA pro Gel bis die Proben in das Gel eingelaufen sind
- dann auf 40 mA pro Gel hochschalten

Das Bromphenolblau der Proben werden bis an das untere Ende des Gels laufen gelassen, dann der Strom ausgestellt. Wenn man den Strom nicht rechtzeitig abstellt, laufen die Proben aus dem Gel.

4. Western Blot Transfer:

Benötigt wird:

- Blotting Kammer, die ein gefülltes Eisfach haben und mit 1x Transferpuffer gefüllt sein sollte.
- Schale, die mit Transferpuffer gefüllt ist, in der man das „Sandwich“ bauen kann.
- Pro Gel: 2 Schwämme, 2 Chromatographiepapiere in Gelgröße, eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm) in Gelgröße, eine Mini Gel Holder Kassette.

Man legt jetzt die Mini Gel Holder Kassette mit der schwarzen Seite nach unten in die Schale, die mit Transferpuffer gefüllt ist.

Darauf legt man jetzt in folgender Reihenfolge das „Sandwich“ auf:

1. Schwamm
2. Blotting Papier 1 mm
3. Gel, das man bereits aus den Platten geholt hat. Der obere Rand des Gels muss an der Kontaktstelle zum Trenngel sorgfältig abgeschnitten werden.
4. Nitrozellulosemembran

5. Blotting Papier 1 mm

6. Schwamm

Nun schließt man die Platte und stellt sie mit der Seite, die am nächsten am Gel dran ist (hier: schwarz) an den (schwarzen) Minuspol. Bei Einschalten fließt der Strom so vom Minus- zum Pluspol. Die geblotteten Proteine werden aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran (liegt am Pluspol) gebracht. Das Netzgerät sollte bei 45 min Laufzeit auf 300 mA eingestellt werden.

Die Nitrozellulosemembran wird aus der Kammer genommen, das Gel kann verworfen oder mit der Silberfärbung weiterverarbeitet werden.

5. Ponceau S (fakultativ):

Ponceau S färbt Proteine unspezifisch und reversibel. Man schwenkt den Blot ca. 3 min in der Ponceau S Färbung. Danach wäscht man den Blot ordentlich mit Aqua dest.. Dieser gefärbte Blot wird zwischen zwei Folien gelegt und eingescannt.

6. 1h Blocken unspezifischer Bindungsstellen mit einer 5 % Magermilchlösung in TBST (10 ml pro Blot).

7. Zugabe des ersten Antikörpers:

Der Profilin-Antikörper wird in der vom Hersteller angegebenen Konzentration 1 : 10.000 (1 µl/ 10 ml) der 5 % Magermilchlösung zugefügt. Die Blots werden auf einem Schüttler über Nacht (mindestens 10 h) in den Kühlschrank gestellt.

8. Waschen der Blots:

Man schüttet die Milchlösung aus und spült den Rest mit TBST weg. Dann werden die Blots 3x je 10 min in TBST gewaschen.

9. Zugabe des zweiten Antikörpers:

Der Anti-Mouse Antikörper wird in der Konzentration 1 : 10 000 in 10 ml Magermilchlösung gegeben, dann 1 h bei RT schwenken.

10. Nochmaliges Waschen der Blots (genau wie unter 8.). Blot im TBST lassen.

11. Die ECL Reaktion:

Der Blot wird nun nach gutem Abtropfen (darf nicht eintrocknen) mit der Seite, auf der die Proteine sind,

für 1 min in das ECL (1 : 1 gemischt) oder

für 5 min in das ECL Plus (2 ml und 50 µl) oder

für 5 min in das ECL Advanced (1: 1 gemischt) gelegt

Danach lässt man den Blot wieder ordentlich abtropfen und legt ihn knitterfrei in Folie.

12. Belichtung der Filme im Dunkelraum:

Der eingewickelte Blot wird nun mit der Proteinseite nach oben in eine Röntgenkassette gelegt und mit einem Film bedeckt. Man lässt den Film eine vom ECL und der Proteinmenge abhängige Zeit aufliegen und entwickelt ihn.

13. Die behandelten Blots können für den **Aktin-Antikörper** verwendet werden, indem sie ca. 10 min in TBST gewaschen werden. Danach wird der Aktin-Antikörper in der Konzentration 2 : 10 000 in 10 ml Magermilchlösung gegeben. Mindestens 1 h bei RT schwenken oder über Nacht im Kühlschrank auf den Schüttler stellen. Dann kann wie ab Punkt 10. (Blots 3x je 10 min in TBST waschen, dann ECL und Filme belichten) fortgefahren werden.

14. Methoden zur Darstellung der Proteinmengen:

Als Methoden zur Darstellung der Proteinmengen wurde die Silberfärbung der Gele, die Färbung mit Ponceau S oder der mit einem Aktin-Antikörper behandelte Blot verwendet.

Wenn man alle Methoden miteinander verglich, stellte sich heraus, dass die Ponceau S Färbung am ungenauesten für diesen Versuchsaufbau war, da mit kleinen Proteinmengen (z.T. kleiner als 3 µg) hantiert wurde, was durch das Ponceau S nicht mehr angezeigt wurde. Der Aktin-Blot ist zwar sehr spezifisch, er zeigt aber eben nur den Aktin Gehalt einer Probe an. Wenn die Probe nicht aus Zellen, sondern wie in einigen hier untersuchten Fällen nur aus zellfreiem Überstandsmedium bestand, war nur wenig Aktin messbar. Daher wurden alle drei Methoden je bei Versuchen, die in ihren besten Indikationsbereich fielen, benutzt.

2.2.11. 2D-Western Blot

Man verfährt genauso wie bei einer normalen 2D-Gelelektrophorese, nur dass man ca. 150 – 200 µg Protein verwendet. Diese werden eine Stunde in einem speziellen Lysispuffer mit

11 M Harnstoff inkubiert, der besser die Proteine lösen kann. Die Röhren werden weiterhin mit dem oben verwendeten Lysispuffer vorinkubiert.

Lysispuffer mit 11 M Harnstoff:

11 M Harnstoff	5,71 g/ 10 ml
2 % CHAPS	0,2 g/ 10 ml
10 mM DTT	0,015 g/ 10 ml
4 % Ampholyte pH 4-7	400 µl/ ml
1 % Ampholyte pH 3-10	100 µl/ ml

Es wird wie gewohnt mit den Substanzen verfahren (siehe IEF).

Nach dem SDS Page:

Die überschüssigen Enden und das Sammelgel werden sorgfältig abgeschnitten. Das Gel wird ausgemessen, die Fläche berechnet (s.u.). Das Gel wird in den Transferpuffer gelegt. Dann wird ein „Sandwich“ aus den Schichten Blotting Papier – Gel – Nitrozellulosemembran – Blotting Papier gebaut. Alle Bestandteile werden vorher gut mit Transferpuffer befeuchtet. Die Membran stellt dabei das größte hervorstehende Teil dar.

Diese Konstruktion wird gewendet und in eine **Semi-Dry Blotting Kammer** gelegt.

Nun wird geblottet: Die verwendete Stromstärke (mA) ist dabei das ca. 1-1,5-fache der Gelfläche (cm²). Nach einer Stunde ist der Blot fertig. Man kann mit der Membran wie bei dem Western Blot gewohnt weiter verfahren. Das Gel kann verworfen oder in Silberfärbung angefärbt werden.

2.2.12. Immunhistochemische Färbung

(Dieser Punkt wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. [apl.] Dr. Peter Barth durchgeführt.)

Die Schnitte wurden nach der ABC (Avidin-Biotin-Komplex)-Methode angefertigt.

Die in Paraffin eingelegten Gewebe wurden in 2 µm dünne Scheiben geschnitten und auf spezielle Objektträger gelegt. Diese wurden über Nacht im Brutschrank bei 60 °C inkubiert.

Spülpuffer:

- 5,3 g NaCl
- 1,2 g Tris in 1 l Aqua dest. lösen, pH 7,4 mit HCl einstellen.

10 mM Tri-Na-Citrat-Dihydrat-Puffer:

- 2,941 g Tri-Na-Citrat-Dihydrat in 1 l Aqua dest. lösen, pH 6,0 mit HCl einstellen.

0,1 % Trypsin:

- 300 mg Trypsin und 300 mg Calciumchlorid mit 300 ml Tris-HCl-Puffer lösen und pH mit NaOH auf 7,8 einstellen.
- Vor Gebrauch auf 37 °C aufwärmen.

Tris-HCl-Puffer:

6,057 g Tris in ca. 500 ml Aqua dest., pH auf 7,4 auftitrieren, auf 1 l auffüllen.

1. Entparaffinieren der Schnitte für 3x 10 min in Xylol und Dehydrieren in 100 % Alkohol.
2. Mit Aqua dest. spülen.
3. Mikrowellenbehandlung:
Citratpuffer: 10 mM Tri-Na-Citrat-Puffer (ca. 4 °C kalt), pH 6,0 mit HCl einstellen.
4. Die Schnitte werde in die Plastikkuvetten gestellt. Diese werden mit Citratpuffer randvoll gefüllt. Den Deckel locker aufschrauben. Die Mikrowelle wird auf 600 Watt gestellt. Je dreimal 5 min erhitzen. Jeweils die verdunstete Menge an kaltem Citratpuffer wieder nachfüllen. Danach Küvetten bei RT abkühlen lassen. Nun werden die Schnitte mit Spülpuffer (pH 7,4) gespült.
5. Trypsinisierung mit 0,001 % Trypsin: für 15 min bei 37 °C.
(1 ml 0,1 % Trypsin in 100 ml 0,05 m Tris HCl, pH 7,4 verdünnen)
6. Spülen mit Aqua dest. für 5 min.
7. Dann werden die Objektträger in einen Autostainer gestellt, der diese nach vorgegebenem Programm in folgender Reihenfolge behandelt:
 - Spülen mit Wash Buffer
 - 200 µl Peroxidase Blocking reagent
 - Spülen mit Wash Buffer
 - 200 µl Primärantikörper:
Profilin, 1 : 100 in Chem Mate Antibody diluent für 30 min
 - Spülen mit Wash Buffer
 - 200 µl Sekundärantikörper: biotinylated Anti-Goat IgG, 1 : 100 in Chem Mate Antibody diluent für 30 min

- Spülen mit Wash Buffer
 - 200 µl HRP Komplex (= Streptavidin Peroxidase) für 15 min
 - Spülen mit Wash Buffer
 - 80 µl DAB + Chromogen (x50) mit 4 ml HRP Substrate Puffer für 5 min
 - Spülen mit Wash Buffer
 - 80 µl DAB + Chromogen (x50) mit 4 ml HRP Substrate Puffer für 5 min
 - Spülen mit Wash Buffer
 - Gegenfärben mit Hämalaun: 1 Teil Mayers Hämalaun + 5 Teile Aqua dest., vor Gebrauch filtrieren.
 - Spülen mit Wash Buffer
8. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe: 2x70 %, 2x89 %, 2x100 % für je 5 min, 3x5 min in Xylol, dann mit Entellan eindecken.

2.2.13. Präparation der HUVEC Zellen

(Dieser Punkt wurde von der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. L.C. Hofbauer durchgeführt.)

Nabelschnurtransport: Steriles Gefäß mit HEPES- gepuffertem Medium bzw. mit calciumhaltigem PBS in Kreißsaals abgeben (muss gekühlt gelagert werden).

Materialien:

1 Skalpell, 1 Schere, 4 Klemmen, Abfallgefäß, sterile Tupfer, blaue Braunüle (Kunststoffkanüle etwas kürzen, Flügel abschneiden), 10 ml Spritze, 2 Blue caps, 2 Petrischalen

Pufferlösungen: Kollagenase A 0,2 % (0,2 g/ dl), PBS mit Calcium, 70 % Ethanol

Vorbereitungen:

- Nabelschnur in Petrischale mit Ethanol abspülen (nur außen)
- Abtrennen der Flügel bei der blauen Kanüle
- Wasserbad auf 37 °C vorheizen
- Petrischale mit PBS füllen

Ablauf:

- Nabelschnur knapp oberhalb der oberen Klemme glatt abschneiden, Blut herauslaufen lassen.

- Schnittfläche mit sterilem Tupfer abtupfen.
- Einführen der blauen Kanüle in die Umbilikalvene (eine, weites Lumen)
- locker abklemmen
- mit PBS gefüllte Spritze aufsetzen und Dichtigkeit der Nabelschnur prüfen
- Vene mit ca. 10 ml PBS/ Calcium spülen.
- 10 bis 15 ml Kollagenase A in Spritze aufziehen.
- Injektion von Kollagenase A, bis es am unteren Ende heraustropft
- Vene unten abklemmen und auffüllen.
- Braunüle mit Stopfen verschließen und die Vene in eine Petrischale legen.
- mit Alufolie ummanteln
- Inkubation für 15 min über Wasserbad bei 37 °C
- untere Klemme öffnen
- Auffangen der Zellen in einem blue cap
- Vene mit PBS/ Calcium ausspülen, dabei unterstützend Nabelschnur austreichen
- alles in dem blue cap auffangen
- Zentrifugation 1200 U für 5 min (20 °C)
- Überstand über Pellet mit Schwung abgießen
- Resuspendieren mit 13 ml Medium (mehrmals vorsichtig auf- und abziehen mit Pippetierhilfe)
- Überführung in eine Kulturflasche (HUVEC P0)
- Erfolgskontrolle unter Mikroskop, Suche nach Clustern
- Überführung in Brutschrank, 37 °C und 5 % CO₂

Am nächsten Tag Überprüfung des Wachstums, bei konfluentem Zellrasen Teilung der Kultur (= HUVEC P1), sonst Mediumwechsel am 2. Tag nach Gewinnung der Endothelcluster.

2.2.14. Kultivierung der Zellen

Kulturbedingungen

Die Kulturen wurden in den genannten Medien bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an dafür vorgesehenen Sterilwerkbänken durchgeführt. Der Mediumwechsel wurde alle zwei-drei Tage durchgeführt um gleichbleibende Kulturbedingungen vorzugeben. Bei dem Mediumwechsel wurde mit sterilen Pipetten, Handschuhen und der Sterilbank gearbeitet. Medium wurde immer nur tropfenweise auf den Rand der Platte geträufelt, um den Zellrasen möglichst wenig zu beschädigen.

Passagieren der Zellen

Material:

- Trypsin in EDTA (1 : 250)
- PBS
- Zellen und passendes Medium
- 15 ml Röhrchen

Vorgehen:

- Medium absaugen
- Subkonfluente Kulturen mit PBS-Lösung waschen, um tote Zellen und Reste des Kulturmediums zu entfernen.
- Die Zellschicht wird mit Trypsin/ EDTA-Lösung benetzt (1 ml für 5 cm², 3 ml für 75 cm² und 5 ml für 150 cm² Wachstumsfläche).
- Nach ca. 5 minütiger Inkubation bei RT wird die Flasche leicht beklopft und geschwenkt. Die Zellen werden suspendiert und der Flaschengrund wiederholt mit dem Trypsin abgespült.
- Die Trypsinlösung wird in ein 15 ml Tube abpipettiert und mit der doppelten Menge an Medium versetzt. Das Serum des Mediums inhibiert das Trypsin, die Schädigung der Zellen wird verhindert.
- Nun wird das Tube ca. 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert.
- Die zu bearbeiteten Platten werden vorbereitet: Man gibt 3 ml Medium auf eine 6 cm Platte.
- Der Überstand über dem Pellet wird vorsichtig abpipettiert und verworfen.
- Das Zellpellet wird in Medium suspendiert und auf die Schalen verteilt (vorher berechnen, auf wie viele Platten man die Zellen verteilen will: ca. 1 ml suspendierte Zellen pro 6 cm Schale, für jedes Well der Sechsllochplatte 0,5 ml Medium und für mittlere Flasche ca. 3 ml).
- Die Zellmischung auf die Platten geben, gut schwenken.
- In eine große Flasche gibt man ca. 3 ml Zelllösung und 10 ml Medium.
- Darauf werden die Zellen im Brutschrank inkubiert.

Sobald der Zellen der Flasche fast konfluent sind, wurden sie, wie oben beschrieben, gesplittet. Es wurde gewartet, bis die Zellen am Boden der Platten angewachsen sind, bis mit der Behandlung der Zellen begonnen wird. Das dauerte ca. 2 Tage, abhängig davon, in wie viel Medium man das Pellet aufgelöst hat.

2.2.15. Behandlungen der Zellen

Das DMEM und die Wirkstoffe (außer DMSO oder in DMSO gelöstes Pioglitazon, mit denen schon vorinkubiert wurde) wurden auf die Zellen gegeben, wenn sie noch nicht konfluent waren. So bildeten sich keine Zellhaufen unter der Behandlung, die nicht mit den Stoffen in Berührung gekommen wären (H. Schmidt, mündliche Mitteilung). Die Zellen wuchsen während der Medikamenteninkubation weiter.

- 6 cm (Durchmesser) Schalen sind mit 4 ml Nährmedium zu befüllen.
- Vorbehandlung mit 16 µl DMSO oder 16 µl Pioglitazon (entspricht 40 µM)
- Inkubation für 48 h
- Mediumwechsel: Zugabe von neuem, serumfreien und glukosearmen DMEM Medium, wieder mit je 16 µl DMSO oder 16 µl (entsprechend 40 µM) Pioglitazon versetzt.
- Dazu je nach Versuchsaufbau Zugabe von den entsprechenden Substanzen.
- Zellen zwei Tage (je nach Versuchsaufbau) inkubieren. Zellen und Überstand ernten (siehe weiter: Zellextrakte oder Acetonfällung).

		Für Sechs-Zentimeter-Platten:
Pioglitazon	Stock 10 mM, -20 °C	40 µM = 16 µl/ 4 ml
7-Ketocholesterol	Stock 12,48 mM (0,5 %), +4 °C	8 µM = 2,56 µl/ 4 ml
Gliclazid	Stock 10 mg/ ml, -20 °C	10 µM = 4 µg/ 4 ml
7-β-Hydroxycholesterol	Stock 4,96 mM, -20 °C	10 µM = 8,1 µg/ 4 ml
Interleukin-6	Stock 10 µg/ ml, -20 °C	20 ng/ ml = 8 µl/ 4 ml
Metformin	Stock 20 µM, -20 °C	20 µM = 4 µl/ 4 ml

2.2.16. Zellernte und Herstellung eines Gesamtproteinextraktes

Bereitlegen:

- Zellschaber
- Eppendorf Reaktionsgefäße (Größe je nach Menge der Zellen)
- Zentrifuge
- Pipette

Platten aus dem Brutschrank holen. Die Zellen müssen nicht unbedingt auf der sterilen Werkbank verarbeitet werden.

- Überstand abpipettieren und ggf. weiterverarbeiten (siehe: 2.2.16. Acetonfällung).
- Platte mit 1 ml PBS spülen und wieder abpipettieren.

- 1 ml PBS in Schale pipettieren, Zellen mit Zellschaber vorsichtig vom Boden lösen
- das PBS mitsamt der gelösten Zellen in ein Cap pipettieren, Platte noch mal mit 0,5 ml PBS spülen, auch in Cap geben
- bei 1200–1500 rpm 3-4 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- nochmals 1 ml PBS in Cap geben, Suspendieren der Zellen
- bei 4000 rpm 3-4 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen
- 1ml eisgekühltes PBS, in das 10 µl Proteinaseinhibitor (1 : 100) gelöst sind, herstellen
- Cap auf Eis stellen und mit ca. 50 µl PBS/ Proteinaseinhibitor suspendieren, bis das Pellet gelöst ist.
- Schallen der Zellen: Cycle 0,5; 3 Burst pro Probe
- kurz zentrifugieren, Zellreste entfernen
- Proteinbestimmung

2.2.17. Acetonfällung der Überstände

Die Überstände aus der Zellkultur müssen wegen ihrem geringen Proteingehalt konzentriert werden. Dazu wurde die Acetonfällung verwendet:

- Zuerst wird der Überstand aus den Zellschalen abgenommen und 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert.
- der Überstand davon wird in zu je 300 µl in Eppendorf 1,5 ml Caps gefüllt.
- zu 300 µl Überstand pipettiert man je 1200 µl (= 4-fache Menge) Aceton, gut mischen.
- Proben für eine Stunde in den Gefrierschrank bei –20 °C stellen.
- danach Proben 10 min bei 10.000 rpm zentrifugieren.
- davon wird der Überstand abgenommen, verworfen.
- Die Probe wird noch einmal kurz zentrifugiert, das restliche Aceton wird entfernt.
- Übrig bleibt das Pellet: Dieses wird mit ca. 30 µl PBS und Proteinaseinhibitor (1 : 100) auf Eis suspendiert, indem bei einem Cap des selben Inhalts angefangen wird zu suspendieren. Dann wird der Inhalt aufgenommen und in das nächste Cap des selben Inhalts überführt, suspendieren, usw.
- Danach folgt die Proteinbestimmung.

Die Ergebnisse

3.1. Die Studie

Die Arbeit begann mit der Untersuchung des Plasmas von zehn Diabetes mellitus Typ 2 Patienten, die im Rahmen einer Studie (Parhofer, K. G.) mit dem Insulinsensitizer Pioglitazon behandelt wurden. Die Plasmaproben, die vor und 12 Wochen nach der Behandlung abgenommen wurden, waren Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit.

3.2. Die 2D-Gelelektrophoresen der Plasmaproteine

3.2.1. Der Vergleich von ungereinigten, einfach und zweifach gereinigten Plasmaproben

Im menschlichen Plasma stellen Albumin ca. 60 % und Immunglobuline 15 % des Gesamtproteins dar (Hick C. and A, 2000). Diese Proteine können andere in der Elektrophorese verdecken. Deshalb musste vor den ersten Versuchen ein Reinigungsverfahren gefunden werden, das die restlichen Proteine gut zum Vorschein kommen lässt. Als geeignetes Verfahren wurde das Serum Aurum Kit zur Reinigung gewählt.

Um die ideale Reinigungsform zu finden wurden folgende Untersuchungen gemacht und 2D-Gelelektrophoresen durchgeführt:

1. Normales Plasma: Das ungereinigte Plasma ist stark albuminhaltig. Zu viel an Albumin verzerrt das Laufverhalten anderer Proteine. Außerdem verdeckt es andere, in der Nähe befindliche Proteinpunkte und verhindert deren genaue Identifikation. Ausgeschnittene Proteine könnten so fälschlich als Albumin oder Ig G identifiziert werden, da diese Stoffe aufgrund ihrer hohen Konzentration im gesamten Gel vorkamen.
2. Einmal mit dem Kit gereinigtes Plasma: Die einfache Reinigung war nötig, da einige Proteine vom Albuminschleier verdeckt wurden. Kleine Punkte waren gut sichtbar.
3. Zweimal mit dem Kit gereinigtes Plasma: Weil in den einfach gereinigten Proben immer noch einige Proteininseln verdeckt schienen, wurden 2D-Gelelektrophoresen mit

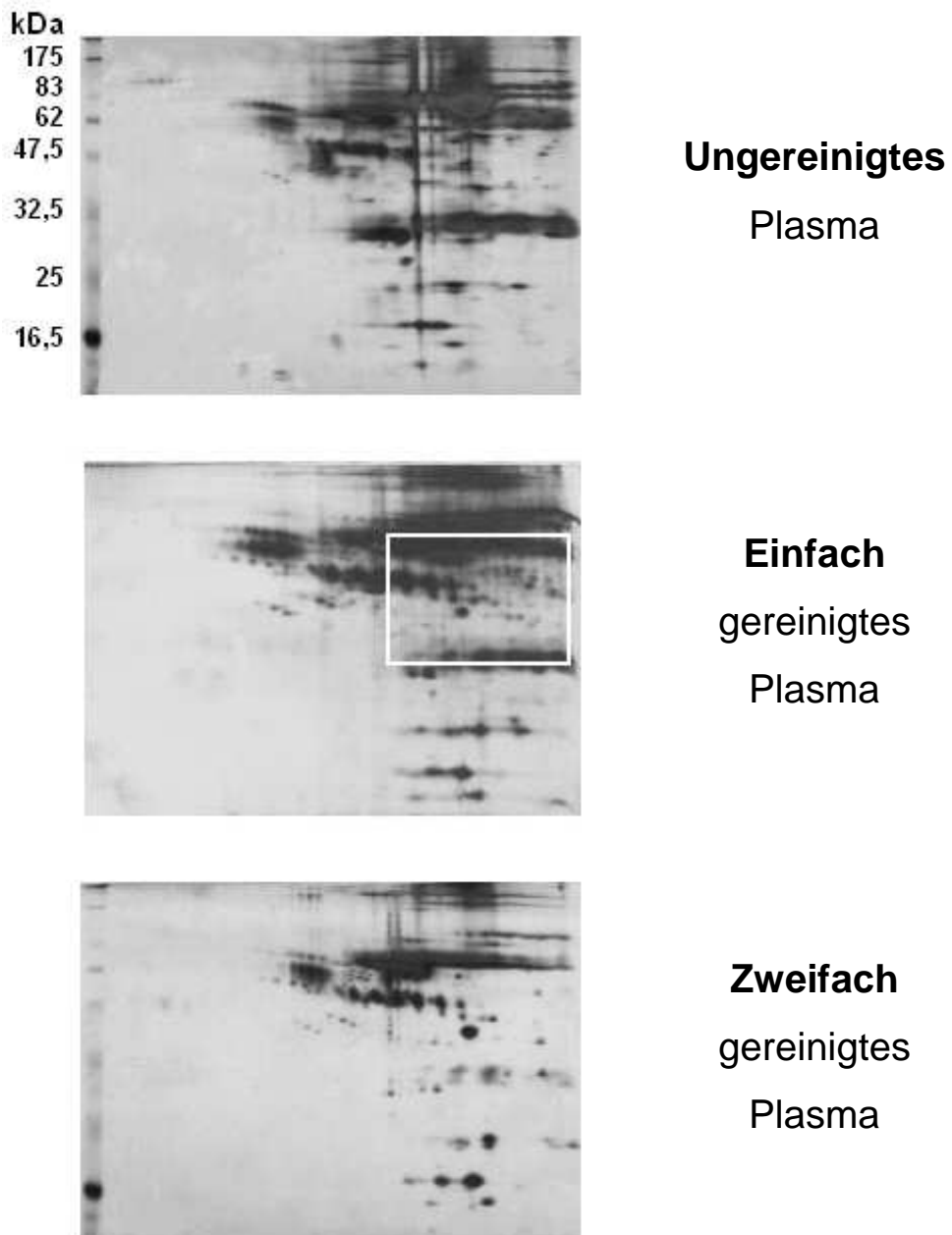
dem Serum Aurum Kit 2x gereinigten Plasma angefertigt. Hier waren einige Proteine klarer zu sehen. Jedoch verschwanden, verstärkten oder verkleinerten sich durch die zweite Reinigung andere vorhandene Proteinpunkte. Diesen Gelen schienen auch einige Punkte zu fehlen, die laut öffentlichen Proteindatenbanken nicht zur Albumin- oder zur Ig G-Familie gehören. Außerdem müsste durch die Entfernung von Albumin, das im normalen Blut ca. 60 % der Proteine (Hick C. and A, 2000) darstellt, eine höhere relative Konzentration von quantitativ weniger vorkommenden Proteinen und somit eine bessere Darstellung in der 2D-Gelelektrophorese gelingen. Dies traf jedoch nur bei einigen Punkten zu. Wenn wirklich nur Albumin und Ig G aus dem Plasma entfernt werden würde, müsste sich ergeben, dass die relativen Konzentrationen der verbleibenden Protein ansteigen. Jedoch war bei den zweifach gereinigten Proben immer ein spärlicheres Proteinmuster der anderen Proteine zu erkennen. Es schien, als würden einige der kleineren Punkte „weggereinigt“ werden.

Es wurden immer gleiche Proteinmengen für die 2D-Gelelektrophoresen in der ungereinigten, der einfach und zweifach gereinigten Form aufgetragen.

Als Mittelweg zwischen guter Reinigung und Detailtreue erwies sich die einfache Reinigungsstufe als geeignetes Verfahren (Abb. 1). Um nichts zu übersehen, wurden zusätzlich auch die zweifach gereinigten Plasmaproben von allen Patienten untersucht. Da viele Proteine im Blut eine Größe von 100 000–13 000 Da und einen pH-Wert von 4-8 haben, wurde mit Gelen gearbeitet, die diesen Bereich abdecken. Es wurden keine Gradientengele ausgewählt, da diese schwierig reproduzierbar herzustellen sind. Weil kleinere Proteine als 13 kDa oft auch Abbauprodukte sind, wurde die Untergrenze für die Proteingröße bei dieser Größenordnung (entsprechend einem 15 % Acrylamid-Gel) gezogen. Auch die meisten Proteindatenbanken zeichnen nur Proteine bis zu einer Größe von 13 kDa aus.

Abb. 1: Vergleich der verschiedenen Reinigungsstufen.

