

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl**

**Einfluss des Interleukin-6 -174 G→C Genpolymorphismus auf die
Akutphase-Reaktion bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Jan Stefan Schmid
aus Würzburg**

Würzburg, April 2006

Referent: Professor Dr. C. Wanner

Koreferent: Professor Dr. M. Zimmer

Dekan: Professor Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2006

Der Promovend ist Arzt

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur sowie der erwähnten Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Dissertation liegt bzw. lag in keiner Form einem anderen Prüfungsverfahren vor.

Würzburg, den 01.04.2006

Jan Stefan Schmid

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung des C-reaktiven Proteins als Langzeitprädiktor des kardiovaskulären Risikos in der gesunden Bevölkerung	1
1.2 Die Bedeutung des C-reaktiven Proteins als Langzeitprädiktor des kardiovaskulären Risikos bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung	1
1.3 C-reaktives Protein und Interleukin-6	3
1.4 CRP-Baselinespiegel und Interleukin-6 aus genetischer Sicht	4
1.5 Fragestellung	5
2. Methodik	6
2.1 Kollektivbeschreibungen	6
2.2 Laboranalytik	6
2.3 DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut	7
2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration und des DNA-Reinheitsgrades	8
2.5 Erstellung von DNA-Versuchsverdünnungen	9
2.6 DNA-Amplifikation durch PCR	9
2.7 Bestätigung einer erfolgreichen PCR durch horizontale TAE-Agarose-Gelelektrophorese	11
2.8 DNA-Aufreinigung	12
2.9 Genotypisierung durch Heteroduplexanalyse	12
2.10 Auftrennung der Hetero- und Homoduplices durch vertikale TBE-Acrylamid-Gelelektrophorese	13
2.11 Fluoreszenzfärbung des Acrylamidgels	14
2.12 Statistik	15
3. Ergebnisse	16
4. Diskussion	33

5.	Zusammenfassung	38
6.	Literaturverzeichnis	39
7.	Anhang	50
7.1	Liste der verwendeten Abkürzungen	50
7.2	Verwendete Chemikalien und molekularbiologische Produkte	50
7.3	Verwendete Geräte und Einmalartikel	52

Danksagung und Lebenslauf

1. Einleitung

1.1 Die Bedeutung des C-reaktiven Proteins als Langzeitprädiktor des kardiovaskulären Risikos in der gesunden Bevölkerung

Nach einer prospektiven Studie von Ridker et al. [1] (Physicians' Health Study, 1997) lässt sich mit Hilfe einer einmaligen Messung des Serum CRP-Baselinespiegels gesunder männlicher Probanden das zukünftige Risiko eines Myokardinfarktes bzw. eines zerebralen Insults über einen Zeitraum von über acht Jahren vorhersagen. Diese Vorhersage ist unabhängig von den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren (Anmerkung: Unter dem CRP-Baselinespiegel versteht man den CRP-Spiegel in Abwesenheit klinisch erkennbarer pathologischer Faktoren, welche die Akutphase-Reaktion stimulieren [2]). Weitere Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse auch bei Frauen [3-7] und beschreiben eine Risikoabschätzung [8-12] bezogen auf die kardiovaskuläre Mortalität bzw. die Gesamtmortalität.

Hinsichtlich des kardiovaskulären Risikos zeichnet sich der CRP-Baselinespiegel im Vergleich zum LDL-Cholesterin als stärkerer Prädiktor ab und bietet zusätzliche prognostische Informationen zu den klassischen Framingham Risikofaktoren [13-15].

Zur Stratifizierung des kardiovaskulären Risikos werden CRP-Baselinespiegel <1,0 mg/l als niedriges, 1,0 – <3,0 mg/l als mittleres, >3,0 mg/l als hohes kardiovaskuläres Risiko angesehen [16;17].

1.2 Die Bedeutung des C-reaktiven Proteins als Langzeitprädiktor des kardiovaskulären Risikos bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung

Chronisch nierenkranke Menschen weisen im Vergleich zur gesunden Allgemeinbevölkerung eine stark erhöhte Prävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen auf [18-20]. Annähernd 75 % der Dialysepatienten leiden an einer Linksherzhypertrophie, 40 % an einer koronaren Herzerkrankung und 40 % an einer Herzinsuffizienz [21]. Die jährliche kardiovaskuläre Mortalität dialysepflichtiger Patienten beträgt neun Prozent und ist nach statistischer Korrektur des Mortalitätsrisikos für Alter, Geschlecht und Diabetes mellitus um 10 bis 20fach höher als in der gesunden Bevölkerung [18]. Somit sterben 50 % der Dialysepatienten an kardiovaskulären Zwischenfällen [22].

Die hohe Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen ist noch vor Dialysebeginn frühzeitig im Verlauf einer chronischen Nierenerkrankung zu beobachten [23-30] und nimmt konsekutiv mit abnehmender Nierenfunktion zu [23;24;31-33]. Dies ist von besonderem Interesse, da der kardiovaskuläre Status zu Beginn der Nierenersatztherapie die Patientenprognose beeinflusst [34].

Das erhöhte kardiovaskuläre Risiko chronisch nierenkranker Menschen erklärt sich durch eine höhere Prävalenz klassischer Risikofaktoren [35-37] und spezifischer nicht-klassischer Risikofaktoren [38-40] (s. Tabelle 1).

klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren	nicht-klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren
Alter	Chronische Inflammation
männliches Geschlecht	Oxidativer Stress und Endotheliale Dysfunktion
arterielle Hypertension	Urämie per se
Diabetes mellitus	Dialyse per se
Dyslipidämie	Anämie
positive Raucheranamnese	Hypervolämie, “leaky gut”
Linksherzhypertrophie	Störungen des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels, Calciphylaxie
mangelnde körperliche Aktivität	Hyperhomocysteinämie
kardiovaskuläre Ereignisse in der Familie	Asymmetric-dimethyl-L-arginine (adma) Mangelernährung

Tabelle 1: Klassische und nicht-klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren bei chronischen Nierenerkrankungen [41-43].

Besondere Bedeutung kommt der *chronischen Inflammation der Gefäßwand* zu [44-47], welche eine zentrale Rolle in der Genese der Atherosklerose (Initiation, Progression bis zur Plaqueerosion und -ruptur) [48;49] spielt. Durch Bestimmung der CRP-Baselinespiegel als Marker chronischer Inflammationsprozesse kann das kardiovaskuläre Risiko in der nierenkranken Bevölkerung abgeschätzt werden. So belegen Studien bei Hämodialysepatienten [44;45;50-54] den Zusammenhang für die Zunahme kardiovaskulärer Ereignisse (sowie einem steigendem Mortalitätsrisiko) in Abhängigkeit erhöhter CRP-Baselinespiegel. Entsprechende Erkenntnisse finden sich auch in Peritonealdialysekollektiven [55-57]. Mit fortschreitender Abnahme der Nierenfunktion zeigt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Inflammationsmarker Interleukin-6, CRP,

Fibrinogen sowie ein Abfall von Albumin [36;58;59]. Dialysepflichtige Patienten erreichen einen 8 - 10fach höheren CRP-Baselinespiegel als gesunde Kontrollprobanden [60], obgleich ein akuter oder kürzlich zurückliegender Infekt ausgeschlossen werden kann [44]. Weiterhin verläuft die kardiovaskuläre Erkrankung mit rascherer Progredienz [53]. Chronische Inflammationsprozesse stellen somit ein zentrales Phänomen bei chronisch nierenkranken Patienten dar. Die einmalige Bestimmung des CRP-Baselinespiegels bietet infolgedessen ergänzend zu den klassischen Framingham Risikofaktoren prognostische Informationen (über einen Mindestzeitraum von vier Jahren) hinsichtlich der kardiovaskulären Mortalität bzw. der Gesamtmortalität [53].

In der Zusammenschau deuten diese Erkenntnisse auf eine floride Akutphase-Reaktion in einer beträchtlichen Anzahl von chronisch nierenkranken Patienten hin, welche in enger Beziehung zur Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen und zur kardiovaskulären Mortalität bzw. Gesamtmortalität steht [44].

In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, Interleukin-6 als Hauptregulator der Akutphase-Reaktion in Verbindung mit dem C-reaktiven Protein näher zu betrachten.

1.3 C-reaktives Protein und Interleukin-6

Das C-reaktive Protein (CRP), benannt nach seiner Reaktion mit dem C-Polysaccharid von *Streptococcus pneumoniae*, ist das klinisch bedeutsamste Akutphaseprotein [61]. Das Zytokin Interleukin-6 stellt den zentralen Regulator der Akutphase-Reaktion [61-63] und somit auch der CRP-Genexpression [64-67] dar. Interleukin-6 wird durch Monozyten, Adipozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten gebildet [62;68;69].

Die biologische Bedeutung des C-reaktiven Proteins zeigt sich in seiner Beteiligung an der unspezifischen Immunabwehr durch Opsonierung und Aktivierung des Komplementsystems sowie der Clearance von apoptotischen und nekrotischen Zellen [70].

Nach einem inflammatorischen Stimulus steigen innerhalb von sechs Stunden die CRP-Spiegel an und können mehr als das 10000fache der Norm erreichen [71]. Die CRP-Plasmahalbwertszeit (19 h) wird alleine durch die Syntheserate der Leber determiniert und zeigt keine Veränderungen durch inflammatorische Prozesse [72]. Rascher Anstieg und Abfall der Serumspiegel sowie hohe Sensitivität hinsichtlich entzündlicher Prozesse ermöglichen den klinischen Einsatz zur initialen Erfassung und Verlaufsbeobachtung

unspezifischer inflammatorischer Prozesse und erklären die klinische Bedeutung des C-reaktiven Proteins.

1.4 CRP-Baselinespiegel und Interleukin-6 aus genetischer Sicht

Verschiedene Studien belegen eine 35 – 40 %ige Heritabilität des CRP-Baselinespiegels [2;73;74] mit Interleukin-6 als entscheidenden Regulator der CRP-Genexpression [62-67]. Fishman et al. konnte in der Promotorregion des Interleukin-6 Gens einen Basenaustausch (single nucleotide polymorphism, SNP) von Guanin nach Cytosin an der Position -174 bezogen auf die „transcription start site“ (Interleukin-6 -174 G→C Genpolymorphismus) nachweisen [75] (s. Abb. 1).

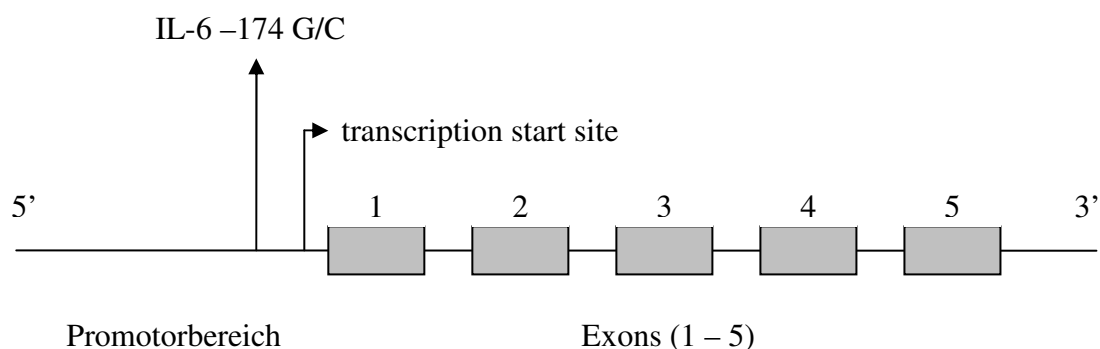


Abb. 1: Interleukin-6 Gen auf Chromosom 7p21

Der Basenaustausch beeinflusst sowohl die Transkriptionsrate des Interleukin-6 Gens, als auch die Interleukin-6 Spiegel [75;76].

