

Universitätsklinikum Ulm

Klinik für Innere Medizin I

Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. Thomas Seufferlein

Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. Bernhard Otto Böhm

Assoziationen des PEDFs  
mit Markern des metabolischen Syndroms  
und kardiovaskulärer Sterblichkeit

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von  
Ann-Kathrin Wieland  
aus Bielefeld

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Otto Böhm

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Yuefei Liu

Tag der Promotion: 16.06.2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Der Wachstumsfaktor Pigment epithelium-derived factor (PEDF).....	1
1.2 Untersuchte Parameter .....	4
1.2.1 Body-Mass-Index (BMI)/Gewichtsklassen .....	4
1.2.2 Taillen-Hüft-Index (THI) .....	5
1.2.3 Diabetes mellitus .....	6
1.2.4 Glykiertes Hämoglobin (HbA1c).....	6
1.2.5 Homeostasis model assessment-Index (HOMA-Index) .....	7
1.2.6 Sterberisiko.....	8
1.3 Fragestellung.....	8
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>10</b>
2.1 PEDF-Gehaltbestimmungen an Blutproben .....	10
2.1.1 Proben- und Patientendatengewinnung.....	10
2.1.2 Bestimmung der PEDF- Konzentration mittels ELISA .....	10
2.1.3 Experimentelles Vorgehen.....	12
2.2 Statistische Analyse .....	16
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>17</b>
3.1 Untersuchungsgruppen .....	17
3.2 Korrelationen klinischer und biochemischer Parameter mit PEDF .....	19
3.2.1 PEDF-Gehalt und BMI .....	19
3.2.2 PEDF-Gehalt und Gewichtsklassen.....	20
3.2.3 PEDF-Gehalt und THI.....	21
3.2.4 PEDF-Gehalt und Diabetes mellitus .....	22

3.2.5	PEDF-Gehalt und HbA1c.....	23
3.2.6	PEDF-Gehalt und HOMA-Index.....	24
3.2.7	PEDF-Gehalt und Sterberisiko.....	25
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>27</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>31</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>32</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>38</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>53</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>54</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ADA	American Diabetes Association
BMI	Body-Mass-Index
CVD	Cardiovascular disease
DCCT-A1c	Diabetes Control and Complications Trial-A1c
DM2	Diabetes mellitus Typ 2
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HbA1c	Glykiertes Hämoglobin
HOMA	Homeostasis model assessment
kDa	Kilodalton
Lj	Lebensjahr
LURIC-Study	Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study
NFAT	Nuclear factor of activated T cells
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of Activated B cells
NSC	Neural stem cells
PEDF	Pigment epithelium-derive-factor
PEDF-Rs	Pigment epithelium-derived-factor receptors
PPAR- $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated-receptor gamma
RCL	Reactive centre loop
Streptavidin-HPR-Konjugat	Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat
THI	Tailen-Hüft-Index
uPA	Urokinase-type plasminogen activator
uPAR	Urokinase-type plasminogen activator receptor

## 1. Einleitung

### 1.1 Der Wachstumsfaktor Pigment epithelium-derived factor (PEDF)

Wachstumsfaktoren sind Botenstoffe, die sowohl Zellwachstum als auch Gewebeproliferationen und Differenzierungen steuern können (Alberts et al. 2012). Sobald die Wachstumsfaktoren von Rezeptoren auf den Oberflächen ihrer Zielzellen erkannt werden, wirken sie über eine Signalkaskade entweder inhibitorisch oder exzitatorisch (Alberts et al. 2012). Ein komplexer Signalweg im Inneren der Zelle führt dabei zur Genabschaltung oder Genaktivierung (Alberts et al. 2012). Dies wurde beispielsweise bei Wundheilungen aber auch bei pathologischen Mechanismen beobachtet (Filleur et al. 2009; Tsao et al. 2006). Zu den Wachstumsfaktoren zählen Proteine und Zytokine (Alberts et al. 2012).

Bei dem Wachstumsfaktor Pigment epithelium-derived factor (PEDF) handelt es sich um ein 50 kDA schweres Glykoprotein (Chung et al. 2008; Filleur et al. 2009). Es besteht aus 418 Aminosäuren, wobei die extrazellulären Proteine von PEDF in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur die Form von Serpinen aufweisen (Gong et al. 2010). Daher gehört PEDF zu der Familie der Serin-Peptidase-Inhibitoren, ohne jedoch deren hemmende Wirkung zu besitzen (Filleur et al. 2009; Xu et al. 2011).

Der Wachstumsfaktor PEDF besitzt die, für Serpine typische, Struktur einer reaktiven Schleife (reactive centre loop; RCL) (Filleur et al. 2009). Die Funktion des RCLs konnte beim PEDF noch nicht eindeutig geklärt werden. Bekannt ist bisher, dass PEDF an Kollagen1 und Heparin binden kann (Olson et al. 2011).

Die oben angeführten Erkenntnisse konnten zumeist durch Tierexperimente an Mäusen gewonnen werden. Dabei wurde das Protein PEDF vorwiegend aus menschlichen fetalen Retinal-Pigment-Epithelium-Zellen isoliert (Tombran-Tink et al. 2004).

PEDF wird in vielen Geweben des menschlichen Körpers exprimiert (Samkharadze et al. 2011). Die höchste Konzentration dieses Proteins konnten in Augen, Hoden, Ovarien, Plazenta und Pankreas nachgewiesen werden (Samkharadze et al. 2011). Hepatozyten exprimieren besonders hohe PEDF-Konzentrationen (Chung et al. 2008). Im verstärkten Maß ist PEDF auch in adipösen Körperbereichen zu finden (Filleur et al. 2009).

PEDF ist durch seine Pluripotenz gekennzeichnet. Es ist bekannt, dass der Wachstumsfaktor sowohl antiangiogenetisch als auch antiproliferierend, differenzierungsfördernd, neuroprotektiv und antiinflammatorisch wirken kann (Akiyama et al. 2010; Filleur et al. 2009; Sabater et al. 2010; Sánchez-Sánchez et al. 2008).

Es wird angenommen, dass PEDF zum Schutz vor oxidativem Stress beiträgt (Filleur et al. 2009; Tsao et al. 2006). Während der Faktor bislang hauptsächlich durch seine starke antiangiogenetische Wirkung bekannt war, beschreibt die Veröffentlichung von Elahy et al. (2012) verschiedene Wirkungen auf Stammzellen. Sie sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Elahy et al. 2012).

**Tab. 1:** Effekte vom Pigment epithelium-derive-factor (PEDF) auf verschiedene Stammzelltypen modifiziert nach Elahy et al. (Elahy et al. 2012)

Stammzelltyp	PEDF-Wirkung	Referenzen
Menschliche embryonale Stammzellen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellproliferation</li> <li>• Unterstützung</li> <li>• Überleben</li> </ul>	Anisimov et al. 2011; Zhu et al. 2011
Neurale Stammzellen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selbsterneuerung</li> <li>• Wartung von Multipotenz</li> <li>• Aktivierung der Zellteilung</li> <li>• antiapoptotische Effekte</li> </ul>	Quan et al. 2005; Ramírez-Castillejo et al. 2006
Retinale Stammzellen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Selbsterneuerung</li> <li>• Zellexpansion</li> <li>• Migrationshemmung und Apoptoseinduzierung von Endothelzellen</li> <li>• Regression der CNV (bei niedrigen Dosen)</li> <li>• Entwicklung von Neovaskularisationen (in hohen Dosen)</li> </ul>	Andreu-Agulló et al. 2009; Hou et al. 2010; Tong et al. 2006

Erste Untersuchungen zeigen, dass der antiangiogenetische und neuroprotektive Effekt durch eine Aktivität der N-terminalen Region des Proteins entsteht, während die C-terminalen Peptide mit den Membranrezeptoren interagieren (Filleur et al. 2009; Sánchez-Sánchez et al. 2008). Wie PEDF biologische Prozesse genau kontrolliert, ist im Detail noch nicht bekannt. Erste Studien weisen darauf hin, dass verschiedene Rezeptoren (PEDF-Rs) für die biologischen Effekte von PEDF denkbar sind. Deren weitere Erforschung könnte dazu beitragen die Mechanismen der Rezeptoren-Liganden-Interaktion bei PEDF genauer zu verstehen. Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B), nuclear factor of activated T cells (NFATs), der peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- $\gamma$ ) oder das System des urokinase-type

plasminogen activator (uPA) und sein Rezeptor urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR), werden über PEDF-aktivierte Signalkaskaden reguliert (Dass et al. 2008; Elahy et al. 2012; Ho et al. 2007; Yabe et al. 2001; Zaichuk et al. 2004).

Andreu-Agulló et al. zeigten auf, dass PEDF ein Gleichgewicht zwischen symmetrischen und asymmetrischen Sequenzen in neural stem cells (NSCs) moduliert. Im multipotenten Entwicklungsstand dieser Zellen begünstigt PEDF deren selbstgesteuerte Spaltung und Instandhaltung dadurch, dass er auf die Notch-Transkriptions-Aktivität wirkt (Andreu-Agulló et al. 2009; siehe hierzu auch Elahy et al. 2012).

Quantitativ gesehen zählt PEDF zu den bedeutendsten Adipokinen und konnte in Mäuseexperimenten bei adipositasbedingter Insulinresistenz als Vermittler nachgewiesen werden (Böhm et al. 2012). Böhm et al. belegten, dass Personen mit erhöhtem Typ-2-Diabetes-Risiko einen PEDF-Gen-Polymorphismus besitzen. Dieser bestimmt, neben der Körperfettmasse, die körperfettabhängige Insulinsensitivität und den Plasma-Leptin-Spiegel (Böhm et al. 2012). Daraus lässt sich ein Forschungsinteresse der Endokrinologie ableiten, die Funktion und Wirkungsweise von PEDF detaillierter offenzulegen. Aktuelle Studien konzentrieren sich auf die Prognose zum Fortschreiten von Erkrankungen. Dazu zählen sowohl die Bereiche der Retino- als auch der Nephropathie. Beide Krankheitsbilder treten vermehrt bei langfristig bestehendem Diabetes mellitus auf (Matsuyama et al. 2008).

In dieser Untersuchung sollen weitere Erkenntnisse über die Assoziation von PEDF mit Markern des metabolischen Syndroms sowie der kardiovaskuläre Sterblichkeit gewonnen werden. Dabei wird der Zusammenhang von PEDF und dem Body-mass-Index, den Gewichtsklassen, dem Taillen-Hüft-Index, Diabetes mellitus, glykierten Hämoglobin, Homeostasis model assessment-Index (HOMA) und dem Sterberisiko untersucht. Diese Parameter werden im folgenden Abschnitt erläutert.

## 1.2 Untersuchte Parameter

### 1.2.1 Body-Mass-Index (BMI)/Gewichtsklassen

Forschungsergebnisse zeigen, dass sich nach Gewichtsverlust von Patienten die PEDF-Konzentration signifikant verringert (Sabater et al. 2010). Aus diesen Beobachtungen leitet sich die Frage ab, ob der PEDF-Spiegel generell mit dem Körpergewicht korreliert. Als Parameter, die das Körpergewicht einschließen, wurden der Body-Mass-Index (BMI) und die entsprechende Gewichtsklassen betrachtet.

Der BMI ist eine Maßzahl für die Bewertung des Körpergewichts in Relation zu der Körpergröße. Die Formel zur Berechnung lautet dabei:

$$\text{BMI [kg/m}^2\text{]} = \text{Körpergewicht [kg]} / (\text{Körpergröße [m]})^2$$

Die Verwendung des BMI als Untersuchungseinheit wird kritisch betrachtet. Andere Indizes beschreiben die Gewichtsklassen detaillierter. Durch seine verbreitete Anwendung gilt er jedoch weiter als Standardmaß für die Einschätzung von Gewichtsklassen (Bedogni et al. 2010) und wird auch in diese Arbeit einbezogen.

Ein BMI von 30 kg/m<sup>2</sup> gilt als Schwellenwert für den Übergang zur Adipositas, bei dem eine erhöhte Morbidität nachzuweisen ist (Dietel et al. 2012).

Adipositas kann in drei Schweregrade eingeteilt werden. Die hier gewählten Einteilungen stammen aus den klinischen Leitlinien der WHO zur Identifizierung, Bewertung und Behandlung von Übergewicht und Adipositas bei Erwachsenen und sind in der folgenden Tabelle dargestellt (WHO, 2000).

**Tab. 2:** Modifizierte Darstellung der Klassifizierung von Gewicht und Fettleibigkeit anhand des Body-Mass-Index (BMI) (WHO, 2000)

Gewichtsklassen	BMI [kg/m <sup>2</sup> ]
Untergewicht	<18,5
Normalgewicht	18,5-24,9
Übergewicht	25,0-29,9
Fettleibigkeit (I)	30,0-34,9
Fettleibigkeit (II)	35,0-39,9
Extreme Fettleibigkeit (III)	40

Insbesondere beim Vorliegen von Risikofaktoren, die durch eine Adipositas beeinflusst werden, wie beispielsweise eine arterielle Hypertonie oder eine gestörte Glukosetoleranz, gelten schon BMI-Werte zwischen 25 und 30 kg/m<sup>2</sup> als klinisch

relevant und behandlungsbedürftig (Dietel et al. 2012). Im Zusammenhang mit Rauchen steigt zudem die Mortalität stark an (Calle et al. 1999).

In dieser Untersuchung wurde insbesondere Adipositas mit erhöhter Morbidität im Zusammenhang mit dem PEDF-Spiegel des Patientenkollektivs betrachtet.

### **1.2.2 Taillen-Hüft-Index (THI)**

Mit Hilfe des Taillen-Hüft-Index (THI) wird versucht die Fettgewebsverteilung einer Person zu erfassen. Beim THI wird das Verhältnis vom Taillen- zum Hüftumfang in Relation gesetzt. Gemessen wird der Taillenumfang mittels drucklosen Anlegens eines Maßbands auf Nabelhöhe. Der Hüftumfang wird an der maximalen Beckenerhebung gemessen und in Zentimetern angegeben (Bozorgmanesh et al. 2010). Laut einer Validitätsstudie lagen 1990 die durchschnittlichen THI-Werte für Männer bei 0,69 und für Frauen bei 0,70 (Rimm et al. 1990).

Mit Hilfe des THI lassen sich zwei Fettverteilungsmuster differenzieren. Ab einem Verhältnis von über 0,9 bei Frauen bzw. über 1,0 bei Männern, spricht man vom viszeralen oder abdominalen /androidem Fett. Abzugrenzen davon ist das gynoide Fettverteilungsmuster, welches die Fettablagerung im Glutea- und Oberschenkelbereich beschreibt. Die Verteilung des Fettgewebes spielt eine bedeutende Rolle beim Ausmaß der Adipositas assoziierten Morbidität. Die genauen Ursachen des unterschiedlichen Morbiditätsrisikos sind noch unbekannt.

Bewiesen ist, dass es bei dem abdominalen Fettverteilungsmuster zu einer stärkeren Entwicklung von Adipositas bedingten Folgeerkrankungen kommt (Dietel et al. 2012). Diese beschleunigen das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen. Bei einem erhöhten THI besteht ein größeres Risiko für die Entwicklung ischämischer Herzkrankheiten und kardiovaskulärer Erkrankungen (Freedman et al. 2007).

Daten von Vague beschreiben, dass Adipositas zudem die Entstehung von Diabetes begünstigt. Er war der Erste, der bei Frauen mit einer androiden Fettleibigkeit eine hohe Prävalenz für die Entstehung von Diabetes erkannte (Vague 1956).

In einer Studie von Yamagishi et al. wird beschrieben, dass ein enger Zusammenhang zwischen PEDF und dem metabolischen Syndrom besteht (Yamagishi et al. 2006).

### 1.2.3 Diabetes mellitus

Bei Diabetes mellitus („Honigsüßer Durchfluss“) handelt es sich um eine chronische Stoffwechselkrankheit. Sie kann entweder auf einem absoluten oder auf einem relativen Insulinmangel oder einer Kombination von beidem beruhen.

Häufige Langzeitkomplikationen der Erkrankung sind unter anderem Blutgefäß- und Nervenschädigungen (Dietel et al. 2012). Die damit verbundenen Veränderungen zahlreicher Organsysteme stellen sowohl für die betroffene Einzelperson als auch für das deutsche Gesundheitssystem eine hohe Belastung dar. Es wird vermutet, dass Diabetes mellitus künftig weltweit eine der wichtigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität sein wird (Dietel et al. 2012).

Die Erkrankung kann ätiologisch klassifiziert werden. In der folgenden Tabelle sind die vier Hauptgruppen aufgeführt.