Die einfache Reinigung zeigt die beste Auflösung, während die ungereinigten Gele verschmieren und bei den zweifach gereinigten Gelen Proteine fehlen. In der einfachen Reinigung sieht man einige Punkte viel deutlicher und schärfer, was man besonders gut an dem rechten oberen Quadranten (weiß umrandet) feststellen kann, wo viele kleinere Proteinpunkte gut erkannt werden können. In der zweifachen Reinigungsstufe scheinen viele Proteine verschwunden zu sein. Dafür gewinnen kleinere Punkte scheinbar wegen der Konzentrierung durch die Entfernung des Albumins und der Immunglobuline an Intensität.

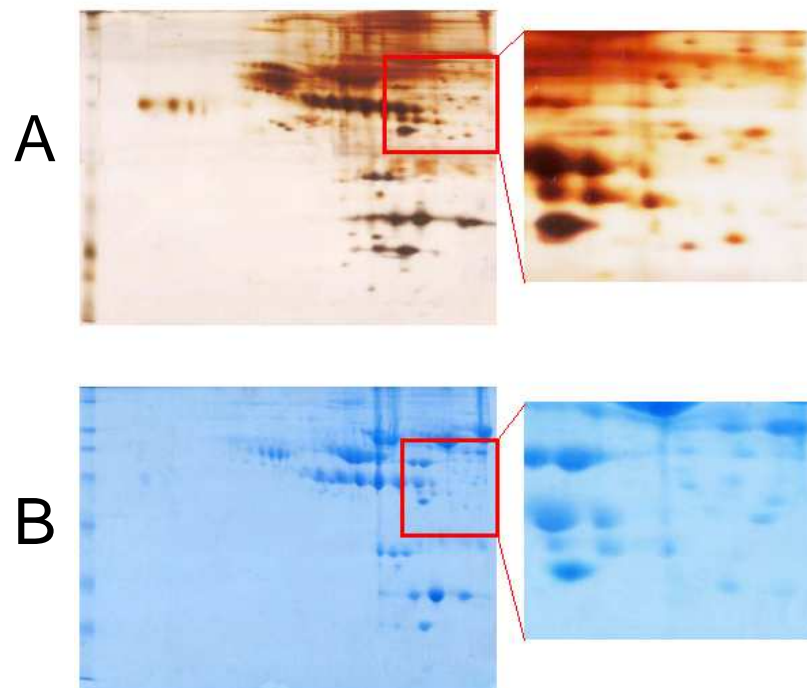


3.2.2. Die Coomassie Färbungen

Die Coomassie Färbungen wurden benutzt, um die im Gel enthaltenen Proteine reversibel anzufärben und sie dann ausschneiden und identifizieren zu können. Die Silberfärbung ist zwar eine empfindlichere Methode, um kleinere Proteinmengen anzufärben, jedoch bindet das Silber irreversibel an die Proteine, was deren Identifizierung erschwert.

Die Gele, die mit Coomassie-Blue® gefärbt wurden, wurden mit ca. 200-300 µg Protein pro Gel hergestellt. Jedoch war die Auflösungsqualität der Coomassie gefärbten Gele begrenzt. Es wurden nur große Proteinpunkte angefärbt. Die Gele konnten aber nicht mit unendlich viel Protein angefertigt werden, da sonst die Proteine das Gel überluden und die im Plasma enthaltenen Salze das Bild verschmierten. Kleine Punkte, die sich individuell von Mensch zu Mensch während der Pioglitazonbehandlung veränderten, wurden nicht identifiziert, denn sie konnten wegen ihrer geringen Menge in der Coomassie Färbung nicht angefärbt und somit nicht ausgeschnitten werden (Abb. 2).

Abb. 2: Das silbergefärbte Gel (A) lässt deutlich viele kleine Punkte in der Vergrößerung erkennen. In der Coomassiefärbung (B) jedoch gehen die Feinheiten verloren. Beide Gele wurden mit dem selben Plasma durchgeführt.



3.3 Die Identifizierung interessanter Proteine

3.3.1. Der Vergleich zwischen Gesunden und unbehandelten Diabetikern

Obwohl alle Diabetiker Proteinmuster mit leichten Unterschieden untereinander hatten, stellte sich die Frage, ob sie nicht doch alle eine bestimmte Proteinkonstellation im Vergleich mit Gesunden gemeinsam hatten. Das konnte nur im Vergleich zu gesunden Probanden herausgefunden werden. Darauf wurden Proben von sechs gesunden Probanden gewonnen, die sich im Alter von 22 bis 46 Jahren befanden.

Interessant war, dass Diabetiker und Gesunde trotz der Veränderungen, die der Diabetes im Körper bewirkt, nur wenige Abweichungen im Proteinprofil hatten. Die Veränderungen, die man zwischen den Diabetikern und den Gesunden feststellen konnte, gingen nur leicht über die Unterschiede, die es zwischen allen Probanden gab, hinaus. Es traten keine neuen Proteine auf. Am deutlichsten zeigten sich Konzentrationsveränderungen.

Diese Proteine waren bereits in der Literatur bekannt. Zum Beispiel hatten acht von zehn Diabetiker einen deutlichen Alpha1-Acid Glykoprotein (Orosomuroid) Punkt, der in Abb. 3 mit 1 (Abb. 3) gekennzeichnet ist. In Proteinkarten ist dieser Punkt oft ein größerer, verschwommener Punkt. Jedoch hatten die Gele eine so genaue Auflösung, dass sie sogar Orosomuroid-Glycosylierungen bei den meisten Patienten erkennen ließen, was bei Glycosilierungsstörungen vorkommen kann (Kleinert P et al., 2007), wie auf Abb. 3.1. dargestellt. Dieses Protein ist ein bekannter Entzündungsmarker (Engstrom et al., 2003). Fünf Gesunde hatten keinen Orosomuroidpunkt, nur ein einziger Gesunder hatte einen kleinen Punkt. Erst in der zweiten Reinigungsstufe konnte bei den meisten gesunden Probanden ein Orosomuroidpunkt gesehen werden. Das Transthyretin Multimer (Punkt 2, Abb. 3.2.) hatte, obwohl es ein negatives akute Phase Protein ist, bei Gesunden eine niedrigere Menge als bei Diabetikern. Der HDL-Punkt (Apolipoprotein A1) (Abb. 3.3.) ist bei Gesunden größer, was für einen normalen Fettstoffwechsel spricht. Diabetiker schienen mehr Haptoglobin Alpha 2 zu haben (Punkt 4, Abb. 3.4.). Bei den Gesunden wirkten die Haptoglobinbanden schwächer, die Punkte der Kette waren etwas kleiner. Auch war die Haptoglobin Alpha 1 Kette (mit 5 markiert, Abb. 3.5.) bei Gesunden schwächer.

Abb. 3: Vergleichsbild von einem Gesunden, einfach gereinigt. Auf dieser Grafik sind alle gefundenen Unterschiede markiert und werden in den Abbildungen 3.1. bis 3.5. im Vergleich mit einem durchschnittlich ausgefallenem Gel eines Diabetikers gezeigt. G = Gesunder, D = Diabetiker.

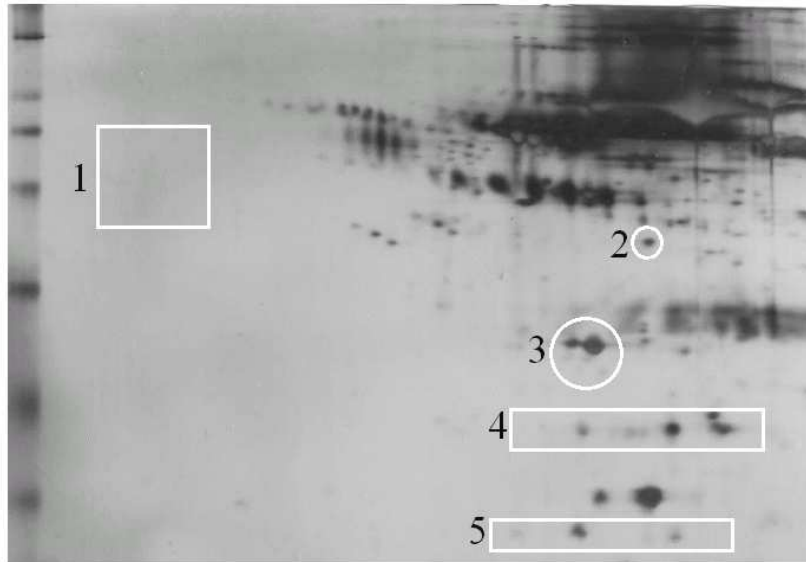


Abb. 3.1.
Alpha1-Acid-
Glykoprotein
(Orosomuroid)

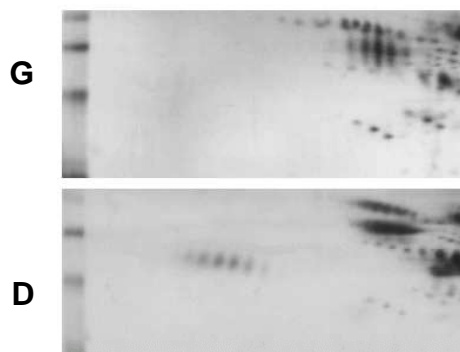


Abb. 3.2.
Transthyretin

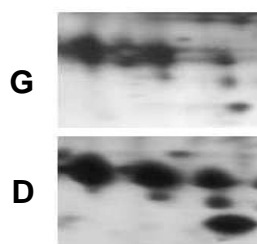


Abb. 3.3.
HDL
(Apolipoprotein A1)

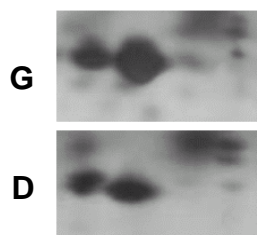
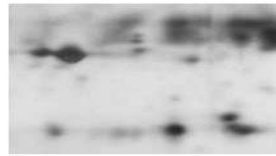


Abb. 3.4.
Haptoglobin
Alpha 2 Kette
(unten)

G



D

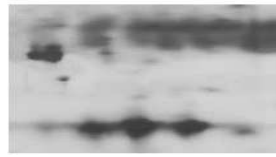
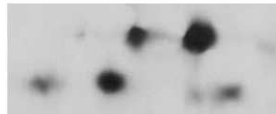


Abb. 3.5.
Haptoglobin
Alpha 1 Kette
(unten)

G



D



3.3.2. Das Proteom der Diabetiker unter sich im Vergleich

Hier sollen Unterschiede zwischen den Patienten untereinander angeführt werden, da dies den Großteil der veränderten Proteine darstellte. Der Vergleich fand von Proben vor der Therapie untereinander statt. Es zeigten sich insbesondere Unterschiede bei den kleinen Proteinen. Die Proteinmuster der Gele fielen nie gleich aus, da die Silberfärbung je nach Einwirkzeit Intensitätsschwankungen aufweist, die besonders bei dem Vergleich der hier auffälligen kleineren Punkte stark ins Gewicht fällt. Deshalb wurden diese nicht weiter beachtet. Patienten mit bekannter Nephropathie zeigten häufiger, besonders bei kleinen Proteinmengen, inkonstante Veränderungen während der Therapie im Proteom als Diabetiker ohne Nephropathie.

Man konnte keine deutlichen Korrelationen zwischen den Krankheiten und dem Proteom des Plasmas bei dieser kleinen Probandengruppe ziehen.

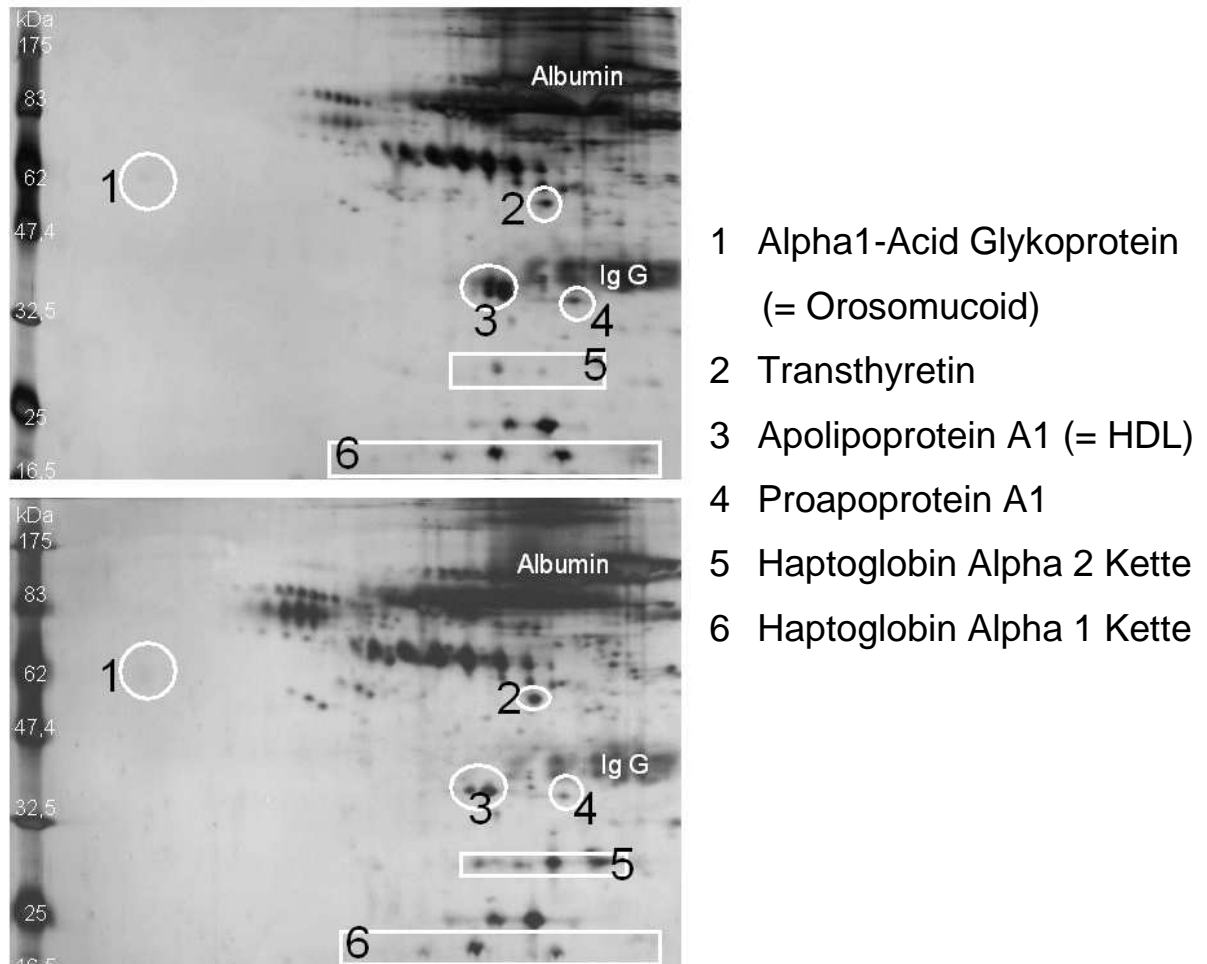
Folgende Punkte zeigten jedoch innerhalb der Diabetikergruppe ein verändertes Vorkommen von Individuum zu Individuum:

- Orosomuroid
- Transthyretin
- Haptoglobin Alpha 1 und 2 Kette
- Proapoprotein A1
- Apolipoprotein A1 (= HDL)

Besonders die Proteine des Lipidprofils (Apolipoprotein A1, Proapoprotein A1) und dem indirekten Entzündungsmaß (Haptoglobin: Engler R, 1995; Transthyretin: HE Birch and G

Schreiber, 1986) zeigten Veränderungen im Vorkommen (siehe Abb. 4.).

Abb. 4: Veränderte Proteine der untereinander verglichenen Diabetiker vor der Therapie, einfache Reinigung.



Besonders bei Haptoglobin zeigten sich bei zwei Patienten Auffälligkeiten. Haptoglobin ist ein tetrameres Glykoprotein, das in drei verschiedenen Phänotypen vorkommt, da die Alpha Kette zwei allele Formen hat, während die Beta Kette nur in einer Form vorkommt:

Haptoglobin Typ 1-1 bestehend aus den Ketten: 2x Alpha-1 und 2 Beta

Haptoglobin Typ 1-2 bestehend aus den Ketten: Alpha-1 und Alpha-2 und 2 Beta

Haptoglobin Typ 2-2 bestehend aus den Ketten: 2x Alpha-2 und 2 Beta

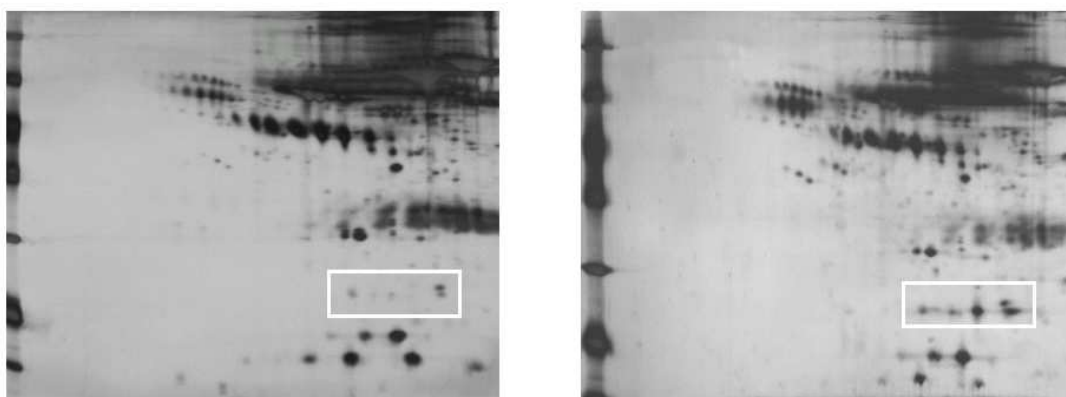
Alpha 1: 9 kDa; Alpha 2: 17,3 kDa; Beta: 35-40 kDa (je nach Glykosylierung)¹⁷

(Auf der obigen Abbildung ist der Größenmarker leicht verzerrt und daher nicht genau passend zu den angegebenen Größen.)

Bei zwei der zehn Diabetiker war das Proteinmuster an dieser Stelle stark verändert: Es schienen Proteine zu fehlen. Auf der unteren Abbildung erkennt man nur wenige Proteine auf Höhe der 17,3 kDa im Vergleich zum nebenstehenden Gel, das wie ein Großteil der Gele aussieht (Abb. 5).

Abb. 5: Gesamtansicht eines 15 % Gels, pH 4–8, einfache Reinigung.

Vorkommen der Haptoglobin Alpha 2 Kette bei 17,3 kDa bei verschiedenen Patienten.



Patient ohne Alpha 2 Kette

Patient mit Alpha 2 Kette

Die Haptoglobin Alpha Kette existiert in zwei Allelformen, dem Alpha 1 bei 9 kDa und dem Alpha 2 bei 17,3 kDa. Der Phänotyp 1-1 exprimiert die Haptoglobin Alpha 2 Kette nicht¹⁸. Die anderen Patienten hatten einen Haptoglobin Alpha 1-2 oder 2-2 Phänotyp. Die Haptoglobin 1-1-Allelform schien nicht mit dem Schweregrad des Diabetes zu korrelieren. Diese Aussage ist statistisch nicht aussagekräftig, da die Teilnehmerzahl (= zehn, davon nur zwei mit Haptoglobin 1-1 Typ) dieser Studie zu klein war. Die Alpha Haptoglobinkette veränderte ihre Struktur während der Therapie, wie es in Kapitel 3.3.4. noch genauer erläutert wird.

3.3.3. Der Vergleich der Diabetiker vor und nach der Behandlung mit Pioglitazon – Durch die Pioglitazontherapie veränderte Proteine

Vergleich der gereinigten Gele

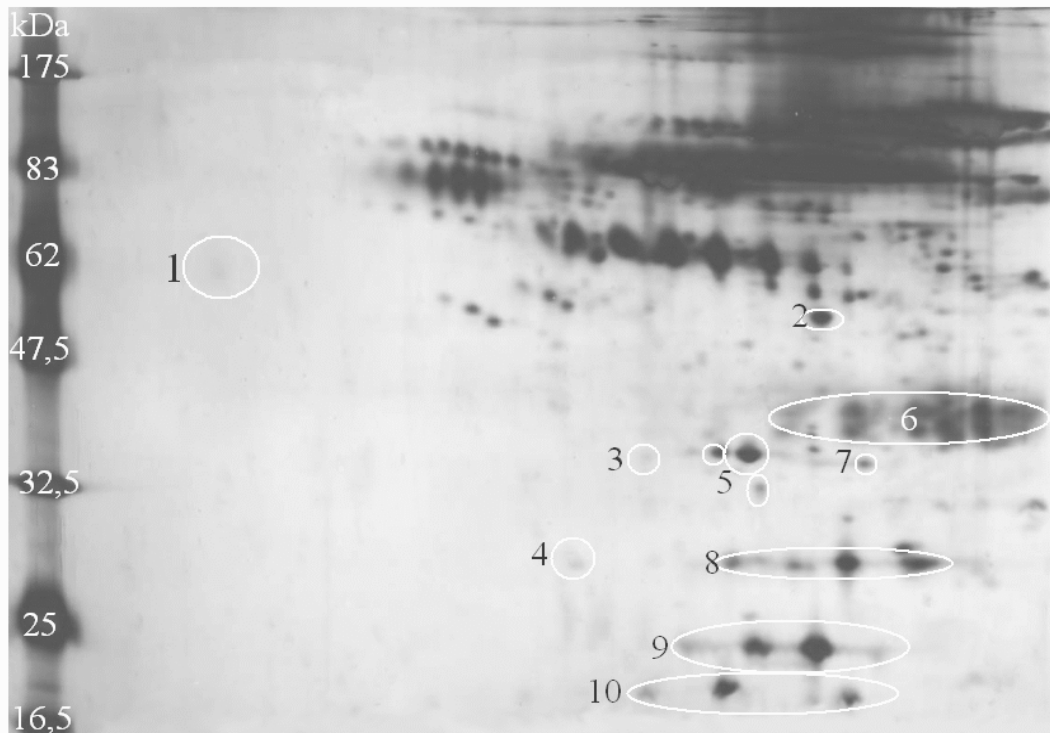
Die Gele der Plasmaproben der Patienten vor und nach 12 Wochen Behandlung wurden in der Silberfärbung miteinander verglichen. Das geschah manuell, ohne Computerprogramme an einem Leuchttisch. Alle Gele wurden in einer einfachen und einer zweifachen Reinigungsstufe angefertigt, um einige Proteine besser zu erkennen. Nach der

Behandlung neu aufgetretene oder verschwundene Punkte wurden auf präparativen Gelen durch Coomassie angefärbt, ausgeschnitten und mit MALDI/ TOF Analyse identifiziert. Diese Ergebnisse wurden dann zusätzlich mit den Datenbanken von ExPASy verglichen. Die Ergebnisse der einfachen und zweifachen Reinigungsstufe sollen hier zusammen dargestellt werden, da sie ähnliche Ergebnisse liefern.

Das Proteom der 10 Patienten erwies sich als relativ einheitlich trotz verschiedenster Krankheiten, Medikamenteneinnahmen, Krankheitsdauer und Altersstufen. Es zeigten sich beim genaueren Hinsehen viele kleine Schwankungen bei den verschiedenen Probanden und im Verlauf der 12 Wochen auch bei den gleichen Patienten. So gab es Schwierigkeiten, die Gele und die Veränderungen während der Behandlung unterhalb aller Patienten genau miteinander zu vergleichen. Ein Punkt, der bei allen Proben neu auftritt oder verschwindet konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Bei den meisten Patienten änderte sich das Proteom nach der Behandlung nur im Bereich sehr kleiner Punkte. Die in den verschiedenen Reinigungsstufen bei einzelnen Patienten entdeckten Regulationen der kleineren Proteine wurden jedoch nicht weiter untersucht, da die Veränderungen nie bei mehr als einem Patienten auftraten. Außerdem waren die Proteine zu klein für eine Analyse und versprachen keine interessanten Ergebnisse.

Zusätzlich wurden Proteine identifiziert, die stärkere Schwankungen von Mensch zu Mensch und während der Therapie zeigten, die bereits in der Literatur beschrieben wurden.

Abb. 6: Gefärbtes 15 %iges Gel, auf dem alle identifizierten Proteine eingetragen sind. Die durch die Therapie veränderten Proteine sind 1,3,4,8,9,10. Alle anderen Proteine wurden identifiziert, da sie sich innerhalb der untersuchten Gruppe unterschieden.



Identifizierte Punkte:

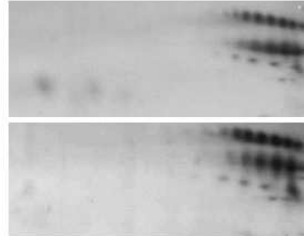
- 1 Alpha1-Acid Glykoprotein (= Orosomucoid, Abb. 6.1.)*
- 2 Transthyretin Multimer
- 3 Ig J Kette (Abb. 6.2.)*
- 4 Hämapexin Fragment (Abb. 6.3.)*
- 5 Apolipoprotein A1 (= HDL)
- 6 Ig G leichte Ketten
- 7 Proapoprotein A1
- 8 Haptoglobin Alpha 2 Kette (Abb. 6.4.)*
- 9 Transthyretin Monomer (Abb. 6.5.)*
- 10 Haptoglobin Alpha 1 Kette (Abb. 6.6.)*

* = Diese Proteine werden durch die Pioglitazonbehandlung verändert.

Es wurden insgesamt 6 Punkte durch die Pioglitazonbehandlung reguliert. Diese waren:

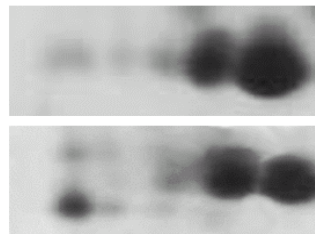
- (Punkt 1, Abb. 6.1.) Alpha1-Acid Glykoprotein (= Orosomuroid, unten links im Bild): Senkungen bei 4 Patienten

Abb. 6.1.: Vor
Behandlung
Nach
Behandlung



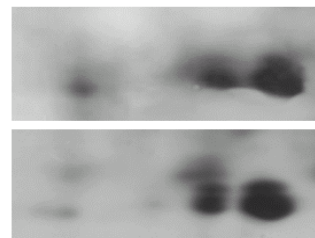
- (Punkt 3, Abb. 6.2.) Ig J Kette: Steigerungen bei 3 Patienten

Abb. 6.2.: Vor
Behandlung
Nach
Behandlung



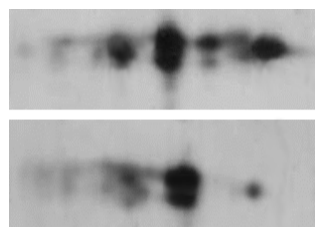
- (Punkt 4, Abb. 6.3.) Hämopexin: Senkungen bei 3 Patienten

Abb. 6.3.: Vor
Behandlung
Nach
Behandlung

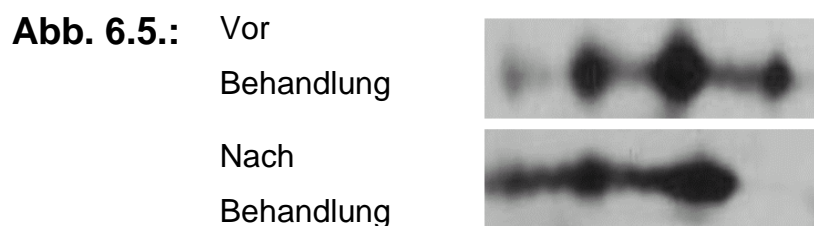


- (Punkt 8, Abb. 6.4.) Haptoglobin Alpha 2 Kette: Senkungen bei 3 Patienten

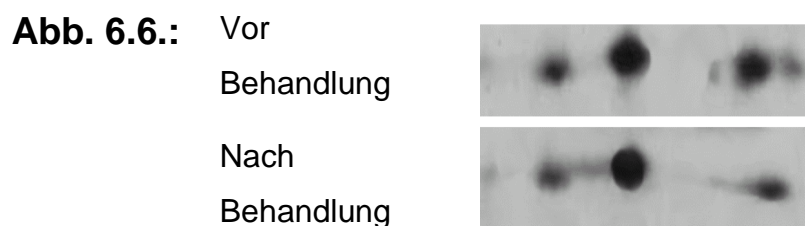
Abb. 6.4.: Vor
Behandlung
Nach
Behandlung



- (Punkt 9, Abb. 6.5.) Transthyretin: Senkungen bei 2 Patienten



- (Punkt 10, Abb. 6.6.) Haptoglobin Alpha 1 Kette: Senkungen bei 2 Patienten



Orosomuroid (= Alpha1-Acid Glykoprotein; Punkt 1 in Abb. 6, Abb. 6.1.): Bei acht von zehn der mit Pioglitazon behandelten Diabetikern konnte in der 2D-Gelelektrophorese nach einfacher Reinigung zur Entfernung von Albumin und Ig G ein Orosomuroidpunkt identifiziert werden. Die restlichen zwei Patienten hatten nur sehr wenig bis gar kein Orosomuroid. Vier der acht Patienten zeigten eine deutliche Reduktion von Orosomuroid nach der zwölfwöchigen Behandlung mit Pioglitazon. Das ist interessant, da alle sechs gesunden Gegenproben keinen oder nur einen gerade sichtbaren Orosomuroidpunkt hatten.