Die CRP-Baselinespiegel [77-80] unterliegen im Vergleich zu den Interleukin-6 Baselinespiegeln [81-83] keiner zirkadianen Rhythmik und weisen eine hohe intraindividuelle Stabilität über einen Zeitraum von fünf Jahren auf [84]. Aus genannten Gründen ist die Bestimmung der CRP-Baselinespiegel vorzuziehen.

1.5 Fragestellung

Unter Berücksichtigung der dargelegten Fakten resultierte die Aufgabenstellung dieser Arbeit in der *Untersuchung des Interleukin-6 -174 G→C Polymorphismus hinsichtlich seines vorstellbaren Einflusses auf die Akutphase-Reaktion*. Unter der Voraussetzung eines sich ergebenden Zusammenhangs zwischen dem Interleukin-6 -174 G→C Polymorphismus und den Plasmaspiegeln der Akutphaseproteine eröffnete sich die Möglichkeit einer individuellen Risikostratifizierung chronisch nierenkranker Patienten. Bei der Durchführung dieser Arbeit dienten 224 chronische (nicht dialysepflichtige) Nierenkranke als Patientenklientel (s. Kap. 2.1).

2. Methodik

2.1 Kollektivbeschreibungen

In der Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Würzburg (Nephrologische Ambulanz) und in einer Dialysepraxis im Raum Würzburg (Dres. med. Schramm, Zimmermann, Netzer; Gemeinschaftspraxis für Innere Medizin, Nephrologie und Diabetologie) erfolgte im Zeitraum von April 1999 bis Januar 2002 die Rekrutierung von 224 Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz unterschiedlicher Genese bei noch nicht bestehender Dialysepflichtigkeit. Ein klinisch apparenter oder kürzlich zurückliegender Infekt galt als Ausschlusskriterium für dieses Patientenkollektiv.

Sowohl im Rahmen von Blutspendeaktionen des Roten Kreuzes als auch über die transfusionsmedizinische Abteilung der Universitätsklinik Würzburg wurden 301 nierengesunde Blutspender aus der Region Unterfranken in das Kontrollkollektiv aufgenommen. Einer ausführlichen ärztlichen Befragung und Untersuchung der Kontrollpersonen schloss sich die Entnahme der Blutproben an. Patienten mit Auffälligkeiten im Hinblick auf Anamnese, körperliche Untersuchung und Laborergebnisse, insbesondere Probanden mit einem akuten und kürzlich zurückliegenden Infekt, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Sämtliche Patienten und Probanden wurden über die Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

2.2 Laboranalytik

Alle Laboranalysen erfolgten im Zentrallabor der Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Würzburg nach standardisierten und vollautomatisierten Methoden. Im speziellen wurden das C-reaktive Protein mit dem Analysesystem Cobas Integra 700 der Firma Roche (high sensitive homogeneous immunoassay), das Fibrinogen mit dem Behring Coagulation System der Firma Behring, Homocystein mit AXSYM der Firma Abbott, und jeweils Ferritin, Transferrin, Albumin, Kreatinin, Harnstoff mit dem Analysesystem MODULAR der Firma Roche bestimmt.

2.3 DNA-Isolierung aus EDTA-Vollblut

Die Isolierung der Patienten-DNA aus EDTA-Vollblut erfolgte unter Verwendung des peqGOLD Blood DNA Maxi Kit der Firma Peqlab Biotechnologie in Anlehnung an das mitgelieferte Protokoll (Version 04.02.).

Zunächst wurde das bei -20°C gelagerte Patienten-Vollblut bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Erythrozytenlyse fand Anwendung durch Vorlegen von maximal 2,5 ml Blut in Falcon-Zentrifugenröhrchen (15 ml) der Fa. Becton Dickinson, Zugabe von 10 ml Puffer EL (4°C), Durchmischung auf dem Schüttler (VF2) und Inkubation auf Eis für 10 min. Nach Zentrifugation (20°C , 3000 U/min, 5 min, Hettich Rotixa/P) ließ sich der Überstand unter Beibehaltung des entstandenen Leukozytenpellets verwerfen. Die Zugabe von 10 ml Puffer EL (4°C) und Verwendung des Schüttlers erleichterte die Resuspension des Zellpellets. Die folgende Zentrifugation führte zu einer erneuten Zellpelletbildung (20°C , 3000 U/min, 5 min); der Überstand wurde dann verworfen.

Die nachfolgende Leukozytenlyse erfolgte durch Resuspension des Zellpellets in 1 ml Lyse-Puffer A unter Verwendung des Schüttlers und Überführung der Suspension in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß.

Die sich anschließende Proteolyse wurde durch Zugabe von 20 μl Proteinase K und kurzem Schütteln eingeleitet. Zahlreiche Vorversuche ergaben eine unzureichende DNA-Ausbeute bei Zugrundelegung der im Protokoll angegebenen Inkubationszeit von 20 min bei 70°C . Eine deutliche Erhöhung der Inkubationsdauer im Thermomixer auf 24 h (70°C , 500 U/min, Eppendorf 5436) führte zu einer bemerkenswerten Steigerung der DNA-Ausbeute.

Anschließend wurden die DNA-Bindungssäulen in die Sammel-Tubes eingesetzt. Die Versetzung der Suspension mit 500 μl Bindungs-Puffer A und kurzem Schütteln garantierte optimale DNA-Bindungsverhältnisse für die nachfolgende Überführung in die DNA-Bindungssäulen. Nach einer Inkubation von einer Minute schloss sich die Zentrifugation der Suspension (20°C , 4000 U/min, 5 min) mit nachfolgendem Verwerfen des Filtrats an.

Anschließend wurden 2 ml DNA-Waschpuffer D1 zugegeben, zentrifugiert (20°C , 4000 U/min, 5 min) und das Filtrat verworfen. Dies wurde zweimal, jedoch mit jeweils 3 ml DNA-Waschpuffer D2, wiederholt.

Nach Abtrennung des Ethanol durch Zentrifugation (20°C , 4000 U/min, 15 min) erfolgte durch Zugabe von 250 μl vorgewärmten (38°C) Elutions-Puffer D, Inkubation

(5 min) und Zentrifugation (20° C, 4000 U/min, 5 min) die Elution der Patienten-DNA in eine sterile Sammel-Tube.

Das Eluat wurde in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert, als DNA-Stammlösung etikettiert und bei -20° C gelagert.

2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration und des DNA-Reinheitsgrades

Die Bestimmung der DNA-Konzentration ergab sich durch UV/VIS-Spektrometrie (Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 12).

Nach Vorlegen von jeweils 90 µl Aqua bidestillata in Proben- und Standardküvette folgte der Nullabgleich des Photometers. Anschließend wurde der Inhalt der Proben-Küvette mittels Membranpumpe (Laboport, N86 KN.18) sorgfältig abgesaugt und 5 µl der geschüttelten DNA-Stammlösung mit 85 µl Aqua bidestillata verdünnt sowie durchmischt. Nach Messen der Extinktion im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm, wurde die Probenküvette sorgfältig abgesaugt, mit 85 µl Aqua bidestillata gespült und erneut abgesaugt.

Vor Bestimmung der Extinktion der nächsten DNA-Probe erfolgte zunächst eine Leerwertmessung von 85 µl Aqua bidestillata als Kontrolle des Nullabgleichs. Anschließend wurden 5 µl der geschüttelten DNA-Stammlösung hinzugegeben, durchmischt und daraufhin die Extinktion gemessen.

Die Berechnung der DNA-Konzentration ergab sich nach der Formel:

$$\text{Konzentration (ng/}\mu\text{l)} = \text{Extinktion (260 nm)} \times 50 \times 18 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

Der DNA-Reinheitsgrad ließ sich durch folgenden Quotienten abschätzen und sollte im

Intervall [1,6-2,0] liegen:
$$\frac{\text{Extinktion (260 nm)}}{\text{Extinktion (280 nm)}}$$

Der errechnete Mittelwert der DNA-Konzentration für das gesamte Patientenkollektiv entsprach 193 ng/µl, der errechnete Mittelwert der DNA-Reinheit 1,898.

2.5 Erstellung von DNA-Versuchsverdünnungen

Aus den isolierten DNA-Stammlösungen wurden jeweils 300 µl DNA-Versuchsverdünnungen der Konzentration 10 ng/µl hergestellt. Entsprechend nachfolgender Formel wurde für jede DNA-Verdünnung ein bestimmtes Volumen an Aqua bidestillata in ein steriles 2 ml Reaktionsgefäße vorgelegt, ein definiertes Volumen der DNA-Stammlösung zugegeben und anschließend mit dem Schüttler durchmischt.

$$10 \text{ ng}/\mu\text{l} = \frac{3000 \text{ ng}}{300 \mu\text{l}}$$

$$\text{Volumenentnahme aus der Stammlösung } (\mu\text{l}) = \frac{3000 \text{ ng}}{[\text{DNA-Stammlösung } (\text{ng}/\mu\text{l})]}$$

$$\text{Volumenvorlage an Aqua bidestillata } (\mu\text{l}) = 300 \mu\text{l} - \text{Volumenentnahme Stammlösung } (\mu\text{l})$$

2.6 DNA-Amplifikation durch PCR

Die DNA-Amplifikation erfolgte unter Verwendung des Thermocycler Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf. Alle Reagenzien wurden auf Eis pipettiert und vor Gebrauch geschüttelt (Microspin FV-2400). Tabelle 2 stellt die verwendeten Primer- und Heteroduplexinduktor-Sequenzen dar.

	Basensequenz
Primer forward	5' - GCTTCTTAGCGCTAGCCTCAATG - 3'
Primer reverse	5' - TGGGGCTGATTGGAAACCTTATTA - 3'
Heteroduplexinduktor	5' - GTTCTGCTTCTTAGCGCTAGCCTCAATGACGACCT AAGCTGCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTGCA <u>AAAAG</u> ATGCTAAAGGACGTCACATTGCACAATCTTAATAAG GTTTCCAATCAGCCCCACCCGC - 3'

Tabelle 2: Auflistung der Primer- und Heteroduplexinduktor-Sequenzen [85]

Jeder 25 µl PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

1. 15,25 µl Aqua bidestillata,
2. 2,50 µl PCR-Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (10x), MBI Fermentas,
3. 2,00 µl MgCl_2 (25 mM), MBI Fermentas,
4. 2,00 µl dNTP Mix (10 mM), MBI Fermentas,
5. 1,00 µl Primer forward (5 pmol/µl), MWG Biotech,
6. 1,00 µl Primer reverse (5 pmol/µl), MWG Biotech,
7. 0,25 µl Taq DNA Polymerase – native, without BSA (5 U/µl), MBI Fermentas,
8. 1,00 µl Patienten-DNA (10 ng/µl)

oder

- 1,00 µl Heteroduplexinduktor (0,1 pmol/µl), MWG Biotech

Zur Minimierung des Pipettierfehlers wurde zunächst ein PCR-Mastermix, entsprechend der oben genannten Reihenfolge (1. – 7.), in einem sterilen 2 ml Reaktionsgefäß angesetzt, geschüttelt und anschließend im Verhältnis 2 : 1 als Patienten- sowie Heteroduplexinduktor-Mastermix aufgeteilt. Zur Erstellung des 25 µl PCR-Ansatzes in PCR-Tubes (0,2 ml) der Firma Eppendorf waren jeweils 24 µl des Patienten-Mastermixes und 1 µl der geschüttelten Patienten-DNA erforderlich. Weiterhin wurden dem Heteroduplexinduktor-Mastermix Probenzahl/3 µl des geschüttelten Heteroduplexinduktor zugesetzt, sorgfältig geschüttelt und auf PCR-Tubes (0,2 ml) der Firma Eppendorf verteilt. Die spätere Heteroduplexanalyse machte jeweils die Amplifikation der Patienten-DNA und Heteroduplex-DNA erforderlich. Eine parallel mitgeführte Negativkontrolle sollte das Auftreten einer Kontamination ausschließen.

Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur wurde einmalig ein 200 µl DNA-Mastermix auf acht Reaktionsgefäße aufgeteilt und bei einem Temperaturgradienten von $58 \pm 5^\circ \text{C}$ amplifiziert. Die nachfolgende Agarose-Gelelektrophorese erlaubte die Identifizierung der Annealing-Temperatur mit der höchsten Spezifität und Produktausbeute. Weiterhin ergaben umfangreiche Vorversuche, dass eine hohe DNA-Ausbeute nur durch sehr lange Zyklenschritte (je 1 min) zu erreichen war. Eine Erhöhung der DNA- bzw. der Mg^{2+} -Konzentration beeinflusste negativ die Spezifität der PCR.

Folgende Programmierung des Thermocyclers erwies sich als vorteilhaft:

1. 95,0° C für 5 Minuten
 2. 95,0° C für 1 Minute
 3. 60,5° C für 1 Minute
 4. 72,0° C für 1 Minute
- } Wiederholung der
Schritte 2. – 4.:
38-mal
5. 72,0° C für 10 Minuten
 6. 4,0° C für ∞ Minuten

2.7 Bestätigung einer erfolgreichen PCR durch horizontale TAE-Agarose-Gelelektrophorese

Das Auftragen der amplifizierten DNA im Agarosegel diente der Bestätigung einer erfolgreichen und spezifischen PCR.

Hierzu wurden 2 g Agarose in einem Becherglas abgewogen und 100 ml einfach TAE-Puffer hinzugegeben. Der Lösungsvorgang der Agarose erfolgte durch wiederholtes kurzes Aufkochen in der Mikrowelle (900 W, 50 – 60 s, HF 22023). Die folgende Zugabe von 2 µl GelStar Nucleic Acid Gel Stain ermöglichte die spätere Fluoreszenzdarstellung der DNA im Agarosegel. Nach Durchmischung wurde das noch flüssige Gel gleichmäßig und möglichst ohne Blasenbildung in die Gießform der Elektrophoresekammer (Model B3 Buffer Puffer) eingefüllt und 20 – 25 min abgewartet bis die Agarose erhärtet war. Nach Entfernung des Gelkamms und Überschichtung des Gels mit einfach TAE-Puffer folgte die Beladung der ersten und letzten Geltasche mit 3 µl DNA-Längenstandard (peqGOLD Leiter-Mix 100 – 10000 bp). Anschließend wurden jeweils 8 µl der amplifizierten DNA mit 8 µl einfach Loading Buffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die mitgeführte Negativkontrolle diente dem Ausschluss einer eventuellen Kontamination. Nach Anschluss der Elektrophoresekammer an das Spannungsgerät (Electrophoresis Power Supply EPS 301) erfolgte die Gelelektrophorese bei 110 Volt für eine Stunde.

Abschließend wurde die fluoreszenzmarkierte DNA auf einem UV-Transilluminator (TFX-35M) bei einer Wellenlänge von 312 nm dargestellt und das Agarosegel mit einer Polaroidkamera (Direct Screen Instant Camera DS 34) dokumentiert.

2.8 DNA-Aufreinigung

Da für die spätere Auswertung der fluoreszenzgefärbten TBE-Acrylamidgele (s. Kap. 2.10) Bandenmuster mit definiertem Genotyp erforderlich waren, wurden einmalig nach dem Zufallsprinzip 20 Patienten-DNAs (nach erfolgter PCR mit doppeltem Ansatz und Erfolgskontrolle durch eine Agarose-Gelelektrophorese) ausgewählt, aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma MWG Biotech geschickt. Die Aufreinigung der amplifizierten Patienten-DNA verlief unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits (Spin-column format) der Firma Qiagen (in Anlehnung an das beigefügte Protokoll vom Januar 1999). Die Aufreinigung der amplifizierten Patienten-DNA gewährleistete die Abtrennung der freien Nukleotide, Primer, Salze und Taq-Polymerase.

Nach Einsetzen der QIAquick-Bindungssäule in die Sammel-Tube wurden 42 µl PCR-Produkt mit 210 µl Puffer PB vermischt und anschließend in die Bindungssäule pipettiert. Durch die nachfolgende Zentrifugation (20° C, 13000 U/min, 1 min, Centrifuge 5417C) erfolgte die Bindung der DNA an die QIAquick-Bindungssäule. Nach Verwerfen des Filtrats war es erforderlich, die gebundene DNA mit 750 µl Puffer PE zu waschen, zentrifugieren (20° C, 13000 U/min, 60 s) und anschließend das Filtrat erneut zu verwerfen. Abschließend wurde das Ethanol durch Zentrifugation (20° C, 14000 U/min, 2 min) abgetrennt und die DNA durch Zugabe von 50 µl Puffer EB, 1 min Inkubation und Zentrifugation (20° C, 14000 U/min, 1 min) in ein steriles Sammel-Tube eluiert.

Die DNA-Sequenzierung durch die Firma MWG Biotech bewies die Existenz aller drei Genotypen GG, GC, CC innerhalb der zufällig ausgewählten Patientenproben.

2.9 Genotypisierung durch Heteroduplexanalyse

Bei der Heteroduplexreaktion handelt es sich um eine molekularbiologische Methode zur Sequenzanalyse polymorpher Gene [86]. Das Prinzip der Heteroduplexanalyse basiert auf der Synthese doppelsträngiger DNAs mit kurzen, nicht-komplementären DNA-Abschnitten [87]. Aufgrund der unterschiedlichen Basensequenz der Mismatched-Region weisen die doppelsträngigen DNAs verschiedene sterische Konformationen auf [87] und unterscheiden sich folglich in ihrem Laufverhalten im Acrylamidgel [88]. Die entstehenden mutationsspezifischen Bandenmuster ermöglichen die Genotypisierung [85]. Niedrige Kosten, überschaubarer methodischer Aufwand, hohe Sensitivität und Spezifität zeichnen die Heteroduplexanalyse zusätzlich aus [86;89]. Der primäre Versuch

einer Genotypisierung durch Verwendung von „Molecular Beacons“ in einer qualitativen Realtime-PCR war aufgrund der unzureichenden Genotypendiskrimination in der ersten experimentellen Phase nicht erfolgreich.

Nach einer Reihe von Vorversuchen zur Ermittlung spezifischer und scharf begrenzter Banden stellte sich ein optimales Mischungsverhältnis von 1 : 2 für den amplifizierten Heteroduplexinduktor und die amplifizierte Patienten-DNA heraus. Folglich wurden 8 µl des Heteroduplexinduktors und 16 µl der Patienten-DNA in ein PCR-Tube (0,2 ml) der Firma Eppendorf pipettiert und vermischt.

Für die Herstellung der Heteroduplex-DNA im T1 Thermocycler der Firma Biometra erfolgte anschließend die Denaturierung der doppelsträngigen DNA in einzelsträngige DNA durch Erhitzen (5,0° C/s) auf 95,0° C für eine Dauer von 5 min. Durch langsame Abkühlung (0,04° C/s) auf 20° C wurde die Wiederanlagerung der Einzelstränge zu Hetero- und Homoduplices begünstigt. Abschließend war es erforderlich, die Temperatur von 20° C für 15 min beizubehalten und dann die Hetero-/Homoduplices auf 4° C abzukühlen (5,0° C/s).

2.10 Auftrennung der Hetero- und Homoduplices durch vertikale TBE Acrylamid-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die Heteroduplex-Reaktion erfolgte die Auftrennung der Hetero-/Homoduplices durch eine Acrylamid-Gelelektrophorese. Durch zahlreiche Vorversuche konnte eine eindeutige Bandendifferenzierung unter Verwendung eines 15 % Acrylamidgels ermittelt werden.

Für die Erstellung des 15 % Acrylamidgels waren 10,3 ml Aqua bidestillata, 5,0 ml fünffach TBE-Puffer, 9,5 ml Acrylamid (40 %), 180 µl Ammoniumpersulfat (10 %) und 30 µl TEMED (10 %) erforderlich, die als Gesamtlösung in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen (Firma Becton Dickinson) 30 s lang geschüttelt wurden. Ein gleichmäßiges Eingießen des Gels zwischen die Glasplatten der Elektrophoresekammer (MGV-102-33) konnte unter Verwendung des Pipettierhelfers (accujet) erreicht werden. Beim vollständigen Einsetzen des Gelkammes war vor allem darauf zu achten, eine Entstehung von Luftblasen zu vermeiden. Die vollständige Polymerisation des Acrylamidgels war nach 25 – 30 min erzielt.

Nach Entfernung der Gummidichtung wurden die Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingespannt, Gelreste mit dem Skalpell entfernt, der Gelkamm langsam herausgezogen sowie die obere und untere Kammer mit einfach TBE-Puffer gefüllt. Nach gründlicher Spülung der Geltaschen (2 – 3 mal) schloss sich die Beladung der ersten und letzten Geltasche mit 3 µl DNA-Längenstandard (peqGOLD Leiter-Mix 100 – 10000 bp) an. Die aus der Heteroduplex-Reaktion hervorgehenden 24 µl Hetero-/Homoduplex-DNA wurden mit 7 µl einfach Loading Buffer gemischt und hiervon 10 µl in die Geltaschen pipettiert. Weiterhin war es notwendig, als Positivkontrolle die Hetero-/Homoduplex-DNA dreier Patientenproben mit dem definierten Genotyp GG, GC und CC mitzuführen. Nach Anschluss des Elektrophoresegerätes an das Spannungsgerät (Electrophoresis Power Supply EPS 301) erfolgte die Gelelektrophorese bei 200 Volt für zwei Stunden.

2.11 Fluoreszenzfärbung des Acrylamidgels

Zunächst wurden 200 ml einfach TBE in eine Instrumentenschale gegeben, 10 µl GelStar Nucleic Acid Gel Stain zur Fluoreszenzmarkierung der DNA hinzugefügt und auf einem Kreisschüttler (450 U/min, Allégro Rotator) durchmischt. Anschließend erfolgte die Trennung der beiden Glasplatten mit Hilfe eines Spatels. Nach vorsichtigem Ablösen des Gels von der Glasplatte wurde es 30 min zur Fluoreszenzfärbung in die Farbstoff-Puffer-Lösung eingelegt und bei 450 U/min kreisgeschüttelt. Die Auswertung der fluoreszierenden Bandenmuster ermöglichte ein UV-Transilluminator (TFX-35M) bei einer Wellenlänge von 312 nm. Mit Hilfe der Bandenmuster der Positivkontrollen konnten die noch unbekanntem Genotypen indentifiziert werden (s. Abb. 2). Die Dokumentation der Acrylamidgele erfolgte mit einer Polaroidkamera (Direct Screen Instant Camera DS 34).

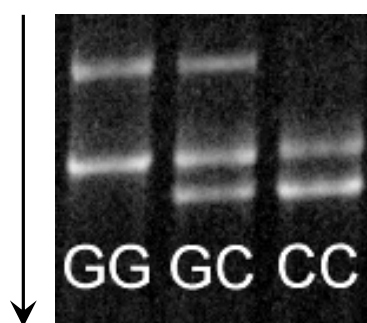


Abb. 2: Zuordnung der Bandenmuster zu ihrem jeweiligen Genotyp. Der Pfeil gibt die Laufrichtung des Acrylamidgels an.