**Tab. 3:** Modifizierte Darstellung der ätiologischen Klassifikationen des Diabetes Mellitus (American Diabetes Association, 2010)

Klasse	Ätiologie
I	Typ 1 Diabetes (absoluter Insulinmangel durch $\beta$ -Zelldestruktion)
II	Typ 2 Diabetes (Insulinresistenz)
III	Andere Diabetesformen (z.B. durch genetische Defekte, medikamentös oder hormonell induziert)
IV	Gestrationsdiabetes (metabolische Veränderung)

Überernährung und eine daraus entstehende Adipositas gelten als entscheidende Manifestationsfaktoren der diabetischen Erkrankung. Hierbei kommt es aufgrund von langfristig hohen Insulinspiegeln zu einer Abnahme der Dichte und der Sensibilität der Insulinrezeptoren, sodass die Insulinwirkung insgesamt vermindert wird (Orgaz et al. 2009). Diabetes im Zusammenhang mit dem PEDF-Plasmaspiegel zu bestimmen, beruht auf der Erkenntnis, dass PEDF als Angiogeneseinhibitor bekannt ist (Ogata et al. 2007). In den Untersuchungen wurden die PEDF-Konzentrationen in Augen von Patienten mit diabetischen Retinopathien bestimmt. Es zeigten sich niedrige okuläre PEDF-Spiegel (Boehm et al. 2003), während der PEDF-Spiegel im Blut von Diabetikern unbekannt war (Ogata et al. 2007).

### 1.2.4 Glykiertes Hämoglobin (HbA1c)

Glykiertes Hämoglobin (HbA1c) ist ein Laborparameter, der den prozentualen Glykohämoglobinanteil am Gesamthämoglobin der Erythrozyten angibt. Er eignet sich

sowohl zur Primärdiagnostik als auch zur Erfassung der Langzeitstoffwechseleinstellung bei Diabetes mellitus (Siegel et al. 2009). Ist der Blutzuckerspiegel bei nicht oder schlecht eingestellten Diabetikern für längere Zeit stark erhöht, findet eine vermehrte Glykierung statt und es kommt zu einem Anstieg des HbA1c-Wertes (Siegel et al. 2009). Besonders bei Patienten mit metabolischem Syndrom und Diabetes mellitus Typ 2, sollte der Glukosespiegel mittels HbA1c gut kontrolliert werden, da ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen (CVD) besteht (Grundy et al. 2004).

Als Standard zur HbA1c-Bestimmung dienen die Diabetes Control and Complications Trial-A1c (DCCT-A1c) kalibrierten Assays.

Als Therapieziel bei diabetischen Patienten empfiehlt die American Diabetes Association (ADA) einen möglichst normnahen Wert zu erreichen, ohne jedoch in den Risikobereich für Hypoglykämien zu kommen (American Diabetes Association 2010). Das individuelle Ziel kann dabei zwischen  $< 6,5\%$  und  $< 7,5\%$  liegen. Laut ADA sollte die Bestimmung des HbA1c mindestens zweimal jährlich erfolgen, bei unangemessener Stoffwechseleinstellung oder Therapieänderung sogar alle 3 Monate (American Diabetes Association, 2010). Als repräsentativer Parameter zur Glukosekontrolle wurde der HbA1c auch in der Studie von Ogata et al. verwendet und im Vergleich zum PEDF-Level betrachtet (Ogata et al. 2007).

### **1.2.5 Homeostasis model assessment-Index (HOMA-Index)**

Der Homeostasis model assessment-Index (HOMA-Index) versucht, neben vielen anderen Indices, Anhalt auf die Insulinsensibilität zu geben. Er ermöglicht Rückschlüsse auf die Betazellfunktion und gilt als möglicher Indikator um das Verhältnis zwischen hepatischer Glukoseabgabe und pankreatischer Insulinsekretion zu beschreiben (Matthews et al. 1985). Die Formel für den Index legten Matthews et al. fest. Die Berechnung erfolgt aus dem Nüchterninsulinspiegel und dem Nüchtern-glukosespiegel und wird, je nach der Messeinheit der Ausgangsdaten der Nüchtern-glukose, angegeben:

$\text{HOMA-Index} = (\text{Nüchterninsulin [mU/l]} \times \text{Nüchtern-glukose [mg/dl]}) / 405$  oder

$\text{HOMA-Index} = (\text{Nüchterninsulin [mU/l]} \times \text{Nüchtern-glukose [mmol/dl]}) / 22,5$

Die errechneten Werte lassen sich dann in Bezug zur Insulinwirkung setzen, wie die folgende Tabelle zeigt.

**Tab. 4:** Interpretation der Homeostasis model assessment (HOMA)-Werte (Hagemann, 2011)

HOMA-Index	Interpretation
≤1	Normal
>2	Hinweis auf eine Insulinresistenz
>2,5	Insulinresistenz sehr wahrscheinlich
>5,0	Durchschnittswert bei Typ 2-Diabetikern

Eine Assoziation der Insulinsensitivität mit frei zirkulierendem PEDF-Level beim Menschen wurde zum ersten Mal von Sabater et al. nachgewiesen (Sabater et al. 2010).

### 1.2.6 Sterberisiko

Im Rahmen der Framinghamstudie aus den Vereinigten Staaten wurden seit 1948 Teilnehmer in regelmäßigen Abständen unter Betrachtung verschiedener gesundheitlicher Aspekte untersucht. In dieser Kohortenstudie wurde das Zusammenspiel vieler Risikofaktoren beschrieben, die die Sterblichkeitsrate erhöhen (Calle et al. 1999). Herz-Kreislauf-Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in den USA dar. Früh wurde erkannt, dass eine Korrelation zwischen einem erhöhten BMI und einem vergrößerten Hüftumfang mit einem erhöhten Sterberisiko besteht. Sowohl bei einem BMI von 30 kg/m<sup>2</sup>, als auch bei einem abdominalen Fettverteilungsmuster, liegt nachweislich eine erhöhte Morbidität vor (Dietel et al. 2012). Die Todesursache ist dabei häufig Herz-Kreislauf-Versagen, welches als Folge aus der Grunderkrankung entsteht (Higgins et al. 1987).

Dass auch Diabetes und das metabolische Syndrom zu einer erhöhten Morbidität führen können, wird in der Veröffentlichung von Freedmann et al. geschildert (Freedmann et al. 2007).

## 1.3 Fragestellung

Die Studie erzielt eine genauere Erforschung der Rolle des Wachstumsfaktors PEDF als kardio-metabolischer Risikomarker an einem Hochrisikokollektiv (LURIC-Kohorte). Entsprechend des Studienkollektivs wurden Schwerpunkte in den Bereichen der Diabetes mellitus, Insulinresistenz sowie Übergewichtigkeit ge-

setzt, welche als Hauptprobleme unserer Wohlstandsgesellschaft gelten [15] (Dietel et al. 2012).

Anhand der Betrachtung folgender klinischer und chemischer Parametern unserer Datensammlung wurde die Studie unter folgenden Fragestellungen vorrangig betrachtet:

1. Bestehen relevante Korrelationen zwischen der PEDF-Konzentration und dem BMI?
2. Sind Zusammenhänge zwischen der PEDF-Konzentration und den Gewichtsklassen erkennbar?
3. Besteht eine Abhängigkeit zwischen der PEDF-Konzentration und dem THI?
4. Gibt es eine Relation zwischen der PEDF-Konzentration und dem Diabetes mellitus?
5. Bestehen signifikante Zusammenhänge zwischen der PEDF-Konzentration und dem HbA1c?
6. Sind relevante Assoziationen zwischen der PEDF-Konzentration und dem HOMA-Index erkennbar?
7. Besteht eine Abhängigkeit zwischen der PEDF-Konzentration und dem Sterberisiko?

Weitere Studienergebnisse sind außerdem im Anhang zu finden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 PEDF-Gehaltbestimmungen an Blutproben

#### 2.1.1 Proben- und Patientendatengewinnung

Sowohl die untersuchten Blutproben, wie auch die dazugehörigen Patientendaten, stammen aus einer gemeinschaftlich für Forschungszwecke angelegten Datenbank der Universitätsklinik Ulm.

Hieraus wurden insgesamt 2981 Blutproben in Hinblick auf deren PEDF-Konzentration untersucht. 169 der untersuchten Patienten stammen dabei aus dem Patientenkollektiv der internen medizinischen Zentrumsdatenbank der Universität Ulm (Deutschland). Die übrigen 2812 Patientensätze stammen aus einer Datenbank namens LURIC (Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health). Als interne Kontrollen verwendeten wir bei jeder Elisaplatte zwei ausgewählte Patientenserien aus der Blutbank. Bei dem Gesamtkollektiv wurden als Schwerpunkte die Aspekte Geschlecht, Alter, Gewicht und Diabetes mellitus im Zusammenhang mit der PEDF-Konzentration betrachtet. Weitere Datenbetrachtungen sind aufgefächert im Anhang zu finden.

Bei dem Großteil der untersuchten Patienten war Diabetes mellitus bekannt, wovon vorwiegend Typ 2 vertreten war.

Alle Probanden hatten das Mindestalter von 18 Jahren. Eine Einverständniserklärung der Einzelpersonen lag vor.

#### 2.1.2 Bestimmung der PEDF- Konzentration mittels ELISA

Um die quantitative PEDF-Konzentration in den verschiedenen Patientenserien zu ermitteln, wurde die Enzyme-linked immunosorbent assay-Technik (ELISA-Technik) verwendet.

Es wurden kommerzielle ELISA-Kits RD191114200R HUMAN PEDF ELISA der Firma BioVendor Research and Diagnostic Products (Modrice, Czech Republic, 2010) verwendet. Die Nachweisgrenze für PEDF betrug 1200 ng/ml, die Intra-Assay-Variabilität lag bei 5-10 %. Der gesamte Inhalt des Kits ist in der folgenden Tabelle 5 aufgelistet.

**Tab. 5:** Übersicht der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Kit-Reagenzien modifiziert nach Herstellerangaben (BioVendor Research and Diagnostic Products, 2010)

Kitkomponente	Zustand	Menge
antikörperbeschichtete Mikrotitrerieplatte	direkt verwendbar	96 Vertiefungen
biotinmarkierte Antikörper	direkt verwendbar	13 ml
Streptavidin-HPR-Konjugat	direkt verwendbar	13 ml
Masterstandard	gefriergetrocknet	2 Ampullen
Qualitätskontrollen (hohe PEDF-Konzentration)	gefriergetrocknet	2 Ampullen
Qualitätskontrollen (niedrige PEDF-Konzentration)	gefriergetrocknet	2 Ampullen
Verdünnungspuffer	direkt verwendbar	75 ml
Waschlösung	konzentriert	100 ml

Abbildung 1 stellt den Inhalt des Kits noch einmal photographisch dar.



**Abb. 1:** Blutproben (links), Mikrotitrerieplatte (mittig) und BioVendor Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Kit mit: Verdünnungspuffer für Blutseren und Herstellerkontrollen, Herstellerstandard (hoch und niedrig), Masterstandard, Waschlösungskonzentrat, biotinmarkierte Antikörper, Streptavidin-HPR-Konjugat, Substratlösung, Stopplösung

Tabelle 6 beschreibt die verwendeten Laborutensilien.

**Tab. 6:** Auflistung verwendeter Geräte mit Hersteller/Lieferfirmen

Geräte	Hersteller/Lieferfirma
Reagenzgläser	Greiner bio-one, Deutschland
Pipetten	Gilson, Frankreich
Multipipette plus	Eppendorf, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender&Hobein AG, Schweiz
MTS 2/4 digital Mikrotiterschüttler	IKA, Deutschland
ELx808 Absorptions-Reader für Mikroplatten	BioTek, Deutschland

### 2.1.3 Experimentelles Vorgehen

Die ELISA-Tests wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Zu Beginn wurden die gefrorenen Blutproben einige Minuten bei Zimmertemperatur auf Eis gelegt. Nach dem Auftauen konnten sie verdünnt werden. Dazu wurden 5 µl des Serums (Gilsonpipette, 20 p mit gestopftem Aufsatz) abpipettiert und mit 495 µl (Multipipette) des Verdünnungspuffers mittels Vortexgerät (Stufe 5-6) in Reagenzgläsern vermischt. Es folgte eine zweite Verdünnungsreihe. Dafür wurden 5 µl des neuen Flüssigkeitsgemischs abpipettiert und mit 395 µl Verdünnungspuffers, wie oben beschrieben, gut vermischt (siehe Abbildung).



**Abb. 2:** Serum- und Puffervermischung am Vortexgerät zur Herstellung der Verdünnungsreihen  
Die Herstellerstandards, sowie die zwei mitgelieferten Kontrollen, wurden kitspezifisch (siehe Abbildung 1: gelber Zettel) mit den Verdünnungspuffer (Gilsonpipette;

1000 p mit gestopften Aufsätzen) vermennt. Diese Mischungen wurden innerhalb von 15 Minuten immer wieder geschwenkt. Die homogene Lösung stellte den Masterstandard und damit das Ausgangsprodukt für die Standardverdünnungsreihe dar. Die Verdünnung erfolgte nach den in Tabelle 7 aufgeführten Herstellerangaben.

**Tab. 7:** Anleitung zur Herstellung der Standardverdünnungsreihe (BioVendor Research and Diagnostic Products, 2010)

Volumen vom Standard	Verdünnungspuffer	Konzentration
Stock	-	6,00 ng/ml
250 µl vom Stock	250 µl	3,00 ng/ml
250 µl von 3,00 ng/ml	250 µl	1,50 ng/ml
250 µl von 1,50 ng/ml	375 µl	0,60 ng/ml
250 µl von 0,60 ng/ml	250 µl	0,30 ng/ml
250 µl von 0,30 ng/ml	250 µl	0,15 ng/ml

Die Kontrollröhrchen (hoch und niedrig konzentriert) wurden nicht weiter verdünnt, da sie als Pipettierkontrollen der ursprünglichen Verdünnungsreihe dienten. In der folgenden Abbildung 3 sind die verwendeten Materialien zu sehen.



**Abb. 3:** Verwendete Pipetten und Reagenzröhrchen zur Herstellung der Verdünnungsreihen und Übersichtstabelle zum Einbringen der Proben auf der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Platte

Von den entstandenen Lösungen wurden je 100 µl der Standardreihe mittels Gilsonpipette (200 p mit gestopftem Aufsatz) in die ELISA-Platte pipettiert. Sowohl die Standardreihen, als auch die Kontrollen sowie die reine Pufferlösung (zur späteren Kalibrierung im Faxgerät) wurden jeweils zweifach eingebracht. Die Platte

wurde mit einer Klebefolie bedeckt und für 1h bei 300 rpm und Raumtemperatur auf dem Mikrotitrierschüttler gerüttelt (siehe Abbildung 4).

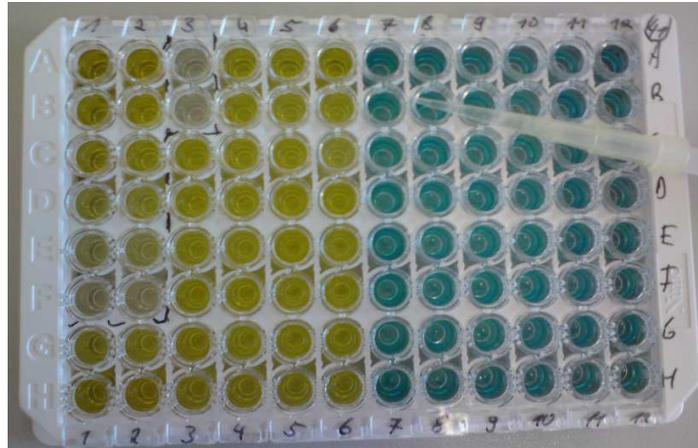


**Abb. 4:** MTS 2/4 digital Mikrotitrierschüttler mit Serumproben befüllter Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Platte beim ersten Inkubationsschritt

Nach der Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Folie entfernt und die Kühlen entleert. Jede Vertiefung wurde fünfmal mit 0,35 ml einer Waschkonzentratlösung (100 ml Waschkonzentrat zu 900 ml destilliertem Wasser) ausgewaschen und nach jeder Waschung kräftig ausgeklopft. Es durften keine Luftblasen oder Wasserspuren in den Kühlen mehr sichtbar sein.

Die weiteren Pipettierschritte erfolgten alle mit der gleichen Eppendorfer Multipipette (mit jeweils einem ungestopften Aufsatz). Zunächst wurden 100 µl biotinmarkierte Antikörper in jede der Kühlen eingebracht, die Platte wieder mit Folie beklebt und 1h bei Raumtemperatur mit 300 rpm auf dem Mikrotitrierschüttler inkubiert. Im Anschluss folgte die Entleerung und Waschung wie zuvor. Daraufhin wurden 100 µl des Streptavidin-HRP-Konjugat in alle Vertiefungen eingebracht, klebend abgedeckt und wieder 1h bei 300 rpm auf dem Mikrotitrierschüttler inkubiert. Nach der Endwaschungsreihe wurden 100 µl Substratlösung in die Kühlen einpipettiert. Die Platte musste in diesem Zustand ruhig 5 Minuten im Dunkeln stehen. Hierbei verfärbten sich die bisher klaren Substanzen bläulich.