Transthyretin Multimer (Punkt 2 in Abb. 6): Dieser Punkt änderte während der Untersuchung von Person zu Person seine Intensität. Auch veränderte er sich während der zwölfwöchigen Behandlung bei den verschiedenen Gelen der selben Patienten. Er schien jedoch keine bestimmte Tendenz im Zusammenhang zur Pioglitazonbehandlung zu haben.

Ig J Kette (Punkt 3 in Abb. 6, Abb. 6.2.): Der Punkt veränderte sich bei vier Patienten, wobei es bei dreien nach der Behandlung anstieg und bei einem Patienten abfiel. Die verminderte Konzentration des Ig J zeigte sich nur bei einem Patienten in der zweifachen Reinigungsstufe. Hier ist eher mit einer Verfälschung durch die Reinigungsmethode zu rechnen.

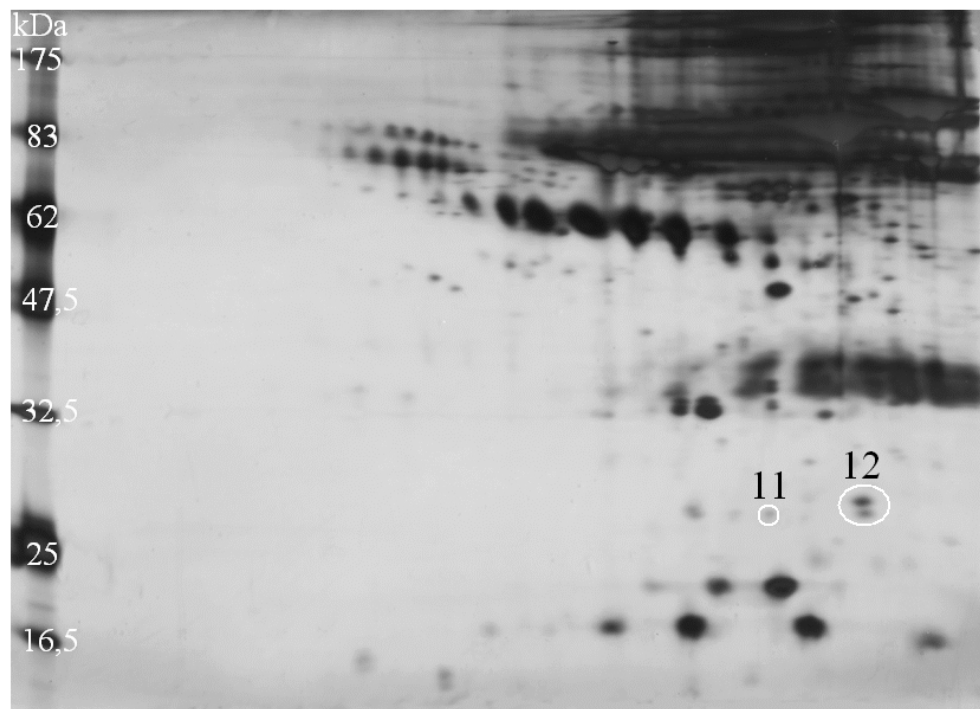
Hämopexin Fragment (Punkt 4 in Abb. 6, Abb. 6.3.): Dieser Punkt veränderte sich bei fünf Patienten. Es stieg nach der Behandlung bei einem Patienten in der ersten Reinigungsstufe und bei einem anderen in der zweiten Reinigungsstufe an. Die Konzentration sank bei drei verschiedenen Patienten. Bei einem dieser Patienten war die verringerte Menge in beiden Reinigungsstufen sichtbar. Somit konnte ein Effekt nachgewiesen werden.

Apolipoprotein A1 (= HDL, Punkt 5 in Abb. 6) stieg bei einem Patienten. Bei drei Probanden verschwand ein Punkt im basischen Bereich der Haptoglobin Alpha 2 Kette (Punkt 8 in Abb. 6, Abb. 6.4.).

Das Transthyretin Monomer bei 25 kDa (Punkt 9 in Abb. 6, Abb. 6.5.): Bei zwei Patienten wird ein Punkt dieser Bande nach der Behandlung kleiner. Der letzte Punkt der Haptoglobin Alpha 1 Kette verblasste bei zwei Patienten (Punkt 10 in Abb. 6, Abb. 6.6.).

Bei zwei der Patienten war die Haptoglobin Alpha 2 Kette nicht vorhanden und offenbarte vorher verdeckte Proteine (Abb. 7).

Abb. 7: Plasma eines Probanden ohne die Haptoglobin Alpha 2 Kette (entsprechend Punkt 8 in Abb. 6). Die hier sichtbaren Proteine 11 und 12 werden normalerweise von der Alpha 2 Kette überdeckt.



Identifizierte Punkte bei fehlender Haptoglobin Alpha 2 Kette:

- 11 Beta Globin
- 12 Alpha 1 Antitrypsin

Diese Punkte zeigten immer stabile Konzentrationen.

3.3.4. Vergleich der Diabeteskomplikationen mit dem Proteomen der Diabetiker untereinander

Aus den Patientendaten konnte man keine Prognose abgeben, welche Komplikationen des Diabetes anhand der beobachteten Veränderungen am besten auf die Pioglitazontherapie angesprochen haben. Es wurden hierbei das Vorkommen von Apoplexie, Polyneuropathien, Nephropathien, Retinopathien und Arteriosklerosemanifestationen berücksichtigt. Bei den Diabeteskomplikationen lässt sich bei dieser inhomogenen und kleinen Gruppe kein eindeutiger Zusammenhang zum Proteom finden. Jedoch hatten zwei Patienten, bei denen eine Arteriosklerose sicher ausgeschlossen werden konnte, kein Orosomuroid im Plasma. Weiterhin fiel auf, dass bei Patienten mit Nephropathie das Proteinmuster eher inkonstant ist. Das spricht für eine Beteiligung der Nierenfunktion am Proteom des Plasmas.

Bei dem Vergleich der Diabetesfolgen mit den Formen der Haptoglobinbanden fiel auf, dass ein Zusammenhang zwischen der Haptoglobin Alpha 2 Kette mit der Inzidenz von Arteriosklerose bestand. Die Probanden, bei denen die Haptoglobinpunkte im Vergleich zur Gesamtfärbung stärker konzentriert wirkten, hatten Arteriosklerose. Die zwei Patienten mit dem 1-1 Allel hatten beide Arteriosklerose.

3.3.5. Die erweiterte Gelserie: Bis 7 kDa, pH 3-10 mit 20 %igen Gelen

Da sich nur wenige und zudem bereits bekannte Proteine während einer Pioglitazontherapie veränderten, wurde die Suche nach regulierten Proteinen auf einen größeren Proteinbereich ausgeweitet. Zu diesem Zweck wurden 20 %ige Gele für eine Proteingröße von ca. 80 bis 7 kDa und einem pH von 3 bis 10 angefertigt. Hier wurden ebenfalls zusätzlich Gesunde mit Diabetikern verglichen.

Diabetiker hatten untereinander Schwankungen vor und nach der Therapie in der Intensität von Punkten, die kleiner als 15 kDa waren. Diese veränderte Proteine konnten (siehe Abb. 8 und 9) als Apolipoproteine oder LDL identifiziert werden. Ein Punkt in diesem Bereich fiel besonders auf, da er bei einigen Diabetikern fehlte oder starke Intensitätsschwankungen zeigte. Dieser Punkt konnte als Profilin-1 identifiziert werden (Abb. 8 und 9).

Abb. 8: Veränderte Proteine im 20 %igem Gel.

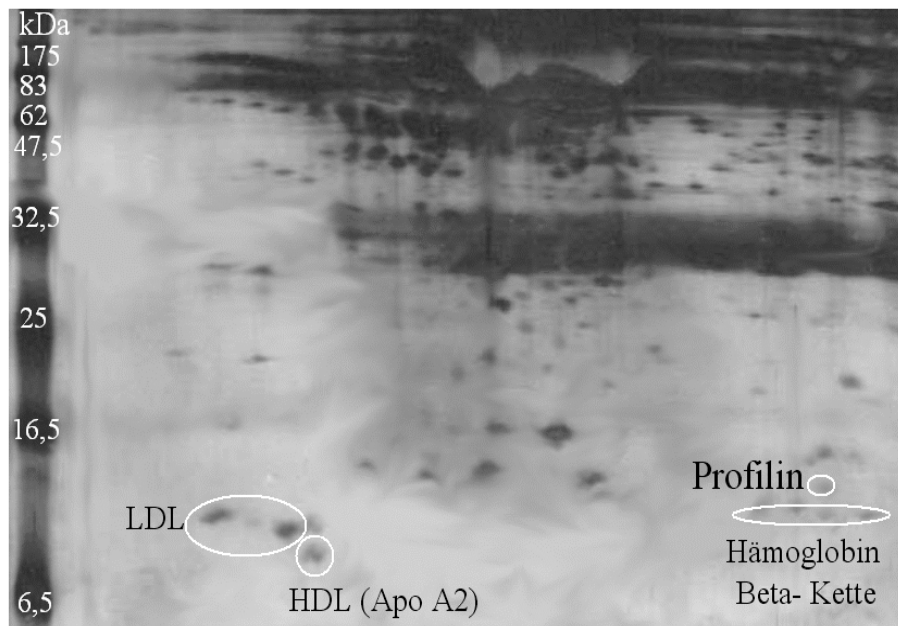
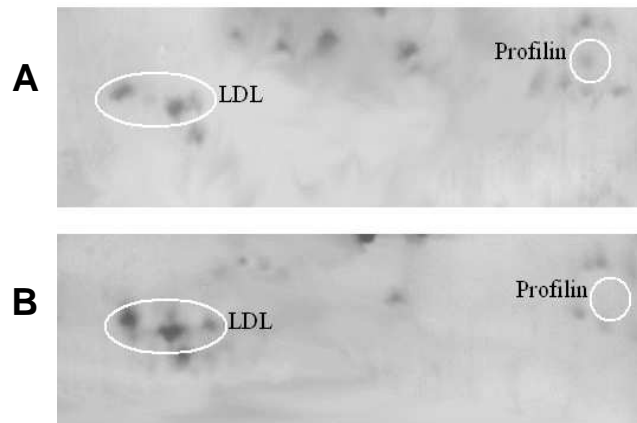


Abb. 9: Vergleichsgel zur Abbildung 8.

Dargestellt ist der Bereich von 6-16 kDa. Gel A zeigt einen gesunden Probanden, Gel B einen Diabetiker. Man kann bei dem Diabetiker deutlich das vermehrte LDL und das verminderte Profilin erkennen.

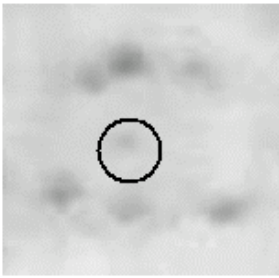


3.3.5.1. Unterschiede zwischen Gesundem und Diabetiker in den 20 %igen Gelen:

Die Identifizierung des Profilins

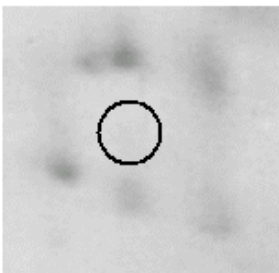
Um die gefundenen Schwankungen im Profilingehalt deutlich zu machen, wurde folgender Vergleich (Abb. 10) der 2D-Gelelektrophoresen mit ungereinigtem Plasma angefertigt, um Effekte der Reinigung auszuschließen. Man sieht deutlich den Unterschied zwischen einem Gesundem und einem Diabetiker. Die Punkte liegen im gleichen Gebiet des Gels, jedoch sind sie durch leicht verschiedene Laufverhalten der Gele an etwas anderen Stellen.

Abb. 10: Profilinpunkte eines Gesunden und Diabetikers im Vergleich, ungereinigtes Plasma, Ausschnitt aus einem 20 %igem Gel.



Gesunder Mensch:

Hier erkennt man den schwarz umrandeten Proteinpunkt, der als Profilin identifiziert wurde.



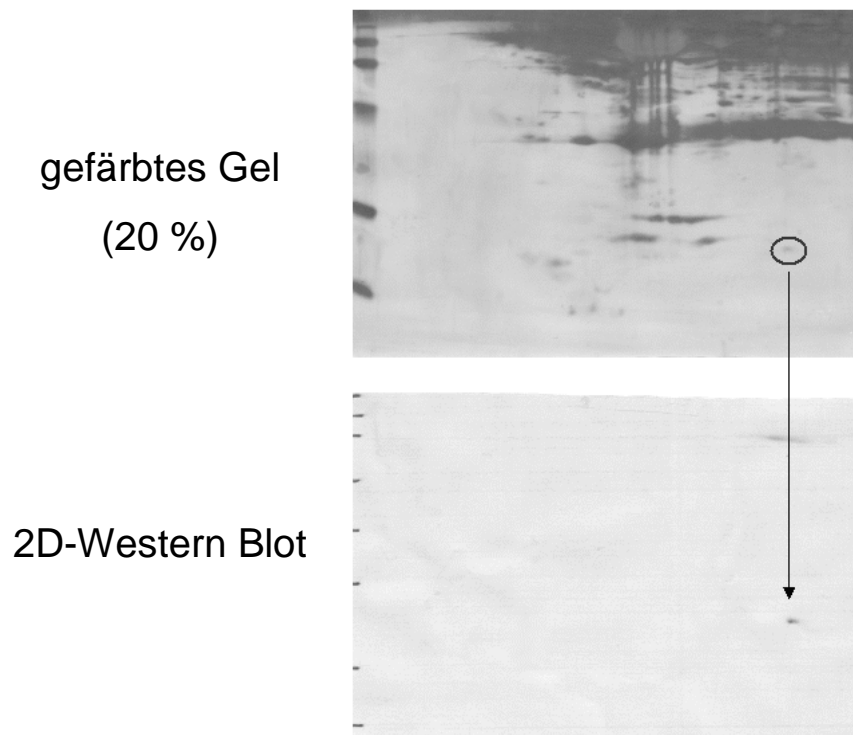
Diabetiker:

Der Profilinpunkt ist nicht sichtbar.

Er müsste sich an der schwarz umrundeten Stelle befinden.

Generell kann man in den 2D-Gelelektrophoresen starke Schwankungen des Profilinspiegels unter den Gesunden und unter den Diabetikern erkennen. Es zeigte sich jedoch immer die Tendenz, dass Gesunde einen größeren Profilinpunkt hatten. Die Identifikation des Profilins wurde durch einen 2D-Gelelektrophorese-Western-Blot bestätigt (Abb. 11). Darauf wurde ein Western Blot aller untersuchten Probanden und Gesunden gemacht, um den Profilin Gehalt der Proben genauer zu vergleichen.

Abb. 11: 2D-Gelelektrophorese-Western-Blot mit Anti-Profilin-1 verglichen mit der Silberfärbung des gleichen Gels.



3.4. Western Blot mit dem Profilin-1 Antikörper

3.4.1. Profilin wird im Plasma von Gesunden und Diabetikern nachgewiesen

Die Plasmaproben von Diabetikern und gesunden Menschen wurden mit dem Western Blot auf die Profilinmenge hin untersucht. Da die Nachweise des Profilins in der 2D-Gelelektrophorese mit dem einfach gereinigtem und ungereinigtem Plasma stattfanden, wurde die Versuchsreihe der Western Blots deshalb mit den gleichen Proben durchgeführt. Es erwies sich als optimal, je 15 µg gereinigtes oder verdünntes Plasma pro Tasche zu verwenden.

Der Nachweis von Profilin erfolgte nach Antikörperbehandlung mit dem ECL-System.

Nur die Plasmaproben der sechs Gesunden zeigten im einfach gereinigten und ungereinigten Plasma Signale. Bei Diabetikern konnten so keine Profilinbanden gefunden werden. Daher wurden die Blots noch mit Advanced ECL behandelt, was rund zehnmals empfindlicher ist. Erst mit diesem ECL-System konnte Profilin auch bei Diabetikern nachgewiesen werden, allerdings in viel geringeren Mengen als bei Gesunden.

Die gesunden Menschen um die Zwanzig hatten größere Schwankungen untereinander als die in der fünften Lebensdekade stehenden Gesunden (Abb. 12, Probanden 4,5,6). Alle Gesunden hatten einen BMI unter 30.

Abb. 12: Plasma von gesunden Probanden im Alter von 22-46 Jahren. Alle haben trotz identischer Proteinmengen im Ponceau S verschiedene Mengen von Profilin im Western Blot mit Anti-Profilin. Die Probanden sind dem Alter nach geordnet. Die Ältesten stehen links, das Alter sinkt von links nach rechts.

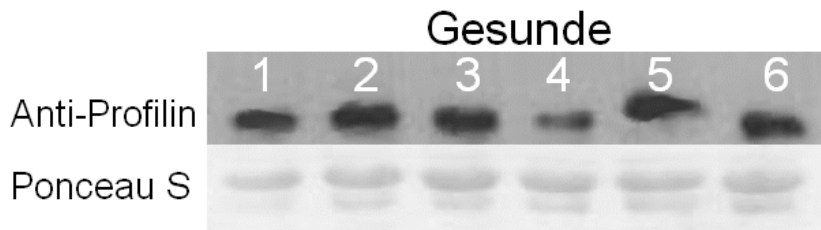
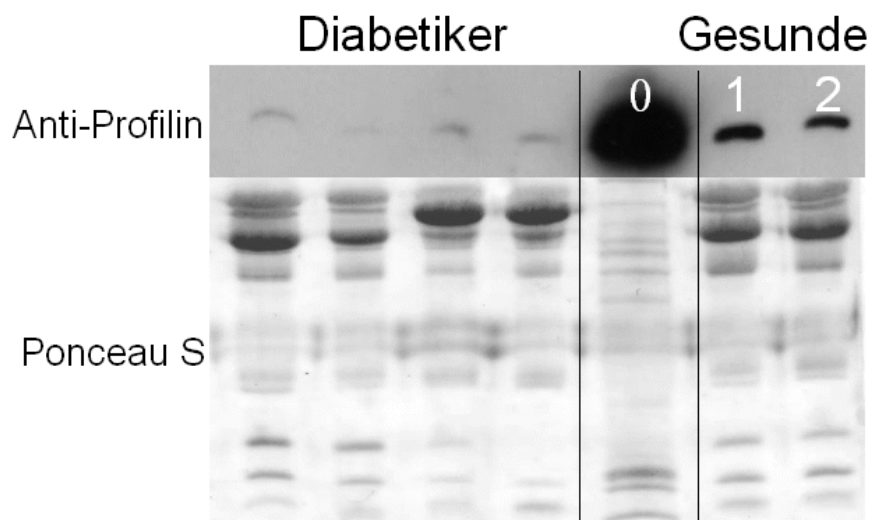


Abb. 13: Gereinigtes Plasma von gesunden Patienten (entsprechend Proband 1 und 2 in Abb. 12) im Vergleich zu Diabetikern: Die gesunden Probanden stellen sich auf dem Bild überexponiert dar. Sie zeigten schon mit dem einfachen ECL-System Signale. Die Diabetiker haben sehr schwache Signale. Mit Jurkat-Zellen-Gesamtproteinextrakt (= 0) ist der Vergleichsstandard für den Profilinantikörper markiert.



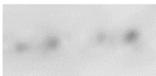
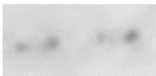




























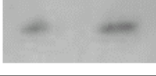
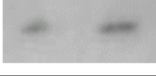


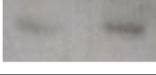
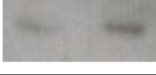




3.4.2. Ergebnisse der Patienten 1-10 als Western Blots mit Profilinantikörpern

Die Proben der Diabetiker, die von vor und nach der Behandlung stammen, wurden paarweise nebeneinander geblottet (alles in der 1x gereinigten Stufe). Es zeigte sich die Tendenz, dass Profilin bei sieben von zehn Patienten nach Behandlung ansteigt (Abb. 14). Als Vergleichsstandart auf jedem Blot diente immer dasselbe Plasma eines gesunden Probanden. Um eine mögliche Beeinträchtigung der Proben durch die Reinigungsschritte auszuschließen, wurden danach Blots mit ungereinigtem Plasma gemacht. Dieses wurde in PBS (1 : 10) verdünnt, da die Proteine im Plasma zu konzentriert waren und nicht im Messbereich des Proteinbestimmungsverfahrens lagen.

Bei dem Vergleich der Patientendaten konnte kein Zusammenhang zwischen dem Profilinspiegel und den Erkrankungen, der Diabetesdauer, dem Alter, den kardiovaskulären Komplikationen oder dem Gewicht gezogen werden. Zehn Patienten sind für solch eine Aussage eine zu kleine Stichprobe, um signifikante Aussagen zu bekommen.

Abb. 14: Western Blots mit 15 µg Protein aus einfach gereinigtem und ungereinigtem Plasma.

A bezeichnet jeweils den Zustand vor Behandlung, B nach 12 Wochen Behandlung mit Pioglitazon. Die Versuche wurden je mit einfach gereinigtem Plasma und ungereinigtem Plasma gemacht. Die Ergebnisse fielen bei allen 10 Patienten unabhängig von der Reinigung gleich aus. Der gleichmäßige Auftrag von Proteinmengen wurde durch Ponceau S-Färbung verifiziert.

Patient	Ungereinigt		Gereinigt		Veränderung durch die Behandlung
	A	B	A	B	
1					bleibt gleich
2					bleibt gleich
3					steigt
4					kein Profilin nachweisbar
5					steigt
6					steigt
7					steigt
8					steigt
9					steigt
10					steigt

3.5. Proben von 50 Patienten, an welchen eine Herzkatheter-Untersuchung durchgeführt wurde

Nun schien es interessant, zu überprüfen, wie bei einer größeren Untersuchungsgruppe von Diabeteskranken der Profilinspiegel aussieht. Solche Proben konnten nicht gewonnen werden. Da aber Diabeteskranken oft kardiovaskuläre Komplikationen haben, wurden zu

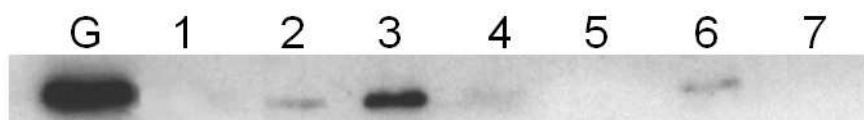
Studienzwecken freigegebene Proben aus dem Marburger Herzkatheterlabor verblindet und gegen eine gesunde Probe, die als Standard diente, untersucht. Alle Patienten litten unter einer mehr oder weniger manifesten koronaren Herzkrankheit. Leider stand kein Plasma eines gesunden 60-70-Jährigen Probanden ohne Gefäßkrankheiten als gesunde Gegenprobe zur Verfügung. Da jedoch die gesunden Proben von Zwanzig bis Mitte Vierzig alle einen ähnlichen Profilingehalt hatten, schien dieses Vorgehen vertretbar.

3.5.1. Western Blot mit Profilin, ECL Advanced, von 50 Patienten des Herzkatheterlabors

Es wurden 50 konsekutive Proben aus Dezember 2004 (8.12.-20.12.2004) untersucht: 11 Frauen und 39 Männer. 40 der untersuchten Patienten waren an einer KHK erkrankt, 10 hatten eine noch nicht manifeste KHK. Der jüngste Untersuchte war 24, der Ältteste 85 Jahre. Der Median lag bei 64 Jahren. Es wurde in den angefertigten Western Blots 15 mal Profilin exprimiert (7 stark, 8 schwach), das entspricht einer Rate von 30 %. Die Blots wurden mit dem sensitivsten ECL (Advanced) System und Filmen entwickelt, die im Labor zur Verfügung standen. Eine Aufteilung in die Untergruppen von Profilin „stark exprimiert“ und „niedrig exprimiert“ erschien aufgrund der kleinen Fallzahl als nicht sinnvoll. Patienten aus dieser Gruppe hatten bemerkenswert oft gar keinen nachweisbaren Profilinspiegel. Bei der zuerst untersuchten Diabetikergruppe war das nur in einem Fall von zehn so (Abb. 15).

Abb. 15: Proben der Patienten einer Herzkatheter-Untersuchung.

Die Patienten, die einer diagnostischen Herzkatheter-Intervention unterzogen wurden (Proben 1-7), exprimierten wenig bis gar kein Profilin. Die Probe eines Gesunden (G) wurde auf allen Blots dieser Reihe als Vergleichsstandart aufgetragen.



3.5.2. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse des Profilingehaltes im Plasma wurden einem Statistiker übergeben, der die Blutfettwerte und andere Parameter zu Verfügung hatte. Diese Werte wurden mit dem

Vorkommen von Profilin-1 im Plasma korreliert. Der Profilin Gehalt wurde mit dem Geschlecht, der Schwere einer KHK, den Lipidwerten, dem BMI und dem Alter korreliert.

Statistisch signifikante Unterschiede konnten gezeigt werden für:

- HDL (bei Profilin-Expression höher)
- BMI (bei Profilin-Expression höher)

Tendenzielle Unterschiede zeigten sich nicht signifikant für:

- Triglyzeride (bei Profilin-Expression niedriger)
- Apo A-I (bei Profilin-Expression höher)

Es ergab sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Altersgruppen. Profilin war geschlechtsunabhängig. Aufgrund der kleinen Fallzahl sind die Ergebnisse mit Vorsicht zu bewerten. Die Tendenzen sind jedoch spannend.

Da sich die Frage stellte, wo die Quelle für das bei Gesunden und bei Diabetikern nach der Pioglitazonbehandlung erhöhte Profilin lag, wurden weitere Literaturrecherchen unternommen. Obwohl die Leber der Produktionsort der meisten Proteine im Blut ist, schien es sinnvoll, den Profilin Gehalt in dem dem Blut naheliegendsten und von einem Diabetes mellitus am meisten in Mitleidenschaft gezogenen System zu untersuchen – dem Gefäßendothel.

3.6. Profilinvorkommen im menschlichem Endothel: Der immunhistochemische Nachweis

Mit Hilfe der Immunhistochemie wurde das Profilinvorkommen in Gefäßen von vier diabetischen Ober- bzw. Unterschenkelamputaten untersucht. Zum Vergleich diente ein Amputat eines Nicht-Diabetikers der gleichen Altersklasse. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Amputation 62, 68, 72 und 89 Jahre alt. Der Nicht-Diabetiker war 76 Jahre alt. Alle litten an pAVK. Der Nicht-Diabetiker war starker Raucher und wurde wegen einer Gangrän des Fußes infolge der pAVK amputiert. Bei allen Patienten konnte eine Intimafibrose mit Mediaverkalkungen festgestellt werden. Es zeigte sich, dass gerade in den arteriosklerotischen Plaques große Profilinmengen vorkommen (Abb. 16).

Bei allen folgenden Bildern gilt: Die durch den Antikörper braun gefärbten Gewebe enthalten Profilin.

Abb. 16: Profilin-positive (braun) arteriosklerotische Ablagerungen in der Gefäßwand. Das Profilin liegt in den arteriosklerotischen Kalkspangen. Rechts ist das Endothel mit dem Gefäßlumen sichtbar. L = Gefäßlumen, E = Endothel, rot umrandet ist Profilin, das von einer Kalkformation umschlossen ist.



Dieser Befund war in allen arteriosklerotischen Plaques bei den Diabetikern sichtbar. Im Präparat des Nicht-Diabetikers waren keine größeren arteriosklerotischen Kalkspangen und auch kein Profilin sichtbar. Weiterhin konnte man feststellen, dass Profilin sich verstärkt im Endothel findet. Besonders kleinere Gefäße hatten bei allen Patienten stärker profilinhaltiges Endothel (Abb. 17).

Abb. 17: Das einschichtige Endothel (rot markiert) ist Profilin-positiv (braun) gefärbt. Das Lumen erscheint hell.



Folgende Bilder zeigen sich als interessante Nebenfunde:

Zellen, die sich viel bewegen, wie Fibroblasten, Thrombozyten und Lymphozyten zeigen eine Profilin-positive Reaktion (Abb. 18). Auch finden sich bei allen Patienten um die Muskelfasern herum profilinhaltige Strukturen (Abb. 19). Im Muskel selbst sind die gestreiften Myofibrillen deutlich Profilin-positiv (Abb. 20).