2.12 Statistik

Zur statistischen Datenauswertung und -darstellung dienten die Programme „SPSS 11.5.1 für Windows“ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), „Sigma Plot for Windows 2001 Version 7.0“ (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und „Microsoft Excel 2002“ (Microsoft Cor., Redmond, WA, USA).

Vor Beginn der statistischen Analyse wurden zunächst stetig numerische Variablen unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung geprüft. Die Aufnahme der „Mittelwerte \pm Standardabweichung“ in tabellarische Darstellungen diente der Erhöhung der Anschaulichkeit, wenngleich in späteren Tests auf Normal- und Nicht-Normalverteilung der Variablen geachtet wurde. Die Berechnung der Korrelationskoeffizienten erfolgte bei normalverteilten Parametern nach Pearson, bei nicht-normalverteilten Werten nach Spearman-Rank. Für Mittelwertsvergleiche zweier nicht-normalverteilter unabhängiger Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test, bei vorliegender Normalverteilung der Student's t-Test für unabhängige Variablen verwendet. Eine eventuelle Abweichung der Genotypen- und Allelfrequenz des Interleukin-6 Polymorphismus vom Hardy-Weinberg-Gesetz wurde durch Anwendung eines für diese Fragestellung angepassten Chi-Quadrat-Tests ausgeschlossen. Die Untersuchung einer signifikanten Häufung eines Genotyps bei KHK und pAVK-Patienten ermöglichte der Chi-Quadrat-Test. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen.

Die Untersuchung des Interleukin-6 -174 G \rightarrow C Polymorphismus hinsichtlich seines vorstellbaren Einflusses auf die Akutphase-Reaktion erfolgte sowohl unter der hypothetischen Annahme eines kodominanten Effekts des G- und C-Allels (Genotypen GG, CC und GC), als auch eines dominanten Effekts des G- bzw. C-Allels (Kodierung der Genotypen GG, GC als G $+$ und CC als G $-$, entsprechend CC, GC als C $+$ und GG als C $-$).

3. Ergebnisse

In Tabelle 3 sind die klinischen und biochemischen Basisdaten der noch nicht dialysepflichtigen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz sowie der nierengesunden Kontrollprobanden dargestellt.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 137 Männern und 87 Frauen mit einem mittleren Alter von $57,2 \pm 17,1$ Jahren und einem Body Mass Index (BMI) von $26,7 \pm 4,6$ zusammen. Bei 82,6 % der Patienten konnte klinisch eine arterielle Hypertonie und anamnestisch in 44,0 % ein positiver Raucherstatus, in 35,3 % ein Diabetes mellitus, in 20,1 % eine koronare Herzkrankheit (KHK), in 11,6 % eine periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) sowie in 8,0 % der Fälle ein früherer zerebraler Insult festgestellt werden.

Das Patienten- und Kontrollkollektiv zeigte signifikante Unterschiede hinsichtlich des Alters, BMIs, Kreatinins, Harnstoffs, C-reaktiven Proteins, Fibrinogens und Albumins. Die Abbildungen 3 – 5 stellen für beide Kollektive die Korrelationen der Akutphaseproteine vergleichend dar.

Basisdaten	Patientenkollektiv (n = 224)		Kontrollkollektiv (n = 301)	
Alter bei Studieneintritt [Jahre]	$57,2 \pm 17,1^{***}$	[14,0 – 86,0]	$42,0 \pm 10,9$	[20,0 – 67,0]
Geschlecht [Männer/Frauen]	137/87		168/133	
Körpergröße [m]	$1,71 \pm 0,09^{**}$	[1,50 – 1,95]	$1,73 \pm 0,09$	[1,50 – 2,01]
Körpermasse [kg]	$77,7 \pm 15,4$	[41,0 – 126,0]	$76,9 \pm 13,0$	[50,0 – 120,0]
BMI [kg/m^2]	$26,7 \pm 4,6^{**}$	[16,3 – 42,8]	$25,6 \pm 3,4$	[19,3 – 42,0]
Arterielle Hypertonie	185 (82,6)		/	
Raucher	74 (44,0) ⁺		54 (17,9)	
Diabetes mellitus	79 (35,3)		/	
KHK	45 (20,1)		/	
zerebraler Insult	18 (8,0)		/	
pAVK	26 (11,6)		/	
Systolischer Blutdruck [mmHg]	$142,1 \pm 21,3^{***}$	[85,0 – 220,0]	$130,9 \pm 15,3$	[100,0 – 175,0]
Diastolischer Blutdruck [mmHg]	$83,3 \pm 11,5^{***}$	[55,0 – 120,0]	$78,4 \pm 6,9$	[60,0 – 100,0]
Kreatinin im Serum [mg/dl]	$2,0 \pm 1,2^{***}$	[0,5 – 8,3]	$1,0 \pm 0,2$	[0,7 – 1,6]
Harnstoff im Serum [mg/dl]	$77,0 \pm 46,0^{***}$	[16,0 – 240,0]	$33,3 \pm 8,9$	[14,1 – 62,1]
Kreatinin-clearance [ml/min]	$58,3 \pm 38,1$	[4,0 – 190,0]	n. u.	

Fortsetzung auf der folgenden Seite

Basisdaten	Patientenkollektiv (n = 224)		Kontrollkollektiv (n = 301)	
Cholesterin [mg/dl]	218,0 ± 51,7 ^{***}	[89,0 – 419,0]	186,2 ± 31,2	[118,0 – 303,0]
LDL-Cholesterin [mg/dl]	134,4 ± 44,7 ^{***}	[25,0 – 290,0]	99,3 ± 27,5	[34,0 – 190,0]
HDL-Cholesterin [mg/dl]	43,7 ± 16,0 ^{***}	[21,0 – 139,0]	56,6 ± 13,7	[26,0 – 106,0]
Triglyceride [mg/dl]	194,3 ± 127,1 ^{***}	[40,0 – 899,0]	160,4 ± 113,4	[34,0 – 845,0]
Apolipoprotein A1 [mg/dl]	144,5 ± 33,5 ^{***}	[16,0 – 254,0]	163,5 ± 25,2	[108,0 – 291,0]
Apolipoprotein A2 [mg/dl]	26,3 ± 11,7 ^{***}	[1,2 – 61,3]	36,0 ± 15,7	[4,8 – 208,0]
Apolipoprotein B [mg/dl]	100,3 ± 29,0	[18,0 – 193,0]	98,6 ± 22,6	[48,0 – 185,0]
Lipoprotein (a) [mg/dl]	45,1 ± 47,1 ^{***}	[4,9 – 287,6]	21,9 ± 32,5	[0,5 – 195,0]
Genotypenverteilung GG/GC/CC [%]	33,5/50,9/15,6		n. u.	
C-reaktives Protein [mg/dl]	0,8 ± 1,8 ^{***}	[0,1 – 17,6]	0,2 ± 0,4	[0,0 – 6,2]
Fibrinogen [g/l]	3,9 ± 1,6 ^{***}	[0,8 – 9,5]	2,7 ± 0,6	[1,0 – 5,5]
Homocystein [µmol/l]	16,1 ± 6,3	[5,5 – 37,9]	n. u.	
Ferritin [µg/l]	197,5 ± 289,0	[11,0 – 2809,0]	n. u.	
Transferrin [mg/dl]	223,9 ± 49,3	[0 – 363,0]	n. u.	
Albumin [g/dl]	3,9 ± 0,6 ^{***}	[0,6 – 4,9]	4,7 ± 0,3	[3,8 – 5,7]

Tabelle 3: Klinische Basisdaten des Patienten- und Kontrollkollektivs. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung oder Absolutwerte (Prozentwerte) angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kollektiven sind durch Sterne markiert * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. + Raucheranamnese bezogen auf 168 Patienten; bei 56 Patienten konnte eine Raucheranamnese nicht erhoben werden. Abkürzungen: n. u., nicht untersucht; /, im Referenzbereich liegend. Weitere Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