Es folgte das direkte Einpipettieren der Stopplösung. Dabei wurde ein Farbumschlag von blau zu gelb sichtbar, wie in der Abbildung 6 erkennbar ist. Die Farbinintensität stand wieder in Relation zur enthaltenen PEDF-Menge.



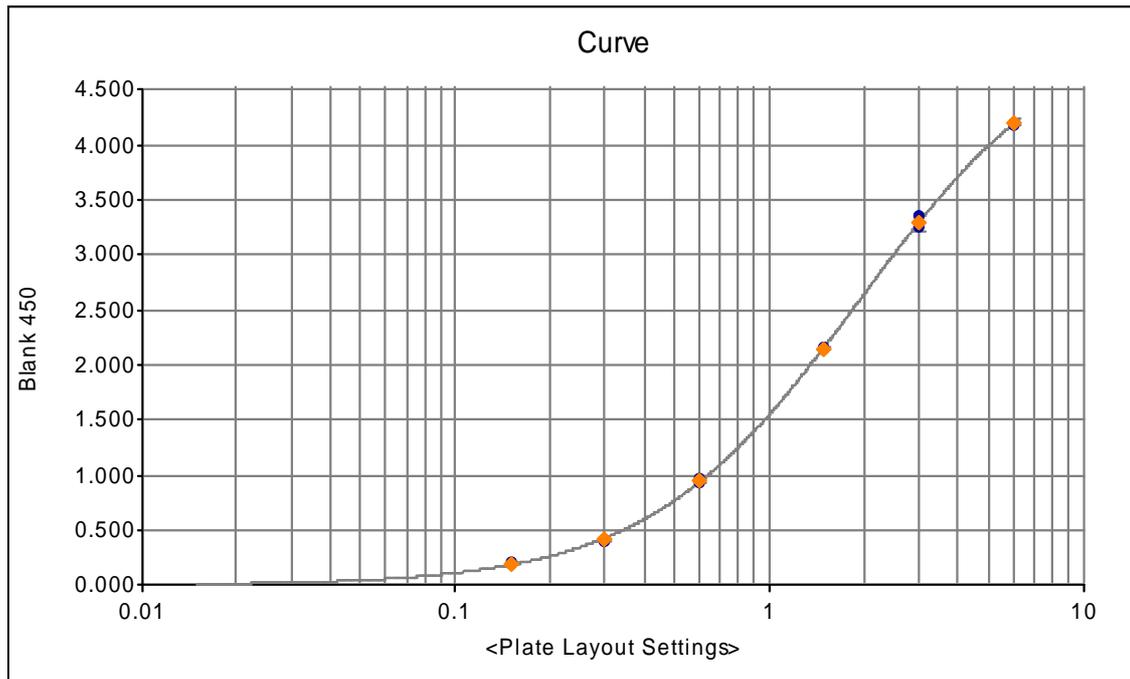
**Abb. 5:** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Platte beim Einpipettieren der Stopplösung mit einem deutlichen Farbumschlag von blau zu gelb

Sobald diese Lösung eingebracht worden war, musste die ELISA-Platte innerhalb von 5 Minuten bei einer Wellenlänge von 450 nm im Absorptions-Reader eingelesen werden. Hier erfolgte eine Farbdichtenmessung.



**Abb. 6:** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Platte mit vollständig befüllter Stopplösung beim Einlesen im BioTek- ELx808 Absorptions-Reader

Die sofortige computergestützte Auswertung der Standardproben (Konzentrationsangaben in ng/ml) konnte erste Hinweise auf Pipettierfehler geben (siehe Abbildung 7).



**Abb. 7:** Typische Auswertungskurve nach Einlesen der Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-Platte zur Abweichungsanalyse der Standardproben. Die Messpunkte liegen hier alle im Normbereich.

## 2.2 Statistische Analyse

Alle erworbenen Daten wurden anschließend, durch verschiedene Korrelationsanalysen, mit dem Statistikprogramm Wilcoxon signed rank test (GraphPad Prism, USA) ausgewertet.

Wesentliche Blutbildparameter wurden mittels Spearman-Test ausgewertet. Dieser eignet sich zur Auswertung unabhängiger Beobachtungspaare, wobei die korrelierenden Größen mindestens ordinal skaliert sein müssen (Toutenburg et al. 2009). Der Rangkorrelationskoeffizient „ $r$ “, ist dabei ein Maß für die Stärke monotoner Zusammenhänge zwischen den verschiedenen Größen. Je näher „ $r$ “ bei -1 oder +1 liegt, umso stärker ist der Zusammenhang.

Die verschiedenen Gruppenanalysen wurden im Mann-Whitney-U-Test (U-Test) verglichen (Toutenburg et al. 2009). Bei dieser Studie wird ein p-Wert von  $p < 0.05$  als Signifikanzmaß festgelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungsgruppen

Die Gesamtdatenmenge aus der Populationsstudie umfasst 2981 Patienten, wovon 2003 Personen männlich, 951 weiblich waren. Bei einem Großteil der Patienten bestand ein kardiovaskuläres Risiko (s. S. 10). Um eine erste Gliederung des Gesamtkollektivs zu erhalten, wurden zunächst die Durchschnittswerte für folgende Aspekte geschlechtsspezifisch aufgefächert ermittelt:

- 1) Alter in Lebensjahren
- 2) Gewichtsbeurteilung mittels BMI [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] und Gewichtsklassen [kg]
- 3) Diabeteserkrankungen

Da nicht immer alle Parameter bei jeder Blutprobe bekannt waren, kam es bei unseren Untersuchungen zu variierenden Patientenzahlen in den verschiedenen Kategorien. Im folgenden Abschnitt werden Korrelationsanalysen zwischen den verschiedenen Parametern und den PEDF-Werten dargestellt.

1) Der Altersdurchschnitt lag insgesamt bei 61,58 Lebensjahren. Geschlechtsspezifisch aufgefächert lag der Altersdurchschnitt der Frauen mit 62,64 Lebensjahren etwas höher als der bei den Männern mit 61,08 Lebensjahren (siehe Tabelle 8).

**Tab. 8:** Altersübersicht in Lebensjahren [Lj] der Probanden mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm

	Frauen	Männer	Gesamt
<b>Anzahl der Patienten</b>	955	2009	2964
<b>Durchschnittsalter [Lj]</b>	62,64	61,08	61,58
<b>Standardabweichung</b>	11,81	11,05	11,32
<b>Minimalwert [Lj]</b>	18	18	18
<b>Maximalwert [Lj]</b>	92	88	92

2) Im Studienkollektiv lag der Gesamtdurchschnitt des BMI bei einem Wert von 28,11. Auch hier war der Durchschnittswert bei Frauen mit 28,65 etwas über dem der Männer mit 27,85 (siehe Tabelle 9).

**Tab. 9:** Body-Mass-Index (BMI)-Übersicht [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] der Probanden mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm

	Frauen	Männer	Gesamt
Anzahl der Patienten	952	2003	2959
Durchschnittlicher BMI [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ]	28,65	27,85	28,11
Standardabweichung	6,436	4,465	5,192
BMI-Minimalwert [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ]	16,75	16,34	16,34
BMI-Maximalwert [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ]	73	68	73

Die meisten untersuchten Studienteilnehmer befanden sich mit ihrem Körpergewicht [kg] im Bereich des Übergewichts, wie auch die weitere Auffächerung zeigt (siehe Tabelle 10).

**Tab. 10:** Gewichtsklassenübersicht der Probanden, mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm in Kooperation, gestaffelt von Untergewicht bis Adipositas Grad III

Anzahl der Probanden mit	Frauen	Männer	Gesamt
Untergewicht	7	0	7
Normalgewicht	269	476	746
Übergewicht	367	1002	1372
Adipositas Grad I	186	375	561
Adipositas Grad II	62	67	129
Adipositas Grad III	61	32	93

3) Insgesamt war ca. 1/3 der Patienten des Studienkollektivs von diabetischen Erkrankungen betroffen. Der Hauptanteil von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2- Erkrankung prägt unseren Datensatz (siehe Tabelle 11).

**Tab. 11:** Diabeteserkrankungsübersicht der Probanden mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm in Kooperation

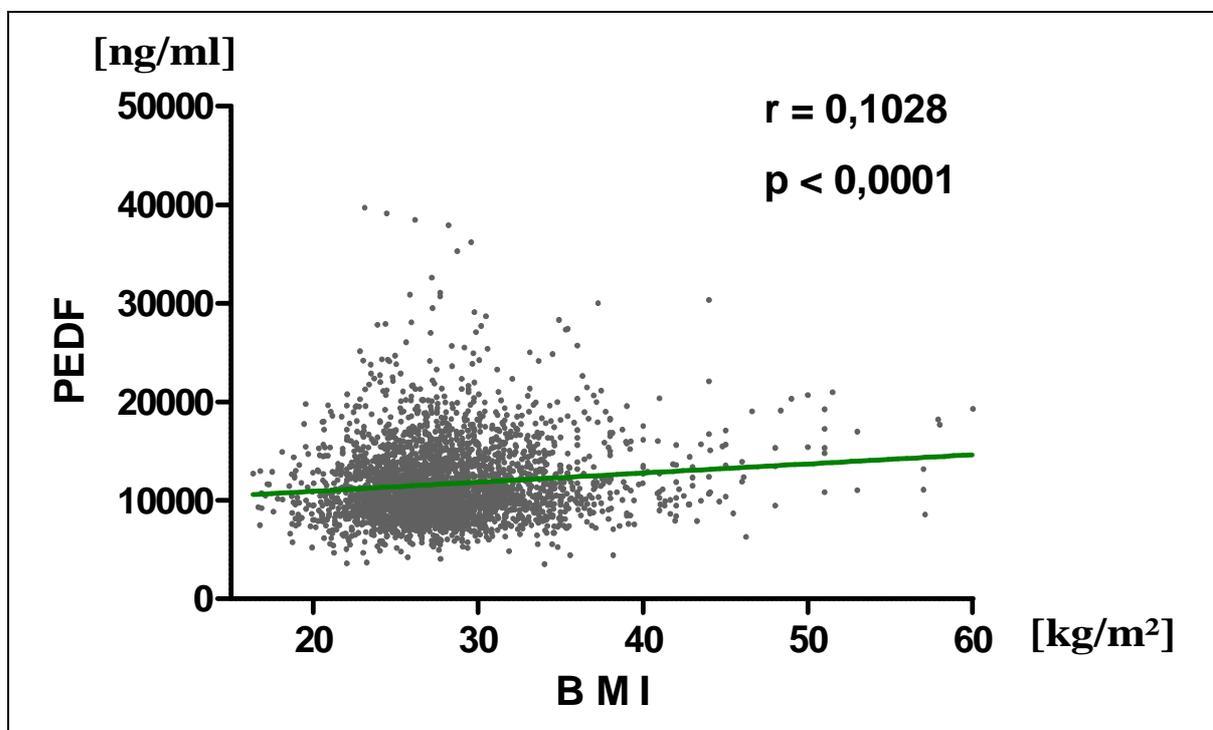
Diabeteserkrankungen	Frauen	Männer	Gesamt
Diabetes mellitus insgesamt	336	676	1012
Diabetes mellitus Typ 1	1	7	8
Diabetes mellitus Typ 2	222	361	583
unbekannter Typ (nicht näher bezeichnet)	113	308	421

### 3.2 Korrelationen klinischer und biochemischer Parameter mit PEDF

Im Vergleich zwischen der PEDF-Konzentration und bestimmten klinischen oder biochemischen Parametern wurden die Aspekte BMI, Gewichtsklassen, THI, Diabetes mellitus, HbA1c, HOMA-Index und Sterberisiko besonders betrachtet. Die Auswertung der Abhängigkeiten ist Inhalt dieses Abschnitts.

#### 3.2.1 PEDF-Gehalt und BMI

In Abbildung 8 ist der Zusammenhang vom PEDF-Wert [ng/ml] und BMI [kg/m<sup>2</sup>] in Form eines Streudiagramms dargestellt. Die Vermutung, dass eine Korrelation zwischen den beiden Werten vorliegt, kann nicht verworfen werden ( $p < 0,0001$ ). Die Korrelation wird durch die Regressionsgrade (grün) sichtbar.

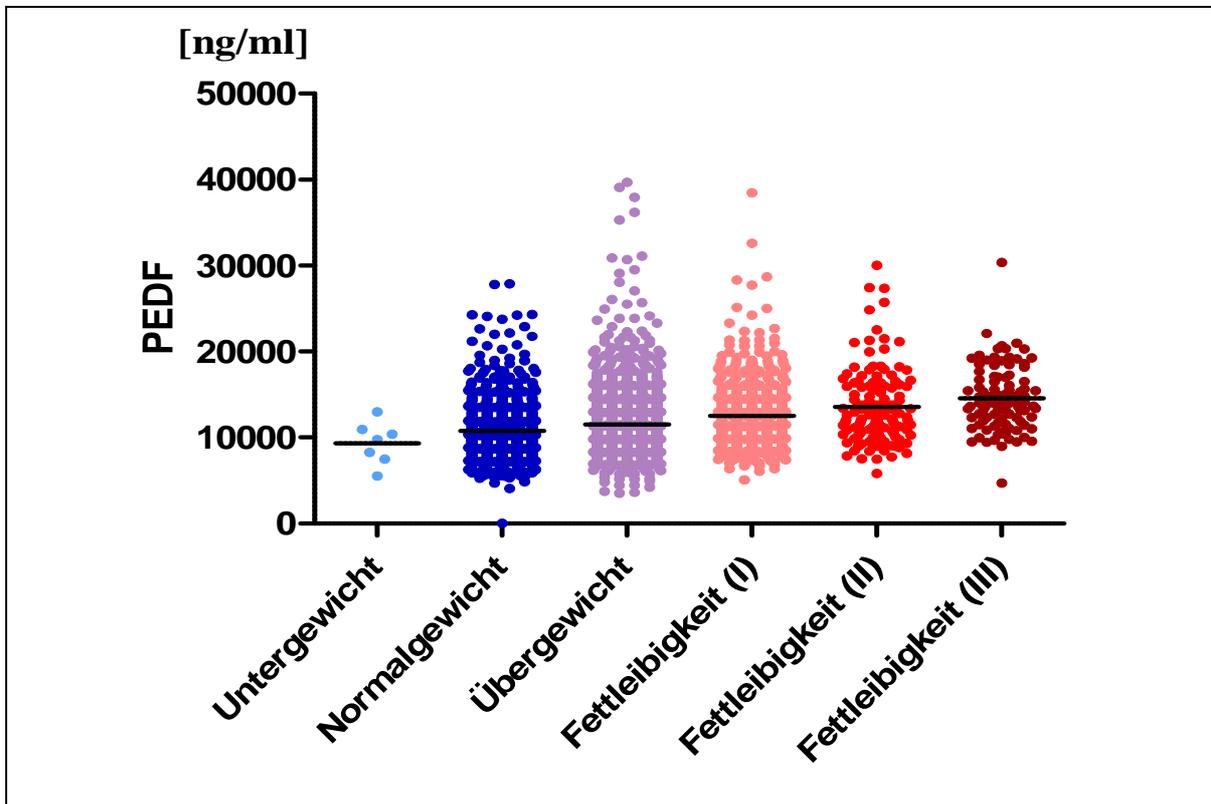


**Abb. 8:** Streudiagramm zum Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Gehalt [ng/ml] und dem Body-Mass-Index (BMI) [kg/m<sup>2</sup>] mit leicht ansteigender Regressionsgerade (grün) und angegebenen Rangkorrelationskoeffizienten ( $r = 0,1028$ ), sowie dem Signifikanzwert ( $p < 0,0001$ ), bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm

Der Rangkorrelationskoeffizient zwischen dem PEDF-Gehalt [ng/ml] und dem BMI [kg/m<sup>2</sup>] liegt bei 0,1028. Somit ist hier von einer positiven Abhängigkeit der beiden Werte auszugehen.

### 3.2.2 PEDF-Gehalt und Gewichtsklassen

In Abbildung 9 ist der PEDF-Gehalt in ng/ml bei den verschiedenen Gewichtsklassen zu sehen. Deutlich wird, dass die meisten Probanden des Studienkollektivs übergewichtig waren (in der Abbildung violett dargestellt).



**Abb. 9:** Darstellung des Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Gehalts [ng/ml] und der Gewichtsklassen in Form von Kohortenclustern (schwarzer Balken = Durchschnittsgehalt an PEDF) bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm

Der durchschnittliche PEDF-Gehalt stieg mit den Gewichtsklassen an (schwarze Balken). Somit gibt es einen stark signifikanten Zusammenhang ( $p < 0,0001$ ) zwischen den Gewichtsklassen und den PEDF-Werten.