Abb. 18: Genau in Mitte ist ein Fibroblast (mit F markiert) und darüber ein Lymphozyt (mit L markiert) zu sehen. Beide sind Profilin-positiv. Unten rechts ist auch ein kleines Gefäß (= G) angeschnitten, dessen Intima ebenfalls Profilin-positiv reagiert.



Abb. 19: Profilinhaltige Zellen (Pfeile), die um Muskelfasern angeordnet sind.

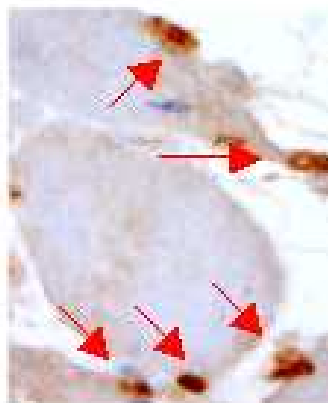
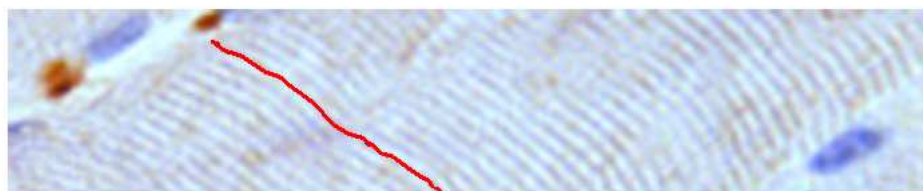


Abb. 20: Im Muskel selbst kann man dunkle, Profilin-positiv reagierende Myofibrillen erkennen. Eine der Myofibrillen ist zur Besseren Darstellung rot hervorgehoben.



3.6.1. Der Vergleich zwischen Diabetikern und Gesunden

Alle Patienten hatten wegen einer mehr oder minder ausgeprägten Arteriosklerose Plaques in den größeren Gefäßen. Bei dem Gesunden war das Endothel geringer profilinhaltig. Wegen der Gangrän und der folgenden Entzündung sind gerade in diesen Präparaten viele Immunzellen zu erkennen, was die Vergleichbarkeit einschränkte.

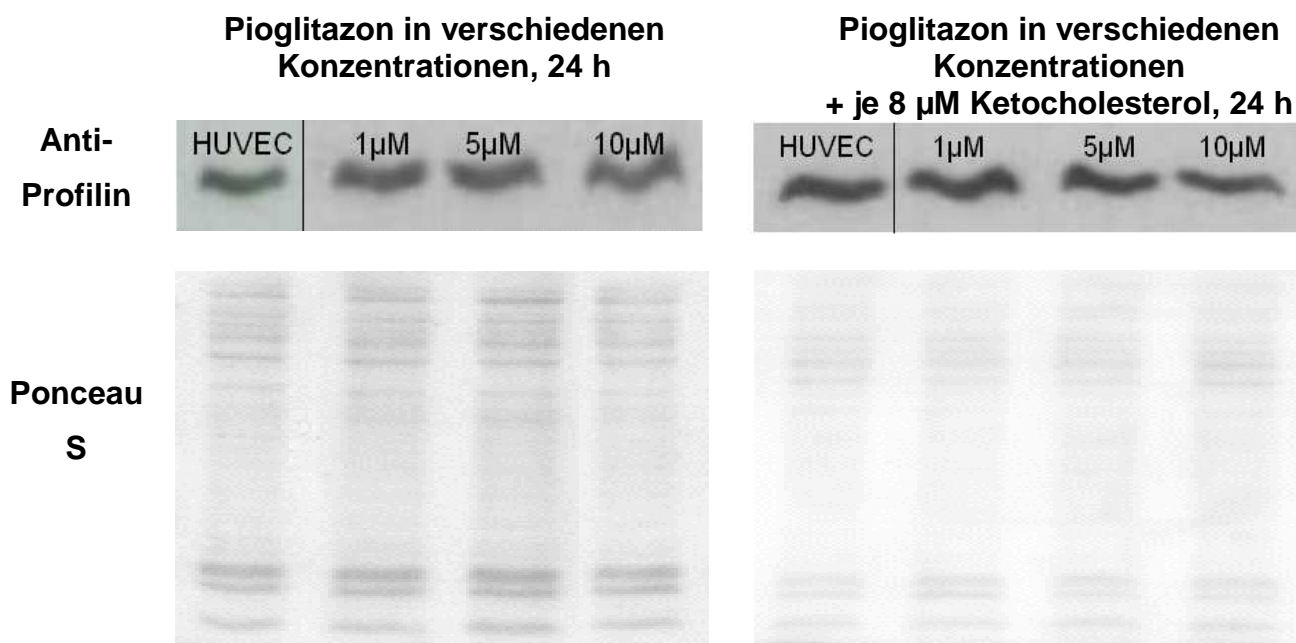
3.7. Versuche mit Pioglitazon und HUVEC Zellen

Da das Endothel eines Stoffwechselkranken anderen Reizen als das eines Gesunden ausgesetzt ist, wurde versucht, solche Situationen im Zellmodell zu simulieren. So wurde überprüft, ob die veränderten Profilinspiegel der Diabetikergruppe und der KHK-Patienten auf eine endotheliale Dysfunktion oder die diabetische Stoffwechsellaage zurückzuführen sind. Außerdem war es interessant zu klären, wie sich Pioglitazon in verschiedenen Konzentrationen auf den Endothelstoffwechsel auswirkt.

3.7.1. Vorversuche zur Bestimmung der geeigneten Konzentrationen und Inkubationszeiten

In Voruntersuchungen wurde nachgewiesen, in welchen Konzentrationen sich Pioglitazon auf den Profilinspiegel auswirkt und welche Zeit erforderlich ist, um eine Wirkung zu entfalten: Zuerst liefen die Versuche über 24 h. Die Zellen wurden mit verschiedenen Pioglitazonkonzentrationen (1, 5, 10 μM) behandelt, dann ein Gesamtproteinextrakt hergestellt. Es wurden 10 μg Protein pro Bahn geladen und mit ECL Advanced entwickelt. Es zeigte sich im Vergleich zu unbehandelten HUVEC Zellen kein Effekt auf die Profilinmengen bei verschiedenen Pioglitazonkonzentrationen. Ebenfalls für 24 h wurden HUVEC Zellen mit den gleichen Pioglitazonkonzentrationen (1, 5, 10 μM) und zusätzlich 8 micromolar Ketocholesterol behandelt. Ketocholesterol wurde gewählt, da es bei einer diabetischen Stoffwechsellaage und oxidativem Stress vermehrt vorkommt (Ferderbar S et al., 2007). So konnte man nachweisen, ob Pioglitazon in Kombination mit Ketocholesterol einen veränderten Wirkungseintritt im Vergleich zu den nur mit Pioglitazon behandelten Zellen zeigt. Es wurde mit 10 μg Protein pro Bahn geblottet und mit ECL Advanced entwickelt. Hier ergab sich keine bis eine nur leichte Verringerung des Profilinspiegels bei 10 μM Pioglitazonzusatz (Abb. 21).

Abb. 21: Die unbehandelten Zellen sind als „HUVEC“ gekennzeichnet. Über den Bahnen kann man die Konzentration, in der Pioglitazon bzw. Ketocholesterol beigefügt wurde, ablesen. Inkubationszeit: 24 h.



Da sich nach 24 h Inkubationszeit keine Veränderungen des Profilin gehaltes der Zellen zeigte, wurden die Versuche auf 48 h ausgedehnt. Bei der Zellernte nach 48 h waren die Zellen nur noch ca. 30-50 % konfluent. Somit war die geerntete Zellmenge klein. Die im Medium gelösten Proteine waren sehr verdünnt, so dass nur durch eine Acetonfällung Proteinmengen messbar waren. Nach 48 h Behandlung und Blots mit 5 µg Protein pro Bahn (wegen besserer Handhabung) blieb der Profilinspiegel bei 1 µM und 5 µM Pioglitazonzusatz relativ gleich. Er sank bei 10 µM. Zellen, die nur mit Ketocholesterol behandelt wurden, zeigten einen niedrigeren Profilinspiegel. Wenn 1 µM Pioglitazon in Kombination mit 8 µM Ketocholesterol zugegeben wurde, blieb der Spiegel so, als ob nur Ketocholesterol zugefügt worden wäre (Abb. 22 A). Die Aktin-Blots dazu wiesen gleiche Mengen pro Tasche aus.

Da Glukose und Ketocholesterol den Profilinspiegel verändern können (Tojo H, 2003; Clarkson MR et al., 2002; Romeo G et al., 2004), wurde für den folgenden Versuch ein fettsäure- und glukosearmes Medium gewählt, um Effekte auszuschließen, die bereits die Stoffe bewirken, die im Medium enthalten waren. Man verwendete höhere Mengen an Pioglitazon oder Ketocholesterol, da ein besseres Ansprechen der Zellen auf höhere Pioglitazonkonzentrationen vermutet wurde. Die Zellen wurden 48 h mit 0, 10 und 40 µM

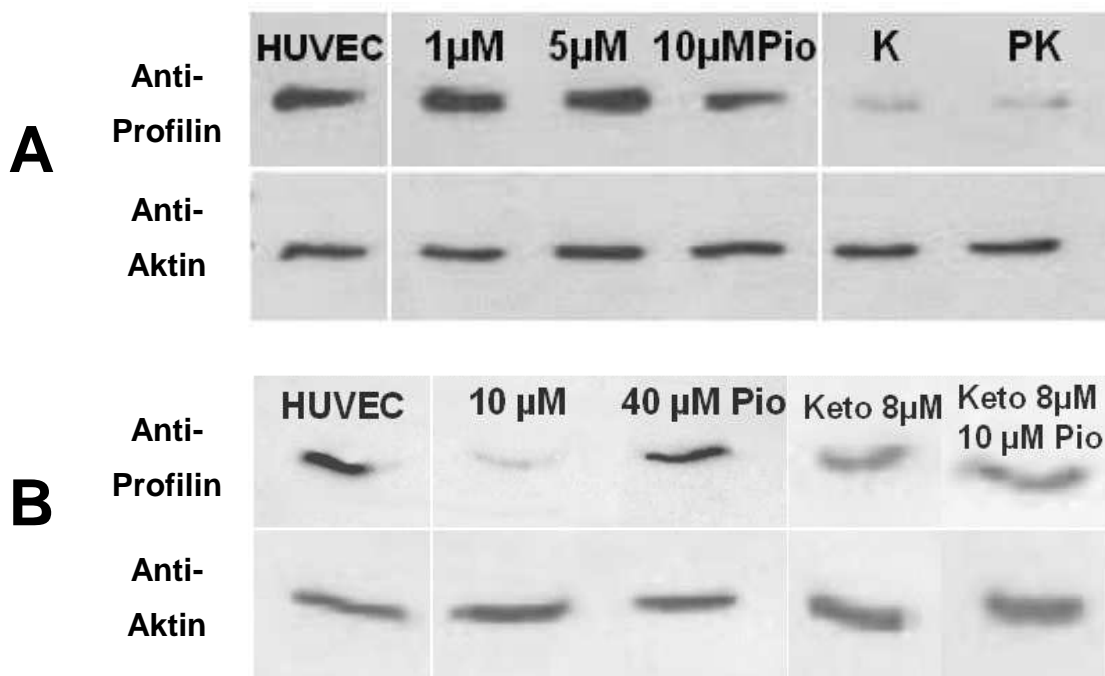
Pioglitazon in einem fettsäure- und glukosearmen Medium inkubiert. Die Blots wurden wegen einer nur geringen Proteinmenge, die sich aus den Versuchen ergab, mit 4 μg Protein gemacht. Hier sank der Profilinspiegel bei 10 μM und erreichte bei 40 μM fast wieder den Profilinhalt der unbehandelten Zellen. Es wurden zusätzlich je 8 mM Ketocholesterol mit 0 und 10 μM Pioglitazon inkubiert (Abb. 22 B). Hier zeigte sich eine geringe Senkung des Profilinhalt.

Als vergleichbarer Standard bei beiden Versuchen dienen die unbehandelten, die mit 10 μg Pioglitazon und die allein mit Ketocholesterol inkubierten Zellen. Die Versuche zeigen wegen den verschiedenen verwendeten Konzentrationen nur Tendenzen an.

Abb. 22: Western Blot mit Anti Profilin, 48 h Inkubation.

Die Effekte in verschiedenen Medien werden hier dargestellt. Die Versuche in A fanden mit normalem Nährmedium, in B mit einem fettsäure- und glukosearmen Medium statt. Bei Versuch B wurde mit höheren Konzentrationen gearbeitet, da ein besseres Ansprechen der Zellen auf höhere Konzentrationen vermutet wurde. Als vergleichbare Bahnen bei beiden Versuchen dienen die unbehandelten, die mit 10 μg Pioglitazon und die mit Ketocholesterol inkubierten Zellen.

(Pio = Pioglitazon Konzentration in μM , PK = 1 μM Pioglitazon und 8 μM Ketocholesterol, K oder Keto = 8 μmol Ketocholesterol)



Wie man sieht, zeigt sich in den Versuchen mit normalem Medium die Tendenz, dass Pioglitazon in Kombination mit Ketocholesterol eine Senkung des Profilinspiegels bewirkt (Abb. 22 A). Ketocholesterol mit fettsäurearmen Medium (Abb. 22 B) veränderte die Profilinmenge weniger als die Zellen im normalen Medium. In beiden Versuchen mit verschiedenen Medien zeigte sich eine Reaktion auf Pioglitazon. Profilin scheint von bestimmten Pioglitazonmengen verschieden stark gesenkt zu werden.

3.7.2. Versuche mit Ketocholesterol, Hydroxycholesterol, Interleukin-6, Metformin, Gliclazid und Pioglitazon

Da man einen von Pioglitazon abhängigen Effekt im Profilinspiegel sehen konnte, stellte sich die Frage, ob auch andere orale Antidiabetika oder diabetestypische Stoffwechselprodukte über Wege wirken, die den Profilinspiegel beeinträchtigen. Dafür wurden neu gewonnene endotheliale Zellen (HUVEC) verwendet. Die Zellen reagierten mit fortschreitender Passagenanzahl weniger auf die zugegebenen Stoffe. Ab der fünften Passage reagierten die Zellen nur noch gering und wurden deswegen verworfen. Der Versuchsaufbau mit fettsäure- und glukosearmen Medium wurde beibehalten. Die Zellen wurden mit den oralen Diabetestherapeutika Gliclazid, Metformin und Pioglitazon oder den Stoffen Interleukin-6, Ketocholesterol und Hydroxycholesterol behandelt. Auch wurde Pioglitazon mit allen Stoffen kombiniert. Bei Versuchen mit Pioglitazon wurden die Zellen wie schon in den Voruntersuchungen 48 h mit 40 mM Pioglitazon vorinkubiert, da Pioglitazon über eine langsame nukleäre Expression von Proteinen (Gesellschaft Schweizerischer Amts- und Spitalapotheker, August 2003) wirkt, danach wurden die anderen Stoffe zugegeben. Es wurde mit 40mM Pioglitazon inkubiert, da man sich stärker sichtbare Effekte in der Interaktion unter den Medikamenten versprach.

Des Weiteren wurden Ketocholesterol, was bei einer diabetischen Stoffwechsellage erhöht ist (Ferderbar S et al., 2006) und Hydroxycholesterol als Ausdruck eines pathologisch veränderten Lipidprofils verwendet. Interleukin-6 wurde ausgewählt, da es bei Entzündungen und der diabetischen Stoffwechsellage vermehrt vorkommt (de Rekeneire N et al., 2006). Um das intra- und extrazelluläre Profilin zu messen wurde der Gesamtproteinextrakt und zur Ermittlung des sezernierten Profilins das Medium der Zellen untersucht. Der Mediumüberstand war interessant, weil Endothelzellen über eine sekretorische Funktion verfügen.

Die Tabellen 1 bis 4 zeigen alle Versuche, die auswertbar waren. Die Vorversuche gingen nicht in die Tabellen ein. Einige Bahnen der Western Blots waren trotz gründlicher

Proteinbestimmungen nicht mit gleichen Proteinmengen beladen. Diese wurden dann nicht gewertet. Deshalb wurden nicht bei allen Stoffen gleich viele Versuche gemacht. Es existieren zu allen Stoffen außer Pioglitazon mindestens neun Versuche mit guter Auswertbarkeit. Zu Pioglitazon gibt es nur je vier oder fünf Versuche, da die Ergebnisse sehr eindeutig ausfielen.

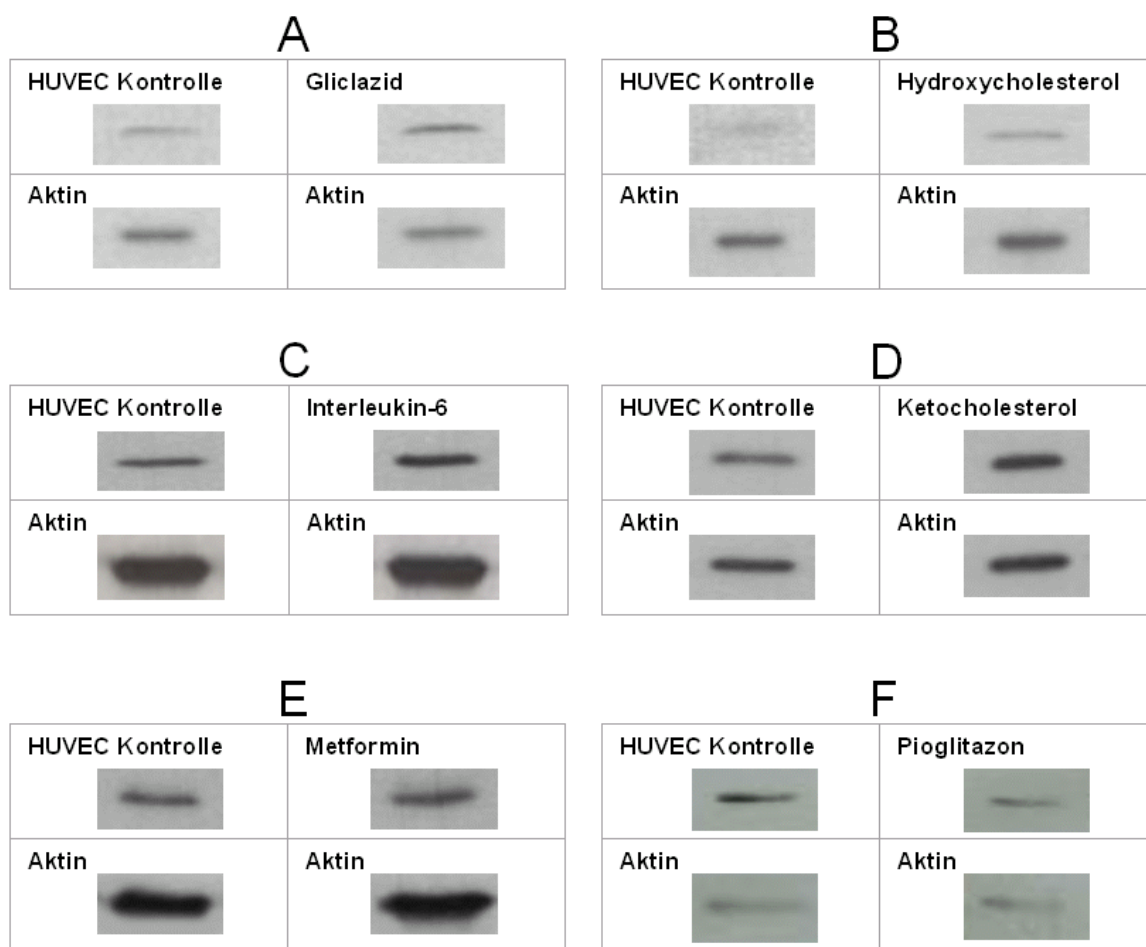
Bei den Behandlungen traten teilweise entgegengesetzte Effekte auf. Manche Stoffe zeigten Steigerungen und Senkungen im Profilinspiegel trotz standardisiert durchgeführter Versuche (z.B. Hydroxycholesterol in Kombination mit Pioglitazon). Das rührt daher, dass der Profilinspiegel bei manchen behandelten Zellen kaum von den der unbehandelten Zellen abwich. Da diese kleinen Schwankungen jedoch erkennbar waren, konnten sie nicht ignoriert werden. Allein Gliclazid, Ketocholesterol und Pioglitazon reagierten mit sehr starken Änderungen im Profilinspiegel. Die unten angegebene Tendenz in den Tabellen 1 bis 4 berücksichtigt die Stärke dieser Änderungen der Expression. Versuche, die nur geringe Steigerungen oder Senkungen gegenüber den unbehandelten HUVECs zeigten, wurden in der Tendenzspalte der Tabelle daher im Ergebnis als gleiche Profilinspiegel deklariert.

3.7.2.1. Ergebnisse der Gesamtproteinextrakte

Die Versuche ergaben, dass der Profilinhalt der Zellen bei der Zugabe von Hydroxycholesterol, Ketocholesterol, Interleukin-6, Metformin und Gliclazid ansteigt (Tab. 1). Pioglitazon allein senkt den Profilinspiegel stark (Abb. 23 F).

Tab. 1: Ergebnisse der Western Blots der Zellkultur.

Zellextrakte Profilinhalt	steigend	Gleich	sinkend	Tendenz insgesamt
Gliclazid	9	2	1	+
Hydroxycholesterol	9	3	0	+
Interleukin-6	5	4	1	+
Ketocholesterol	6	2	3	+
Metformin	5	2	2	+
Pioglitazon	0	1	4	-

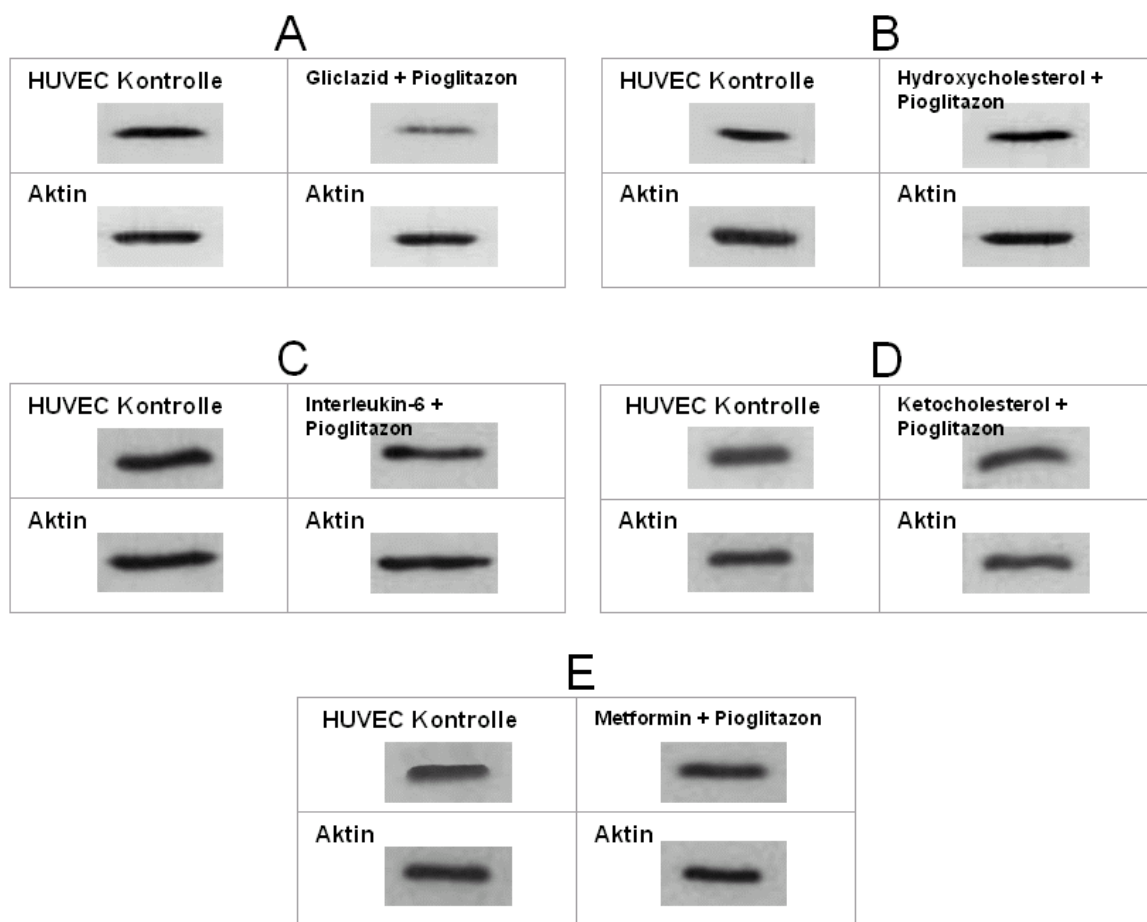
Abb. 23: Western Blots der Gesamtproteinextrakte.

3.7.2.2. Pioglitazon in Kombination, im Gesamtproteinextrakt

Bei der gleichzeitigen Gabe von Pioglitazon und Hydroxycholesterol, Ketocholesterol, Interleukin-6 oder Metformin bleiben die Profilinspiegel im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf gleichem Niveau (Tab. 2, Abb. 24 B-E). Wenn man die Zellen mit Gliclazid und Pioglitazon behandelt, sinkt der Profilinspiegel unter den der unbehandelten Zellen (Abb. 24 A).

Tab. 2: Ergebnisse der Western Blots der Zellkultur.

Zellextrakte mit je 40 μ M Pioglitazon Profilingehalt	steigend	gleich	sinkend	Tendenz insgesamt
Gliclazid	0	2	8	-
Hydroxycholesterol	5	2	5	=
Interleukin-6	1	6	3	=
Ketocholesterol	3	4	3	=
Metformin	2	4	3	=

Abb. 24: Western Blots der Gesamtproteinextrakte.

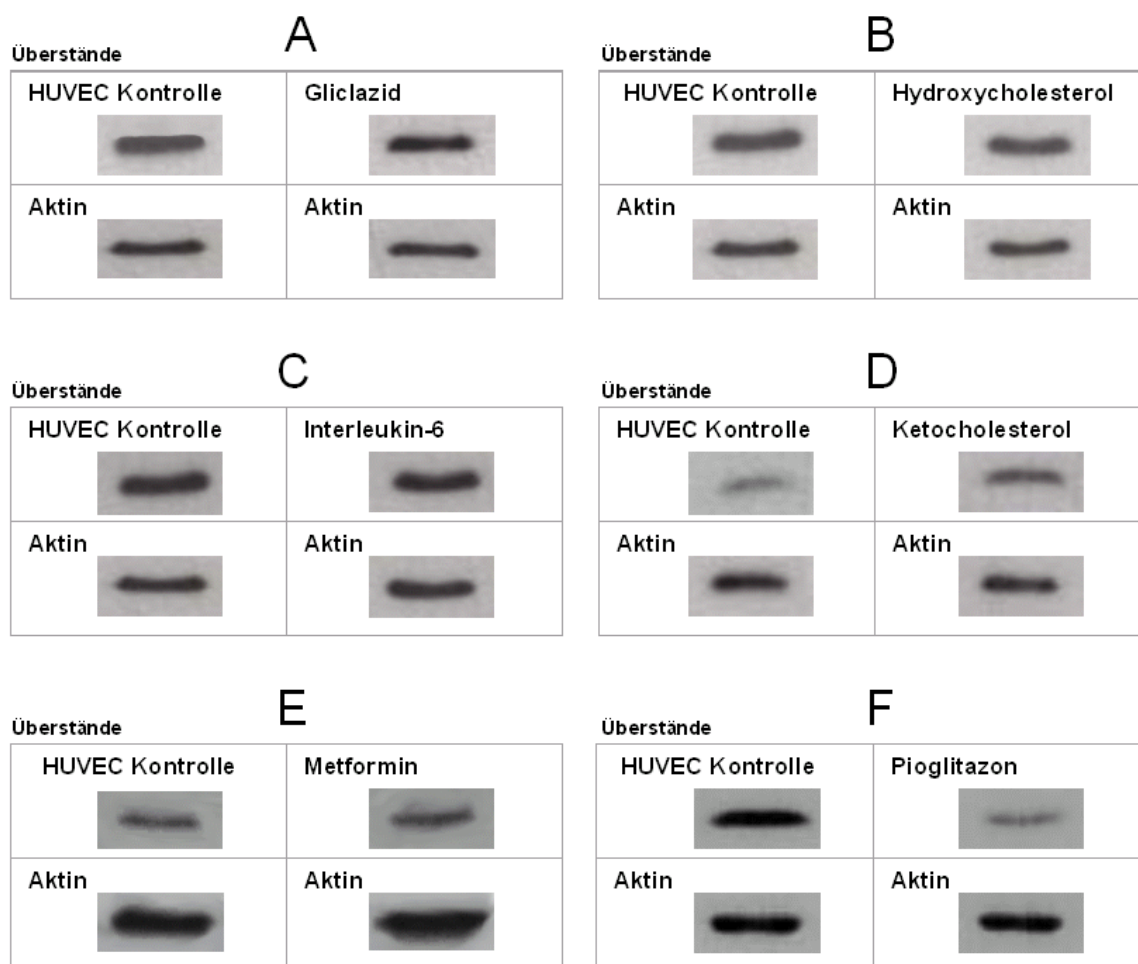
3.7.2.3. Ergebnisse der Versuche mit den Zellüberständen

Die gleichen Versuchsaufbauten wurden mit den Überständen der Zellen gemacht, um das Profilin zu erfassen, das die Zellen sezernieren. Der Profilinhalt der Zellüberstände, die mit Hydroxycholesterol, Interleukin-6, Metformin oder Gliclazid behandelt wurden, blieb im Vergleich zu den Überständen der unbehandelten Zellen gleich, trotz erhöhter Spiegel in den Zellen (Tab. 3). Nur bei Zellen, die mit Ketocholesterol versetzt wurden, stieg der sezernierte Profilinhalt (Abb. 25 D). Pioglitazon alleine minimiert den Profilinhalt im Zellüberstand (Abb. 25 F).