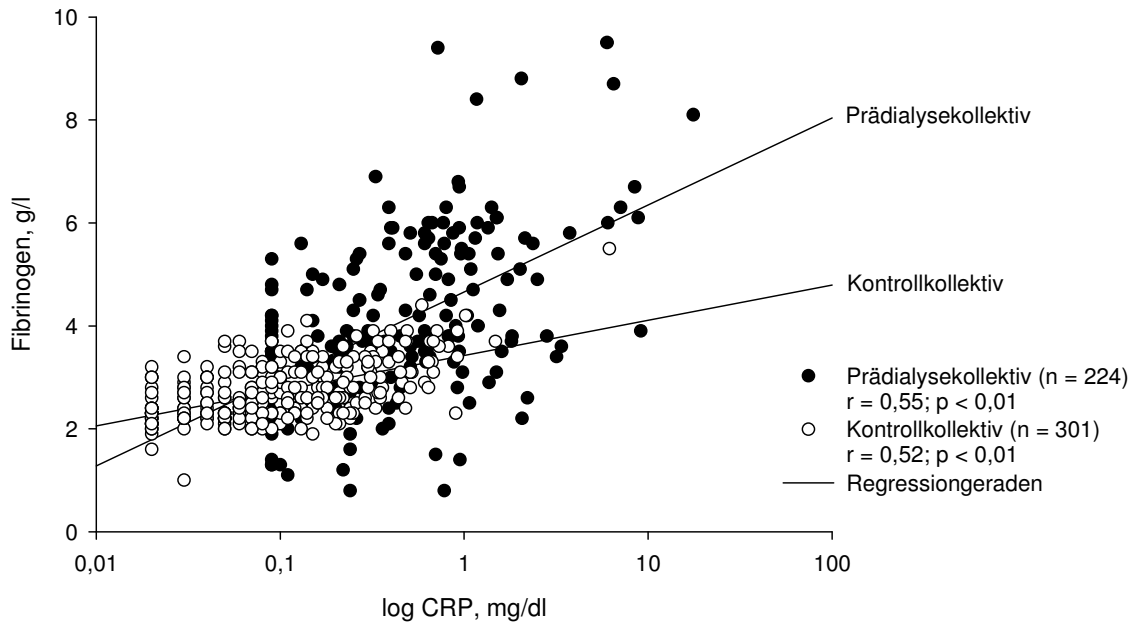


Abb. 3: Korrelation zwischen CRP und Fibrinogen

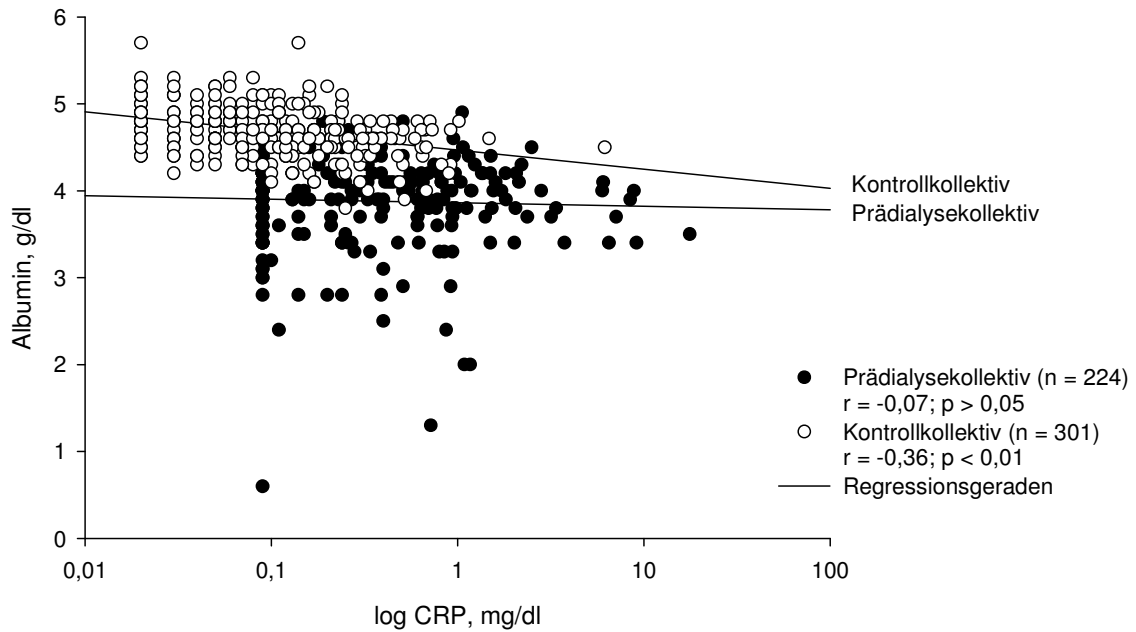


Abb. 4: Korrelation zwischen CRP und Albumin

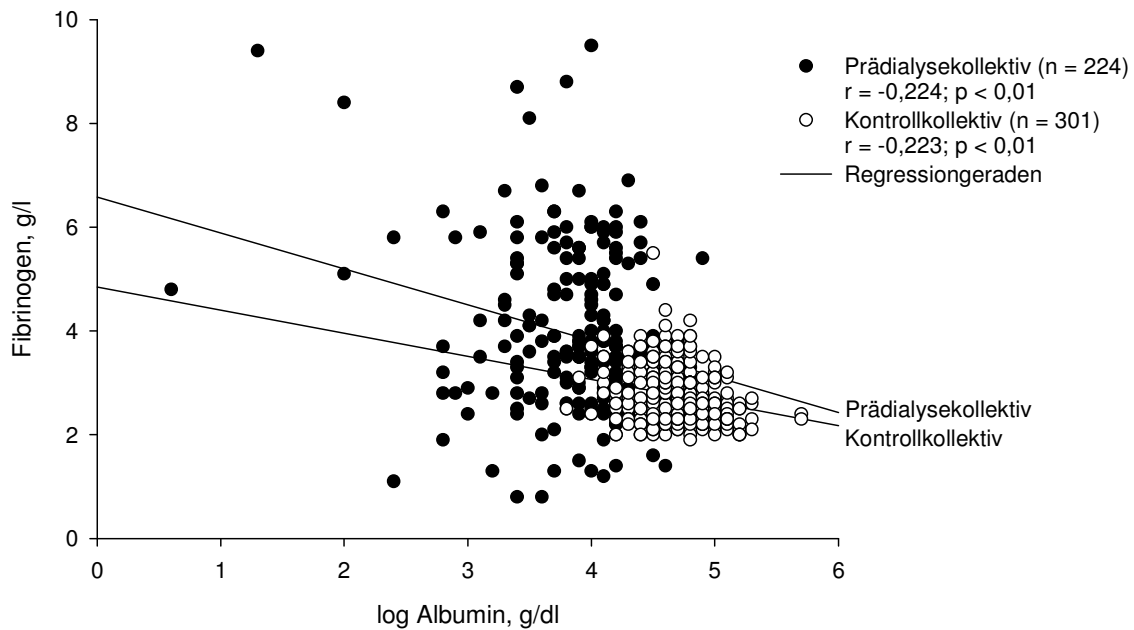


Abb. 5: Korrelation zwischen Albumin und Fibrinogen

In Tabelle 4 sind für das Patientenkollektiv unter besonderer Berücksichtigung der Akutphaseproteine die Korrelationskoeffizienten nach Spearman-Rank und Pearson aufgeführt.

Signifikant positive Korrelationen konnten zwischen Kreatinin und nachfolgenden Parametern nachgewiesen werden: CRP ($r = 0,34$; $p < 0,01$), Fibrinogen ($r = 0,38$; $p < 0,01$) und Homocystein ($r = 0,60$; $p < 0,01$). Eine signifikant negative Korrelation ergab sich zwischen Kreatinin und Albumin ($r = -0,17$; $p < 0,01$).

Signifikant korreliert zeigte sich auch die Kreatinin-clearance mit CRP ($r = -0,36$; $p < 0,01$), Fibrinogen ($r = -0,42$; $p < 0,01$), Homocystein ($r = -0,56$; $p < 0,01$). Keine signifikante Assoziation wurde mit Albumin ($r = 0,12$; $p > 0,05$) gefunden.

CRP korrelierte signifikant mit Fibrinogen ($r = 0,55$; $p < 0,01$), Homocystein ($r = 0,22$; $p < 0,01$), BMI ($r = 0,14$; $p < 0,05$), jedoch nicht mit Albumin ($r = -0,07$; $p > 0,05$). Weiterhin ließen sich zwischen Fibrinogen und den nachfolgenden Parametern signifikante Korrelationen beobachten: Homocystein ($r = 0,14$; $p < 0,05$) und Albumin ($r = -0,22$; $p < 0,01$). Signifikante Korrelationen konnten des weiteren zwischen dem Alter und Kreatinin ($r = 0,30$; $p < 0,01$) sowie der Kreatinin-clearance ($r = -0,53$; $p < 0,01$), CRP ($r = 0,35$; $p < 0,01$), Fibrinogen ($r = 0,31$; $p < 0,01$) und Homocystein ($r = 0,33$; $p < 0,01$) festgestellt werden.

Variablen	Alter	BMI	RR Sys.	RR Dia.	Kreatinin	Harnstoff	Krea-Clearance	CRP	Fibrinogen	Homocystein	Ferritin	Transferrin	Albumin	Lp(a)
Alter	1,00													
BMI	0,04	1,00												
RR Sys.	0,27**	0,18**	1,00											
RR Dia.	-0,31**	0,07	0,44**	1,00										
Kreatinin	0,30**	0,03	0,25**	-0,05	1,00									
Harnstoff	0,49**	0,08	0,23**	-0,22**	0,83**	1,00								
Krea-Clearance	-0,53**	0,07	-0,23**	0,20**	-0,80**	-0,79**	1,00							
CRP	0,35**	0,14*	0,12	-0,13	0,34**	0,34**	-0,36**	1,00						
Fibrinogen	0,31**	-0,10	0,07	-0,17*	0,38**	0,39**	-0,42**	0,55**	1,00					
Homocystein	0,33**	[0,11]	0,17*	-0,09	0,60**	0,58**	-0,56**	0,22**	0,14*	1,00				
Ferritin	0,20**	0,22**	0,18**	0,00	0,25**	0,28**	-0,14*	0,11	0,17*	0,19**	1,00			
Transferrin	0,00	[0,14*]	0,00	0,05	-0,29**	-0,21**	0,16*	0,00	-0,17**	[-0,07]	-0,37**	1,00		
Albumin	-0,02	0,09	-0,01	0,10	-0,17**	-0,16*	0,12	-0,07	-0,22**	-0,08	-0,09	0,58**	1,00	
Lp(a)	0,00	-0,10	-0,05	-0,04	0,18**	0,18**	-0,17*	0,19**	0,14*	0,10	-0,03	0,00	0,00	1,00

Tabelle 4: Korrelationen nach Spearman und [Pearson] im Patientenkollektiv (n = 224)

Statistisch signifikante Korrelationen sind durch Sterne markiert * p < 0,05, ** p < 0,01; die Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

Tabelle 5 stellt zusammenfassend die Genotypen- und Allelverteilung des Interleukin-6 –174 G→C Polymorphismus im Patientenkollektiv dar. Die bestimmten Genotypfrequenzen unterscheiden sich nicht signifikant vom Hardy-Weinberg-Gesetz ($p = 0,44$). Die ermittelten Allelfrequenzen ließen sich in früheren Studien an gesunden Probanden bestätigen [85;90].

Patientenkollektiv (n = 224)	
IL-6 Genotypen	
kodominantes Modell:	
GG	75 (33,5)
GC	114 (50,9)
CC	35 (15,6)
dominant-rezessives Modell:	
G+ (GG und GC)	189 (84,4)
G– (CC)	35 (15,6)
C+ (CC und GC)	149 (66,5)
C– (GG)	75 (33,5)
IL-6 Allelverteilung	
G	264 (58,9)
C	184 (41,1)
G/C Ratio	1,4

Tabelle 5: Interleukin-6 Genotypen- und Allelverteilung im Patientenkollektiv (n = 224). Die Daten sind als Absolutwerte (Prozentwerte) angegeben.

Die Untersuchung des Interleukin-6 Polymorphismus unter der Annahme eines *kodominanten Effektes* der Allele Guanin und Cytosin ergab im Patientenkollektiv keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Serum-/Plasmaspiegel der Akutphaseproteine CRP, Fibrinogen, Homocystein, Ferritin, Transferrin und Albumin sowie der Nierenparameter Kreatininclearance, Kreatinin und Harnstoff (s. Tabelle 6). Abb. 6 – 9 stellen die Serum-/Plasmaspiegel ausgewählter Akutphaseproteine und Nierenparameter in Abhängigkeit vom Interleukin-6 Polymorphismus unter der Annahme eines *kodominanten Effektes* dar.

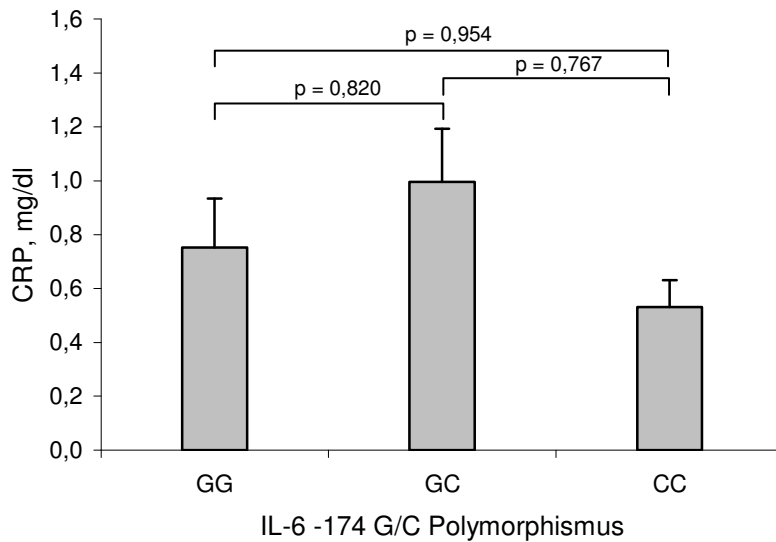


Abb. 6:

Assoziation IL-6 Genotyp GG, GC, CC und CRP-Plasmaspiegel im Patientenkollektiv (kodominantes Modell, Mittelwert \pm Standardfehler).