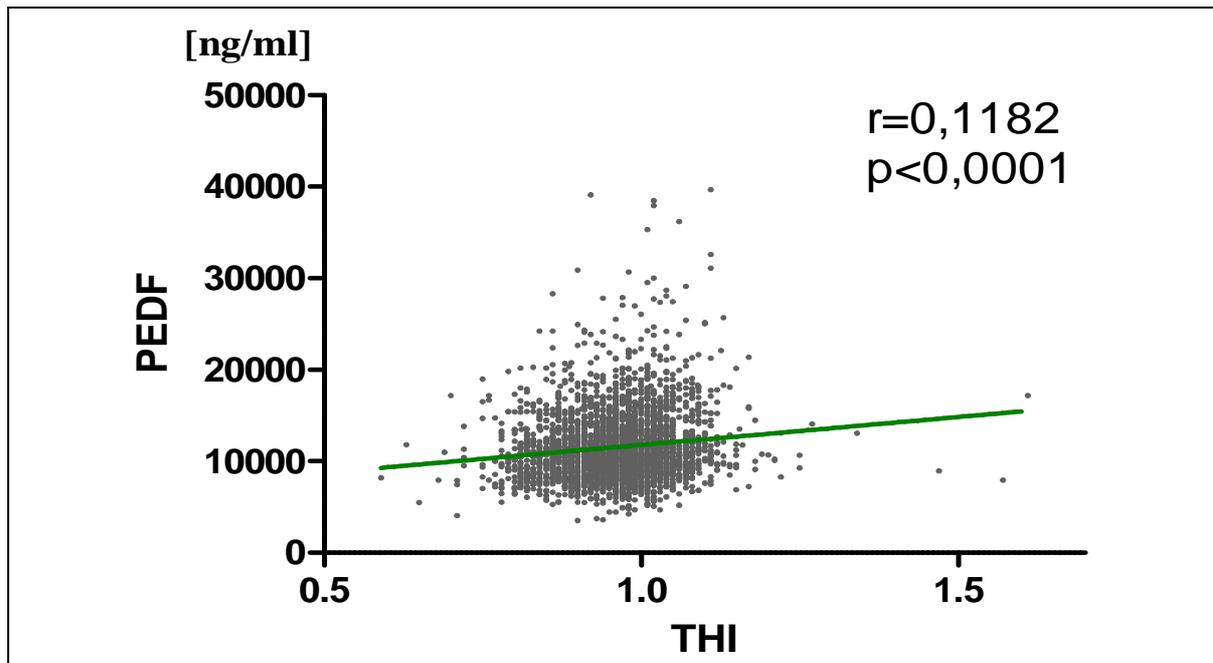
Das höchste PEDF-Maß zeigte sich bei den Personen, bei denen eine extreme Fettleibigkeit (III) vorlag. Es wird deutlich, dass die PEDF-Expression bei erhöhtem Körpergewicht vermehrt auftritt. Eine geschlechteraufgefächerte Betrachtung ist im Anhang<sup>1</sup> dargestellt.

<sup>1</sup> IV. Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Body-Mass-Index (BMI) [kg/m<sup>2</sup>] aufgeteilt nach Geschlecht,

VII. Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Körpergewicht [kg] aufgeteilt nach Geschlecht

### 3.2.3 PEDF-Gehalt und THI

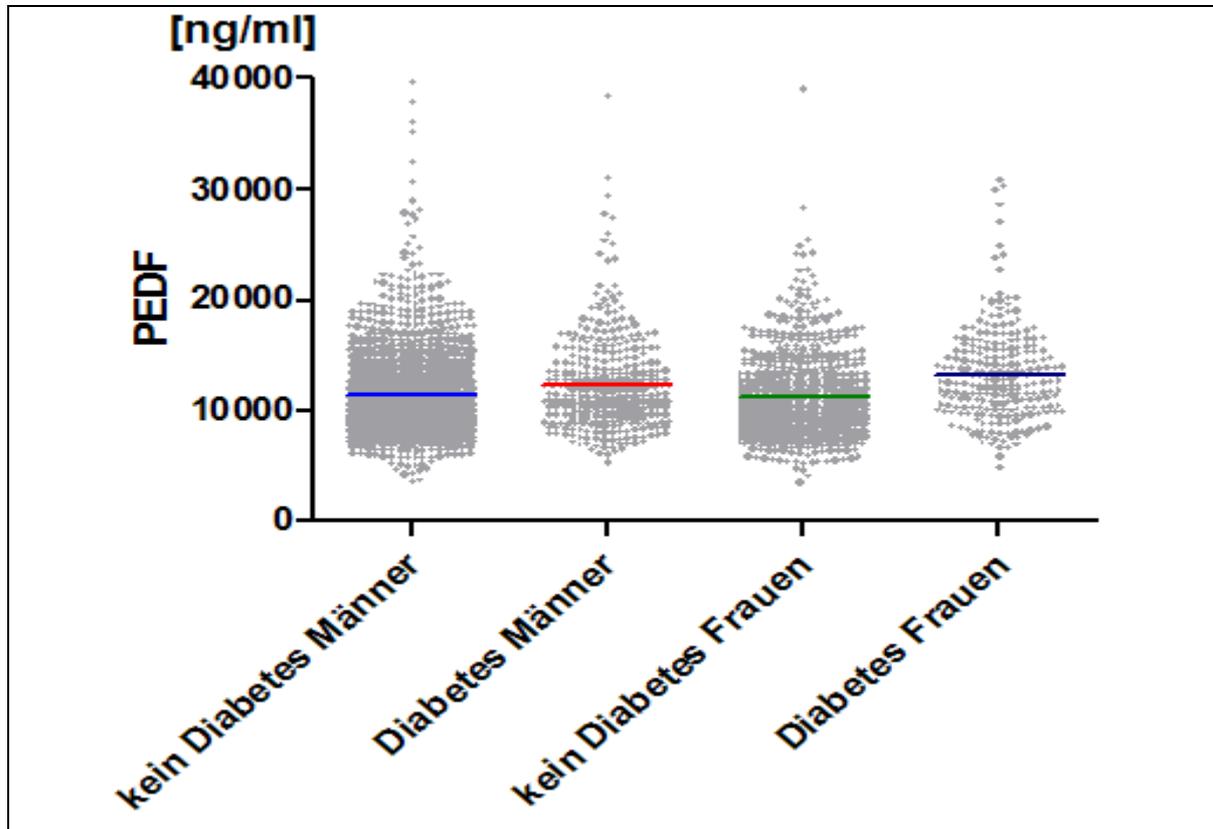
Die Abbildung 10 zeigt die Relation des PEDF-Gehalts [ng/ml] zum THI in Form eines Streudiagramms (graue Punkte). Auch der THI korreliert mit dem PEDF-Wert positiv ( $p < 0,0001$ ). Der Zusammenhang wird in der Abbildung durch die ansteigende Regressionsgerade (grün) hervorgehoben. Der Rankkorrelationskoeffizient liegt bei 0,1182.



**Abb. 10:** Streudiagramm zum Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Gehalt [ng/ml] und Taillen-Hüft-Index (THI) mit ansteigender Regressionsgerade (grün) und angegebenen Rangkorrelations-koeffizienten ( $r = 0,1182$ ) sowie dem Signifikanzwert ( $p < 0,0001$ ) bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm in Kooperation

### 3.2.4 PEDF-Gehalt und Diabetes mellitus

In Abbildung 11 ist die Darstellung von PEDF-Werten [ng/ml] bei Patienten mit Diabetes mellitus und gesunden Probanden geschlechterspezifisch zu sehen.



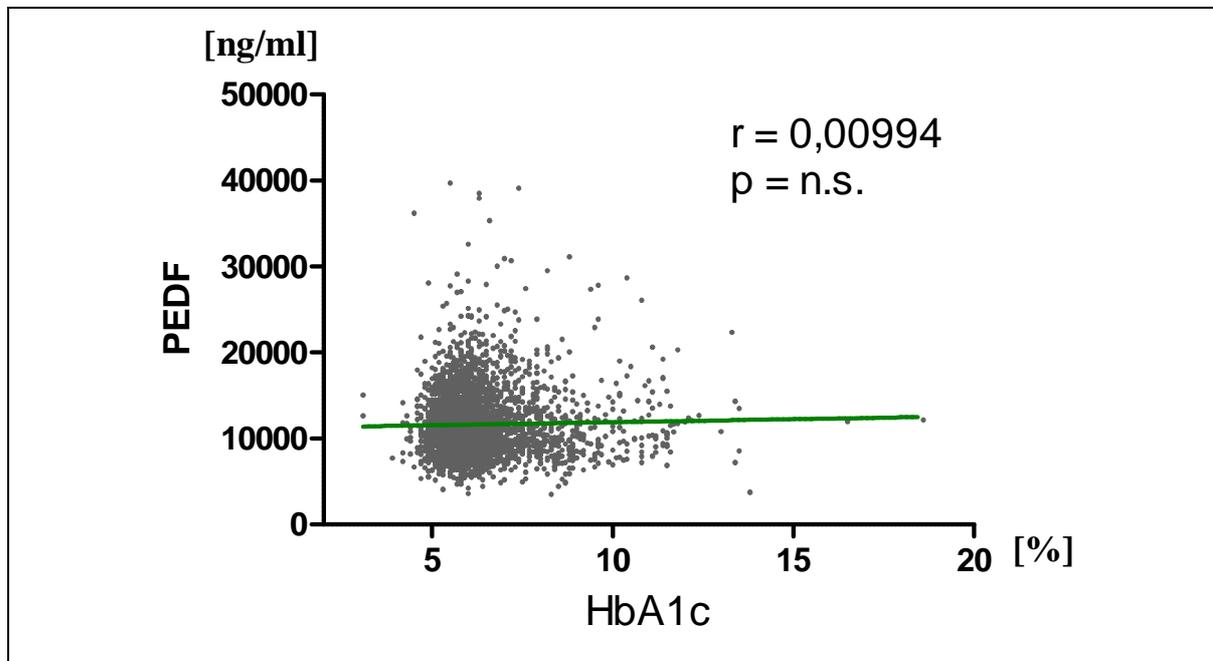
**Abb. 11:** Darstellung des Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Gehalts [ng/ml] und Diabetes mellitus in Form von Kohortenclustern geschlechtsspezifisch aufgefächert mit Durchschnitts-PEDF-Gehalt der Einzelgruppen durch farblich unterschiedliche Balken bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm in Kooperation

Bei alleiniger Betrachtung der durchschnittlichen PEDF-Werte zwischen Patienten mit Diabetes mellitus und gesunden Probanden, ließ sich erkennen, dass der PEDF-Gehalt bei den Personen mit Diabeteserkrankungen höher lag.

Beim Vergleich aller Mittelbalken wurde deutlich, dass Frauen mit Diabetes den höchsten durchschnittlichen PEDF-Gehalt aufwiesen.

### 3.2.5 PEDF-Gehalt und HbA1c

In Abbildung 12 sind die PEDF-Werte [ng/ml] und HbA1c-Wert [%] grafisch in Form eines Streudiagramms (graue Punkte) dargestellt. Die statistische Auswertung der Korrelation zeigt keinen signifikanten Zusammenhang zwischen den Werten ( $r = 0,00994$ ,  $p = \text{n.s.}$  (= nicht signifikant)).

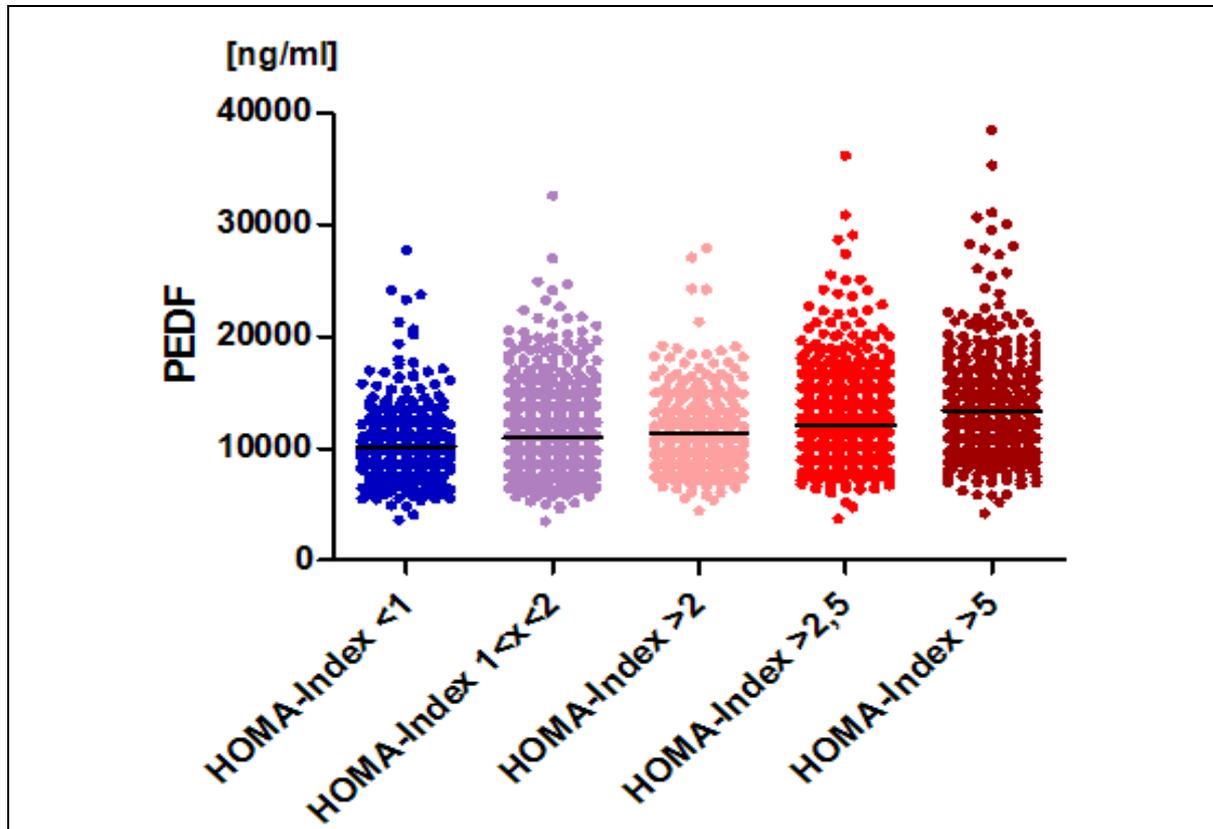


**Abb. 12:** Streudiagramm zum Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Gehalt [ng/ml] und dem glykierten Hämoglobin (HbA1cs) [%] in Form mit Regressionsgerade (grün) und angegebenen Rangkorrelationskoeffizienten ( $r = 0,00994$ ), sowie dem p-Wert ( $p = \text{n.s.}$ ), bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm

Hieraus ergibt sich, dass die Nullhypothese auf Basis der Daten verworfen werden musste und von keinem Zusammenhang zwischen den Werten auszugehen ist.

### 3.2.6 PEDF-Gehalt und HOMA-Index

Die Abbildung 13 stellt den PEDF-Wert in ng/ml der verschiedenen HOMA-Index-Gruppen (nach rechts größer werdend) dar.