Tab. 3: Ergebnisse der Western Blots der Mediumüberstände der Zellen.

Überstände Profilingehalt	steigend	Gleich	sinkend	Tendenz insgesamt
Gliclazid	2	5	2	=
Hydroxycholesterol	2	5	4	=
Interleukin-6	4	3	2	=
Ketocholesterol	7	0	2	+
Metformin	4	5	1	=
Pioglitazon	0	0	4	-

Abb. 25: Western Blots der Mediumüberstände.



3.7.2.4. Pioglitazon in Kombination, im Zellüberstand

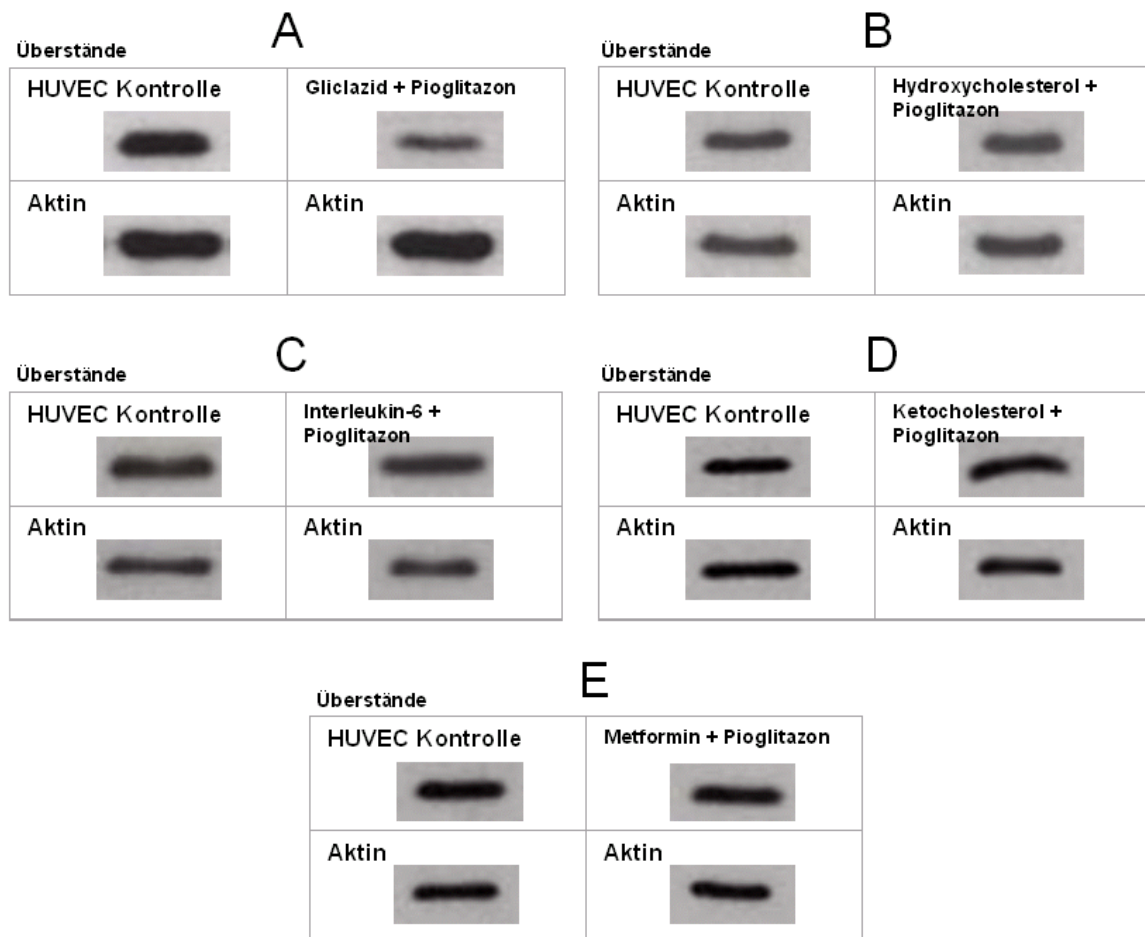
Bei den Zellüberständen der Substanzen, die man mit Pioglitazon mischte, ergaben sich ähnliche Ergebnisse, wie bei denen, die man allein gab. Hydroxycholesterol, Ketocholesterol, Interleukin-6 und Metformin je mit Pioglitazon ergaben keine

Änderungen im Profilingehalt (Tab. 4, Abb. 26 B-E). Allein Gliclazid plus Pioglitazon konnte eine deutliche Senkung des Profilingehalts bewirken (Abb. 26 A).

Tab. 4: Ergebnisse der Western Blots der Mediumüberstände der Zellen.

Überstände mit je 40 µM Pioglitazon Profilingehalt	steigend	gleich	sinkend	Tendenz insgesamt
Gliclazid	2	2	5	-
Hydroxycholesterol	1	7	3	=
Interleukin-6	1	5	3	=
Ketocholesterol	2	5	3	=
Metformin	3	4	3	=

Abb. 26: Western Blots der Mediumüberstände.



Diskussion

4.1. Zum Studiendesign

Diese Studie zeigt viele Vor- und Nachteile, die die medikamentöse Forschung am Menschen bietet. In der Studie sollten 22 Personen eingestellt werden, es konnten jedoch nur 10 gefunden werden, die die strengen Studienkriterien erfüllten. Genetische Schwankungen im Proteom statistisch auszubalancieren kann nur bei größeren Stichproben durchgeführt werden. Deswegen hatten die rekrutierten Versuchspersonen verschiedenste Nebendiagnosen und Erkrankungszeiträume. Durch die kleine Studiengruppe konnten keine signifikanten Schlüsse gezogen werden. Der Schwerpunkt dieser sich als Pilotprojekt verstehenden Studie lag darin, die noch wenig erforschte, direkte medikamentöse Wirkung von Pioglitazon im Proteom des Menschen aufzuspüren.

Bei keiner Medikamentenstudie können genaue Aussagen über den Grad der Compliance getroffen werden. Die Kontrolle des HbA1c in dieser Studie, konnte zur Complianceprüfung verwendet werden. Dieser befand sich bei den Patienten zwischen 5,9 und 7,7. Die Patienten schienen daher die Medikamente regelmäßig einzunehmen. Die intensive Kontrolle des HbA1c allein könnte sich jedoch optimierend auf den diabetischen Stoffwechsel und das Proteom ausgewirkt haben. Die Einstellung des HbA1c sollte aber auch in der Praxis selbstverständlich für eine antidiabetische Therapie sein. Mit den Thiazolidindionen gelingt die HbA1c Einstellung (Johansen OE and Jorgensen AP, 2006). So kann die gute Kontrollierbarkeit des HbA1c nur ein weiterer Indikator für den Erfolg dieses Wirkstoffes sein. Bei allen Patienten wurde eine orale antidiabetische Komedikation beibehalten. In Deutschland war die Monotherapie mit Thiazolidindionen derzeit noch nicht zugelassen (Karow et al., 2006). Somit können die untersuchten Effekte des Pioglitazons nicht hundertprozentig von denen des Sulfonylharnstoffes separiert werden. Die Effekte des Sulfonylharnstoffes sind jedoch gut untersucht, da es schon mehr als 50 Jahre auf dem Markt ist. Somit müssten die neu auftretenden Wirkungen auf das Pioglitazon zurückführbar sein.

Die Studie lief über 12 Wochen. Die maximale Wirkung der Thiazolidindione ist nach 4-12 Wochen erreicht, da die Genexpression reguliert wird (Karow et al., 2006). Hierbei könnte bei einigen der Patienten die optimale Wirkung noch nicht erreicht worden sein. Das Plasmaproteom könnte deshalb die maximalen Veränderungen noch nicht zeigen. Jedoch wurden in einer Studie an Endothelzellen nachgewiesen, dass bereits Behandlungen ab vier Wochen mit Pioglitazon starke Effekte haben können (Martens et al., 2005).

4.2. Die 2D-Gelelektrophoresen des Plasmas der Diabetiker

Die 2D-Gelelektrophorese ist eine gute Methode zur Proteomuntersuchung. Sie kann auf einem Gel bis zu 10 000 Proteine zeigen. Leider unterliegt sie inneren Schwankungen, da die Verarbeitungsbedingungen nie hundertprozentig gleich sind. Somit ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse eingeschränkt. Die Schwankungen der Intensität der Proteinpunkte können somit auf tatsächlichen Proteomveränderungen oder auf Veränderungen der Farbintensivität des Gels beruhen. Die Intensitätsschwankungen fielen besonders bei dem Vergleich der schwächer gefärbten Punkte stark ins Gewicht. Viele Gele wurden mehrmals angefertigt, um diesen Effekt klein zu halten. Die Veränderungen dieser schwächer gefärbten Punkte schienen irrelevant zu sein, da sie wahrscheinlich durch unspezifische Bindungen an die Reinigungssäule während der Vorbereitung verschwanden und so Schwankungen offenbarten, die es real nicht gab. Wegen den viel schwächer gefärbten Coomassie Gelen im Vergleich zu den silbergefärbten und der so begrenzten Identifizierbarkeit wurden die kleinen, kaum gefärbten Punkte aus der Auswertung herausgenommen.

4.3. Besprechung der identifizierten Proteine und deren Bedeutung im Zusammenhang mit Diabetes Mellitus und der Pioglitazontherapie

4.3.1 Veränderte Parameter im Vergleich zwischen Gesunden und Diabetikern

Interessant war, dass Diabetiker und Gesunde trotz der Veränderungen, die der Diabetes mellitus im Körper bewirkt, immer noch ein sehr ähnliches Proteinprofil hatten. Die Veränderungen, die man zwischen den Diabetikern und den Gesunden feststellen konnte gingen nur leicht über kleine Unterschiede, die es zwischen allen Probanden gab, hinaus.

Die entdeckten Unterschiede (siehe Kapitel 3.2.5.) stellen Profilin, Transthyretin, die Haptoglobin Alpha und Beta Kette und das Orosomuroid dar, die alle laut Literatur (siehe unten) diabetesspezifisch verändert sein können. Speziell die bei dem Vergleich zwischen Gesunden und Diabetikern neu gefundenen Verhältnisse sollen hier diskutiert werden, einige Zusätze dazu werden noch unter 4.3.2 diskutiert.

Alpha1-Acid Glykoprotein (Orosomuroid)

Dieses Protein ist ein Akute Phase Protein (APP). Das Vorliegen von Orosomuroid kann mit der Entwicklung von Diabetes assoziiert sein (Engstrom et al., 2005). Orosomuroid als

inflammationssensitiver Marker bleibt während des Diabetes erhöht (Engstrom et al., 2003). In der Studie von Lin Y et al. (Lin Y et al., 2001) wurde gezeigt, dass Fettgewebe APPs wie das Orosomucoid herstellen kann. Die Orosomucoidsteigerung könnte davon kommen, dass Gesunde einen im Schnitt niedrigeren BMI (maximal 29) im Vergleich zu den Diabetikern (maximal 34) hatten. Auch war die Gruppe der gesunden Probanden jünger. Der Orosomucoidspiegel kann bei Älteren leicht höher ausfallen. Jedoch verändert sich die Orosomucoidkonzentration während des Lebens insgesamt nur wenig und es gibt auch keine großen Unterschiede zwischen den Geschlechtern (Ritchie RF et al., 2000). Wahrscheinlich war der Spiegel bei den Diabetikern primär wegen der ablaufenden niedriggradigen Entzündung während des Diabetes mellitus erhöht. Orosomucoid wird außerdem durch die Gefäßinflammation bei einer KHK im Plasma erhöht (Snyder et al., 1977), wie sie bei dem metabolischen Syndrom ebenfalls vorkommt.

Haptoglobin

Bei dem Vergleich mit Gesunden fiel auf, dass bei Diabetikern die einzelnen Punkte der Haptoglobinkette Alpha 1 und 2 dicker waren. Das unterstreicht die Ergebnisse einer bereits von Van Campenhout et al. (Van Campenhout et al., 2006) veröffentlichten Studie, in der beschrieben wurde, dass Diabetiker einen höheren Haptoglobingehalt als gesunde Menschen haben.

Profilin-1

Profilin-1 ist ein Protein, das in jeder bis jetzt untersuchten eukaryontischen Zellart gefunden wurde (Sohn RH et al., 1995). Es ist nicht nur an der Modulation der Aktivität von Aktin beteiligt, sondern auch an Signalkaskaden der Phosphoinositide (Goldschmidt-Clermont et al., 1990). Es häufen sich Hinweise, dass Profilin an vielen molekularen Interaktionen mitwirkt (Witke W, 2004). Profilin ist unter anderem essentiell für die Zytokinese von Zellen und für die Bildung von Vesikeln am Golgi-Apparat (Dong J et al., 2000). Es ist beteiligt an der Regeneration von Neuronen (Tang BL, 2003). Ein Ausschalten des Profilins ist letal (Wittenmayer N, 2002). Darüber hinaus kann es sich als tumorsuppressiv erweisen (Wittenmayer N et al., 2000). Niedrige Profilinkonzentrationen fördern die Polymerisation von Aktin, zu hohe hemmen diese. Allgemein kann man sagen, dass Profilin die Zellelastizität verbessert (Wagner O, 2003). Profilin konnte in verschiedenen Versuchsaufbauten widersprüchliche Wirkungen auf die Aktin-Polymerisation haben (Yarmola EG et al., 2006). Das spricht für eine hohe Komplexität in seinen Interaktionen.

Gesunde haben einen besonders hohen Profilinspiegel im Plasma. Im Plasma der Diabetiker und Arteriosklerotiker kommt weniger Profilin vor. Das könnte sich davon ableiten, dass Profilin als Interaktionspartner von Aktin ein Marker für Zellmotilität und somit für den Vitalitätsgrad der Zelle sein könnte. Während es bei Gesunden im Blut höher konzentriert ist, scheint das Endothel bei Diabetes bei einer Dysfunktion mehr Profilin einzulagern. Es stellt sich die Frage, ob man an einen Alterseffekt denken sollte, da die Diabetiker im Mittel 60 Jahre waren, die gesunden Gegenproben nur 26 Jahre. Jedoch hatten die sechs untersuchten Gesunden 22-46-Jährigen kaum Unterschiede im Profilinspiegel zwischen den Altersstufen. Die gesunden Menschen um die Zwanzig hatten sogar größere Schwankungen untereinander als zu den in der fünften Lebensdekade stehenden Gesunden. In Versuchen an Pankreaszellen wurde bereits eine Veränderung des Profilin Gehalts durch Diabetes mellitus beschrieben (Ahmed M, 2005). Mehr zu Profilin soll weiter unten im Text besprochen werden.

4.3.2. Vergleich der Diabetikerproteome vor und nach der Behandlung

Das Proteom der 10 Patienten erwies sich als recht einheitlich trotz verschiedenster Krankheiten, Medikamenteneinnahmen, Krankheitsdauern und Altersstufen. Bei dieser kleinen Gruppe ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge zwischen diesen Zuständen und bestimmten Proteomkonstellationen finden. Patienten mit Nephropathie zeigten jedoch häufiger Veränderungen im Proteom vor und nach der Behandlung, besonders bei kleinen Proteinmengen. Das könnte durch den renalen Proteinverlust bei dieser Krankheit zu erklären sein. Diese Information könnte für zukünftige Studien am Proteom von Nierenkranken wichtig sein.

Die Proteine Haptoglobin und Transthyretin gehören zu den Entzündungsmarkern. Sie zeigen den Entzündungsstatus des Organismus zum Abnahmezeitpunkt des Blutes. Die schlecht eingestellten Lipoproteine konnten als Momentaufnahmen des pathologischen Fettstoffwechsels identifiziert werden. Das Proteom deutete somit insgesamt eine diabetische Stoffwechsellage an. Die Ergebnisse der zweifach gereinigten Proben sind wahrscheinlich nicht gut reproduzierbar, da anzunehmen ist, dass Plasmaproteine unspezifisch an die Reinigungssäule banden und adsorbiert wurden. Anschließend sollen nun die veränderten Proteine und deren Bedeutungen genauer besprochen werden.

Orosomuroid (Alpha1-Acid Glykoprotein)

Eine Entzündung kann den Anstieg bestimmter Plasmaproteine, darunter Orosomuroid und auch Haptoglobin, fördern. Das Orosomuroid kann wachstumsfördernde Wirkungen auf

Fibroblasten haben oder in vitro Immunreaktionen supprimieren, die Plättchenadhäsion modifizieren oder wie das Haptoglobin für eine Hämolyse stehen (Haupt UR, 2005). Der Orosomuroid Spiegel korreliert mit Alter, BMI und einer schlechten Blutzuckereinstellung (Akbay et al., 2004). Da die behandelten Diabetiker eine Diabetesdauer von mindestens einem Jahr seit Diagnose (im Median fünf Jahre, maximal 11 Jahre) hatten, ist davon auszugehen, dass sich der hohe Orosomuroidspiegel auf die langjährige Entzündungsreaktion zurückführen lassen kann.

Der Diabetes Mellitus wird von der endothelialen Dysfunktion begleitet, welche wahrscheinlich durch die chronische niedriggradige Entzündung hervorgerufen wird. Der Orosomuroidspiegel steigt bei einer endothelialen Dysfunktion (Poland et al., 2001). Ein akuter Gewebsschaden kann neben Entzündungen auch Auslöser für Orosomuroidanstiege sein (Hansen et al., 1989). Da eine Arteriosklerose ebenfalls einen Entzündungsreiz mit Läsionen im Gefäß darstellt (Gaudio et al., 2006), könnte damit die Erhöhung des Orosomuroids bei solchen Patienten erklärt werden. Inflammationsmarker deuten allgemein auf ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten wie einen Herzinfarkt oder einen Schlaganfall hin (Engstrom et al., 2003). Eine periphere arterielle Verschlusskrankheit kann bei hohen Orosomuroidspiegeln entstehen (Engstrom et al., 2004). Diese Thesen werden von dem Befund untermauert, dass zwei Patienten, bei denen eine Arteriosklerose sicher ausgeschlossen werden konnte, kein messbares Orosomuroid im Plasma hatten. Arteriosklerose-Patienten dagegen zeigten immer einen Orosomuroidspot.

Bei drei der zehn Paare wurde der Orosomuroidspiegel durch die Pioglitazonbehandlung reduziert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass durch die Pioglitazongabe, welche antiinflammatorische Funktionen im Blut hat (Koufany M et al., 2008), die niedriggradige Entzündung während des Diabetes mellitus hemmen könnte. Da eine Steigerung des Orosomuroidspiegels mit einer späteren Entstehung des Diabetes (Engstrom et al., 2005) verbunden ist, könnte der frühzeitige Einsatz von Pioglitazon schon bei Vorstufen des metabolischen Syndroms einen Vorteil ergeben.

Ig J Kette

Die Ig J Kette ist ein Bestandteil des Ig A. Ig A kommt in Körpersekreten wie Speichel, Eingeweiden, Lungen und Muttermilch vor und hat Abwehrfunktionen gegenüber Krankheitserregern. Im Plasma wird eine viel niedrigere Konzentration als in den Sekreten erreicht. Die Ketten, aus denen Ig A besteht, unter anderem auch das Ig J, werden in Plasmazellen produziert. Durch seine spezielle Bauart ist es besonders resistent gegen

proteolytische Enzyme¹⁹. Da das Ig J bei drei Patienten nach der Behandlung anstieg, könnte das ein Anzeichen für eine proportional gesteigerte Ig A Produktion sein. Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 haben einen erhöhten Ig A Spiegel (Gomes et al., 2006). Bei einem Patienten schien das Ig J nach Pioglitazongabe zu sinken. Daraus könnte man ableiten, dass der ebenfalls diabetesspezifisch erhöhte Ig A Spiegel gesunken ist und die Schwere des Diabetes durch die Therapie gemildert wurde. Da jedoch drei Steigerungen im Sinne einer Diabetesprogression verzeichnet wurden, scheint dieser Effekt jedoch nicht für eine Pioglitazontherapie zu sprechen.

Hämopexin

Der Hämopexingehalt sank bei drei Patienten nach der Behandlung, bei einem stieg er an. Hämopexin ist kein Akute-Phase-Protein. Es ist ein Marker, der unabhängig von Entzündungen signifikant bei Diabetikern erhöht ist (Van Campenhout et al., 2006). Nach der Pioglitazontherapie sinkt der Spiegel bei drei der zehn Patienten. Da bei einem Patient der Unterschied in beiden Reinigungsstufen deutlich sichtbar war, konnte somit ein Effekt nachgewiesen werden. Es schien, dass sich Pioglitazon auch auf diesen Bereich günstig auswirken kann, da ein weiterer diabetesspezifische Marker gesenkt wurde. Jedoch kann der gesenkte Hämopexinspiegel ebenso wie der gesenkte Haptoglobinspiegel für eine Hämolyse stehen (Delanghe JR, Langlois MR, 2001).

Apolipoprotein A1 (= HDL)

Bei einem Patienten stieg das HDL nach der Behandlung stark an. In Studien wurde bereits erwähnt, dass Pioglitazon oder andere Thiazolidindione signifikant die HDL-Sekretion in vivo oder in vitro steigern können (Berhanu et al., 2006; Rottlaender D et al., 2007). Die Hochregulation von Apolipoprotein A1 ergab einen Zusammenhang zu den von Prof. Parhofer zur gleichen Studiengruppe veröffentlichten Ergebnissen, dass Pioglitazon bei acht von den zehn behandelten Patienten den HDL-Fettstoffwechsel in Richtung Normalwerte hin korrigiert (Parhofer et al., 2005). Dass die Verbesserungen bei den anderen Patienten nicht registriert wurden, könnte an den eingeschränkten Möglichkeiten der 2D-Gelelektrophorese im genauen Proteinmengenvergleich liegen.

Haptoglobin

Es fiel ein Zusammenhang zwischen der Konzentration der Proteine der Haptoglobinkette und der Inzidenz von Arteriosklerose auf. Die Haptoglobinbande der Alpha 2 Kette zeigte sich bei

drei der zehn Patienten nach der Therapie weniger intensiv. Bei zwei der gleichen Patienten konnte man den selben Effekt zusätzlich noch bei der Alpha 1 Kette sehen. Die Senkung dieses Akute Phase Proteins spricht für ein Nachlassen einer Entzündung. Die Pioglitazontherapie müsste, auch wegen antioxidativen Fähigkeiten, eine Entzündung unterdrücken (Mehta et al., 2003), was hier wahrscheinlich der Fall war. Das vor der Behandlung erhöhte Haptoglobin schien Ausdruck der Gefäßinflammation im Zeichen des Diabetes zu sein.

Der Haptoglobinspiegel wird gesteigert durch Entzündungen, IL-1, IL-6, verschiedene Zytokine, Hämolyse, Apoptose und akuten Gewebsschaden²⁰, die bei Diabetes vorkommen können. In der Studie von Densem et al. (Densem CG et al., 2004) wurde beschrieben, dass, obwohl bei dem 1-1 Typ die höchsten Haptoglobinspiegel gemessen wurden, Haptoglobin 2-1-Phänotypen öfter Gefäßkrankheiten bekommen. In der hier vorliegenden Studie hatten beide 1-1 Typ Patienten, aber nicht alle acht Typ 2-1 Patienten Arteriosklerose. Interessant ist die Studie von Levy et al. (Levy AP et al., 2005), in der die Theorie aufgestellt wurde, dass Haptoglobin 2-1 und 2-2 bei Diabetikern eine geringere KHK-Rate hatten als Gesunde, für die die 1-1 und 2-1 Konstellation normalerweise ein höheres Risiko bedeutete. Hierzu konnte im Proteom der hier Untersuchten beobachtet werden, dass tatsächlich nur fünf der acht 2-1 und 2-2 Typen an einer manifesten Arteriosklerose litten, jedoch beide 1-1 Typen. Bei diesem Punkt war es wichtig, die Literatur für Diabetiker und Nicht-Diabetiker zu unterscheiden, da sie sich teilweise widerspricht. Jedoch stimmten die gefundenen Verhältnisse trotz kleiner Untersuchungsgruppe mit den bereits veröffentlichten Artikeln über diabetische Verhältnisse (Levy AP et al., 2005) überein.

Transthyretin

Die Transthyretinkette bei 13 kDa schien sich bei zwei Patienten in der zweifach gereinigten Gel-Serie während der Behandlung verkleinert zu haben. Da sich die Veränderungen nur in den zweifach gereinigten Proben zeigten, könnte ein real nicht vorhandener Effekt durch die Reinigung entstanden sein. Es könnte wiederum ein so sensibler Effekt sein, der erst wegen der zweifachen Reinigung und der so entstandenen Konzentration der Stoffe sichtbar wurde. Transthyretin ist ein negatives Akute-Phase-Protein (Campbell FM et al., 2005). Es wurde bereits (Sundsten T et al., 2007) als ein Protein beschrieben, welches sich zwischen Diabetikern und Gesunden unterscheiden kann. Niedriges Transthyretin korreliert mit der Entwicklung von kardiovaskulären Folgen. Es kann in dem PINI Index = $\text{CRP} \times (\text{Alpha1-Acid-Glykoprotein}) / (\text{Albumin} \times \text{Transthyretin})$ dazu benutzt werden, um das Risiko von

kardialen und vaskulären Krankheiten zu berechnen (Terrier N et al., 2005). Ein niedriger Spiegel ergibt hohe Komplikationsinzidenzen. So könnte es Aufschluss über den Zustand der diabetischen Stoffwechsellage des Organismus geben. Die Verringerung des Transthyretin-Monomers könnte deshalb eine Entzündungssteigerung ausweisen. Jedoch wurde bereits beschrieben, dass bei einer Diabetesinduktion bei Ratten das Transthyretin-Monomer hochreguliert wurde (Kim SW, 2006). Dementsprechend könnte die hier gezeigte Verringerung auf eine Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage hindeuten. Das Monomer scheint keine Effekte auf die Insulinfreisetzung oder die Apoptose zu haben, wie es das Multimer haben soll (Refai E, 2005). Transthyretin schien außerdem in einer groß angelegten Studie im Alter zu sinken, es hat seine maximale Konzentration mit 35 Jahren. Männer hatten hierbei die höheren Spiegel (Ritchie RF et al., 1999). Der hier gezeigte Effekt könnte also einen Altersprozess darstellen. Es fiel jedoch bei dem Vergleich der teilweise jüngeren Gesunden mit den älteren Diabetikern nicht als niedriger exprimiert auf.

Profilin-1

Der Einsatz von Pioglitazon steigerte den Profilinspiegel bei sieben von zehn Diabetikern. Interessant ist, dass Thiazolidindione hemmend auf die Polymerisation von Aktin wirken können (Singh N et al., 2005). Auch könnte Profilin in den Lipidstoffwechsel involviert sein (Goldschmidt-Clermont et al., 1990), der ebenfalls durch Pioglitazon beeinflusst wird. Hier kann eventuell eine Interaktion von Thiazolidindionen und Profilin stattfinden. Im Verlauf diabetischer Veränderungen findet ein Aktinskeletumbau statt (Clarkson MR et al., 2002). Da Profilin das Aktin beeinflusst, wird sich die Aktinkonzentration und somit dessen zelluläre Expression erhöhen. Die so veränderte Expression von Proteinen hat sich abhängig von oxidativem Stress erwiesen (Naito Y et al., 2006). Hier könnte ebenfalls eine Ansatzstelle der Thiazolidindionwirkung bei Diabetes sein, da bei diesen Stoffen bereits eine gute Wirkung gegen oxidativen Stress nachgewiesen wurde.