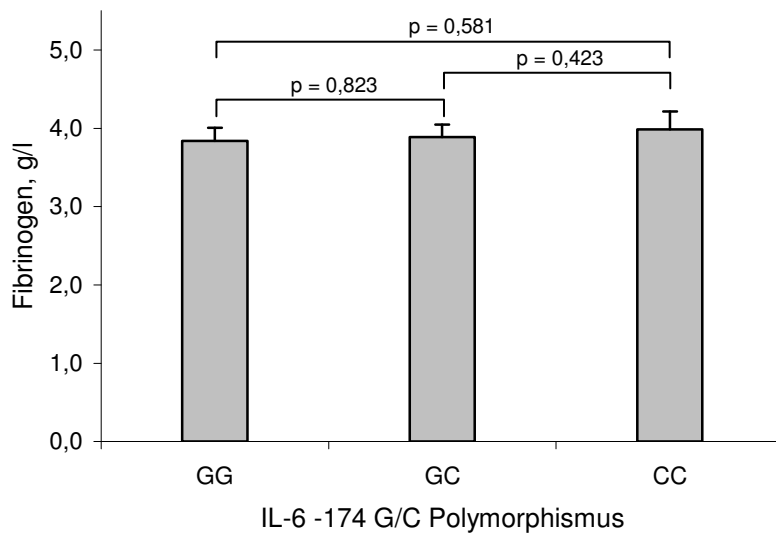


Abb. 7:

Assoziation IL-6 Genotyp GG, GC, CC und Fibrinogen-Plasmaspiegel im Patientenkollektiv (kodominantes Modell, Mittelwert \pm Standardfehler).

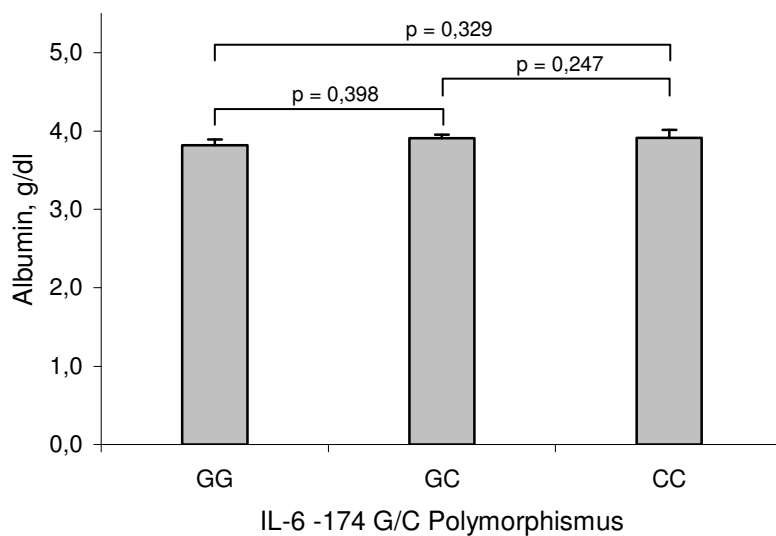


Abb. 8:

Assoziation IL-6 Genotyp GG, GC, CC und Albumin-Plasmaspiegel im Patientenkollektiv (kodominantes Modell, Mittelwert \pm Standardfehler).

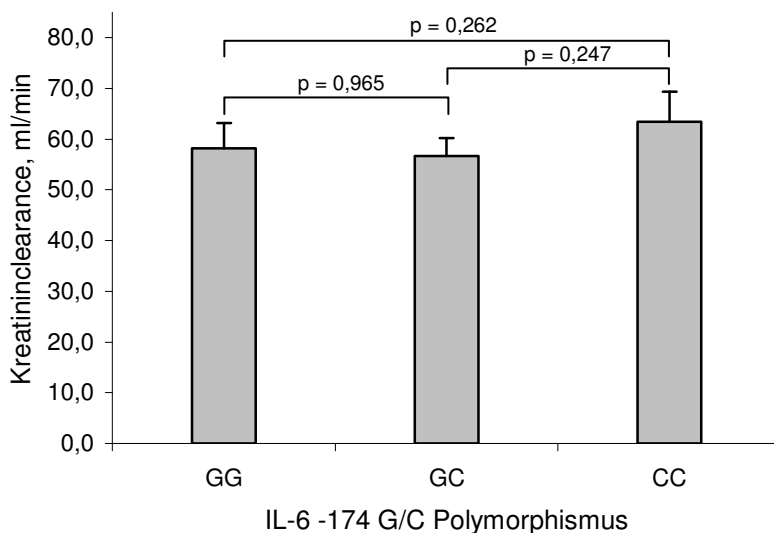


Abb. 9: Assoziation IL-6 Genotyp GG, GC, CC und Kreatinin-clearance im Patientenkollektiv (kodominantes Modell, Mittelwert ± Standardfehler).

	GG	GC	CC
C-reaktives Protein [mg/dl]	0,75 ± 1,57	1,00 ± 2,11	0,53 ± 0,59
Fibrinogen [g/l]	3,84 ± 1,44	3,89 ± 1,71	3,99 ± 1,35
Homocystein [µmol/l]	15,96 ± 5,65	16,68 ± 7,06	14,67 ± 4,90
Ferritin [µg/l]	265,77 ± 448,94	161,51 ± 146,84	168,20 ± 148,08
Transferrin [mg/dl]	219,79 ± 49,70	226,89 ± 50,69	223,00 ± 44,33
Albumin [g/dl]	3,82 ± 0,62	3,91 ± 0,52	3,91 ± 0,60
Lipoprotein (a) [mg/dl]	42,36 ± 50,07	48,76 ± 48,21	39,05 ± 35,66
Kreatinin im Serum [mg/dl]	2,08 ± 1,34	2,02 ± 1,18	1,89 ± 0,92
Harnstoff im Serum [mg/dl]	76,90 ± 45,38	79,78 ± 48,64	68,61 ± 38,13
Kreatinin-clearance [ml/min]	58,23 ± 41,69	56,72 ± 36,92	63,46 ± 34,41

Tabelle 6: Baselinespiegel der Akutphaseproteine und Nierenparameter in Bezug auf den Genotyp GG, GC, CC. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben; Unterschiede zwischen den Genotypen $p > 0,05$.

Die Untersuchung des Interleukin-6 Polymorphismus unter der Annahme eines *dominant-rezessiven Effektes* der Allele Guanin und Cytosin ergab im Patientenkollektiv keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Serum-/Plasmaspiegel der Akutphaseproteine CRP, Fibrinogen, Homocystein, Ferritin, Transferrin und Albumin sowie der Nierenparameter Kreatinin-clearance, Kreatinin und Harnstoff (s. Tabelle 7).

Abb. 10 – 17 stellen die Serum-/Plasmaspiegel ausgewählter Akutphaseproteine und Nierenparameter in Abhängigkeit vom Interleukin-6 Polymorphismus unter der Annahme eines *dominant-rezessiven Effektes* dar.

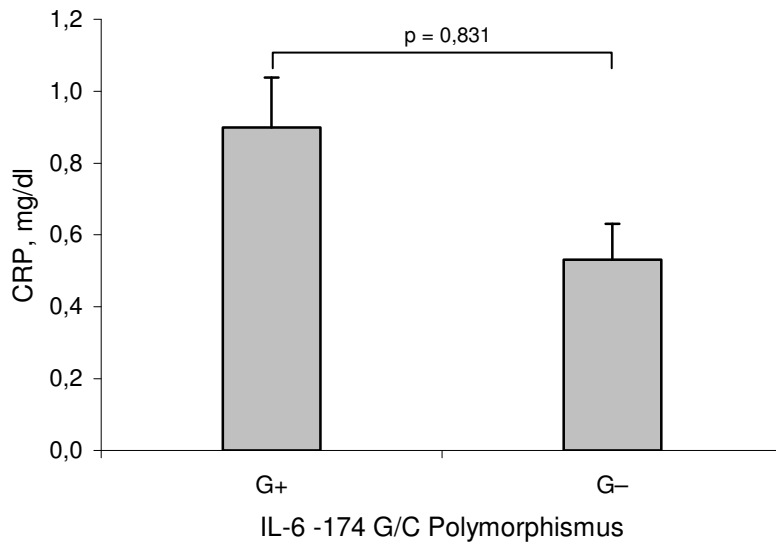


Abb. 10:

Assoziation IL-6 Genotyp G+, G- und CRP-Plasmaspiegel im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell, Mittelwert \pm Standardfehler).

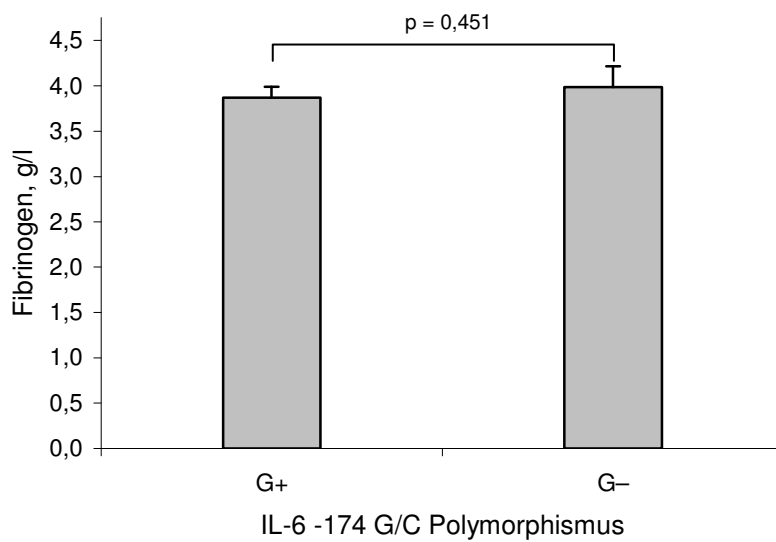


Abb. 11:

Assoziation IL-6 Genotyp G+, G- und Fibrinogen-Plasmaspiegel im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell, Mittelwert \pm Standardfehler).

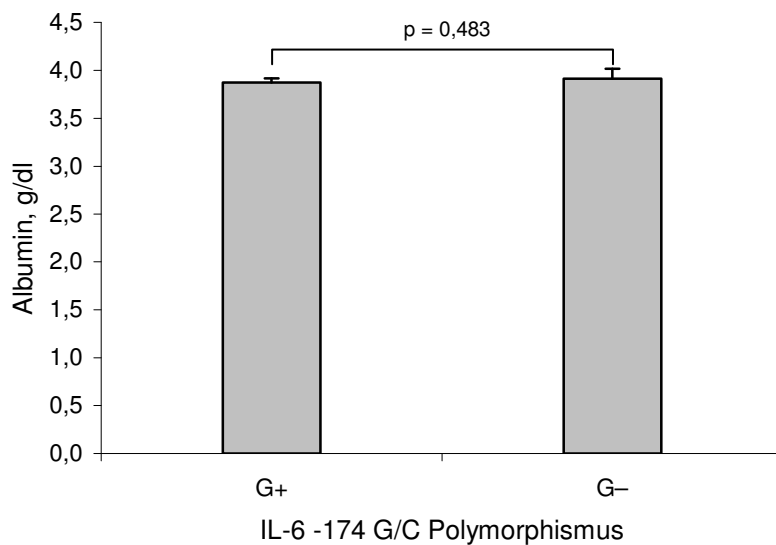


Abb. 12:

Assoziation IL-6 Genotyp G+, G- und Albumin-Plasmaspiegel im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell, Mittelwert \pm Standardfehler).