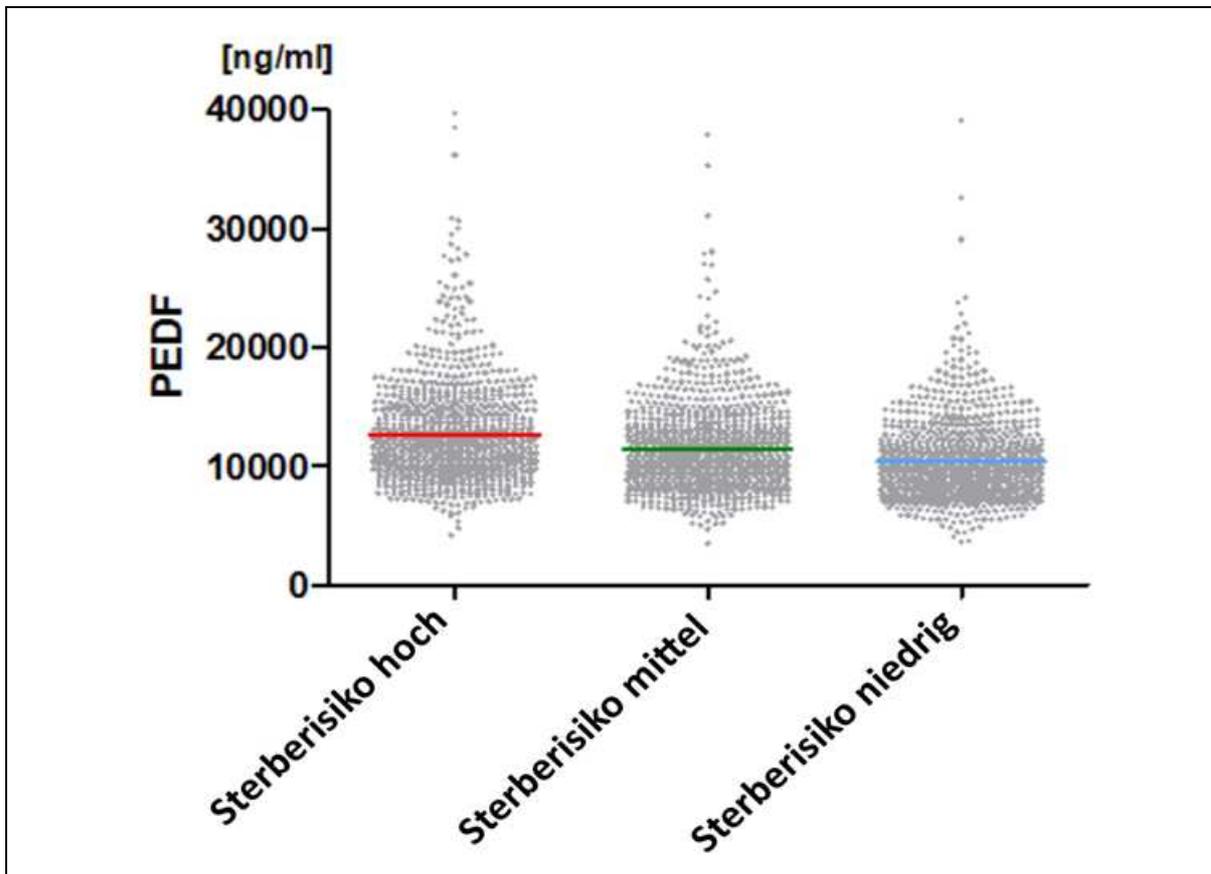
**Abb. 13:** Darstellung des Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Gehalts [ng/ml] und der Homeostasis model assessment (HOMA)-Index-Gruppen in Form von Kohortenclustern mit Darstellung der Durchschnittsbalken (schwarz) bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm. Die Gruppeneinteilung ist von der HOMA-Index-Tabelle im Einleitungsteil (S.8) übernommen worden.

Je größer der HOMA-Index war, umso höher lag der durchschnittliche PEDF-Level (schwarzer Balken). Die höchste PEDF-Konzentration lag hier bei den größten HOMA-Index-Werten.

Ein HOMA-Index von  $\geq 2,5$  beschreibt eine Insulinresistenz. Die Werte zeigen, dass bei zunehmender Insulinresistenz auch der PEDF-Level steigt. Die Ergebnisse zeigen mit dem Wert  $p < 0,0001$  eine Signifikanz auf.

### 3.2.7 PEDF-Gehalt und Sterberisiko

In Abbildung 14 sind die PEDF-Level der drei Sterberisikogruppen aufgezeigt.



**Abb. 14:** Darstellung des Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Gehalts [ng/ml] und des Sterberisikos in Form von Kohortenclustern mit Darstellung der Durchschnittsbalken bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm

Die Durchschnittswerte sind durch die farblichen Balken gekennzeichnet. Der rote Balken gibt den Wert der Gruppe mit hohem Sterberisiko, der Grüne den Wert der Gruppe mit mittlerem Risiko und der Blaue den Wert der Gruppe mit niedrigem Risiko an. Der p-Wert lag jeweils bei  $p < 0,0001$  und deutet damit auf eine Signifikanz hin.

Die höchsten PEDF-Werte wurden bei der Gruppe mit hohen Sterberisiko verzeichnet. Die Gruppeneinteilung erfolgte in Anlehnung an die Framinghamstudie (s.S.8).

Insgesamt scheint - laut unseren Ergebnissen - die PEDF-Konzentration im Blut somit im Zusammenhang mit dem BMI und daher auch den Gewichtsklassen, sowie mit dem THI, einer Diabetes mellitus-Erkrankung, als auch dem HOMA-Index und dem Sterberisiko zu stehen. Der HbA1c-Index ließ keinen signifikanten Zusammenhang zum PEDF-Wert erkennen.

### 4. Diskussion

In unserer Studie wurden die PEDF-Konzentrationen, eines überwiegend Übergewichtigen Patientenklientels, in Assoziation mit Markern des metabolischen Syndroms und kardiovaskulärer Sterblichkeit betrachtet.

Unsere Auswertungen deuten darauf hin, dass sich eine Korrelation zwischen dem PEDF-Level und dem Body-Maß-Index, beziehungsweise den entsprechenden Gewichtsklassen, ableiten lässt. Ebenfalls scheinen sich relevante Assoziationen zwischen dem PEDF-Gehalt und dem Taillen-Hüft-Index abzuzeichnen. Da der THI bei einem erhöhten BMI größer ist, erscheinen die dabei jeweils erhöhten PEDF-Werte stimmig. Dementsprechend waren bei Personen mit einem niedrigen BMI (und somit einer geringeren Gewichtsklasse) und niedrigerem THI auch nur geringere PEDF-Konzentrationen nachweisbar.

Zudem konnten wir bei den Patienten mit Diabetes mellitus erhöhte PEDF-Werte feststellen. Da die meisten Probanden unserer Studie unter Diabetes mellitus Typ 2 leiden, welcher mit Übergewicht assoziiert wird, unterstützt dieses die oben genannten Ergebnisse. Auch ein Zusammenhang der PEDF-Konzentrationen und dem Parameter HOMA (als Maß der Insulinresistenz) scheint laut unseren Ergebnissen zu bestehen, während zwischen dem HbA1c (als Standardparameter in der Diabetesdiagnostik) und dem PEDF kein signifikanter Zusammenhang vorhanden zu sein scheint. Daher dürfte der HbA1c zur weiteren Erforschung der Rolle von PEDF nicht geeignet sein. Jedoch könnte man überlegen PEDF als Marke für das Sterberisiko weiter zu untersuchen. In unserer bisherigen Studie zeichneten sich erhöhte PEDF-Werte bei einem erhöhten Sterberisiko ab.

Dies würde die Ergebnisse der Framinghamstudie unterstützen, die das Sterberisiko im Zusammenhang mit dem BMI und Hüftumfang betrachtete und aufzeigte, dass sowohl ein erhöhter BMI als auch ein vergrößerter Hüftumfang in Korrelation mit einer erhöhten Sterblichkeitsrate stehen (Calle et al. 1999).

Auch Sabater et al. Forschungsergebnisse, dass sich die PEDF-Konzentrationen signifikant nach Gewichtsverlust verringert (Sabater et al. 2010) wird durch unsere Ergebnisse insofern bestätigen, dass bei einem niedrigeren BMI oder THI jeweils geringere PEDF-Mengen nachgewiesen werden konnten.

Auch die Studie von Filleur, bei der erhöhte PEDF-Konzentrationen besonders in adipösen Bereichen zu finden waren, erscheint durch unsere Ergebnisse nicht widersprüchlich (Filleur et al. 2009).

Daten von Chung et al. berichten, dass PEDF besonders in Hepatozyten in hoher Form exprimiert wird, worauf weitere Ergebnisse von uns hindeuten (Chung et al. 2008).

Freedman et al. beobachteten, dass besonders das Risiko für kardiovaskuläre Störungen bei einem erhöhten THI steigt (Freedman et al. 2007). Unsere Erkenntnisse, dass die PEDF-Konzentration direkt mit den Erkrankungsbildern zu korrelieren scheint, birgt die Idee PEDF als möglichen Marker im Blut bei Patienten zur frühzeitigen Erkennung für Folgeerscheinungen zu verwenden. Dies könnte nicht nur dem Individuum gesundheitlich helfen, sondern auch das Gesundheitssystem finanziell entlasten. Laut Dietel stellt Adipositas heute eine der größten Herausforderungen im Gesundheitswesen dar (Dietel et al. 2012).

Ergebnisse von Vague et al. beschreiben, dass Frauen mit einer androgenen Fettleibigkeit eine hohe Prävalenz für die Entstehung von Diabeteserkrankungen haben. Die Krankheiten scheinen eng aneinander gekoppelt zu sein (Vague 1956). Da der PEDF-Gehalt, laut unserer Ergebnisse, sowohl Patienten mit Diabetes mellitus, also auch bei Patienten mit erhöhtem THI, erhöht waren, wäre PEDF gegebenenfalls auch als Marker in der Diabetesforschung denkbar.

Ogata et al. fanden PEDF bisher im Plasmaspiegel von Diabetespatienten (Ogata et al. 2007). In Mäuseexperimenten bezeichneten Böhm et al. den Wachstumsfaktor PEDF als bedeutendes Adipokrin bei der Vermittlung adipositasbedingter Insulinresistenz (Böhm et al. 2012). Unsere Erkenntnisse geben Hinweise darauf, dass PEDF eine solche Rolle auch im menschlichen Regulierungssystem spielen könnte. Weiter Forschungen für spezifische Ergebnisse in diesem Bereich wären notwendig.

Da Retino- und Nephropathie Krankheitsbilder sind, die häufig mit Diabetes mellitus einhergehen (Matsuyama et al. 2008), könnte auch in diesem Bereich Forschungsinteresse bestehen. So wäre zu überlegen, ob PEDF eventuell auch als Marker zur Früherkennung, nach weiteren Untersuchungen, dienen könnte.

HbA1c als Standardparameter in der Diabetesdiagnostik scheint zur weiteren Erforschung der Rolle von PEDF, laut unserer Ergebnisse, nicht möglich zu sein. Dies unterstützt die Aussage aus dem Kurzbericht: "Plasma Concentration of Pigment Epithelium-Derived Factor in Patients with Diabetic Retinopathy" (Ogata et al. 2007). Der Grund dafür bleibt weiterhin fraglich, so dass ein Forschungsziel von zukünftigen Studien darin liegen könnte.

Bislang wurde, laut Freedmann, nur das CRP (C-reaktives Protein) als Marker für eine erhöhte Morbidität durch Diabetes, und das metabolische Syndrom verwendet (Freedman et al. 2007). Nach unseren Untersuchungen wäre auch HOMA als Parameter in Zusammenhang mit der PEDF-Konzentration zu überlegen.

Laut Dietel, stellen die zahlreichen Veränderungen von Organsystemen auch bei Diabetes mellitus eine hohe Belastung des Gesundheitssystems dar (Dietel et al. 2012). Somit wäre es sinnvoll auch hier noch weitere Forschungen durchzuführen. Er stellt zudem die Hypothese auf, dass Diabetes mellitus künftig weltweit mit einer der wichtigsten Ursachen für die allgemeine Morbidität und Mortalität sein wird (Dietel et al. 2012). Da in unseren Studienergebnissen bei einem erhöhten Sterberisiko, erhöhte PEDF-Werte zu verzeichnen waren, bestände auch hier die Überlegung PEDF als einen Marker für das Sterberisiko zu sehen. Eine Idee für die Zukunft könnte beispielsweise sein, sowohl Morbidität als auch Mortalität besser im metabolischen Zusammenhang mittels PEDF-Konzentration prognostizieren zu können.

Generell scheint es laut unserer Ergebnisse deutliche Zusammenhänge zwischen PEDF-Konzentrationen und verschiedenen Parametern, die in Bezug zum Körpergewicht, Insulinresistenz oder zum Sterberisiko stehen, zu geben. Bei all unseren Ergebnissen sollte jedoch beachtet werden, dass es sich bei der hier beschriebenen Studie um ein eingeschränktes Patientenkollektiv handelte. Weitere Studien wären nötig und sicherlich sinnvoll.

Da die Folge, aus den hier betrachteten Grunderkrankungen, häufig Herz-Kreislauf-Versagen als Todesursache ist (Higgins et al. 1987), könnte man versuchen diesem aktiv durch frühzeitige Maßnahmen entgegenzuwirken.

Die Idee der Früherkennung und Verifizierung von metabolischem Risiko mittels PEDF-Konzentrationsuntersuchungen als zuverlässiger Marker bleibt zu überlegen.

### 5. Zusammenfassung

Der Pigmentepithel abgeleitete Faktor (PEDF) ist ein 50 kDa großes Glykoprotein, welches durch seine Pluripotenz gekennzeichnet ist. Als Wachstumsfaktor übt er multimodale Effekte aus und spielt unter anderem eine Rolle bei diabetischen Retino- und Nephropathien, sowie Körpergewichtsveränderungen. Ziel der vorliegenden Studie war es neue Zusammenhänge und unerforschte Relevanz von PEDF in Bezug auf das metabolische Regulationssystem zu untersuchen.

Für die Untersuchungen der PEDF-Blutkonzentration im überwiegend insulinresistenten Studienkollektiv wurden standardisierte Enzyme-linked immunosorbent (ELISA)-Verfahren mit einheitlichen Kits verwendet. Der Fokus unserer Studie lag auf der Suche nach signifikanten Assoziationen zwischen dem PEDF-Gehalt und dem Body-Mass-Index (BMI), sowie den Gewichtsklassen, dem Taillen-Hüft-Index (THI), der Diabetes mellitus, dem glykiertem Hämoglobin (HbA1c) als auch dem Homeostasis Model Assesment-Index (HOMA-Index) und dem Sterberisiko.

Sowohl bei einem erhöhten BMI, als auch bei einem größeren Taillen-Hüft-Index konnte eine höhere PEDF-Menge festgestellt werden. Auch bei den Gewichtsklasse und den PEDF-Werten ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zeigen, wobei das höchste PEDF-Maß beim höchsten Adipositasgrad vorlag.

Bei Diabetes mellitus-Patienten lag die PEDF-Konzentration höher, als bei Patienten ohne Diabeteserkrankung. Dabei war die Signifikanz bei Frauen deutlich stärker erkennbar als bei Männern. Zwischen dem HbA1c und dem PEDF-Wert konnte keine Korrelation nachgewiesen werden.

Wiederum war bei zunehmender Insulinresistenz (HOMA-Index) der PEDF-Gehalt im Blutserum erhöht und eine Signifikanz erkennbar.

Auch ein erhöhtes Sterberisiko war mit höheren PEDF-Werten assoziiert.

Somit scheint das Auftreten von PEDF sowohl bei Diabetes mellitus, als auch Adipositas verstärkt aufzutreten. Welche Rolle der Wachstumsfaktor dabei genau spielt könnte durch weitere Nachforschungen detaillierter entschlüsselt werden. Eventuell könnte PEDF dann künftig als Marker zur Risikofrüherkennungen bei verschiedenen Erkrankungen oder als Anhaltspunkt für Verlaufsvorhersagen im Rahmen des metabolischen Komplexes Verwendung finden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Akiyama T, Dass C R, Shinoda Y, Kawano H, Tanaka S, Choong P F: PEDF regulates osteoclasts; osteoprotegerin and RANKL. *Biochem.Biophys.Res. Commun.*, 391: 789-794 (2010)
2. Alberts B, Graw J: *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 4 Aufl, Wiley-VCH, Weinheim, 570-608 (2012)
3. American Diabetes Association: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 33 Suppl 1: 62-69 (2010)
4. Andreu-Agulló C, Morante-Redolat J M, Delgado A C, Fariñas I: Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nat.Neurosci.*, 12: 1514-1523 (2009)
5. Anisimov S V, Christophersen N S, Correia A S, Hall V J, Sandelin I, Li J, Brundin P: Identification of molecules derived from human fibroblast feeder cells that support the proliferation of human embryonic stem cells. *Cell.Mol.Biol.Lett.*, 16: 79-88 (2011)
6. Bedogni G, Kahn H S, Bellentani S, Tiribelli C: A simple index of lipid overaccumulation is a good marker of liver steatosis. *BMC Gastroenterol.*, 10: 98-230X-10-98 (2010)
7. BioVendor Research and Diagnostic Products: Human PEDF Elisa Product Data Sheet. Modrice, Czech Republic, Version: 2015011041 (2010)
8. Boehm B, Lang G, Volpert O, Jehle P, Kurkhaus A, Rosinger S, Lang G, Bouck N: Low content of the natural ocular anti-angiogenic agent pigment epithelium-derived factor (PEDF) in aqueous humor predicts progression of diabetic retinopathy. *Diabetologia*, 46: 394-400 (2003)
9. Böhm A, Ordelleide A, Machann J, Heni M, Ketterer C, Machicao F, Schick F, Stefan N, Fritsche A, Häring H: Ein weitverbreiteter Polymorphismus im PEDF-Gen determiniert sowohl Körperfettmasse als auch Insulinsensitivität und Plasma-Leptin-Spiegel. *Diabetes Stoffwechse.*, 7: 19-21 (2012)