Wegen des signifikant vorkommenden Profilins bei Gesunden oder wegen der Annäherung der Profilinspiegel der behandelten Diabetiker an die eines Gesunden könnte man den Profilinspiegel im Plasma vielleicht in Zukunft als „Gesundheitsmarker“ betrachten: Neben dem festgestellten Anstieg des Profilins durch die Therapie wurden in der Patientengruppe und in der Literatur eine Verbesserung der Blutfettwerte (Parhofer KG et al., 2005) und andere positive Effekte auf die Gesundheit nach Pioglitazonbehandlung beschrieben. Jedoch bleibt es noch offen, diese Verhältnisse an einer größeren Studiengruppe zu untersuchen.

Abschließend kann behauptet werden, dass mit der 2D-Gelelektrophorese bereits bekannte und darüber hinaus neue Marker für eine diabetische Stoffwechsellage identifiziert wurden und dadurch die Brauchbarkeit dieser Methode gezeigt und bestätigt werden konnte. Durch die Pioglitazonbehandlung konnte bei diesen Markern eine Entzündungsreduktion und eine Verbesserung des Diabetes erreicht werden. Die meisten identifizierten Proteine wurden bereits in der Literatur bei diabetischer Stoffwechsellage beschrieben. Deshalb wurden zu diesen Proteinen keine weiteren Untersuchungen gemacht. Jedoch konnte mit Profilin ein neues, in diesem Zusammenhang bisher unbekanntes Protein identifiziert werden.

4.4. Die Proben aus dem Herzkatheterlabor

Die hier untersuchten Plasmaproben der Patienten wurden in der Nachsorge einer Herzkatheteruntersuchung gewonnen. Deshalb war die hier verwendete Studiengruppe eine gute Wahl zur Untersuchung der Auswirkung der Arteriosklerose auf den Profilin Gehalt. 50 Patienten waren, auf die Gesamtheit der Gefäßkrankenpopulation in Deutschland bezogen, statistisch zwar nicht aussagekräftig, aber genug, um Auffälligkeiten im Profilinspiegel zu erkennen. Signifikante Auffälligkeiten konnten für das HDL und den BMI festgestellt werden, die proportional zum Profilinspiegel waren. Interessant ist, dass unter einer Pioglitazontherapie eine Gewichtszunahme stattfindet. Vielleicht könnte die durch die Behandlung mit Glitazon oder die unter normalen Umständen entstandene Gewichtszunahme bestimmte Wege im Stoffwechsel aktivieren, die das Profilin steigern. Dass das HDL proportional zum Profilin war, unterstreicht weiter die gefundene Feststellung, dass gesündere Menschen höhere Profilinspiegel im Plasma haben. Es ist interessant, dass diese durchaus kranke Patientengruppe nur sehr wenig oder größtenteils gar kein nachweisbares Profilin im Blut hatte. Das unterstreicht die Hypothese, dass ein hoher Profilinspiegel im Plasma einen Gesundheitsmarker darstellen kann.

4.5. Profilin im menschlichem Endothel: Der immunhistochemische Nachweis

In einer Publikation von Romeo et al. (Romeo G et al., 2004) wurde beschrieben, dass Profilin-1 mit der endothelialen Dysfunktion zusammenhängt, wie sie auch bei Typ 2

Diabetikern vorkommt. Die Expression von Profilin bei der arteriosklerotischen Plaquebildung ist erhöht und wahrscheinlich an ihr beteiligt (Romeo G et al., 2004). Der immunhistochemische Nachweis in den Plaqueformationen konnte diese These bestärken. Das Profilin bleibt nach der Plaquebildung an diesem Ort. Gerade im Kern der arteriosklerotischen Kalkspangen war bei den untersuchten Probanden viel Profilin zu finden. Profilin wird während der Zellschädigung freigesetzt (McLeod et al., 1989). Das könnte das Vorkommen des Profilins an dieser Stelle erklären. Der einzige Nicht-Diabetiker hatte jedoch laut Pathologiebericht auch arteriosklerotische Plaques, da er an einer pAVK litt. Die zur Verfügung gestellten Schnitte wiesen keine großen Gefäße und auch keine sichtbaren Plaques auf. So konnte nicht genau überprüft werden, ob der Nicht-Diabetiker in den Plaques profilinhaltige Kerne aufwies.

Das Endothel der untersuchten Patienten, die an Diabetes und Arteriosklerose litten, war hingegen immer profilinhaltig. Eine erhöhte Speicherung von Profilin bei Zellschädigung könnte ebenfalls den hohen Profilinspiegel im Plasma bei Gesunden erklären: Bei Gesunden wird das Profilin nicht in dysfunktionelle Endothelien aufgenommen oder dort gebildet. Die Anreicherung des Profilins in arteriosklerotischen Plaques und im Endothel könnte daher für eine pathologische Aufnahme oder Bildung bei Zellschädigungen sprechen. Ebenfalls wird Profilin in Endothelzellen unter erhöhten Homozysteinkonzentrationen hochreguliert (Dardik et al., 2002), was ein Risikofaktor für kardiovaskuläre und thrombotische Krankheiten ist (Fowler B, 2005). Auch vermehrt sich Profilin im Endothel während endothelialen Verletzungen (Dardik et al., 2002) und reichert sich in ischämischen Zellen an (Atkinson SJ et al., 2004). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie bestätigen die Daten, dass endotheliales, intrazelluläres Profilin bei vaskulären Störungen hochreguliert wird. Das macht deutlich, dass Profilin im Organismus eine wichtige Rolle bei der endothelialen Dysfunktion zu spielen scheint. Der Fund von Profilin im diabetischen Endothel konnte in dieser Arbeit auch auf die peripheren Arterien und Arteriolen im Vergleich zur Arbeit von Romeo et al. (Romeo G et al., 2004), der ausschließlich aortale Endothelien untersuchte, erweitert werden. Profilin spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei dem Endothelwachstum (Ding Z et al., 2006). Da bei Diabetes ein vermehrtes, pathologisches Wachstum der kleinen Gefäße der Niere und der Retina stattfindet (Duh E and Aiello LP, 1999), scheint das vermehrte Vorkommen im Endothel der Diabetiker erklären zu können. Profilin ist zudem ein vom Inflammationsgrad des Organismus abhängiger Mediator zwischen der T-Zell Adhäsion und den Endothelzellen (Tanaka Y, 2000). Dies ist ein interessanter Aspekt, da bei Diabetikern immer eine niedrige

Entzündungsreaktion abläuft (Matthews VB et al., 2008). So könnte das hier nachgewiesene Profilin im Endothel ebenfalls zu den intrazellulären Entzündungsmarkern gezählt werden.

Das Vergleichspräparat war insgesamt nicht optimal zur Auswertung, da wegen der septischen Stoffwechsellage infolge der Gangrän starke inflammatorische Prozesse stattfanden, die die Aktivität des Endothels stark beeinflusst haben könnten. Außerdem war der Untersuchte starker Raucher, was die Inflammation weiter fördern kann. Das Endothel schien trotzdem weniger Profilin zu beinhalten. Jedoch ist es nicht möglich, eine gesunde menschliche Gegenprobe in dieser Altersgruppe zu finden, in der ein solch invasiver Eingriff zur Gefäßentnahme gerechtfertigt wäre. Der hier gefundene Patient erwies sich als Kompromiss, da trotz der Inflammation Unterschiede in der Profilindichte des Endothels sichtbar waren.

Als Nebenbefund kam Profilin auch in vielen anderen Strukturen, wie der Epidermis, den Schweißdrüsen, den Leukozyten und Fibroblasten und den Muskelfasern vor. Es scheint somit besonders in Zellen, die eine hohe Wachstumsrate oder einen hohen Akt Gehalt haben, vorzuliegen.

4.6. Diskussion der Ergebnisse der Zellkultur-Versuche

Die Regulationen im Endothel sind extrem wichtig für die Erforschung der Pathogenese von Arteriosklerose - der häufigsten Todesursache in Deutschland. Immer mehr zeichnet sich ab, dass die führenden kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hyperlipidämie, Hypertonie, Diabetes und Rauchen primär über eine funktionelle Schädigung des Endothels arteriosklerotische Gefäßwandverengungen triggern. Das Endothel erfüllt durch Produktion auto-, para-, und endokrin wirksamer Substanzen zahlreiche Aufgaben. Insbesondere ist die Zellschicht, die mit ca. 1 Billion Zellen das größte Organ des menschlichen Körpers darstellt, für den lokalen Gefäßtonus, situationsangepasste Gerinnungsvorgänge und deren fibrino- und thrombolytische Gegenregulation sowie die Steuerung von lokalen Entzündungsabläufen wie auch das vaskuläre Remodelling verantwortlich (Zitat: Pilz H, 2004). Wegen dieser Tatsachen wurde das Endothel im Zusammenhang mit dem Diabetes Mellitus und der Pioglitazontherapie untersucht.

Das endotheliale Modell erwies sich für die folgenden Versuche als geeignet, da die Zellen unter kontrollierten Bedingungen gut behandelbar waren. In Studien wurde nachgewiesen, dass Profilin schon ab 24 h Behandlung ansteigen kann (Salazar et al., 1999). Dieser Wert

wurde als Mindestversuchszeit verwendet. Da in der Literatur bereits die Interaktionen von verschiedenen Fettsäure- und Glukosespiegeln mit dem Profilinspiegel beschreiben wurden (Romeo G et al., 2004 und Clarkson MR et al., 2002), wurden die Zellen während der Einwirkzeit der Medikamente in einem fettsäure- und glukosearmen Medium gehalten. Da bei den ersten Versuchen mit normalen fettsäurehaltigen Medien eine wahrscheinliche Potenzierung der Ketocholesterolwirkung stattfand, was die Wirkung des Pioglitazons überspielte, wurden die Folgeversuche mit fettsäure- und glukosearmen Medium durchgeführt, um eine mögliche Kontamination der Ergebnisse wegen zu hoher Belastung der Zellen durch Fette zu vermeiden und die Wirkungen der einzelnen Stoffe deutlicher zu erkennen. Es war zu erkennen, dass die Versuche von der Mediumwahl abhängig waren.

Man hatte nur ein kleines Zeitfenster, das man mit diesem Versuchsaufbau untersuchen konnte, da die Zellen nach ca. 24 h begannen, im fettsäure- und glukosearmen Medium apoptotisch zu werden. Zusätzlich wirkte das Pioglitazon apoptotisch: Eine Aktivierung von PPAR-Gamma durch Glitazone konnte in in-vitro-Studien Differenzierungsprozesse fördern, die die Zellproliferation hemmen und die Apoptoserate erhöhen (Chen J et al., 2004).

4.6.1. Versuche mit Ketocholesterol, Hydroxycholesterol, Interleukin-6, Metformin, Gliclazid und Pioglitazon

Alle Zellen haben auf die antidiabetischen sowie die diabetesfördernden Stoffe mit Steigerungen im intrazellulären Profilinspiegel reagiert. Einzig Pioglitazon hat den Profilinspiegel stark gesenkt. In der Literatur waren ähnliche Versuchsaufbauten mit Ketocholesterol und Hydroxycholesterol behandelten HUVEC Zellen beschrieben (Romeo G et al., 2004), die gleiche Ergebnisse lieferten wie die hier vorliegende Arbeit. Die restlichen Versuche, insbesondere die mit Mediumüberständen, lieferten völlig neue Erkenntnisse.

4.6.1.1. Diskussion der Wirkung der Stoffe auf die HUVEC Zellen

- Die Gesamtproteinextrakte

Pioglitazon

Pioglitazon zeigte in den ersten Versuchen eine konzentrationsabhängige Wirkung auf den Profilinspiegel. Es war in der Monotherapie das einzige Medikament, das den Profilinspiegel in der Zelle und die Sekretion senken konnte. Eine Pioglitazonbehandlung kann Typ 2 Diabetikern mit kardiovaskulären Risiken direkten Schutz gegen eine TNF-Alpha induzierte endotheliale Dysfunktion gewähren (Martens FM et al., 2005). Da Profilin bei

inflammatorischen Prozessen, wie bei der Arteriosklerose, an der Zelloberfläche von Endothel und in arteriosklerotischen Plaques (Romeo G et al., 2004) erhöht ist, kann der gesenkte Profilinspiegel der Zellen als eine Verbesserung der Dysfunktion interpretiert werden. Im Kapitel 4.7. werden dazu ausführlich Pathomechanismen beschrieben, auf die eine intrazelluläre Profilinerhöhung zurückzuführen ist und die diese These unterstreichen.

Da die Nabelschnüre von gesunden Babies stammten, kam die Behandlung der HUVEC Zellen mit Pioglitazon einer Behandlung von gesunden Probanden nahe. Deshalb könnte das Modell nicht ganz optimal gewesen sein.

Ketocholesterol und Hydroxycholesterol

Ketocholesterol ist im Organismus ein Zeichen für oxidativem Stress (Ferderbar S et al., 2006) und bei der diabetischen Stoffwechsellage erhöht (Scheffer PG et al., 2004; Murakami H et al., 2000). Auch steigen Ketocholesterol- und Hydroxycholesterolwerte bei Frauen mit einem BMI über 40 an (Zwirska-Korcza K et al., 2001). Ketocholesterol ist toxisch für das Endothel (Zhou Q et al., 2000). Diese Quellen unterstreichen die Rollen der beiden Oxysterole bei dem metabolischen Syndrom im Organismus. Die intrazelluläre Profilinsteigerung auf diese Stoffe könnte einen Schritt in die Richtung der Dysfunktion anzeigen. Die so ausgelöste Profilinsteigerung, die schon von Romeo G. (Romeo G et al., 2004) an diabetischen Endothelien von Menschen beschrieben wurde, konnte in dieser Studie bestätigt werden. Dabei wurde in dieser Studie Kulturen menschlicher Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) und nicht aortales Endothel verwendet. Somit können nun die Thesen verallgemeinert auf das menschliche Endothel bezogen werden.

Die Kombination von Pioglitazon mit den Oxysterolen veränderte den Profilinhalt im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht. Hier haben sich wahrscheinlich die Profilin senkenden Effekte des Pioglitazons und die Profilin steigernden des Ketocholesterols und des Hydroxycholesterols neutralisiert, was ein interessanter Effekt ist. Das zeigt, dass die zellulären Effekte von Ketocholesterol durch Pioglitazon blockiert werden können. Wenn man davon ausgeht, dass Ketocholesterol schädliche Wirkungen auf das Endothel hat, können die Folgen des oxidativen Stress im Gefäß umgangen werden. Somit können sich für Pioglitazon in Zukunft potentielle Anwendungsmöglichkeiten in der Arterioskleroseprophylaxe ergeben – Einem Krankheitsgebiet, in dem es bisher keine deutlich wirksamen Medikamente gibt und das jährlich die meisten Tode in den Industrienationen fordert.

Interleukin-6

Die IL-6 Behandlung der HUVEC Zellen wurde durchgeführt, da Typ 2 Diabetikern einen erhöhten IL-6 Spiegel haben (de Rekeneire N et al., 2006). Das IL-6 kann die Insulinsensitivität im Organismus verändern. Zusätzlich soll es bei der Inflammation des Endothels als Botenstoff interagieren (Bastard JP et al., 2006). Auch können HUVEC Zellen Interleukin-6 selbst herstellen (May LT et al., 1989). IL-6 ist Botenstoff von niedriggradigen Entzündungen, die in die Pathogenese des Typ 2 Diabetes involviert sind (Syrenicz A et al., 2006). Dieser Stoff scheint also im diabetischen Organismus eine interessante Rolle zu spielen. Da Interleukin-6 so insgesamt an der Gefäßentzündung beteiligt ist, wurde untersucht, ob sich der Profilinspiegel in den Zellen verändern würde. Es zeigte sich bei der Behandlung mit IL-6 ein leichter Anstieg von Profilin. Da IL-6 ein Stoff ist, der zur endothelialen Entzündung beiträgt (de Carvalho MH et al., 2006), fiel der Anstieg des Profilins erwartungsgemäß aus, da Profilin in den immunhistologisch untersuchten Endothelien ebenfalls bei Arteriosklerose und der endothelialen Dysfunktion vermehrt vorkam.

Bei der Kombination von Pioglitazon und Interleukin-6 veränderte sich der Profilinspiegel nicht. Das zugesetzte Pioglitazon schien wieder den Effekt der Monotherapie zu neutralisieren. Man kann wie bei den Oxysterolen behaupten, dass die Effekte von IL-6 in der Zelle durch Pioglitazon inhibiert werden. Das wiederum könnte eine Protektion für das Endothel vor der IL-6 bedingten Inflammation darstellen.

Die oralen Antidiabetika: Metformin und Gliclazid

Auch Metformin konnte den Profilingehalt der Zellen erhöhen. Bei diesem Medikament wurde bereits eine antiatherogene Wirkung im Organismus festgestellt (Eguchi K et al., 2007; Mamputu JC et al., 2003). Jedoch erhöhte Metformin wie die Oxysterole oder das inflammationssteigernde Interleukin-6 den Profilinspiegel. Metformin bringt allerdings auf den Gesamtorganismus bezogen auch Vorteile in der Behandlung. Auf zellulärer Ebene scheint es aber die gleiche Wirkung wie endothelschädigende Stoffe zu haben. Das ist ein hochinteressantes Ergebnis, welches viele Fragen aufwirft und später genauer diskutiert werden soll, da bei Gliclazid derselbe Effekt auftrat. In Kombination von Pioglitazon mit Metformin blieben die Spiegel gleich den der unbehandelten Zellen. Hier zeigte sich wieder, dass Pioglitazon die Wirkung anderer Stoffe auf den Profilingehalt neutralisieren kann.

Gliclazid bewirkte die stärksten Steigerungen im Profilinspiegel. In der Literatur wird beschrieben, dass Gliclazid präventiv auf die Entwicklung von Arteriosklerose wirkt (Renier

G et al., 2003). Bei Diabetikern vermindert es die erhöhte Adhäsivität von diabetischen Monozyten am Endothel. Daraus konnte man schließen, dass Gliclazid eventuell präventiv auf die Arterioskleroseentstehung wirkt (Desfaits AC et al., 1999). Zudem wurde belegt, dass Gliclazid zusätzlich antioxidativ ist (Ceriello A., 2006). Da oxidativer Stress das Endothel schädigen kann, könnte wegen dem Schutz vor Oxidation und der Arterioskleroseentstehung die Erhöhung des Profilinspiegels als eine Verbesserung der Endothelfunktion interpretiert werden. Da die Oxysterole und das Interleukin-6 die gleichen Effekte auf das Profilin haben, könnte man ebenso von einem durch diese Stoffe hervorgerufenen pathologischen Mechanismus im Endothel ausgehen. Gerade über Metformin und Sulfonylharnstoffe gibt es jedoch viele Studien, die deren positive Wirkungen auf den Organismus schildern. Es fällt also schwer, an eine Endothelschädigung zu glauben. Dass Metformin und Sulfonylharnstoffe den Profilinspiegel wie endothelschädigende Stoffe ansteigen lassen, ist durchaus interessant. Da die Monotherapie mit Pioglitazon gezeigt hat, dass es Stoffe gibt, die das Profilin senken, kann man also nicht von einer unspezifischen Erhöhung von Profilin durch alle Stoffe ausgehen. Hier werden noch weitergehende intensive Untersuchungen benötigt, um letztendlich zu klären, was das Verhalten des Profilins über den diabetischen Stoffwechsel aussagen kann und welche Rolle es bei der medikamentösen Therapie spielt.

Gliclazid plus Pioglitazon konnte eine starke Senkung des Profilingehalts bewirken. Das war besonders interessant, da bei der Monotherapie ohne Pioglitazon sehr hohe Spiegel in den Zellen gemessen wurden. Ansonsten senkte kein Stoff oder keine Kombination außer Pioglitazon den Profilinspiegel. In der Kombination setzt Pioglitazon sich in seiner Wirkung durch und neutralisiert den Profilinspiegel nicht nur, wie bei den anderen Stoffen, sondern senkt ihn sogar. In der Interaktion dieser beiden Wirkstoffe könnte sich das Pioglitazon eventuell wegen der relativen höheren Konzentration durchgesetzt haben. Das ist jedoch wenig wahrscheinlich, da alle anderen Stoffe die Neutralisation des Profilinspiegels erfuhren, obwohl sie auch in geringen Konzentrationen auf die Zellen gegeben wurden. Für Pioglitazon und Gliclazid wurden bereits gefäßprotektive Wirkungen nachgewiesen (Fonseca VA 2007; Horio T et al., 2005; Martens FM et al., 2005; Sourij H et al., 2006; Renier G et al., 2003). In der Therapie könnte das bedeuten, dass sich beide Medikamente gut ergänzen, wenn man davon ausgeht, dass eine Senkung des intrazellulären Profilingehalts einen Vorteil darstellt.

4.6.1.2. Diskussion der Wirkung der Stoffe auf die HUVEC Zellen - Die Überstände

Durch die Versuche mit den Überständen wurde die endotheliale Sekretion von Profilin ins Blut simuliert. Es sollte festgestellt werden, ob die Endothelien für die Profilinänderungen im

Plasma der untersuchten Gruppe verantwortlich waren. Die Untersuchungen, ob die Endothelzellen für den Profilingehalt des Plasmas verantwortlich sind, sind anders ausgefallen als erwartet: Das Endothel produziert den Profilinbestand im Plasma anscheinend nicht, da gerade gesunde Endothelzellen, die keinen schädigenden Stoffen ausgesetzt wurden, wenig Profilin sezernieren. Die Gesunden Patienten hatten jedoch viel Profilin im Plasma, die Kranken sehr wenig. Die Zellen, die zuvor mit Ketocholesterol und Hydroxycholesterol behandelt wurden, veränderten durch die Behandlung die Sekretion kaum. Das war verwunderlich, da man mit Profilinveränderungen gerechnet hätte. Es wurden insgesamt nur sehr geringe Mengen an Profilin sezerniert. Jedoch hat das Endothel eine sehr große Fläche und stellt das größte Organ im Körper dar (Pilz H, 2004). Die geringen Effekte könnten daher im Organismus weitaus potenter oder verzerrt wirken.

Einzel und in Kombination mit Pioglitazon hatten Hydroxycholesterol, Interleukin-6 und Metformin keinerlei Wirkung auf die Profilinsekretion. Somit könnten die Wirkungen dieser Stoffe auf den Profilingehalt nur auf das Zellinnere beschränkt sein. Interessant ist, dass Ketocholesterol in der Monotherapie die Profilinsekretion erhöht, Hydroxycholesterol jedoch nicht, obwohl beide strukturverwandt sind. Es scheint, dass Ketocholesterol differenziertere, potente Wirkungen auf die Endothelzellen hat.

Die Zellen sezernieren bei ausschließlicher Gliclazidbehandlung genauso viel Profilin wie unbehandelte Zellen. So könnte man wie bei der Behandlung mit Metformin oder Interleukin-6 folgern, dass die Gliclazidwirkung in der Monotherapie keinen Einfluss auf den extrazellulären Profilingehalt und somit den des Blutes hat. Jedoch hat es sich bei der Untersuchung der Gesamtproteinextrakte und der Überstände gezeigt, dass Gliclazid in Kombination mit Pioglitazon den Profilinspiegel senken konnte. Pioglitazon scheint sich in dieser Kombination in seiner Wirkweise durchzusetzen. Dies ist interessant, da das Pioglitazon bei den Überständen trotz seiner in der Monotherapie starken profilinsenkenden Wirkung in Kombination mit anderen Stoffen keine Veränderung der Profilinsekretion bewirkt hat. Bei den Gesamtproteinextrakten dagegen konnte Pioglitazon seine Wirkung bei allen Kombinationen durchsetzen und die Wirkungen aller Stoffe neutralisieren. Bei den Überständen war es so, dass Pioglitazon die ohnehin nur neutralen Wirkungen von Hydroxycholesterol, Interleukin-6 und Metformin nicht weiter beeinflusste, während es den einzigen sekretionssteigernden Stoff, nämlich Ketocholesterol, in der Kombination dennoch neutralisiert. Gliclazid nimmt hierbei wieder eine Sonderstellung ein, da es in der Monotherapie keine Wirkung auf die Profilinsekretion zeigte, jedoch mit Pioglitazon kombiniert eine Senkung herbeiführte, anstatt wie bei den anderen Stoffen in Kombination

nur neutral zu wirken. Die Interaktion von Pioglitazon und Sulfonylharnstoffen scheint deshalb vielgestaltig und weiter untersuchenswert.

Die drei Stoffe, die Veränderungen der Profilinsekretion im Überstand zeigten, hatten bei den Zellextrakten die gleichen Wirkungen. So konnten allein Pioglitazon, Pioglitazon plus Gliclazid und Ketocholesterol den Profilin Gehalt der Überstände verändern. Ketocholesterol bewirkte dabei als einziges eine Sekretionssteigerung. Anscheinend ist das Endothel besonders sensibel gegenüber diesen Stoffen. Sie scheinen wichtig für Pathomechanismen der endothelialen Dysfunktion zu sein. Ketocholesterol ist der einzige Stoff, der den intra- und extrazellulären Profilin Spiegel ansteigen lässt. Da Ketocholesterol den Profilin Spiegel steigerte, Pioglitazon und Pioglitazon mit Gliclazid ihn aber senkte, könnte daraus geschlossen, dass die Stoffe Kontrahenten in ihrer Wirkung sind.

Ketocholesterol kann schädigende Wirkungen auf Endothelien und andere Zellen haben (Luthra S et al., 2007; Leonarduzzi G et al., 2004; Zhou Q et al., 2000), die durch Pioglitazon in vivo sowie in vitro wieder rückgängig gemacht werden konnten. Generell konnte auch beobachtet werden, dass Pioglitazon die Wirkung von pathologischen Stoffen wie den Oxysterolen und Interleukin-6 auf den Profilin Gehalt und die Sekretion der Zellen am Endothel neutralisieren kann. Durch diese neu gewonnene Erkenntnis kann die Studie als voller Erfolg gesehen werden.

4.7. Profilin: Ein Rückblick auf die Ergebnisse und ein Blick in die Zukunft

Profilin ist ein ubiquitär vorkommendes Protein und scheint in verschiedenen Kompartimenten des menschlichen Organismus unterschiedliche Funktion zu haben. Bisher sind seine Wirkungen außer in der Allergologie und der Zytokinese noch wenig erforscht. Profilin verspricht jedoch in der Zukunft eine große Rolle zu spielen.

Erst kürzlich wurde durch eine Arbeit von Romeo und Kazlauskas (Romeo GR und Kazlauskas A, 2008) bestätigt, dass eine verminderte Expression von Profilin-1 einen Schutz vor Arteriosklerose darstellt, was die hier in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und aufgestellten Theorien untermauert.

Wenn man nach allen hier gewonnenen Ergebnissen geht, scheint Profilin ein Marker für pathologische Zustände in der Endothelzelle zu sein, der auf eine antidiabetische Therapie gut anspricht. Zu viel intrazelluläres Profilin ist wahrscheinlich ein Mediator der Inflammation und ein Wegbereiter der Arteriosklerose. Dazu passt, dass intrazelluläres Profilin von Pioglitazon deutlich gesenkt wurde. Dass das Pioglitazon bereits unumstritten positive Effekte

auf die endotheliale Dysfunktion (Maegawa H, 2007), die antioxidativen und antiarteriosklerotischen Fähigkeiten, (Staels B, 2005) und die Entwicklung von Makro- und Mikroangiopathien hat, war bereits bekannt (Vinik A et al., 2006). Somit kann der niedrige Profilinspiegel als das Sinken eines pathologischen Wertes und die Erhöhung als Reaktion auf einen pathologischen Reiz interpretiert werden. Besonders Pioglitazon, Pioglitazon plus Gliclazid und Ketocholesterol beeinflussten den Stoffwechsel des Endothels so stark, dass eine Veränderung der Synthese und Sekretion von Profilin entstand. Da alle Stoffe nachgewiesene Wirkungen auf die Prävention oder die Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion haben, kann postuliert werden, dass das Profilin eine Rolle in diesem Pathomechanismus spielt. Somit wäre der Profilinspiegel auf Zellebene als weiterer Inflammationsmarker zu identifizieren. Eventuell steht es in einem dynamischen Gleichgewicht, das sensibel auf Medikamente, Botenstoffe und krankhafte Einflüsse reagiert. Der Profilin Gehalt verhält sich in verschiedenen Kompartimenten des Körpers anders. Es scheint im Blut und im Endothel verschiedene Aufgaben zu haben, da viel Profilin im Plasma bei Gesunden vorkommt, jedoch wenig davon im Endothel. Es ist daher davon auszugehen, dass es im Plasma ein Marker für die Gesundheit darstellt. Diese Hypothese trifft auf alle Versuchspersonen zu (10 Diabetiker, 50 KHK Erkrankte und 6 Gesunde). Bei Diabetikern verhielt es sich entgegengesetzt. Sie hatten niedrige Plasmaspiegel, aber viel Profilin in den Endothelzellen.