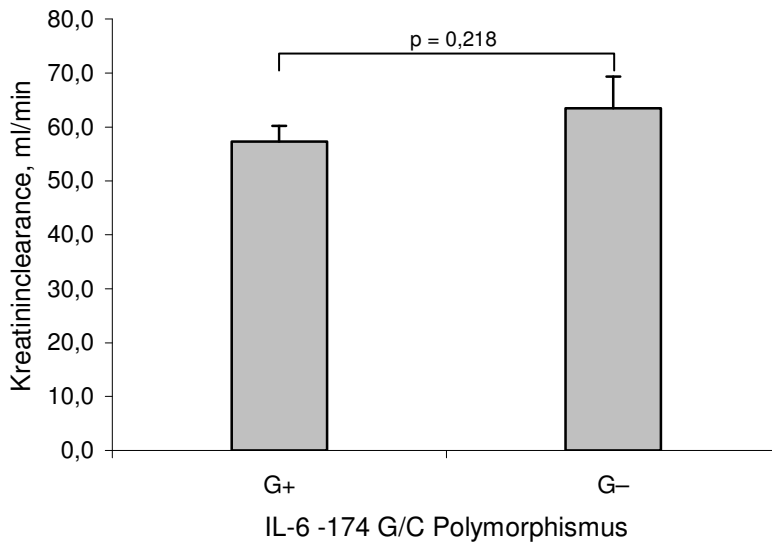


Abb. 13:

Assoziation IL-6 Genotyp G+, G- und Kreatininclearance im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell, Mittelwert ± Standardfehler).

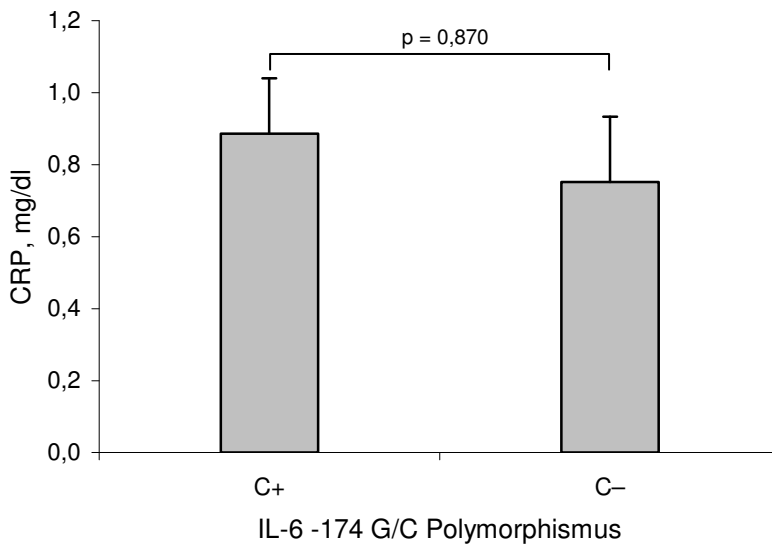


Abb. 14:

Assoziation IL-6 Genotyp C+, C- und CRP-Plasmaspiegel im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell, Mittelwert ± Standardfehler).

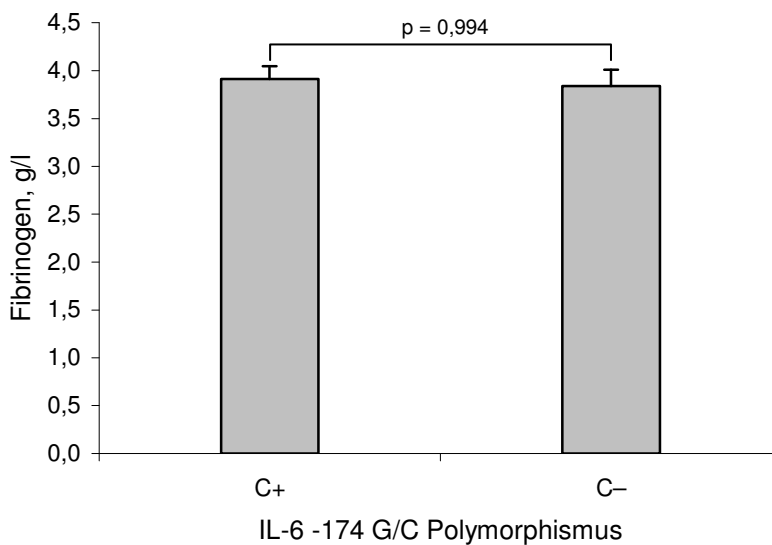


Abb. 15:

Assoziation IL-6 Genotyp C+, C- und Fibrinogen-Plasmaspiegel im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell, Mittelwert ± Standardfehler).

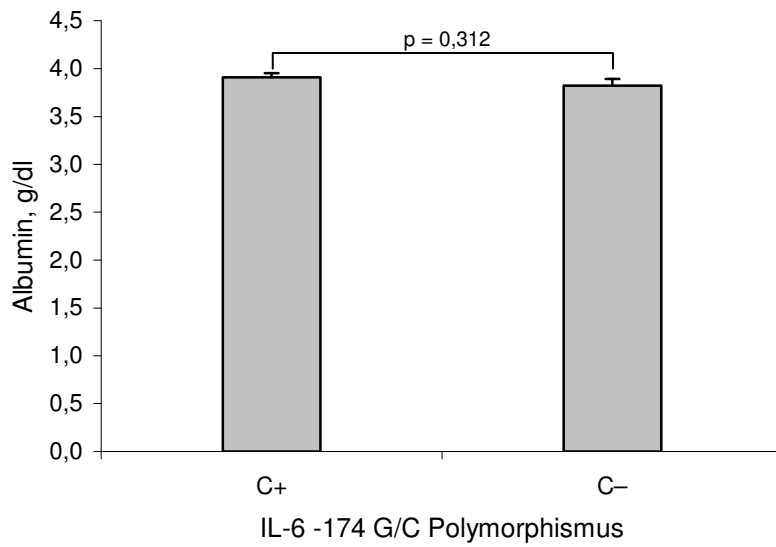


Abb. 16:

Assoziation IL-6 Genotyp C+, C- und Albumin-Plasmaspiegel im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell, Mittelwert \pm Standardfehler).

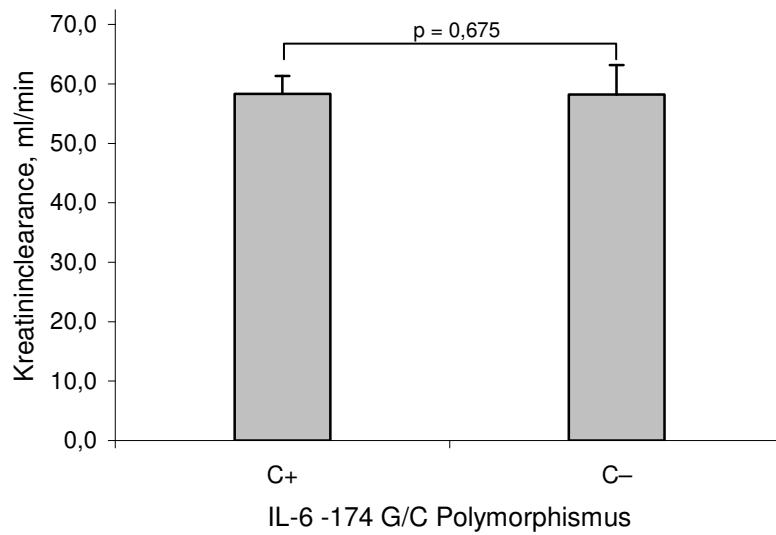


Abb. 17:

Assoziation IL-6 Genotyp C+, C- und Kreatininclearance im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell, Mittelwert \pm Standardfehler).

	G+	G-	C+	C-
C-reaktives Protein [mg/dl]	0,90 ± 1,91	0,53 ± 0,59	0,89 ± 1,88	0,75 ± 1,57
Fibrinogen [g/l]	3,87 ± 1,61	3,99 ± 1,35	3,91 ± 1,63	3,84 ± 1,44
Homocystein [µmol/l]	16,40 ± 6,54	14,67 ± 4,90	16,21 ± 6,66	15,96 ± 5,65
Ferritin [µg/l]	202,88 ± 308,07	168,20 ± 148,08	163,08 ± 146,66	265,77 ± 448,94
Transferrin [mg/dl]	224,07 ± 50,29	223,00 ± 44,33	225,98 ± 49,15	219,79 ± 49,70
Albumin [g/dl]	3,87 ± 0,56	3,91 ± 0,60	3,91 ± 0,54	3,82 ± 0,62
Lipoprotein (a) [mg/dl]	46,25 ± 48,92	39,05 ± 35,66	46,51 ± 45,69	42,36 ± 50,07
Kreatinin im Serum [mg/dl]	2,04 ± 1,24	1,89 ± 0,92	1,99 ± 1,12	2,08 ± 1,34
Harnstoff im Serum [mg/dl]	78,62 ± 47,25	68,61 ± 38,13	77,11 ± 46,46	76,90 ± 45,38
Kreatininclearance [ml/min]	57,31 ± 38,75	63,46 ± 34,41	58,33 ± 36,34	58,23 ± 41,69

Tabelle 7: Baselinespiegel der Akutphaseproteine und Nierenparameter in Bezug auf den Genotyp G+, G-; C+, C-. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben; Unterschiede zwischen den Genotypen $p > 0,05$.

Im Patientenkollektiv konnte keine signifikante Assoziation zwischen IL-6 Polymorphismus und einer bestehenden koronaren Herzkrankheit (KHK) bzw. peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) nachgewiesen werden. So zeigten weder KHK-, noch pAVK-Patienten im Chi-Quadrat-Test (unter Berücksichtigung eines *kodominanten bzw. dominant-rezessiven Modells*) eine signifikante Häufung eines Genotyps ($p > 0,05$). Abbildungen 18 – 23 beschreiben die Genotypenverteilungen in Abhängigkeit von der KHK- und pAVK-Anamnese.

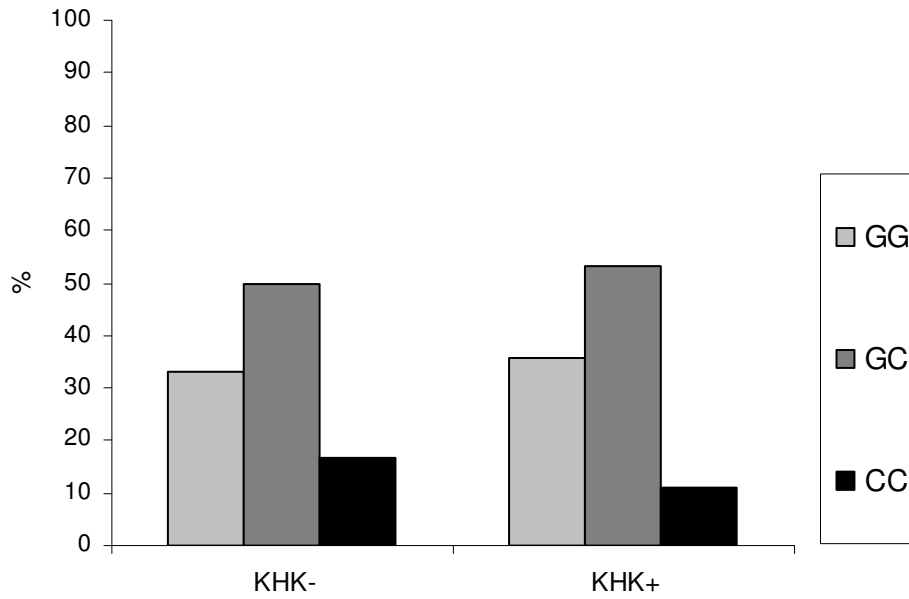


Abb. 18: Assoziation IL-6 Genotyp GG, GC, CC und KHK-Anamnese im Patientenkollektiv (kodominantes Modell). Unterschiede zwischen den Genotypen $p = 0,639$. Die Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