10. Bozorgmanesh M, Hadaegh F, Azizi F: Predictive performances of lipid accumulation product vs. adiposity measures for cardiovascular diseases and all-cause mortality, 8. 6-year follow-up: Tehran lipid and glucose study. *Lipids Health Dis.*, 9: 1-13 (2010)
11. Broadhead M L, Choong P F, Dass C R: Efficacy of continuously administered PEDF-derived synthetic peptides against osteosarcoma growth and metastasis. *BioMed Research Int.*, vol. 2012, Article ID 230298, 10 pages: (2012)
12. Calle E E, Thun M J, Petrelli J M, Rodriguez C, Heath Jr C W: Body-mass index and mortality in a prospective cohort of US adults. *N.Engl.J.Med.*, 341: 1097-1105 (1999)
13. Chung C, Doll J A, Gattu A K, Shugrue C, Cornwell M, Fitchev P, Crawford S E: Anti-angiogenic pigment epithelium-derived factor regulates hepatocyte triglyceride content through adipose triglyceride lipase (ATGL). *J.Hepatol.*, 48: 471-478 (2008)
14. Dass C R, Choong P: uPAR mediates anticancer activity of PEDF. *Cancer Biol. Ther.*, 7: 1262-1270 (2008)
15. Dietel M, Suttrop N, Zeitz M: *Harrisons Innere Medizin*. 18.Aufl, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin, Teil 6: 77-78, Teil 10: 224-225, 242-243, Teil 16: 344-345 (2012)
16. Elahy M, Baidur-Hudson S, Dass C R: The emerging role of pedf in stem cell biology. *BioMed Research International*, vol. 2012, Article ID 239091, 6 pages: (2012)
17. FET e.V.: *Fachkompendium Diabetes mellitus Typ 2*. GRIN Verlag, München, 11-17 (2009)
18. Filleur S, Nelius T, De Riese W, Kennedy R: Characterization of PEDF: A multi - functional serpin family protein. *J.Cell.Biochem.*, 106: 769-775 (2009)
19. Freedman D S, Kahn H S, Mei Z, Grummer-Strawn L M, Dietz W H, Srinivasan S R, Berenson G S: Relation of body mass index and waist-to-height ratio to cardiovascular disease risk factors in children and adolescents: the Bogalusa Heart Study. *Am.J.Clin.Nutr.*, 86: 33-40 (2007)

20. Gong Q, Yang X, Cai W, Gao G, Yang Z: Expression and purification of functional epitope of pigment epithelium-derived factor in *E. coli* with inhibiting effect on endothelial cells. *Protein J.*, 29: 167-173 (2010)
21. Grundy S M, Brewer H B, Jr, Cleeman J I, Smith S C, Jr, Lenfant C, American Heart Association, National Heart, Lung, and Blood Institute: Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, 109: 433-438 (2004)
22. Hagemann O:, <http://www.laborlexikon.de/Lexikon/Infotext/h/HOMA-Index.htm>. 22.07.2011
23. Higgins M, Kannel W, Garrison R, Pinsky J, Stokes J: Hazards of Obesity - the Framingham Experience. *Acta Med.Scand.*, 222: 23-36 (1987)
24. Ho T C, Chen S L, Yang Y C, Liao C L, Cheng H C, Tsao Y P: PEDF induces p53-mediated apoptosis through PPAR gamma signaling in human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc.Res.*, 76: 213-223 (2007)
25. Hou H, Liang H, Wang Y, Zhang Z, Wang B, Shi Y, Dong X, Cai Y: A therapeutic strategy for choroidal neovascularization based on recruitment of mesenchymal stem cells to the sites of lesions. *Molecular Therapy*, 18: 1837-1845 (2010)
26. Kannel W B, Plehn J F, Cupples L A: Cardiac failure and sudden death in the Framingham Study. *Am.Heart J.*, 115: 869-875 (1988)
27. Matsuyama K, Ogata N, Matsuoka M, Shima C, Wada M, Jo N, Matsumura M: Relationship between pigment epithelium-derived factor (PEDF) and renal function in patients with diabetic retinopathy. *Mol.Vis.*, 14: 992-996 (2008)
28. Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R: Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28: 412-419 (1985)
29. Ogata N, Matsuoka M, Matsuyama K, Shima C, Tajika A, Nishiyama T, Wada M, Jo N, Higuchi A, Minamino K: Plasma concentration of pigment epithelium-

- derived factor in patients with diabetic retinopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* , 92: 1176-1179 (2007)
30. Olson S T, Gettins P G: Regulation of proteases by protein inhibitors of the serpin superfamily. *Prog.Mol.Biol.Transl.Sci.*, 99: 185-240 (2011)
31. Orgaz J L, Ladhani O, Hoek K S, Fernández-Barral A, Mihic D, Aguilera O, Seftor E A, Bernad A, Rodríguez-Peralto J L, Hendrix M J C, Volpert O V, Jiménez B: Loss of pigment epithelium-derived factor enables migration, invasion and metastatic spread of human melanoma PEDF and melanoma progression. - Macmillan Publishers Ltd., 47: 4147-4161 (2009)
32. Quan G M, Ojaimi J, Li Y, Kartsogiannis V, Zhou H, Choong P F: Localization of pigment epithelium-derived factor in growing mouse bone. *Calcif.Tissue Int.*, 76: 146-153 (2005)
33. Ramírez-Castillejo C, Sánchez-Sánchez F, Andreu-Agulló C, Ferrón S R, Aroca-Aguilar J D, Sánchez P, Mira H, Escribano J, Fariñas I: Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat.Neurosci.*, 9: 331-339 (2006)
34. Reaven G, Abbasi F, McLaughlin T: Obesity, insulin resistance, and cardiovascular disease. *Recent Prog.Horm.Res.*, 59: 207-224 (2004)
35. Reford S A: Obesity Epidemiology, Pathogenesis and Treatment: A multidisciplinary Approach. *Medical*, 73-74 (2014)
36. Rimm E B, Stampfer M J, Colditz G A, Chute C G, Litin L B, Willett W C: Validity of self-reported waist and hip circumferences in men and women. *Epidemiology*, 1: 466-473 (1990)
37. Sabater M, Moreno-Navarrete J M, José Ortega F, Pardo G, Salvador J, Ricart W, Frühbeck G, Fernández-Real J M: Circulating pigment epithelium-derived factor levels are associated with insulin resistance and decrease after weight loss. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 95: 4720-4728 (2010)
38. Samkharadze T, Erkan M, Reiser-Erkan C, Demir I E, Kong B, Ceyhan G O, Michalski C W, Esposito I, Friess H, Kleeff J: Pigment epithelium-derived factor associates with neuropathy and fibrosis in pancreatic cancer. *Am.J.Gastroenterol.*, 106: 968-980 (2011)

39. Sánchez-Sánchez F, Aroca-Aguilar J, Segura I, Ramírez-Castillejo C, Riese H H, Coca-Prados M, Escribano J: Expression and purification of functional recombinant human pigment epithelium-derived factor (PEDF) secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *J.Biotechnol.*, 134: 193-201 (2008)
40. Siegel E, Schröder F, Kunder J, Dreyer M: Diabetes mellitus XXS pocket, 1. Aufl., Bröm Bruckmeier Verlag, Grünwald, 9-18 (2009)
41. Tombran-Tink J, Barnstable C: Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and matrix remodeling in the bone. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 316: 573-579 (2004)
42. Tombran-Tink J, Aparicio S, Xu X, Tink A R, Lara N, Sawant S, Barnstable C J, Zhang S S: PEDF and the serpins: phylogeny, sequence conservation, and functional domains. *J.Struct.Biol.*, 151: 130-150 (2005)
43. Tong J, Yao Y: Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: a need for balanced expressions. *Clin.Biochem.*, 39: 267-276 (2006)
44. Toutenburg H: Arbeitsbuch zur deskriptiven und induktiven Statistik, graph. Darst., 2. Aufl., Springer-Lehrbuch, Berlin; Heidelberg, XII: 356 (2009)
45. Tsao Y, Ho T, Chen S, Cheng H: Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced cell death by activation of extracellular signal-regulated kinases in cultured retinal pigment epithelial cells. *Life Sci.*, 79: 545-550 (2006)
46. VAGUE J: The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am.J.Clin.Nutr.*, 4: 20-34 (1956)
47. WHO: Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. WHO technical report series ; 894, Geneva : World Health Organization, (2000)
48. Xu Z, Fang S, Zuo Y, Zhang Y, Cheng R, Wang Q, Yang Z, Cai W, Ma J, Yang X: Combination of pigment epithelium - derived factor with radiotherapy enhances the antitumor effects on nasopharyngeal carcinoma by downregulating vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Cancer science*, 102: 1789-1798 (2011)

49. Yabe T, Wilson D, Schwartz J P: NFkappaB activation is required for the neuroprotective effects of pigment epithelium-derived factor (PEDF) on cerebellar granule neurons. *J.Biol.Chem.*, 276: 43313-43319 (2001)
50. Yamagishi S, Adachi H, Abe A, Yashiro T, Enomoto M, Furuki K, Hino A, Jinnouchi Y, Takenaka K, Matsui T: Elevated serum levels of pigment epithelium-derived factor in the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 91: 2447-2450 (2006)
51. Zaichuk T A, Shroff E H, Emmanuel R, Filleur S, Nelius T, Volpert O V: Nuclear factor of activated T cells balances angiogenesis activation and inhibition. *J.Exp.Med.*, 199: 1513-1522 (2004)
52. Zhu D, Deng X, Spee C, Sonoda S, Hsieh C L, Barron E, Pera M, Hinton D R: Polarized secretion of PEDF from human embryonic stem cell-derived RPE promotes retinal progenitor cell survival. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.*, 52: 1573-1585 (2011)

## Anhang

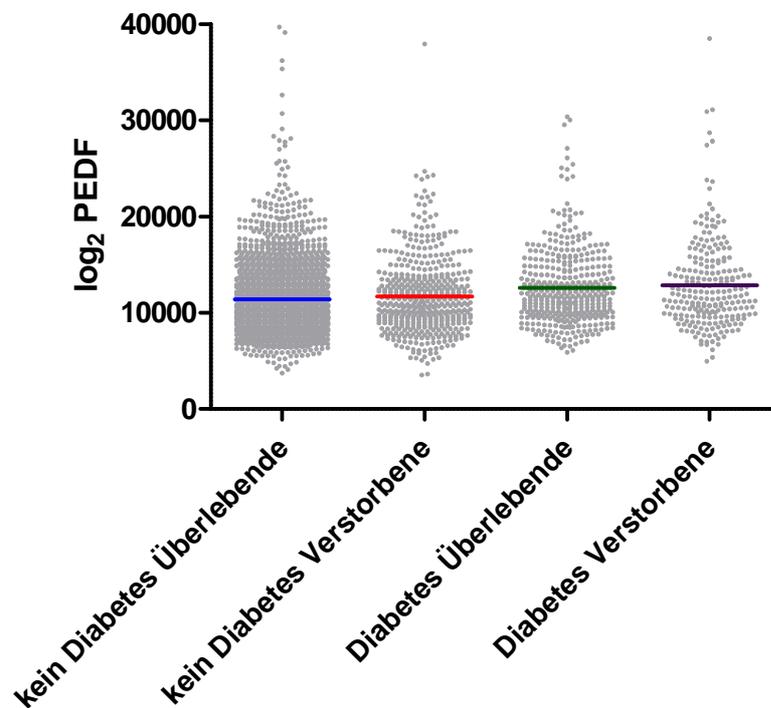
Die Auswertung in diesem Teil erfolgte, wie im Hauptteil, mittels Spearman- oder Mann-Whitney-U-Test (s. S. 16). Die Darstellungen beziehen sich alle auf das gleiche Gesamtkollektiv aus der Datenbank der Universität Ulm von Patienten mit überwiegend kardiovaskulären Risiken (Genaueres dazu unter 2.1.1 (s. S. 10) und 3.1 (s. S. 17ff)).

### Anhangsverzeichnis

I.	Zusammenhang zwischen Pigment epithelium-derive-factor (PEDF) [ng/ml] und Diabeteserkrankung aufgefächert nach Verstorbenen und Überlebenden.....	40
II.	Geschlechtsspezifische Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Darstellung [ng/ml] bei Überlebenden .....	41
III.	Untersuchung von Pigment epithelium-derive-factor (PEDF) [ng/ml] in Relation zum Sterbealter [Lebensjahre] .....	42
IV.	Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Body-Mass-Index (BMI) [kg/m <sup>2</sup> ] aufgeteilt nach Geschlecht.....	43
V.	Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und des Body-Mass-Indexes (BMI) [kg/m <sup>2</sup> ] aufgeteilt nach Überlebenden und Verstorbenen.....	44
VI.	Zusammenhang zwischen der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Körpergewicht [kg].....	45
VII.	Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Körpergewicht [kg] aufgeteilt nach Geschlecht .....	46
VIII.	Zusammenhang zwischen der PEDF-Konzentration [ng/ml] und dem Körpergewicht [kg] aufgefächert nach Überlebenden und Verstorbenen.....	47
IX.	Zusammenhang zwischen der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Hüftumfang [cm] .....	48

X.	Zusammenhang zwischen Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und Taillenumfang [cm].....	49
XI.	Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Taillenumfang [cm] aufgeteilt nach Überlebenden und Verstorbenen .....	50
XII.	Geschlechtsspezifische Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] in Relation zum Taillen-Hüft-Index (THI) .....	51
XIII.	Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Taillen-Hüft-Index (THI) aufgeteilt nach Überlebenden und Verstorbenen .....	52

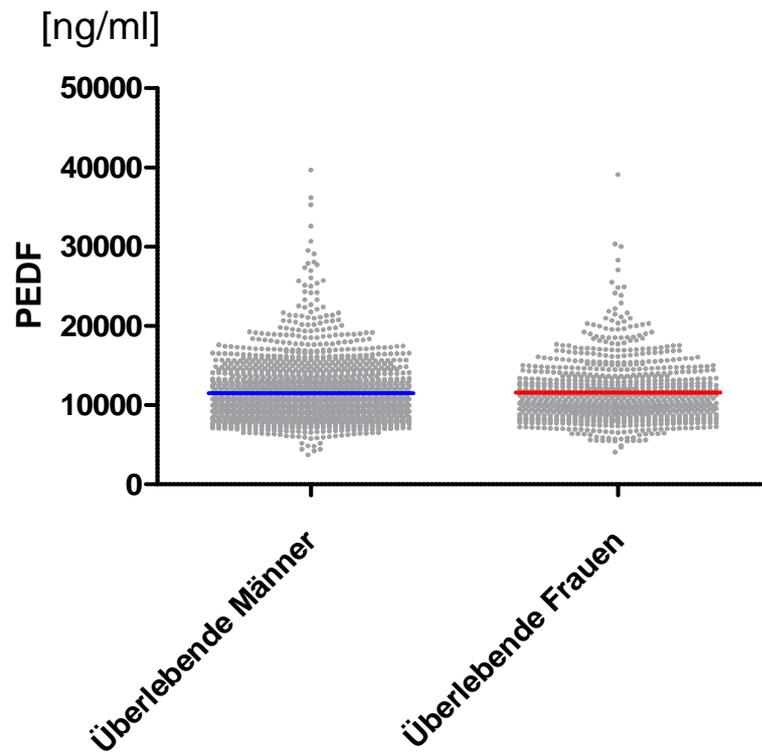
## I. Zusammenhang zwischen Pigment epithelium-derive-factor (PEDF) [ng/ml] und Diabeteserkrankung aufgefächert nach Verstorbenen und Überlebenden



Die Abbildung zeigt den PEDF-Gehalt (logarithmisch aufgetragen) der vier eingeteilten Untersuchungsgruppen in Form von Kohortenclustern bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm. Die farbigen Balken geben den PEDF-Durchschnittsgehalt in den einzelnen Gruppen an.

Bei der Untersuchungsgruppe der Überlebenden ohne Diabetes beträgt der Medianwert des PEDF-Gehalt 10634 ng/ml (blau), bei den Verstorbenen ohne Diabetes 10933 ng/ml (rot), bei den Überlebenden mit Diabetes 11843 ng/ml (grün) und bei den Verstorbenen mit Diabetes 11679 ng/ml (lila).