Ein Angleichen an den Zustand eines Gesunden konnte durch die Pioglitazontherapie in vivo sowie in vitro beobachtet werden. Der Profilin Gehalt des Plasmas steigt bei den behandelten Diabetikern an, die Zellen reagierten trotz der Konfrontation mit einem pathologischen Reagenz wie unbehandelte, quasi gesunde Zellen. Auch das verstärkte den Eindruck, dass der Profilinstatus den Gesundheitszustand eines Organismus abbilden kann. Da Profilin bei arteriosklerotischen, entzündlichen Prozessen im Endothel erhöht wurde, könnte man folgern, dass es gespeichert wird. Das könnte der Grund sein, wieso es bei Gefäßkranken und im Zellversuch unter pathologischen Stoffen nicht sezerniert wird oder das Blut wenig davon enthält.

Profilin hat zudem Einflüsse auf wichtige Signalkaskaden der Phosphoinositide und auf Phospholipide der Zellmembran (Goldschmidt-Clermont et al., 1990). Interaktionen mit Komponenten des Phosphatidylinositol Zyklusses und dem RAS-Pathway zeigen, dass Profilin eine wichtige Verbindung zwischen dem Aktin-Skelett und den großen Zellregulationsmechanismen darstellt, wobei extrazelluläre Signale die Struktur des Aktins verändern können (Sohn RH, Goldschmidt-Clermont PJ, 1994). Profilin ist somit ein

Regulator des Zytoskeletts und scheint ebenfalls eine Rolle im Pathomechanismus des Diabetes mellitus und der endothelialen Dysfunktion zu spielen. Eventuell könnte hierbei das Profilin einen Teil der Reaktionskaskade der Wirkung von diabetischen Stoffwechselprodukten wie den untersuchten Oxysterolen (Romeo GR und Kazlauskas A, 2008) und dem Interleukin-6 darstellen. Profilin war nicht nur in den pathologisch veränderten Gefäßen der Diabetiker erhöht, sondern auch in der Substantia nigra bei Parkinson Patienten (Basso M et al., 2004). Bei der Entstehung von Parkinson spielt wahrscheinlich oxidativer Stress (Schapira AH, 2006) genauso wie bei Prozessen, die bei der endothelialen Dysfunktion ablaufen, eine Rolle (Clapp BR et al., 2004). Dadurch könnte erklärt werden, dass in den mit Reizstoffen behandelten Endothelzellen der Profilinspiegel steigt. Das und weitere, bereits angeführte Argumente sind ein Hinweis darauf, dass die hier gezeigte Überexpression von Profilin in den Zellen ein Zeichen der Zellschädigung dargestellt hat.

Profilin könnte maßgeblich an den Pathomechanismen des metabolischen Syndroms beteiligt sein, da es ein wichtiger Regulator der Muskelkontraktion am glatten Muskel in Gefäßen ist (Tang DD and Tan J, 2003). Da ein zu hoher Gefäßtonus zur Entstehung der Hypertonie maßgeblich beiträgt (González JM, 2007; Touyz RM, 2000), zeigt sich auch hier wieder der enge Zusammenhang des entdeckten Profilins zur Pathogenese des metabolischen Syndroms. Die erhöhte diabetische Profilinexpression könnte auch eine Rolle in der Regulation von dreidimensionalen extrazellulären Matrizen haben, die wichtig für die Entstehung und Reparatur von Kapillaren sind (Salazar R et al., 1999). Daraus könnte die hohe Profilinkonzentration im Sinne einer Kompensation in den geschädigten Gefäßen erklärt werden, wobei Profilin auch bei Zellschäden freigesetzt werden kann (McLeod JF et al., 1989). Intrazelluläres Profilin wird ebenfalls durch eine Erhöhung des Homocysteins (Dardik R et al., 2002) und des Ketocholesterols (Romeo GR und Kazlauskas A, 2008) gesteigert. Das unterstreicht die These, dass intrazelluläres Profilin bei vaskulären Störungen und bei Lipidstoffwechselfathologien im Organismus hochreguliert wird.

In der Zukunft stellt sich die Frage, ob die Veränderung des Profilinspiegels eine Kompensationsreaktion oder eine Progression des Diabetes im Sinne eines Circulus vitiosus markiert. Ob Profilin ein Stoffwechselprodukt der Prozesse ist, die während einer diabetischen Stoffwechselstörung vor sich gehen, oder am Signalweg teilnimmt, wird noch genauer geklärt werden müssen.

4.8. Pioglitazon: Ein Blick in die Zukunft

In dieser Arbeit wurde neu entdeckt, dass Pioglitazon auf den Profilin Gehalt des Endothels wirkt. Dieser Effekt könnte bei der Entwicklung der endothelialen Dysfunktion eine inhibitorische Rolle spielen. Die durch das Pioglitazon bedingte intrazelluläre Profilinabnahme, gekoppelt mit der Entdeckung, dass Profilin der Bindungspartner eines diabetischen Peptides ist (Romeo G et al., 2004) und dass Profilin während der Zellschädigung freigesetzt wird (McLeod et al., 1989), führen zu der Annahme, dass Pioglitazon die schädliche Wirkung des Diabetes mellitus am Endothel vermindert. Die Entwicklung einer Dysfunktion wird gebremst. Pioglitazon bietet anscheinend eine Art Zellschutz vor den Wirkungen der Oxysterole und des Interleukin-6, die den oxidativen Stress (Ferderbar S et al., 2006) und die Inflammation (Bastard JP et al., 2006) der Zelle erhöhen, was im Zellmodell parallel zu einer Profilinerhöhung der Zelle von Statten ging. Da beide Stoffe auch signifikant bei Diabetes erhöht sind (de Rekeneire N et al., 2006; Scheffer PG et al., 2004; Murakami H et al., 2000), scheint die Gabe von Pioglitazon gegen die diabetesfördernden Effekte dieser Stoffe zu wirken, da es den Profilin Gehalt der Zellen normalisiert. Die hier neu entdeckte Profilinerhöhung im Plasma von behandelten Diabetikern steht wahrscheinlich wegen der Wirkung von Profilin auf die Lipide im Blut (Goldschmidt-Clermont et al., 1990) mit der Pioglitazonwirkung im Zusammenhang. Profilin könnte dabei das entscheidende Protein darstellen, welches durch Pioglitazon verändert wird und dessen Wirkungen auf Lipide initiiert oder aber ein Marker der veränderten Lipidspiegel selbst sein. Neben dem in dieser Arbeit festgestellten Anstieg des Profilinspiegels im Plasma der behandelten Diabetiker wurden bereits mannigfaltige, positive Wirkungen von Pioglitazon beschrieben: Verbesserungen der Blutfettwerte (Parhofer KG et al., 2005), des HbA1c, der Insulinresistenz, der Oxidation und der KHK (Johansen OE and Jorgensen AP, 2006; Rios-Vazquez R et al., 2006; Staels B et al., 2006). Zusätzlich stellt Pioglitazon noch für weitere Krankheiten wie die nicht alkoholtoxische Leberverfettung, das polyzystische Ovar und Lipodystrophien eine Therapiealternative dar (Boden G and Zhang M, 2006). In einer Langzeitstudie über 2 Jahre konnte für Pioglitazon nachgewiesen werden, dass es die Triglyzeride hochsignifikant senkt und das HDL verbessert. Diese Effekte bestehen auch und werden sogar erhöht, wenn es mit Metformin oder Sulfonylharnstoffen kombiniert wurde (Betteridge DJ et al., 2005). All diese Effekte des Pioglitazons weisen seine Wichtigkeit für eine gute orale Diabetestherapie auf. Metformin und die Sulfonylharnstoffe alleine schützen nicht vor der Hyperlipoproteinämie. Sie haben keine Einflüsse auf den Lipoprotein-

metabolismus, der letztendlich den besten Schutz vor kardiovaskulären Komplikationen bildet (Chu JW et al., 2003). Somit könnte die Kombinationsbehandlung mit Pioglitazon einen besseren Erfolg vorweisen als die Monotherapie mit den klassischen Medikamenten (Chalmers J, 2007; Seufert J, 2006; Roden M et al., 2005). Für ein gutes Zusammenwirken der Stoffe sprechen auch die Ergebnisse aus der Zellkultur, wobei nur Pioglitazon oder Pioglitazon plus Gliclazid eine Senkung des Profilins im Endothel bewirkten. Wenn man beachtet, dass sich in der Monotherapie bei allen Gesamtproteinextrakten Steigerungen des Profilinspiegels auf pathologische Stoffe ausbildete, unterstreicht das die besondere Stellung des Pioglitzazons. Da Pioglitazon eine antiinflammatorische Komponente hat, würde das dafür sprechen, dass die Hochregulation des Profilins eine Verschlechterung und die Senkung durch das Pioglitazon eine Verbesserung im Zellstoffwechsel widerspiegelt. Das Interessante ist, dass die Zellen bei der Zugabe von Oxysterolen, Interleukin-6 und den Antidiabetika, die eigentlich einen schützenden Effekt haben sollten, einen gleichartigen intrazellulären Profilinspiegel zeigten. Die höchste Steigerung des Profilins in den Proteinextrakten der Zellen wurde sogar bei der alleinigen Gliclazidbehandlung festgestellt. Dabei wurde gerade für Gliclazid auch eine antioxidative Wirkung gefunden (Ceriello A, 2006), wie sie auch Pioglitazon hat. Laut Literatur sollten Metformin und Gliclazid ebenfalls vor diabetischen Folgeschäden schützen: Für Gliclazid und Metformin wurde eine langfristige Verzögerung der Angiopathie beschrieben (Inzucchi SE et al., 2002; Palumbo PJ, 1998; Saenz A et al., 2005). Metformin scheint sogar eine entzündungshemmende Wirkung auf Gefäßwände zu haben (Isoda K et al., 2006). Jedoch verlieren beide Stoffgruppen mit der Zeit ihre antidiabetische Wirkung (Karow T et al., 2006). Bei den Sulfonylharnstoffen wurden jedoch Hinweise gefunden, dass sie in höheren Dosen eine erhöhte Mortalität bedingen (Simpson SH et al., 2006). Im Vergleich zu den erörterten Pioglitazonwirkungen erwiesen sich diese beiden Stoffe als eine nicht optimale medikamentöse Monotherapie des Diabetes mellitus. Eventuell könnte die Erhöhung des Profilinspiegels eine lokale Nebenwirkungen dieser Medikamente am Endothel sein.

Da direkt am Plasmaproteom des Menschen die positiven Wirkungen des Pioglitzazons deutlich nachweisbar waren, sprechen die Argumente für eine Mono- oder Kombinationstherapie mit Pioglitazon in der Zukunft der Diabetesbehandlung. Alle metabolischen Folgen des Diabetes inklusive der Arteriosklerose und Hyperlipidämie kamen bei den hier behandelten Patienten vor. Während der Pioglitazongabe glichen sich sowohl die Lipide und weitere diabetesspezifische Werte (Parhofer KG et al., 2005) als auch die Profilinspiegel an die von gesunden Patienten an. Patienten mit diesem Krankheitskomplex

konnten einen Vorteil durch die Pioglitazontherapie erreichen. Pioglitazon könnte sich in Zukunft als potentes Medikament erweisen, das Wirkungen auf die Entstehung von Arteriosklerose hat.

4.9. Was hat das alles für eine zukünftige Therapie des Diabetes Mellitus Typ 2 zu bedeuten?

Es zeigten sich im Proteom des Plasmas viele Änderungen, die als positiv zu bewerten waren. Insbesondere wurden im Proteom diabetische Folgeerscheinungen durch die Pioglitazonbehandlung vermindert. Am faszinierendsten war die Entdeckung der Wirkung von Pioglitazon auf Profilin, das Mediator in vielen Signalkaskaden, unter anderem auch im Fettstoffwechsel, ist. Die Veränderung der Profilinkonzentration im Plasma der Diabetiker in Richtung Gesunder könnte als ein weiterer Erfolgsparameter der Pioglitazontherapie angesehen werden. Hier könnte eine weitere Entdeckung der Wirkungskaskade des Pioglitazons auf die diabetische Stoffwechsellage, nämlich in der Interaktion mit einem über das Profilin-1 verlaufenden Signalweges, stattgefunden haben. Der Profilingehalt des Plasmas könnte wegen seines deutlichen Anstieges zu einem Parameter der Diabeteseinstellung unter Pioglitazon und vielleicht auch bei anderen Therapien avancieren.

Pioglitazon zeigte eine Wirkung auf den gesamten Organismus so wie auf Endothelzellen, dem Ort, der Diabetikern die schwersten Komplikationen bereiten kann. Mit der Pioglitazontherapie können somit wichtige Ziele in der Diabetesbehandlung erreicht werden: Eine gute Blutzuckereinstellung, die Fettstoffwechsellage normalisierung und die Veränderungen im Endothel entgegen des Mechanismus, der eine Dysfunktion einleitet und erhält (Martens FM et al., 2006; Sourij H et al., 2006; Horio T et al., 2005; Tong NW et al., 2005). Der Diabetes Typ 2 und die endotheliale Dysfunktion sind eng miteinander verbunden. Für Pioglitazon sind gerade auf diesem Gebiet wichtige Wirkungen nachgewiesen worden (Suzuki M et al., 2006; Pfutzner A and Forst T, Mar 2006). Neben der Verbesserung der endothelialen Dysfunktion, senkt Pioglitazon leicht den Blutdruck, korrigiert die Gefäßstruktur, senkt die Schlaganfallhäufigkeit bei Diabetikern (Touyz RM and Schiffrin EL, 2006; Wilcox R et al., 2007) und verhindert sogar das Wiederverschließen von implantierten Stents (Nishio K et al., 2006). In der PROaktiv Studie führte es zu einer deutlichen Risikoverminderung der makrovaskuläre Schäden (Pfutzner A et al., Jul 2006). Somit ist es, wenn man mögliche Nebenwirkungen des Pioglitazons mit den positiven Effekten abwägt

(Macfarlane DP and Fisher M, 2006), perfekt zugeschnitten auf eine Behandlung des metabolischen Syndroms (Reynolds K and Goldberg RB, 2006) und seiner Folgen.

Zusammenfassung

In dieser Studie wurden die Auswirkungen einer Pioglitazontherapie bei Typ 2 Diabetikern auf das Proteom des menschlichen Plasmas untersucht. Mit der 2D-Gelelektrophorese konnten vielfältige Veränderungen im Proteom identifiziert werden. Die Proteine Orosomucoid (Alpha1-Acid Glykoprotein), Haptoglobin, Transthyretin, Hämopexin, Ig J, Profilin und Apolipoprotein A1 (HDL) veränderten ihre Konzentrationen. Viele Veränderungen deuteten auf eine Verminderung der Inflammation im Organismus und auf eine Verbesserung der diabetischen Stoffwechsellage hin. Das Protein, das sich am signifikantesten veränderte, war Profilin-1. Bis auf Profilin waren die Reaktionen der Proteine auf Inflammation und die diabetische Stoffwechsellage bereits bekannt, was den Nutzen der 2D-Gelelektrophorese hervorhebt. Mit Western Blots konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Pioglitazon den Profilinspiegel im Plasma bei sieben von zehn behandelten Diabetikern steigert. Gesunde Probanden hatten ebenfalls hohe Profilinspiegel. Eine Gruppe von 50 untersuchten KHK-Patienten wies dagegen auffallend wenig Profilin im Plasma auf. Darauf wurden Gefäße von Diabetikern und einer Gegenprobe eines Nicht-Diabetikers immunhistochemisch mit dem Profilin-Antikörper gefärbt. Es zeigte sich eine starke Anreicherung von Profilin in arteriosklerotischen Plaques. Diese Entdeckungen legen nahe, dass Profilin ein Marker für die endotheliale Dysfunktion sein könnte. Darauf wurden Endothelzellen (HUVEC) und ihre Reaktion auf Pioglitazon, Metformin, Gliclazid, Interleukin-6, Ketocholesterol, Hydroxycholesterol und Kombinationen dieser Stoffe mit Pioglitazon untersucht. Die Sekretion von Profilin wurde in vitro nur von Ketocholesterol, Pioglitazon oder Pioglitazon plus Gliclazid beeinflusst. Pioglitazon erwies sich als einziger Stoff, der das intrazelluläre sowie das sezernierte Profilin senkt. Alle anderen Stoffe steigerten das intrazelluläre Profilin. Pioglitazon neutralisierte in den verschiedenen Kombinationen die Profilinsteigerung durch andere Medikamente. Bei der Kombination von Pioglitazon mit Gliclazid setzte sich die Pioglitazonwirkung sogar durch und senkte das Profilin. Die Regulation des endothelialen Profilin gehaltes durch Medikamente und Interleukin-6 stellen neue Erkenntnisse dar. Profilin könnte bei zellulären Regelprozessen der endothelialen Dysfunktion einen wichtigen Botenstoff darstellen. Es könnte ebenfalls ein Mediator der Pioglitazonwirkung sein, da es in wichtige Signalkaskaden involviert ist, die auch durch Pioglitazon angesprochen werden. Da Pioglitazon pathologische Entwicklungen am Endothel und im Gesamtorganismus unterbrechen konnte, scheint es gute Anwendungsmöglichkeiten in der Behandlung des Diabetes mellitus und eventuell der Arteriosklerose zu haben.

6 Literatur

Ahmed M, Forsberg J, Bergsten P (2005), "Protein profiling of human pancreatic islets by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry", *J Proteome Res.* 2005 May-Jun;4(3):931-40.

Akbay E, Yetkin I, Ersoy R, Kulaksizoglu S, Toruner F, Arslan M (2004), "The relationship between levels of alpha1-acid glycoprotein and metabolic parameters of diabetes mellitus", *Diabetes Nutr Metab.* 2004 Dec;17(6):331-5.

Artwohl M, Holzenbein T, Furnsinn C, Freudenthaler A, Huttary N, Waldhausl WK, Baumgartner-Parzer SM (2005), "Thiazolidinediones inhibit apoptosis and heat shock protein 60 expression in human vascular endothelial cells", *Thromb Haemost.* 2005 May;93(5):810-5.

Atkinson SJ, Hosford MA, Molitoris BA (2004), "Mechanism of actin polymerization in cellular ATP depletion", *J Biol Chem.* 2004 Feb 13;279(7):5194-9. Epub 2003 Nov 17.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B (2006), "Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance", *Eur Cytokine Netw.* 2006 Mar;17(1):4-12.

Berhanu P, Kipnes MS, Khan MA, Perez AT, Kupfer SF, Spanheimer RC, Demissie S, Fleck PR (2006), "Effects of pioglitazone on lipid and lipoprotein profiles in patients with type 2 diabetes and dyslipidaemia after treatment conversion from rosiglitazone while continuing stable statin therapy", *Diab Vasc Dis Res.* 2006 May;3(1):39-44.

Betteridge DJ, Verges B (2005), "Long-term effects on lipids and lipoproteins of pioglitazone versus gliclazide addition to metformin and pioglitazone versus metformin addition to sulphonylurea in the treatment of type 2 diabetes", *Diabetologia.* 2005 Dec;48(12):2477-81 Epub 2005 Nov 10.

Birch HE and Schreiber G (1986), "Transcriptional regulation of plasma protein synthesis during inflammation" *J. Biol. Chem.*, Vol. 261, Issue 18, 8077-8080, 06, 1986.

Boden G, Zhang M (2006), "Recent findings concerning thiazolidinediones in the treatment of diabetes", *Expert Opin Investig Drugs*. 2006 Mar;15(3):243-50.

Burlingame AL, Boyd RK, Gaskell SJ (1998), "Mass spectrometry", *Anal Chem*. 1998 Aug 15;70(16):647R-716R.

Campbell FM, Waterston M, Andresen LO, Sorensen NS, Heegaard PM, Eckersall PD (2005), "The negative acute phase response of serum transthyretin following *Streptococcus suis* infection in the pig", *Vet Res*. 2005 Jul-Aug;36(4):657-64.

Carlsohn M (2004), "Coxsackievirus B3-induzierte Veränderungen des Proteoms der Wirtszelle: Untersuchungen am Zellkulturmodell mit Hilfe der Zweidimensionalen Gelelektrophorese", Diplomarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologe der Friedrich Schiller Universität Jena, Biologisch-Pharmazeutische Fakultät.

Ceriello A. (2006), "Effects of gliclazide beyond metabolic control", *Metabolism*. 2006 May;55(5 Suppl 1):S10-5.

Chalmers J, Hunter JE, Robertson SJ, Baird J, Martin M, Franks CI, Whately-Smith CR, Mariz S, Campbell IW (2007), "Effects of early use of pioglitazone in combination with metformin in patients with newly diagnosed type 2 diabetes", *Curr Med Res Opin*. 2007 Aug;23(8):1775-81.

Chen J, Li D, Zhang X, Mehta JL (2004), "Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of human coronary artery endothelial cells: modulation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand pioglitazone", *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2004 Mar;9(1):35-41.

Chu JW, Abbasi F, McLaughlin TL, Lamendola C, Schaaf P, Carlson TH, Leary ET, Reaven GM (2003), "Lipoprotein risk factors for cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus treated with oral antihyperglycaemic agents", *Diabetes Obes Metab*. 2003 Sep;5(5):333-7.

Clapp BR, Hingorani AD, Kharbanda RK, Mohamed-Ali V, Stephens JW, Vallance P, MacAllister RJ (2004), "Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced

nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress”, *Cardiovasc Res.* 2004 Oct 1;64(1):172-8.

Clarkson MR, Murphy M, Gupta S, Lambe T, Mackenzie HS, Godson C, Martin F, Brady HR (2002), “High glucose-altered gene expression in mesangial cells. Actin-regulatory protein gene expression is triggered by oxidative stress and cytoskeletal disassembly”, *J Biol Chem.* 2002 Mar 22;277(12):9707-12. Epub 2002 Jan 9.

Dardik R, Savion N, Gal N, Varon D (2002), “Flow conditions modulate homocysteine induced changes in the expression of endothelial cell genes associated with cell-cell interaction and cytoskeletal rearrangement”, *Thromb Haemost.* 2002 Dec;88(6):1047-53.

de Carvalho MH, Colaco AL, Fortes ZB (2006), “Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance”, *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006 Apr;50(2):304-12. Epub 2006 May 23.

Delanghe JR, Langlois MR (2001), “Hemopexin: a review of biological aspects and the role in laboratory medicine”, *Clin Chim Acta.* 2001 Oct;312(1-2):13-23.

Densem CG, Wassel J, Cooper A, Yonan N, Brooks NH, Keevil B (2004), “Haptoglobin phenotype correlates with development of cardiac transplant vasculopathy”, *J Heart Lung Transplant.* 2004 Jan;23(1):43-9.

Deplanque D (2004), “Cell protection through PPAR nuclear receptor activation”, *Therapie.* 2004 Jan-Feb;59(1):25-9.

de Rekeneire N, Peila R, Ding J, Colbert LH, Visser M, Shorr RI, Kritchevsky SB, Kuller LH, Strotmeyer ES, Schwartz AV, Vellas B, Harris TB (2006), “Diabetes, Hyperglycemia, and Inflammation in Older Individuals: The Health, Aging and Body Composition study”, *Diabetes Care.* 2006 Aug;29(8):1902-8.

Derosa G, Cicero AF, D'Angelo A, Gaddi A, Ciccarelli L, Piccinni MN, Salvadeo SA, Pricolo F, Ferrari I, Gravina A, Ragonesi PD (2006), “Effects of 1 year of treatment with pioglitazone or rosiglitazone added to glimepiride on lipoprotein (a) and homocysteine concentrations in

patients with type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome: a multicenter, randomized, double-blind, controlled clinical trial”, *Clin Ther.* 2006 May;28(5):679-88.

Desfaits AC, Serri O, Renier G (1999), “Gliclazide reduces the induction of human monocyte adhesion to endothelial cells by glycated albumin”, *Diabetes Obes Metab.* 1999 Mar;1(2):113-20.

Ding Z, Lambrechts A, Parepally M, Roy P (2006), “Silencing profilin-1 inhibits endothelial cell proliferation, migration and cord morphogenesis”, *J Cell Sci.* 2006 Oct 1;119(Pt 19):4127-37. Epub 2006 Sep 12.

Dmitri Sviridov, Louise E. Pyle, Matti Jauhiainen, Christian Ehnholm, and Noel H. Fidge (2000), “Deletion of the propeptide of apolipoprotein A-I reduces protein expression but stimulates effective conversion of pre β -high density lipoprotein to α -high density lipoprotein”, *Journal of Lipid Research*, Vol. 41, 1872-1882, November 2000.

Dong J, Radau B, Otto A, Muller E, Lindschau C, Westermann P (2000), “Profilin I attached to the Golgi is required for the formation of constitutive transport vesicles at the trans-Golgi network”, *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jul 21;1497(2):253-60.

Drews, J (2000). "Drug discovery: a historical perspective." *Science* 287(5460): 1960-4.

Duh E, Aiello LP (1999), “Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox”, *Diabetes.* 1999 Oct;48(10):1899-906.

Engler R (1995), “Acute-phase proteins in inflammation“, *C R Seances Soc Biol Fil.* 1995;189(4):563-78.

Engstrom G, Hedblad B, Eriksson KF, Janzon L, Lindgarde F (2005), “Complement C3 is a risk factor for the development of diabetes: a population-based cohort study”, *Diabetes.* 2005 Feb;54(2):570-5.

Engstrom G, Stavenow L, Hedblad B, Lind P, Eriksson KF, Janzon L, Lindgarde F (2003), “Inflammation-sensitive plasma proteins, diabetes, and mortality and incidence of myocardial infarction and stroke: a population-based study”, *Diabetes.* 2003 Feb;52(2):442-7.

Eguchi K, Tomizawa H, Ishikawa J, Hoshide S, Numao T, Fukuda T, Shimada K, Kario K (2007), "Comparison of the effects of pioglitazone and metformin on insulin resistance and hormonal markers in patients with impaired glucose tolerance and early diabetes", *Hypertens Res.* 2007 Jan;30(1):23-30.

Federici M, Lauro R (2005), "Review article: diabetes and atherosclerosis - running on a common road", *Aliment Pharmacol Ther.* 2005 Nov;22 Suppl 2:11-5.

Ferderbar S, Pereira EC, Apolinário E, Bertolami MC, Faludi A, Monte O, Calliari LE, Sales JE, Gagliardi AR, Xavier HT, Abdalla DS (2007), "Cholesterol oxides as biomarkers of oxidative stress in type 1 and type 2 diabetes mellitus", *Diabetes Metab Res Rev.* 2007 Jan;23(1):35-42.

Ferderbar S, Pereira EC, Apolinario E, Bertolami MC, Faludi A, Monte O, Calliari LE, Sales JE, Gagliardi AR, Xavier HT, Abdalla DS (2006), "Cholesterol oxides as biomarkers of oxidative stress in type 1 and type 2 diabetes mellitus", *Diabetes Metab Res Rev.* 2006 Apr 24.

Fonseca VA (2007), "Rationale for the use of insulin sensitizers to prevent cardiovascular events in type 2 diabetes mellitus", *Am J Med.* 2007 Sep;120(9 Suppl 2):S18-25

Fowler B (2005), "Homocystein - an independent risk factor for cardiovascular and thrombotic diseases", *Ther Umsch.* 2005 Sep;62(9):641-6.

Frohlich E, Machicao F, Wahl R (2005), "Action of thiazolidinediones on differentiation, proliferation and apoptosis of normal and transformed thyrocytes in culture", *Endocr Relat Cancer.* 2005 Jun;12(2):291-303.

Gaudio E, Carpino G, Grassi M, Musca A (2006), "Morphological aspects of atherosclerotic lesion: past and present", *Clin Ter.* 2006 Mar-Apr;157(2):135-42.

Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R and Weiss W (2000), "The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients", *Electrophoresis*, 21, 1037-1053.

Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Baldassare JJ, Pollard TD (1990), "The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C", *Science*. 1990 Mar 30;247(4950):1575-8.

Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Doberstein SK, Pollard TD (1991), "Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin", *J Cell Biol*. 1991 Jun;113(5):1081-9.

Gomes MA, Rodrigues FH, Afonso-Cardoso SR, Buso AM, Silva AG, Favoreto S Jr, Souza MA (2006), "Levels of immunoglobulin A1 and messenger RNA for interferon gamma and tumor necrosis factor alpha in total saliva from patients with diabetes mellitus type 2 with chronic periodontal disease", *J Periodontal Res*. 2006 Jun;41(3):177-83.

González JM, Somoza B, Conde MV, Fernández-Alfonso MS, González MC, Arribas SM (2007), "Hypertension increases middle cerebral artery resting tone in spontaneously hypertensive rats. Role of tonic vasoactive factor availability." *Clin Sci (Lond)*. 2007 Dec 19.