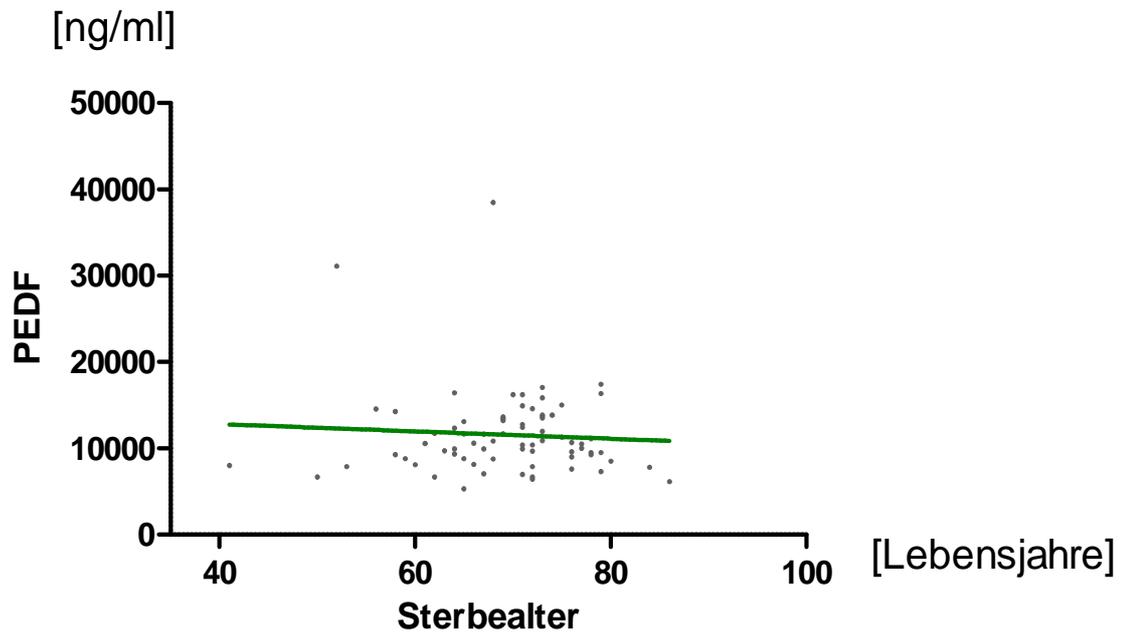
## II. Geschlechtsspezifische Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Darstellung [ng/ml] bei Überlebenden



Die Grafik zeigt die noch lebenden Personen des Patientenkollektivs, mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm, geschlechtsspezifisch aufgeteilt mit den verzeichneten PEDF-Mengen [ng/ml]. Die Balken stellen die Mittelwerte dar. Bei den Männern betrug dieser 10778 ng/ml (blau). Bei den Frauen 10881 ng/ml (rot).

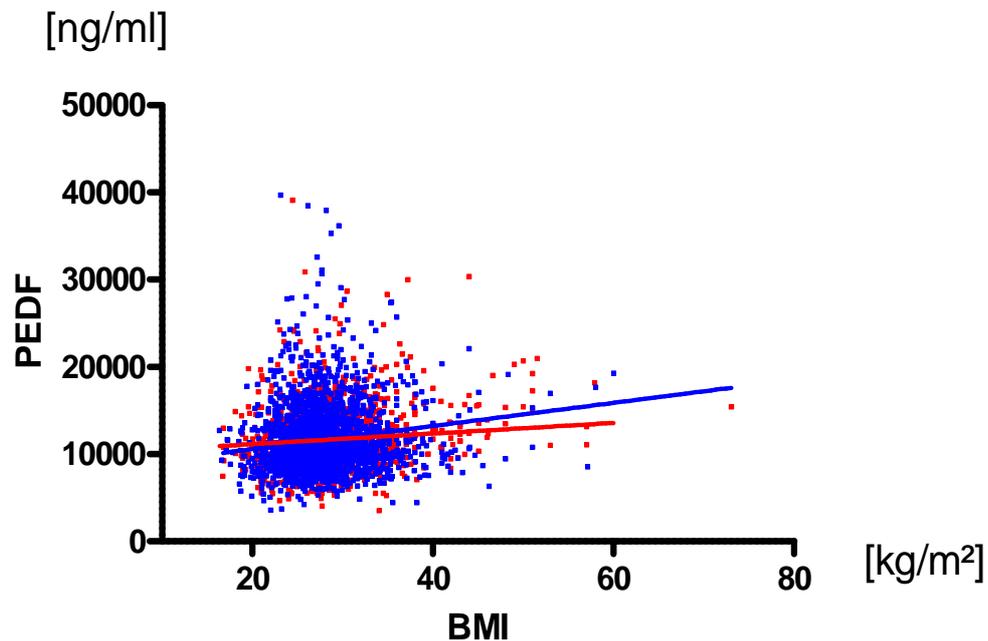
Eine Signifikanz scheint, laut Mann-Whitney-U-Test nicht eindeutig zu bestehen ( $p = 0,6772$ ).

### III. Untersuchung von Pigment epithelium-derive-factor (PEDF) [ng/ml] in Relation zum Sterbealter [Lebensjahre]



In der Abbildung ist das Sterbealter [Lebensjahre] sowie die PEDF-Konzentration [ng/ml] in Form eines Streudiagramms, bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm, dargestellt. Die Nullhypothese auf Basis der Daten muss hier verworfen werden. Es ist von keiner signifikanten Relation der Werte, laut Spearman-Test auszugehen ( $r=0,02940$ ,  $p=n.s.$ ).

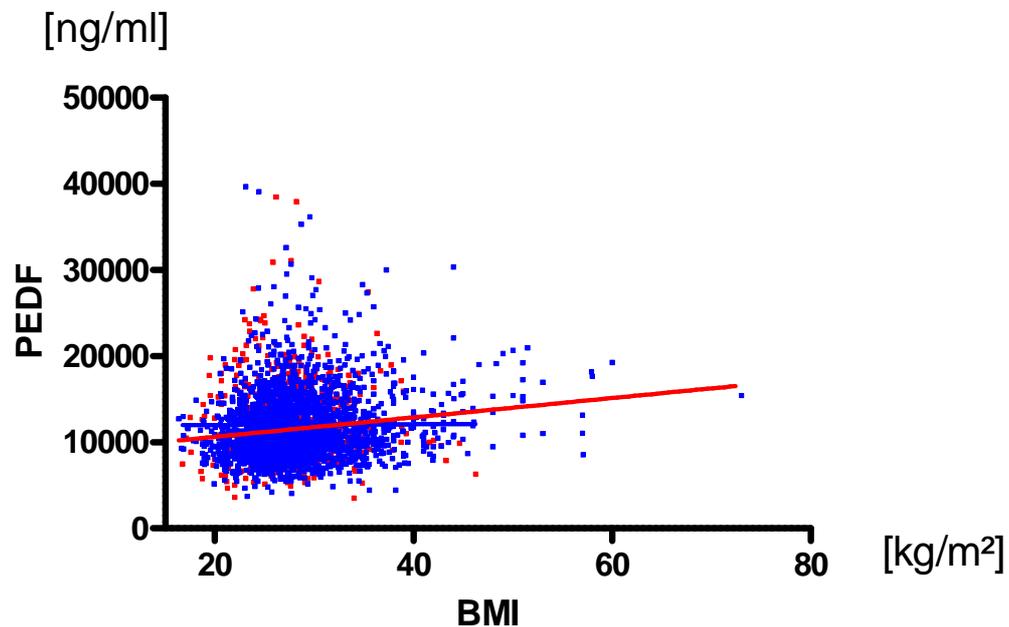
#### IV. Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Body-Mass-Index (BMI) [kg/m<sup>2</sup>] aufgeteilt nach Geschlecht



In dem Streudiagramm ist der PEDF-Gehalt [ng/ml] in Relation zu dem BMI-Wert [kg/m<sup>2</sup>], bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm, geschlechtsspezifisch dargestellt. Die Werte der männlichen Patienten, sowie ihre Regressionsgerade, sind blau markiert. Die Werte und Grade der Frauen sind in roter Farbe dargestellt.

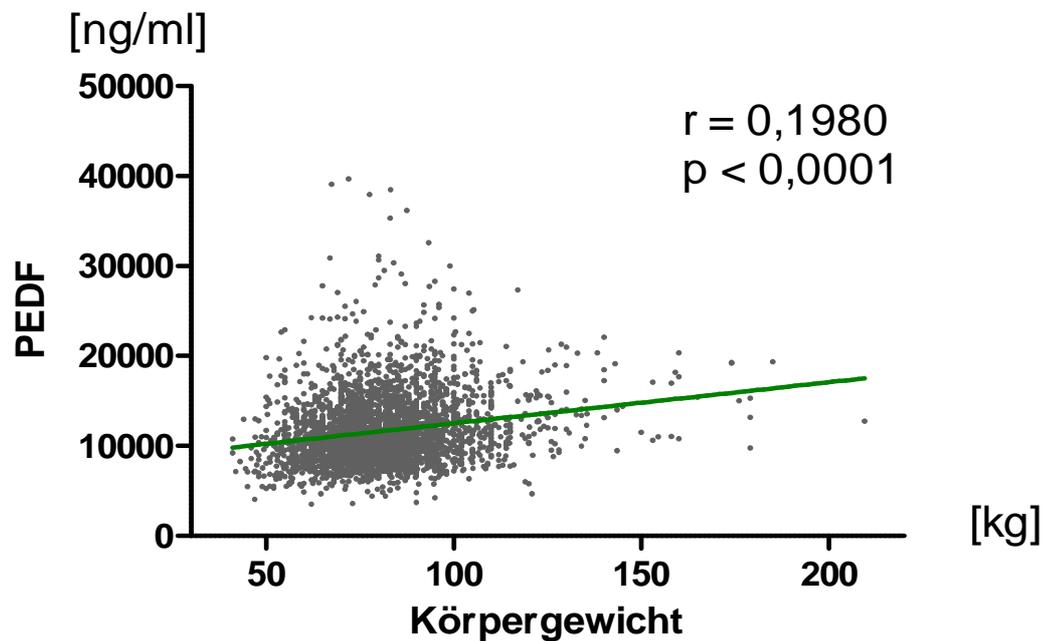
Bei den Männern ( $n = 2171$ ) war der Rangkorrelationskoeffizient ( $r = 0,06987$ ) niedriger als bei den Frauen ( $n = 1006$ ,  $r = 0,1958$ ). Eine signifikante Assoziation erscheint bei den Frauen deutlicher ( $p < 0,001$ ) als bei den Männern ( $p = 0,011$ ).

**V. Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und des Body-Mass-Indexes (BMI) [kg/m<sup>2</sup>] aufgeteilt nach Überlebenden und Verstorbenen**



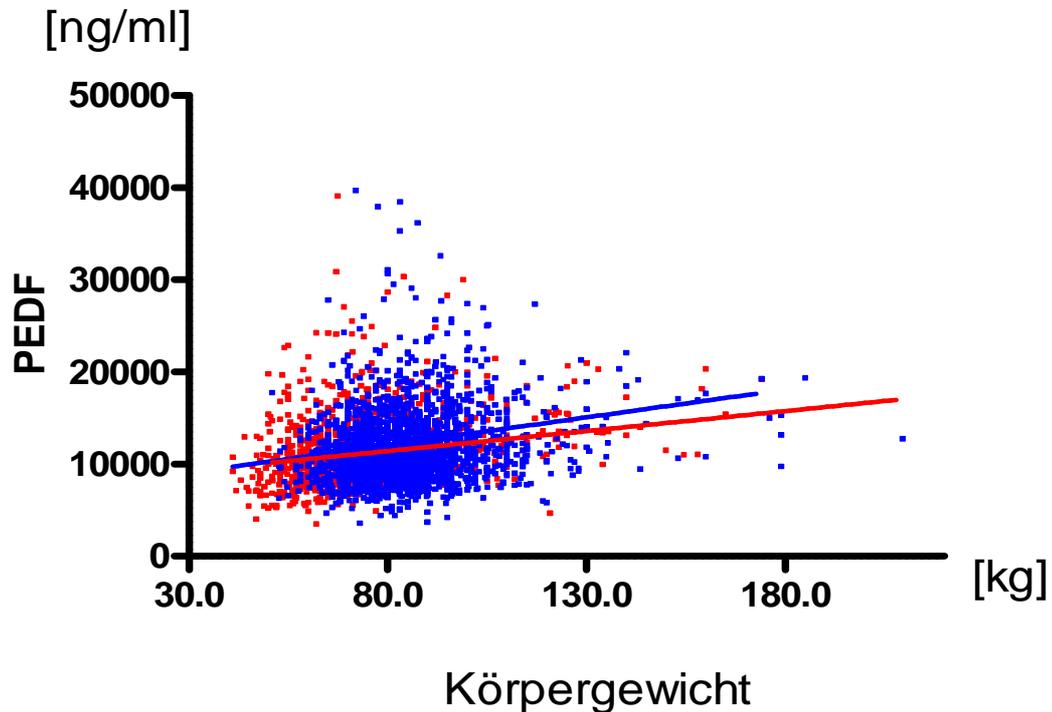
Die Abbildung zeigt die PEDF-Konzentration [ng/ml] im Verhältnis zum BMI [kg/m<sup>2</sup>] aufgeteilt nach Verstorbenen (rot, n = 703) und Überlebenden (blau, n = 2485) im Streudiagramm bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm. Die beiden Gruppen unterscheiden sich sowohl im Rangkorrelationskoeffizient (Verstorbene:  $r = 0,00231$ , Überlebende:  $r = 0,1539$ ), als auch im p-Wert. Während bei der Gruppe der Verstorbenen keine Signifikanz festgestellt werden kann, deutet der Wert  $p < 0,0001$  bei den Überlebenden auf eine Korrelation des BMI und PEDF hin.

## VI. Zusammenhang zwischen der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Körpergewicht [kg]



Das Streudiagramm beschreibt eine signifikante Assoziation zwischen der PEDF-Menge [ng/ml] und dem Körpergewicht [kg] bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm. Während der Rangkorrelationskoeffizient bei  $r = 0,1980$  liegt, wurde der Signifikanzwert bei  $p < 0,0001$  ermittelt.

## VII. Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Körpergewicht [kg] aufgeteilt nach Geschlecht

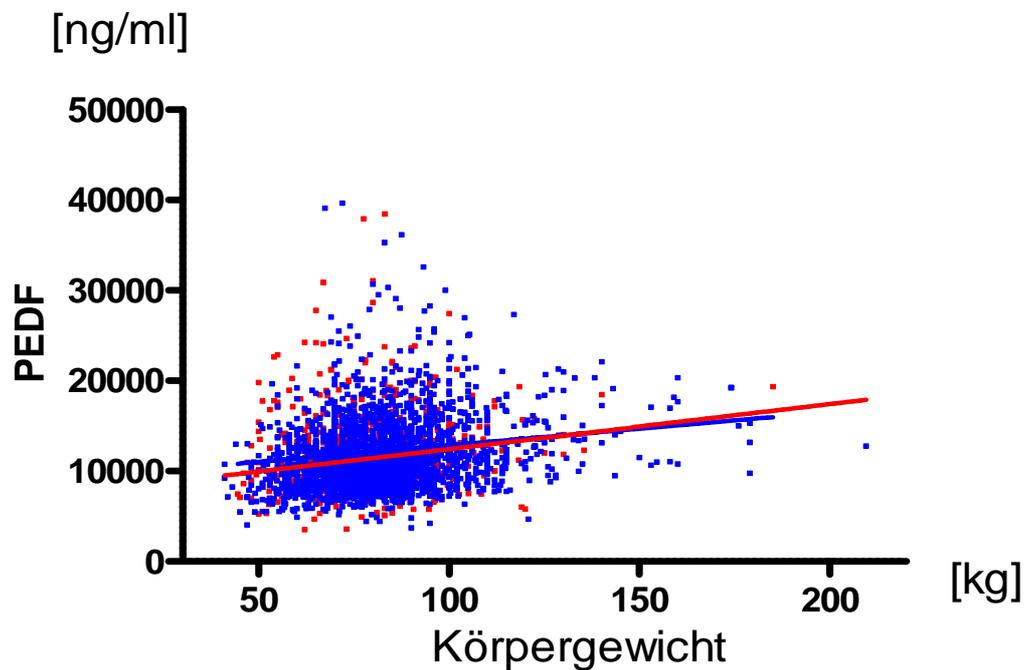


Männer: n=2185  
r= 0,1659  
p< 0,0001

Frauen: n=1023  
r= 0,2801  
p< 0,0001

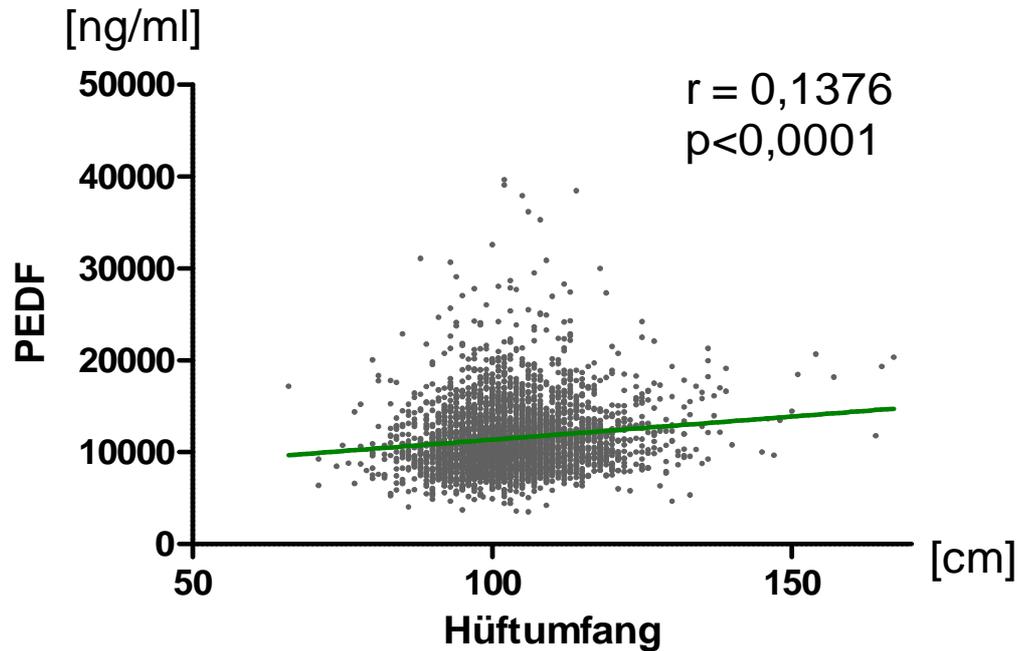
Die Abbildung zeigt die Relation der PEDF-Konzentration [ng/ml] und dem Körpergewicht [kg] geschlechtsspezifisch aufgeteilt (blau = Männer, rot = Frauen) bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm. Beide Gruppen schließen im Vergleich mit ähnlichen Werten ab. Der Rangkorrelationskoeffizient der Männer liegt bei  $r = 0,1659$ , während er bei den Frauen  $r = 0,2801$  beträgt. Der Signifikanzwert beider Gruppen lag bei  $p < 0,0001$ . So kann die Vermutung, dass eine Korrelation besteht nicht verworfen werden.

### VIII. Zusammenhang zwischen der PEDF-Konzentration [ng/ml] und dem Körpergewicht [kg] aufgefächert nach Überlebenden und Verstorbenen



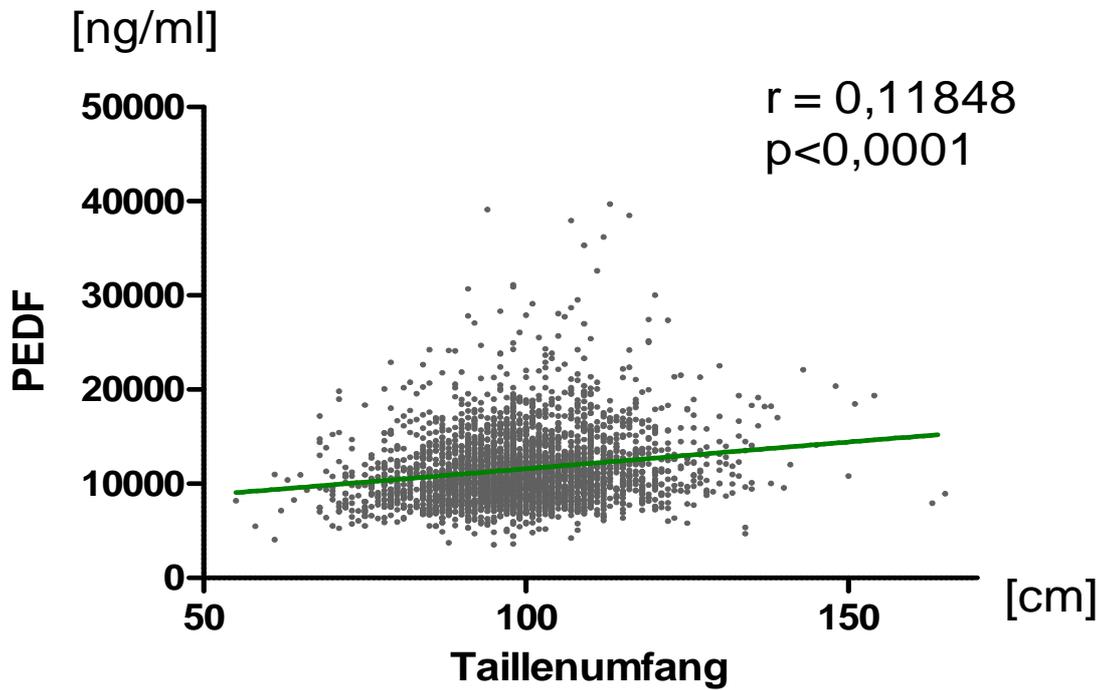
Die Darstellung beschreibt die Relation zwischen der PEDF-Konzentration [ng/ml] und dem Körpergewicht [kg] aufgeteilt nach Verstorbenen (rot,  $n = 705$ ) und Überlebenden (blau,  $n = 2503$ ) bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm. Ein signifikanter Zusammenhang der Messgrößen scheint in der Gruppe der Überlebenden, mit einem Rangkorrelationskoeffizient von  $r = 0,2229$  und  $p < 0,0001$ , deutlicher zu bestehen als in der Gruppe der Verstorbenen ( $r = 0,1325$  und  $p = 0,0004$ ).

**IX. Zusammenhang zwischen der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Hüftumfang [cm]**



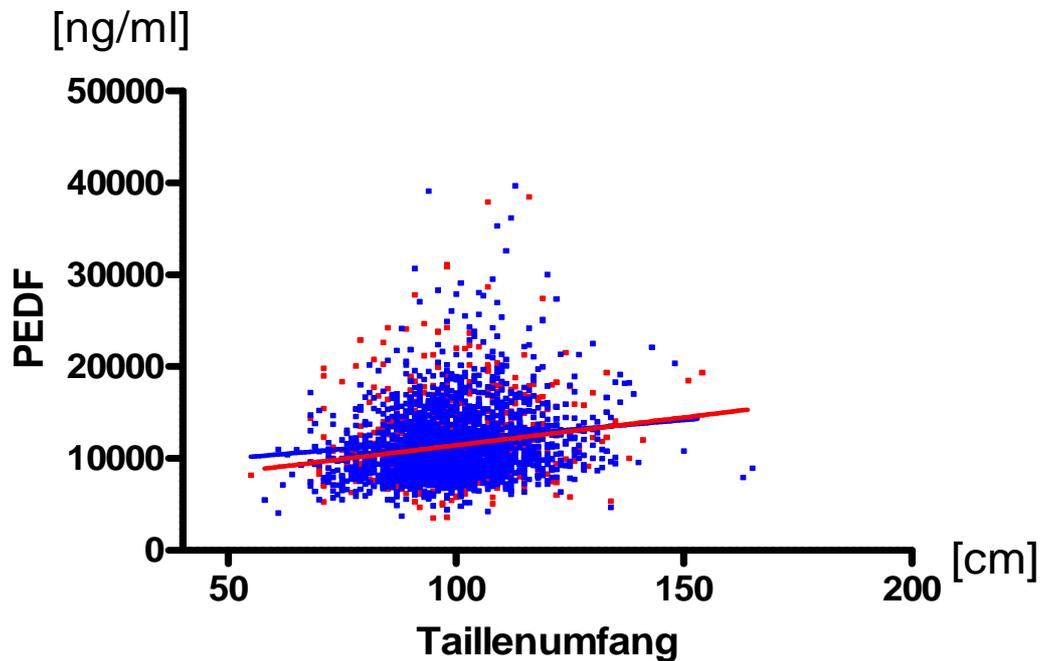
Das Diagramm zeigt die Relation zwischen PEDF-Konzentration [ng/ml] und Hüftumfangsmessung [cm] bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm. Die Regressionsgerade im Streudiagramm zeigt einen positiven Anstieg und gibt einen Hinweis auf eine Korrelation zwischen den beiden Werten ( $r = 0,1980$ ,  $p < 0,0001$ ).

### X. Zusammenhang zwischen Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und Taillenumfang [cm]



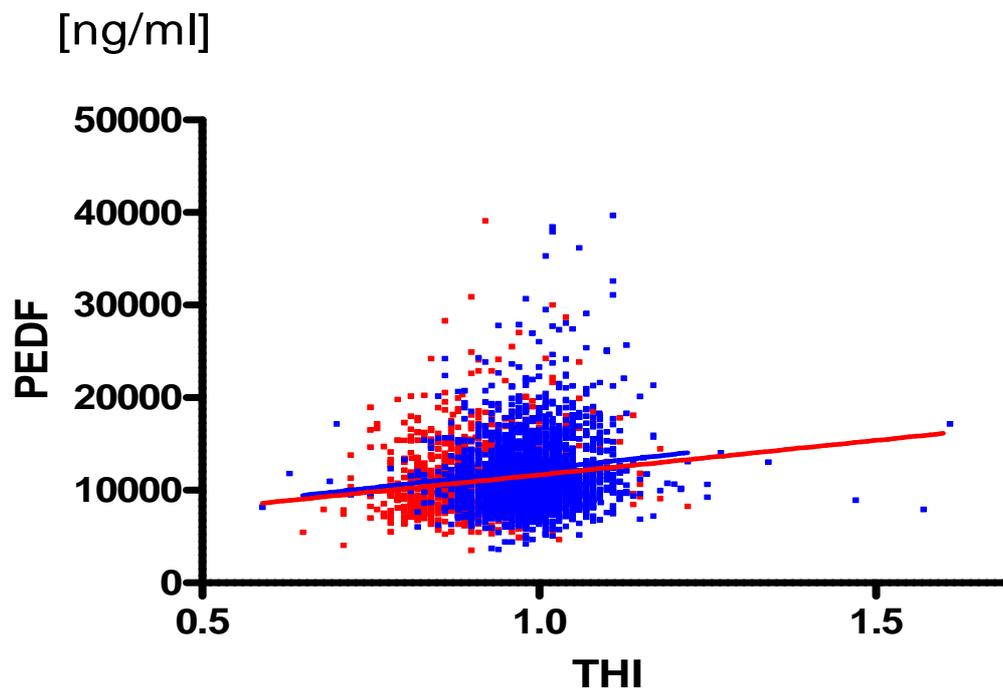
Die Grafik zeigt die PEDF-Konzentration [ng/ml] sowie die Messungen des Taillenumfangs [cm] im Streudiagramm bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm. Der ermittelte Signifikanzwert von  $p < 0,0001$  deutet darauf hin, dass eine positive Abhängigkeit besteht. Die Regressionsgerade verläuft entsprechend positiv, der Rangkorrelationskoeffizient liegt bei 0,11848.

**XI. Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Taillenumfang [cm] aufgeteilt nach Überlebenden und Verstorbenen**



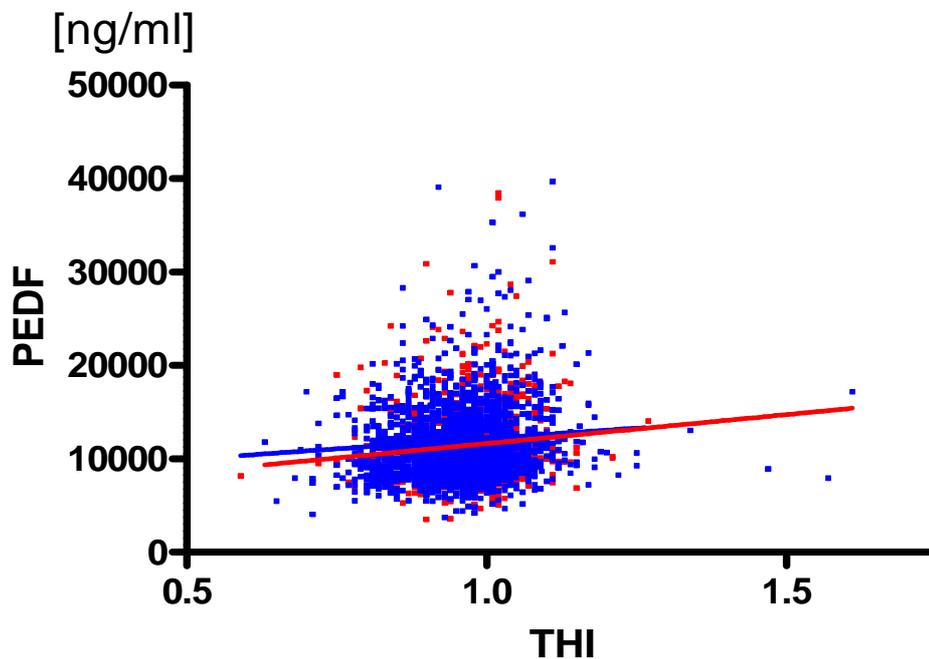
Die Abbildung stellt die PEDF-Konzentration [ng/ml] im Zusammenhang mit dem Taillenumfang [cm], bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm, dar. Das Patientenkollektiv ist in die zwei Gruppen, Verstorbene (rot, n = 700) und Überlebenden (blau, n = 2331), aufgefächert. Während es bei den Verstorbenen geringe signifikante Assoziationen zu geben scheint ( $r = 0,1244$ ,  $p = 0,0010$ ), scheinen relevante Zusammenhänge bei den Überlebenden deutlicher zu sein ( $r = 0,1985$ ,  $p < 0,0001$ ).

## XII. Geschlechtsspezifische Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] in Relation zum Taillen-Hüft-Index (THI)



In der Grafik sind zwei geschlechtsspezifische Streudiagramme (Männer = blau, n = 2108; Frauen = rot, n = 923), bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm, dargestellt. Sie ergeben sich aus der ermittelten PEDF-Konzentration [ng/ml] im Zusammenhang mit dem Taillen-Hüft-Index. Beide Regressionsgeraden sind annähernd gleich steigend. Die p-Werte beider Gruppen ( $p < 0,0001$ ) lassen auf eine signifikante Assoziation schließen.

XIII. Darstellung der Pigment epithelium-derive-factor (PEDF)-Konzentration [ng/ml] und dem Tailen-Hüft-Index (THI) aufgeteilt nach Überlebenden und Verstorbenen



Überlebende n=2331  $r=0,1338$   $p<0,0001$   
Verstorbene: n=700  $r=0,0787$   $p=0,0374$

Die PEDF-Konzentration [ng/ml] im Zusammenhang mit dem Tailen-Hüft-Index, bei Patienten mit vorwiegend kardiovaskulären Risiken aus der Datenbank der Universitätsklinik Ulm, ist in der Grafik veranschaulicht. Das Patientenkollektiv ist hierbei in eine Gruppe von Verstorbenen (= rot, n = 700) und eine Gruppe der Überlebenden (= blau, n = 2331) eingeteilt. Der Randkorrelationskoeffizient bei der Gruppe der Verstorbenen liegt bei 0,0787, bei den noch Lebenden bei 0,1338. Der p-Werte deutet eine stärkere signifikante Assoziation der Messwerte bei den Überlebenden mit  $p < 0,0001$  an, als bei den Verstorbenen mit  $p = 0,0374$ .

## Danksagung

An dieser Stelle danke ich Prof. Dr. med. Bernhard Otto Böhm, dass er mir die Mittel für meine Dissertation zur Verfügung gestellt hat. Durch die Experimente in den Laboren seiner Abteilung konnte ich einen fundierten Einblick in die humanmedizinische Forschung bekommen.

Des Weiteren danke ich herzlich Roza Blagieva für ihre Betreuung, Silke Rosinger für die Statistikeinweisungen und PC-Hilfestellungen sowie der gesamten Abteilung der Inneren Medizin I für die Laboreinarbeitung, freundliche Unterstützung und Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt allen Menschen, die zu einem Teil dieser Doktorarbeit geworden sind, indem sie beispielsweise die Arbeit Korrektur gelesen oder mir geduldig Tipps zur Formatierung und Verbesserung des Inhalts geben haben, hervorzuheben ist dabei Martin Eggert.

Auch möchte ich allen herzlich danken, die sich die Zeit genommen haben meinen Vortrag zur Verteidigung anzuhören und mit ihrer Kritik zu verbessern.

Zuletzt danke ich von Herzen allen meinen Lieben, ohne deren grenzenlose Unterstützung - besonders durch Verständnis und Motivation - sowohl das Studium als auch diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre!

## Lebenslauf

Name: Ann-Kathrin Wieland

### Schulischer Werdegang:

1990 – 1994	Volkeninggrundschule Bielefeld
1994 – 2003	Ceciliengymnasium Bielefeld
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Beruflicher Werdegang:

2003 – 2006	Berufsausbildung zur Zahntechnikerin
2006 -2007	Anstellung als Zahntechnikerin und Aushilfstätigkeiten

### Akademischer Werdegang:

SS 2007	Beginn des Studiengangs Zahnmedizin an der Universität Ulm
April 2008	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
August 2009	Zahnärztliche Vorprüfung
Juni 2012	Staatsexamen Zahnmedizin

### Zahnärztliche Tätigkeit:

September 2012	Beginn der Assistenzzeit in Biberach
Oktober 2013	Fortführung der Assistenzzeit in Ulm
Oktober 2014	Anstellung als Zahnärztin
Februar 2015	Zertifizierung zur Kinderzahnärztin