Gumieniczek A, Hopkala H, Rolinski J, Bojarska-Junak A (2006), "Interleukin-6 and oxidative stress in plasma of alloxan-induced diabetic rabbits after pioglitazone treatment", *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2006;28(1):81-91.

Hanefeld M, Göke B (2000), "Combining pioglitazone with a sulphonylurea or metformin in the management of type 2 diabetes", *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; Vol. 108: 256-266 DOI: 10.1055/s-2000-8528.

Hansen JE, Bog-Hansen TC, Pedersen B, Neland K (1989), "Microheterogeneity of orosomucoid in pathological conditions", *Electrophoresis*. 1989 Aug-Sep;10(8-9):574-8.

Haupt UR (2005), "Beeinflussung der Akute-Phase-Reaktion durch die Vakuumversiegelung bei Sprunggelenksfrakturen", Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Universität Ulm, 2005.

Herold G. und Mitarbeiter (2005), "Innere Medizin – eine Vorlesungsorientierte Darstellung 2005", Herausgeber: Dr. med. Gerd Herold.

Hetzel J, Balletshofer B, Rittig K, Walcher D, Kratzer W, Hombach V, Haring HU, Koenig W, Marx N (2005), "Rapid effects of rosiglitazone treatment on endothelial function and inflammatory biomarkers", *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005 Sep;25(9):1804-9. Epub 2005 Jul 7.

Hick C und A, "Physiologie", Urban und Fischer, 3. Auflage, 2000.

Horio T, Suzuki M, Takamisawa I, Suzuki K, Hiuge A, Yoshimasa Y, Kawano Y (2005), "Pioglitazone-induced insulin sensitization improves vascular endothelial function in nondiabetic patients with essential hypertension", *Am J Hypertens.* 2005 Dec;18(12 Pt 1):1626-30.

Inzucchi SE (2002), "Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review", *JAMA.* 2002 Jan 16;287(3):360-72. Comment in: *J Fam Pract.* 2002 Apr;51(4):311.

Isoda K, Young JL, Zirlik A, MacFarlane LA, Tsuboi N, Gerdes N, Schonbeck U, Libby P (2006), "Metformin inhibits proinflammatory responses and nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells", *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Mar;26(3):611-7. Epub 2005 Dec 29.

Johansen OE, Jorgensen AP (2006), "Glitazone treatment of type 2 diabetes mellitus", *Tidsskr Nor Laegeforen.* 2006 Aug 10;126(15):1928-1930.

Karow, Thomas und Ruth Lang-Roth, "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden 2006".

Kawerk N, Succari-Aderschlag M, Foglietti MJ (1991), "Microheterogeneity of alpha 1-acid glycoprotein in healthy elderly subjects: patterns obtained by crossed affino-immunoelectrophoresis", *Clin Chim Acta.* 1991 Oct 14;202(1-2):65-72.

Kim SW, Hwang HJ, Kim HM, Lee MC, Shik Lee M, Choi JW, Yun JW (2006), "Effect of fungal polysaccharides on the modulation of plasma proteins in streptozotocin-induced diabetic rats", *Proteomics.* 2006 Oct;6(19):5291-302.

Kleinert P, Kuster T, Arnold D, Jaeken J, Heizmann CW, Troxler H (2007), "Effect of glycosylation on the protein pattern in 2-D-gel electrophoresis", *Proteomics*. 2007 Jan;7(1):15-22.

Klose, J (1975), "Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis in mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals", *Humangenetik*, 26, 231-243.

Koufany M, Moulin D, Bianchi A, Muresan M, Sebillaud S, Netter P, Weryha G, Jouzeau JY (2008), "Anti-inflammatory effect of antidiabetic thiazolidinediones prevents bone resorption rather than cartilage changes in experimental polyarthritis", *Arthritis Res Ther*. 2008 Jan 16;10(1):R6.

Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarpotto E, Poli G (2004), "Trojan horse-like behavior of a biologically representative mixture of oxysterols", *Mol Aspects Med*. 2004 Feb-Apr;25(1-2):155-67.

Levy AP, Larson MG, Corey D, Lotan R, Vita JA, Benjamin EJ (2004), "Haptoglobin phenotype and prevalent coronary heart disease in the Framingham offspring cohort", *Atherosclerosis*. 2004 Feb;172(2):361-5.

Lin Y, Rajala MW, Berger JP, Moller DE, Barzilai N, Scherer PE (2001), "Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue", *J Biol Chem*. 2001 Nov 9;276(45):42077-83. Epub 2001 Sep 6.

Lottspeich F and Zorbas H (1998), "Bioanalytik", Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.

Luthra S, Dong J, Gramajo AL, Chwa M, Kim DW, Neekhra A, Kuppermann BD, Kenney MC (2007), "7-Ketocholesterol activates caspases-3/7, -8, and -12 in human microvascular endothelial cells in vitro", *Microvasc Res*. 2007 Dec 6.

Macfarlane DP, Fisher M (2006), "Thiazolidinediones in patients with diabetes mellitus and heart failure: implications of emerging data", *Am J Cardiovasc Drugs*. 2006;6(5):297-304.

Mamputu JC, Wiernsperger NF, Renier G (2003), "Antiatherogenic properties of metformin: the experimental evidence", *Diabetes Metab.* 2003 Sep;29(4 Pt 2):6S71-6.

Martens FM, Rabelink TJ, op 't Roodt J, de Koning EJ, Visseren FL (2006), "TNF-alpha induces endothelial dysfunction in diabetic adults, an effect reversible by the PPAR-gamma agonist pioglitazone", *Eur Heart J.* 2006 Jul;27(13):1605-9. Epub 2006 Jun 8.

Martens FM, Visseren FL, de Koning EJ, Rabelink TJ (2005), "Short-term pioglitazone treatment improves vascular function irrespective of metabolic changes in patients with type 2 diabetes", *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005 Dec;46(6):773-8.

Matthews VB, Febbraio MA (2008), "CNTF: a target therapeutic for obesity-related metabolic disease?", *J Mol Med.* 2008 Jan 22.

May LT, Torcia G, Cozzolino F, Ray A, Tatter SB, Santhanam U, Sehgal PB, Stern D (1989), "Interleukin-6 gene expression in human endothelial cells: RNA start sites, multiple IL-6 proteins and inhibition of proliferation", *Biochem Biophys Res Commun.* 1989 Mar 31;159(3):991-8.

McLeod JF, Kowalski MA, Haddad JG Jr (1989), "Interactions among serum vitamin D binding protein, monomeric actin, profilin, and profilactin", *J Biol Chem.* 1989 Jan 15;264(2):1260-7.

Maegawa H, Nishio Y, Nakao K, Ugi S, Maeda K, Uzu T, Kashiwagi A (2007), "Short-term low-dosage pioglitazone treatment improves vascular dysfunction in patients with type 2 diabetes", *Endocr J.* 2007 Aug;54(4):613-8. Epub 2007 Jul 20.

Mehta JL, Hu B, Chen J, Li D (2003), "Pioglitazone inhibits LOX-1 expression in human coronary artery endothelial cells by reducing intracellular superoxide radical generation", *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003 Dec;23(12):2203-8. Epub 2003 Sep 4.

Murakami H, Tamasawa N, Matsui J, Yasujima M, Suda T (2000), "Plasma oxysterols and tocopherol in patients with diabetes mellitus and hyperlipidemia", *Lipids.* 2000 Mar;35(3):333-8.

Naito Y, Yoshikawa T (2006), "Oxidative stress involvement and gene expression in indomethacin-induced gastropathy", *Redox Rep.* 2006;11(6):243-53.

Nishio K, Sakurai M, Kusuyama T, Shigemitsu M, Fukui T, Kawamura K, Itoh S, Konno N, Katagiri T (2006), "A randomized comparison of pioglitazone to inhibit restenosis after coronary stenting in patients with type 2 diabetes", *Diabetes Care.* 2006 Jan;29(1):101-6.

Otto C, Otto B, Goke B, Pfeiffer AF, Lehrke M, Vogeser M, Spranger J, Parhofer KG (2006), "Increase in adiponectin levels during pioglitazone therapy in relation to glucose control, insulin resistance as well as ghrelin and resistin levels", *J Endocrinol Invest.* 2006 Mar;29(3):231-6.

Palumbo PJ (1998), "Metformin: effects on cardiovascular risk factors in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus", *J Diabetes Complications.* 1998 Mar-Apr;12(2):110-9.

Parhofer KG, Otto C, Geiss HC, Laubach E, Göke B (2005), "Effect of pioglitazone on lipids in well controlled patients with diabetes mellitus type 2 - results of a pilot study", *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2005 Jan;113(1):49-52.

Pfutzner A, Forst T (2006), "Pioglitazone: an antidiabetic drug with the potency to reduce cardiovascular mortality", *Expert Opin Pharmacother.* 2006 Mar;7(4):463-76.

Pfutzner A, Schneider CA, Forst T (2006), "Pioglitazone: an antidiabetic drug with cardiovascular therapeutic effects", *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2006 Jul;4(4):445-59.

Pilz H.(2004), "Endothel - Endotheldysfunktion – Hypertonie", *Journal für Hypertonie* 2004; 8 (Sonderheft 1), 12-15.

Poland DC, Schalkwijk CG, Stehouwer CD, Koeleman CA, van het Hof B, van Dijk W (2006), "Increased alpha3-fucosylation of alpha1-acid glycoprotein in Type I diabetic patients is related to vascular function", *Glycoconj J.* 2001 Mar;18(3):261-8.

Refai E, Dekki N, Yang SN, Imreh G, Cabrera O, Yu L, Yang G, Norgren S, Rossner SM, Inverardi L, Ricordi C, Olivecrona G, Andersson M, Jornvall H, Berggren PO, Juntti-

Berggren L (2005), "Transthyretin constitutes a functional component in pancreatic beta-cell stimulus-secretion coupling", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 22;102(47):17020-5. Epub 2005 Nov 14.

Renier G, Mamputu JC, Serri O (2003), "Benefits of gliclazide in the atherosclerotic process: decrease in monocyte adhesion to endothelial cells", *Metabolism*. 2003 Aug;52(8 Suppl 1):13-8.

Reynolds K, Goldberg RB (2006), "Thiazolidinediones : beyond glycemic control", *Treat Endocrinol*. 2006;5(1):25-36.

Rios-Vazquez R, Marzoa-Rivas R, Gil-Ortega I, Kaski JC (2006), "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma Agonists for Management and Prevention of Vascular Disease in Patients with and without Diabetes Mellitus", *Am J Cardiovasc Drugs*. 2006;6(4):231-42.

Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY (1999), "Reference distributions for the negative acute-phase serum proteins, albumin, transferrin and transthyretin: a practical, simple and clinically relevant approach in a large cohort", *J Clin Lab Anal*. 1999;13(6):273-9.

Ritchie RF, Palomaki GE, Neveux LM, Navolotskaia O, Ledue TB, Craig WY (2000), "Reference distributions for the positive acute phase serum proteins, alpha1-acid glycoprotein (orosomuroid), alpha1-antitrypsin, and haptoglobin: a practical, simple, and clinically relevant approach in a large cohort", *J Clin Lab Anal*. 2000;14(6):284-92.

Roden M, Laakso M, Johns D, Widel M, Urquhart R, Richardson C, Mariz S, Tan MH (2005), "Long-term effects of pioglitazone and metformin on insulin sensitivity in patients with Type 2 diabetes mellitus", *Diabet Med*. 2005 Aug;22(8):1101-6.

Romeo G, Frangioni JV, Kazlauskas A (2004), "Profilin acts downstream of LDL to mediate diabetic endothelial cell dysfunction", *FASEB J*. 2004 Apr;18(6):725-7. Epub 2004 Feb 20.

Romeo GR, Kazlauskas A (2008), "Oxysterol and Diabetes Activate STAT3 and Control Endothelial Expression of Profilin-1 via OSBP1", *J Biol Chem*. 2008 Apr 11;283(15):9595-605. Epub 2008 Jan 28.

Rottlaender D, Michels G, Erdmann E, Hoppe UC (2007), "Therapy with glitazones -a risk for cardiovascular disease?", *Dtsch Med Wochenschr.* 2007 Dec;132(49):2629-32.

Saenz A, Fernandez-Esteban I, Mataix A, Ausejo M, Roque M, Moher D (2005), "Metformin monotherapy for type 2 diabetes mellitus", *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Jul 20;(3):CD002966.

Salazar R, Bell SE, Davis GE (1999), "Coordinate induction of the actin cytoskeletal regulatory proteins gelsolin, vasodilator-stimulated phosphoprotein, and profilin during capillary morphogenesis in vitro", *Exp Cell Res.* 1999 May 25;249(1):22-32.

Schapira AH (2006), "Etiology of Parkinson's disease", *Neurology.* 2006 May 23;66(10 Suppl 4):S10-23.

Scheffer PG, Henry RM, Wever EJ, van Rooij GJ, Bos G, Heine RJ, Dekker JM, Diamant , Stehouwer CD, Nijpels G, Blankenstein MA, Teerlink T (2004), "LDL oxidative modifications in well- or moderately controlled type 2 diabetes", *Diabetes Metab Res Rev.* 2004 Jul-Aug;20(4):298-304.

Seufert J (2006), "A fixed-dose combination of pioglitazone and metformin: a promising alternative in metabolic control", *Curr Med Res Opin.* 2006;22 Suppl 2:39-48.

Simpson SH, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Eurich DT, Johnson JA, (2006), "Dose-response relation between sulfonylurea drugs and mortality in type 2 diabetes mellitus: a population-based cohort study", *CMAJ.* 2006 Jan 17;174(2):169-74.

Singh N, Webb R, Adams R, Evans SA, Al-Mosawi A, Evans M, Roberts AW, Thomas AW (2005), "The PPAR-gamma activator, Rosiglitazone, inhibits actin polymerisation in monocytes: involvement of Akt and intracellular calcium", *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jul 29;333(2):455-62.

Smithies O and Poulik MD (1956), "Two-dimensional electrophoresis of serum Proteins", *Nature*, 176, 1256-1266.

Snyder S, Coodley EL, Durham BC, Pennock RS (1977), "Serum glycoproteins in coronary artery disease", *Circulation*. 1977 Sep;56(3):359-62.

Sohn RH, Chen J, Koblan KS, Bray PF, Goldschmidt-Clermont PJ (1995), "Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate on human profilin", *J Biol Chem*. 1995 Sep 8;270(36):21114-20.

Sohn RH, Goldschmidt-Clermont PJ (1994), "Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton", *Bioessays*. 1994 Jul;16(7):465-72.

Sourij H, Zweiker R, Wascher TC (2006), "Effects of pioglitazone on endothelial function, insulin sensitivity, and glucose control in subjects with coronary artery disease and new-onset type 2 diabetes", *Diabetes Care*. 2006 May;29(5):1039-45.

Staels B (2005), "PPARgamma and atherosclerosis", *Curr Med Res Opin*. 2005;21 Suppl 1:S13-20.

St-Pierre DH, Faraj M, Karelis AD, Conus F, Henry JF, St-Onge M, Tremblay-Lebeau A, Cianflone K, Rabasa-Lhoret R (2006), "Lifestyle behaviours and components of energy balance as independent predictors of ghrelin and adiponectin in young non-obese women", *Diabetes Metab*. 2006 Apr;32(2):131-9.

Sundsten T, Zethelius B, Berne C, Bergsten P (2007), "Plasma proteome changes in type 2 diabetes mellitus subjects with low or high early insulin response", *Clin Sci (Lond)*. 2007 Oct 26.

Suzuki M, Takamisawa I, Yoshimasa Y, Harano Y (2006), "Association between insulin resistance and endothelial dysfunction in type 2 diabetes and the effects of pioglitazone", *Diabetes Res Clin Pract*. 2006 Sep 26.

Syrenicz A, Garanty-Bogacka B, Syrenicz M, Gebala A, Walczak M (2006), "Low-grade systemic inflammation and the risk of type 2 diabetes in obese children and adolescents", *Neuro Endocrinol Lett*. 2006 Aug 5;27(4).

Szapary PO, Bloedon LT, Samaha FF, Duffy D, Wolfe ML, Soffer D, Reilly MP, Chittams J, Rader DJ (2005), "Effects of pioglitazone on lipoproteins, inflammatory markers, and adipokines in nondiabetic patients with metabolic syndrome", *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Jan;26(1):182-8. Epub 2005 Nov 10.

Tanaka Y (2000), "Integrin activation by chemokines: relevance to inflammatory adhesion cascade during T cell migration", *Histol Histopathol.* 2000 Oct;15(4):1169-76.

Tang BL (2003), "Inhibitors of neuronal regeneration: Mediators and signaling mechanisms", *Neurochem Int.* 2003 Feb;42(3):189-203.

Tang DD, Tan J (2003), "Downregulation of profilin with antisense oligodeoxynucleotides inhibits force development during stimulation of smooth muscle", *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Oct;285(4):H1528-36. Epub 2003 Jun 12.

Terrier N, Senecal L, Dupuy AM, Jausset I, Delcourt C, Leray H, Rafaelsen S, Bosc JY, Maurice F, Canaud B, Cristol JP (2005), "Association between novel indices of malnutrition-inflammation complex syndrome and cardiovascular disease in hemodialysis patients", *Hemodial Int.* 2005 Apr;9(2):159-68.

Tojo H, Kaieda I, Hattori H, Katayama N, Yoshimura K, Kakimoto S, Fujisawa Y, Presman E, Brooks CC, Pilch PF (2003), "The Formin family protein, formin homolog overexpressed in spleen, interacts with the insulin-responsive aminopeptidase and profilin Iia", *Mol Endocrinol.* 2003 Jul;17(7):1216-29. Epub 2003 Apr 3.

Tong NW, Wan Q, Liu XJ, Wu H (2005), "In vitro study of the effects of pioglitazone on endothelial cell functions of human umbilical vein and the mechanisms involved", *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2005 Jul;36(4):525-8.

Touyz RM (2000), "Molecular and cellular mechanisms regulating vascular function and structure--implications in the pathogenesis of hypertension", *Can J Cardiol.* 2000 Sep;16(9):1137-46.

Touyz RM, Schiffrin EL (2006), "Peroxisome proliferator-activated receptors in vascular biology-molecular mechanisms and clinical implications", *Vascul Pharmacol.* 2006 Jul;45(1):19-28. Epub 2006 Jun 16.

Van Campenhout A, Van Campenhout C, Lagrou AR, Abrams P, Moorkens G, Van Gaal L, Manuel-Y-Keenoy B (2006), "Impact of diabetes mellitus on the relationships between iron-, inflammatory- and oxidative stress status", *Diabetes Metab Res Rev.* 2006 Feb 28.

Vinik A, Parson H, Ullal J (2006), "The role of PPARs in the microvascular dysfunction in diabetes", *Vascul Pharmacol.* 2006 Jul;45(1):54-64. Epub 2006 Jun 19.

Wagner O (2003), "Strukturelle Grundlagen und Mechanik von Zytogelen", <http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/volltexte/2003/31/>.

Wald DS, Law M, Morris JK (2002), "Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis", *BMJ.* 2002 Nov 23;325(7374):1202.

Wang CH, Ting MK, Verma S, Kuo LT, Yang NI, Hsieh IC, Wang SY, Hung A, Cherng WJ (2006), "Pioglitazone increases the numbers and improves the functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with diabetes mellitus", *Am Heart J.* 2006 Dec;152(6):1051.e1-8 .

Waugh J, Keating GM, Plosker GL, Easthope S, Robinson DM (2006), "Spotlight on pioglitazone in type 2 diabetes mellitus", *Treat Endocrinol.* 2006;5(3):189-91.

Westermeier R (1990), "Elektrophorese-Praktikum", VCH, Weinheim.

Wilkins MR, Williams KL, Appel RD and Hochstrasser DF (eds.) (1997), "Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics", Springer-Verlag, Heidelberg.

Wilcox R, Bousser MG, Betteridge DJ, Schernthaner G, Pirags V, Kupfer S, Dormandy J; PROactive Investigators (2007), "Effects of pioglitazone in patients with type 2 diabetes with or without previous stroke: results from PROactive (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events 04)", *Stroke.* 2007 Mar;38(3):865-73. Epub 2007 Feb 8.

Witke W (2004), "The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes", Trends Cell Biol. 2004 Aug;14(8):461-9.

Wittenmayer Nina, Burkhard Jandrig, Martin Rothkegel, Kathrin Schlüter, Wolfgang Arnold, Wolfgang Haensch, Siegfried Scherneck, Brigitte M Jockusch (2000), "Tumor suppressor activity of profilin requires a functional actin binding site", Eur J Biochem. 2000 Aug; 267:5247-56.

Wittenmayer N (2002), "Funktionelle Charakterisierung des Cytoskelettproteins Profilin als Tumorsuppressor", Dissertation am Institut für Zoologie, verteidigt am 2003-10-02.

Yarmola EG, Bubb MR (2006), "Profilin: emerging concepts and lingering misconceptions", Trends Biochem Sci. 2006 Apr;31(4):197-205. Epub 2006 Mar 15.

Zhang R, Barker L, Pinchev D, Marshall J, Rasamoeliso M, Smith C, Kupchak P, Kireeva I, Ingratta L, Jackowski G (2004), "Mining biomarkers in human sera using proteomic tools", Proteomics. 2004 Jan;4(1):244-56.

Zhou Q, Wasowicz E, Handler B, Fleischer L, Kummerow FA (2000), "An excess concentration of oxysterols in the plasma is cytotoxic to cultured endothelial cells", Atherosclerosis. 2000 Mar;149(1):191-7.

Zwirska-Korczala K, Jagodzinska J, Wielkoszynski T, Jochem J, Wylezol M, Karpe J, Pardela M (2001), "Plasma oxysterols and vitamin E concentrations and lipid profile in morbidly obese women", Pol Arch Med Wewn. 2001 Oct;106(4):909-15.

Fußnoten:

¹ <http://www.diabetes-world.net/de/62877>, vom 11.10.2005

² http://www.zeit.de/2003/48/Diabetes_neu vom 27.08.06

³ 66th Annual Scientific Sessions of the American Diabetes Association, 09.-13. Juni 2006; IDF Pressemitteilung, <http://www.diabetes.uni-duesseldorf.de/index.html?TextID=3229> vom 27.08.06

⁴ Bochum, 18.07.2001, Nr. 207, "Volkskrankheit Gefäßverschluss, Studie zu Herzinfarkt und Schlaganfall", <http://www.uni-protokolle.de/nachrichten/id/75625/>, vom 11.10.2005

- ⁵ <http://www.diabetes.uni-duesseldorf.de/wasistdiabetes/index.html?TextID=1823>, 11.10.05
- ⁶ <http://www.diabetes.uni-duesseldorf.de/wasistdiabetes/begleit/augen/index.html?TextID=1912>, vom 11.10.2005
- ⁷ www.die-gesundheitsreform.de vom 12.10.2006
- ⁸ http://www.diabetes-news.de/info/wer_sind_wir22.htm vom 27.08.06
- ⁹ <http://www.3sat.de/3sat.php?http://www.3sat.de/nano/news/39281/index.html> vom 27.08.06
- ¹⁰ <http://www.diabetes.uni-duesseldorf.de/patientenfragen/verbreitung/index.html?TextID=1056> vom 11.10.2007
- ¹¹ http://www.zeit.de/2003/48/Diabetes_neu vom 27.08.06 aus ©DIE ZEIT, 20.11.2003 Nr.48
- ¹² <http://medikamente.onmeda.de/Wirkstoffgruppe/Glitazone.html> vom 27.08.06
- ¹³ <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/fileadmin/pza/2003-23/titel.htm> vom 24.01.2008
- ¹⁴ <http://www.takeda.de/arzt/pdfs/actos30.pdf> vom 25.01.2008
- ¹⁵ Parhofer K.G., Zitat aus: "Studienplan zum "Einfluß von Pioglitazone auf Lipidstatus, rheologische Parameter und Endothelfunktion bei Patienten mit stabil eingestelltem Diabetes mellitus Typ 2", 29.01.2001
- ¹⁶ <http://www.vcell.de/proteinstation/proteinstation-proteom-analyse-nach-dem-genom-das-proteom/> vom 05.04.2007
- ¹⁷ <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=Haptoglobin> vom 25.01.2008
- ¹⁸ <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=Haptoglobin> vom 25.01.2008
- ¹⁹ <http://www.danlab.de/colostrum.html> vom 24.03.2007
- ²⁰ <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=Haptoglobin> vom 25.01.2008

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2004 bis August 2006 an der Philipps-Universität Marburg in der klinischen Forschergruppe für Gastroenterologie unter der Leitung von Prof. Dr. R. Göke und Frau Apl. Prof. Dr. rer. nat. B. Lankat-Buttgereit angefertigt.

Herrn Prof. Dr. R. Göke danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, das Interesse an meiner Arbeit und die lehrreichen Sitzungen.

Für die geduldige und kompetente Betreuung möchte ich mich bei Frau Apl. Prof. Dr. rer. nat. B. Lankat-Buttgereit herzlich bedanken.

Des Weiteren danke ich Herr Apl. Prof. Dr. med. Dr. med. habil. Klaus Parhofer von der Medizinischen Klinik II, Großhadern, für die freundliche Überlassung der Proben und die freundliche und gute Korrespondenz.

Ich danke der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Lorenz C. Hofbauer und Dr. Ansgar Schmidt für die freundliche Überlassung von HUVEC Zelllinien.

Weiterhin danke ich Herr Prof. Dr. Peter J. Barth für die Anfertigung der immunhistochemischen Schnitte, für deren gemeinsame Begutachtung, die Beantwortung vieler Fragen und für das Interesse am Thema.

Herr Dr. Sattler und der Arbeitsgruppe der Kardiologie in Marburg danke ich für die Überlassung der Proben aus dem Herzkatheterlabor.

Ich danke Dorothee Bornorden und speziell Harald Schmidt für die Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur.

Meinen Mitdoktoranden Krista Saavedra Blume, Harald Curth, Aysegül Depboylu, Sabine Müller, Nadejda Monsefi und Lilian Sewing danke ich für die gute Zeit.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter Gerda, meinem Vater Bernd, meiner Schwester Simone und Christian Stein, die immer an mich geglaubt haben. Sie haben mir in wichtigen Momenten unendlich viel Liebe und Geduld geschenkt. Danke.

Lebenslauf

Name: Susanne Heipel

Schulbildung:

08/1988 – 07/1992: Grundschule Schrecksbach

08/1992 – 06/2001: Albert-Schweitzer-Gymnasium in Alsfeld

Studium:

09/2001: Immatrikulation für das Fach Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg

09/2003: Absolvierung des Physikums

02-03/2004: Famulatur in der Neurologischen Klinik Marburg

06/2004: Beginn einer experimentellen Doktorarbeit bei der klinischen Forschergruppe der Abteilung Gastroenterologie des Universitätsklinikums Marburg

02-03/2005: Famulatur im Universitätsklinikum Marburg, Abteilung der Inneren Medizin

07/2005: Famulatur in der Praxis für Allgemeinmedizin von Dr. B. Amthauer in Alsfeld

09-10/2005: Famulatur in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Charitè/ Campus Benjamin Franklin Universität in Berlin

08/2006-07/2007 Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Marburg

12/2007-04/2008 Mitarbeiterin im Kompetenznetz Parkinson, Marburg

05/2008 Staatsexamen

08/2008 Arbeitsbeginn in der Neurologischen Klinik in Braunschweig

Verzeichnis meiner akademischen Lehrer:

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Alter, Arnold, Aumüller, Bals, Basler, Bastians, Bauer, Baum, Barth, Becker, Behr, Bertalanffy, Brehm, Buchholz, Cetin, Christiansen, Czubayko, Daut, del Rey, Dietrich, Dodel, Ebel, Eilers, Ellenrieder, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Funck, Geus, Göke, Görg, Gotzen, Gress, Grimm, Gudermann, Grzeschik, Hamer, Hasilik, Hellmeyer, Hertl, Herzum, Hesse, Hinrichs, Hofbauer, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jacob, Jungclas, Kann, Kern, Klaus, Klenk, Klose, Koch, König, Koolman, Köhler, Kriebber, Kretschmer, Krieg, Kroll, Kühne, Kuhlmann, Lang, Lankat-Buttgereit, Lemke, Lill, Löffler, Lohoff, Lutz, Maier, Maisch, Mann, Michl, Moll, Möller, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Plant, Printz, Radsak, Ramaswamy, Rausch, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Sattler, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Schneider, Seitz, Seyberth, Sommer, Steiniger, Steinkamp, Stiasny-Kolster, Stiletto, Suske, Tebbe, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilke, Wulf, Zielke

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur differentiellen Plasmaproteinexpression bei Diabetikern unter Glitazontherapie“ der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie, Endokrinologie und Stoffwechsel (Leitung durch Prof. Dr. Gress) der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Prof. Dr. Rüdiger Göke mit Unterstützung durch Apl. Prof. Dr. rer. nat. B. Lankat-Buttgereit ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den