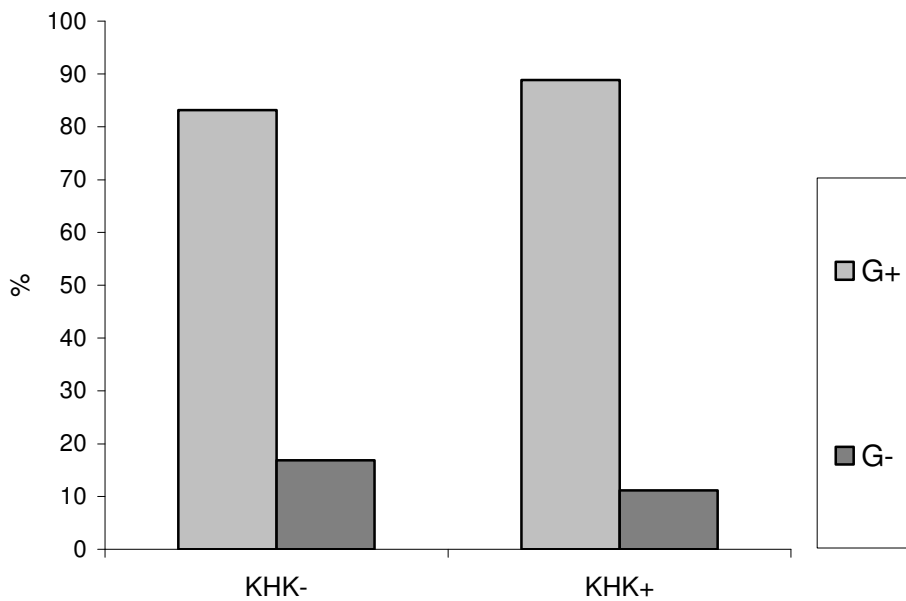


Abb. 19: Assoziation IL-6 Genotyp G+, G- und KHK-Anamnese im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell). Unterschiede zwischen den Genotypen $p = 0,344$. Die Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

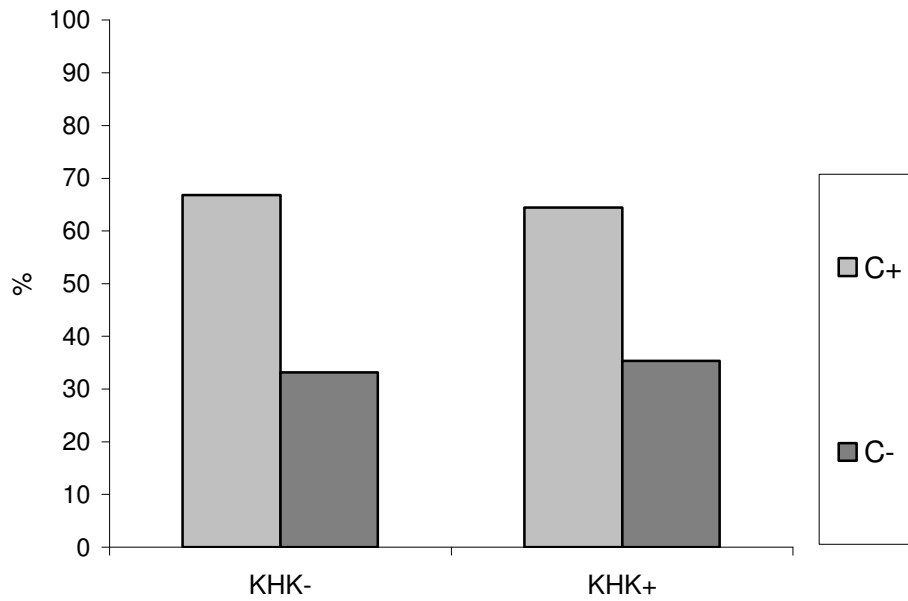


Abb. 20: Assoziation IL-6 Genotyp C+, C- und KHK-Anamnese im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell). Unterschiede zwischen den Genotypen $p = 0,760$. Die Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

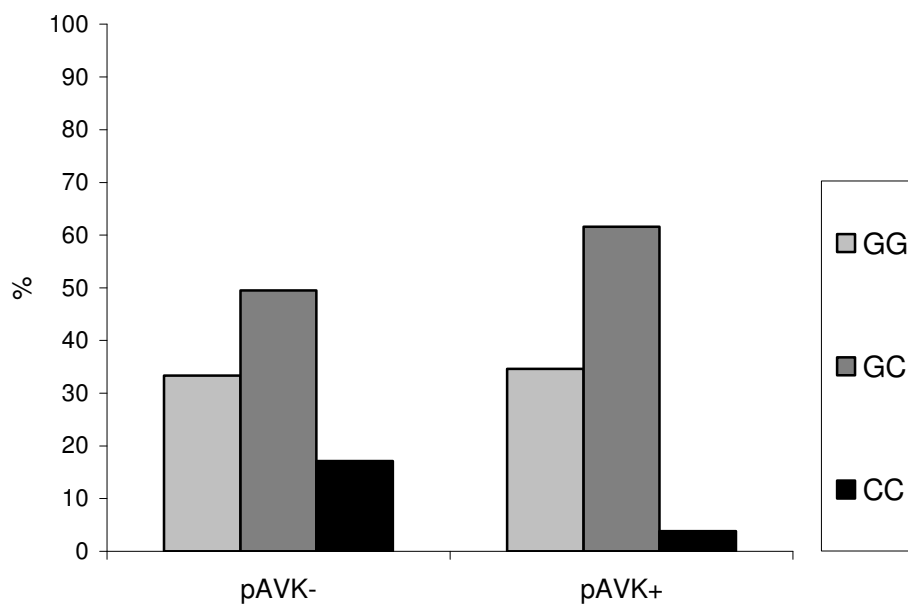


Abb. 21: Assoziation IL-6 Genotyp GG, GC, CC und pAVK-Anamnese im Patientenkollektiv (kodominantes Modell). Unterschiede zwischen den Genotypen $p = 0,194$. Die Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

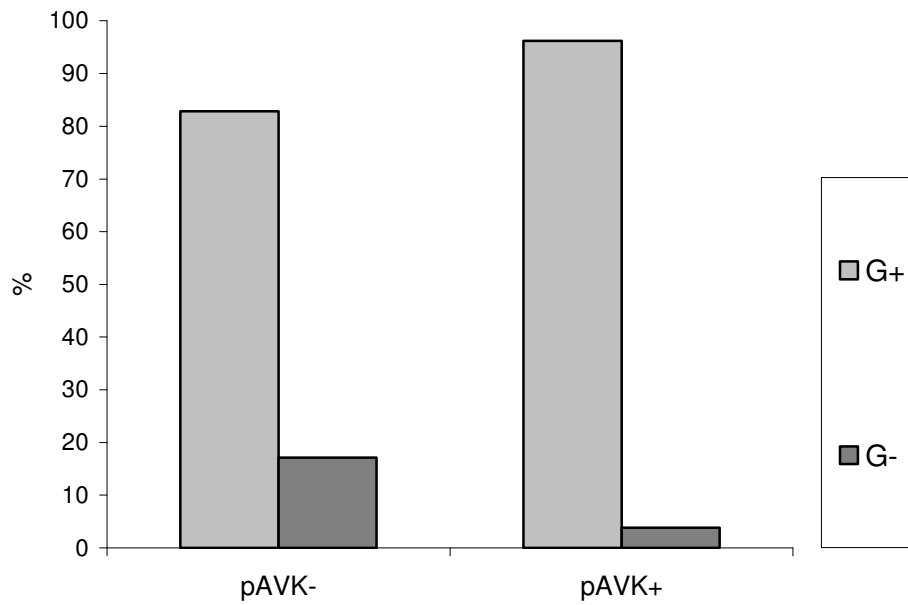


Abb. 22: Assoziation IL-6 Genotyp G+, G- und pAVK-Anamnese im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell). Unterschiede zwischen den Genotypen $p = 0,079$. Die Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

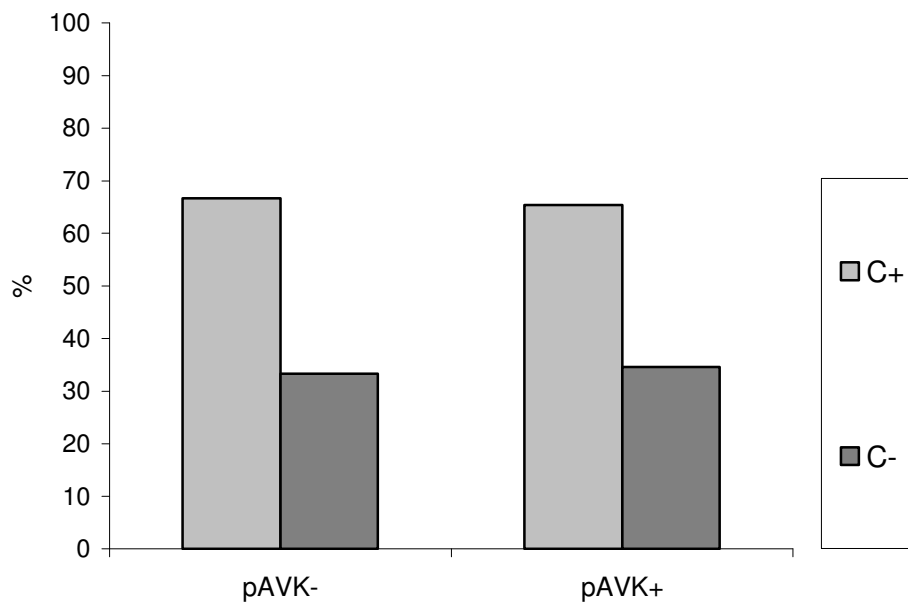


Abb. 23: Assoziation IL-6 Genotyp C+, C- und pAVK-Anamnese im Patientenkollektiv (dominant-rezessives Modell). Unterschiede zwischen den Genotypen $p = 0,896$. Die Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

Ein signifikanter Zusammenhang konnte im Patientenkollektiv zwischen bestehender koronarer Herzkrankheit (KHK) bzw. peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) und erhöhten CRP-, Fibrinogen-, Kreatinin-, Harnstoff-Spiegeln bzw. erniedrigter Kreatininclearance nachgewiesen werden. Keine signifikante Assoziationen ergaben sich zwischen KHK und Albumin bzw. pAVK und Albumin (s. Tabelle 8). Abbildung 24 und 25 zeigen die signifikanten Unterschiede zwischen CRP-Serumspiegeln und KHK bzw. pAVK.

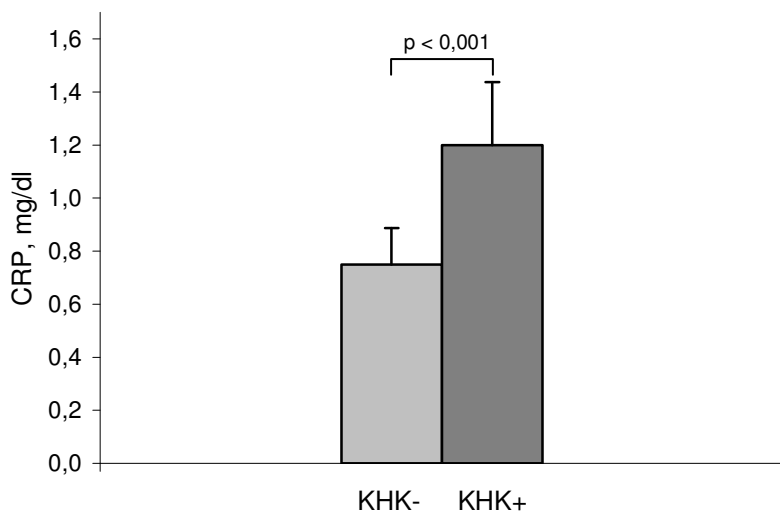


Abb. 24:

Assoziation KHK und CRP im Patientenkollektiv (Mittelwerte \pm Standardfehler). Die Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

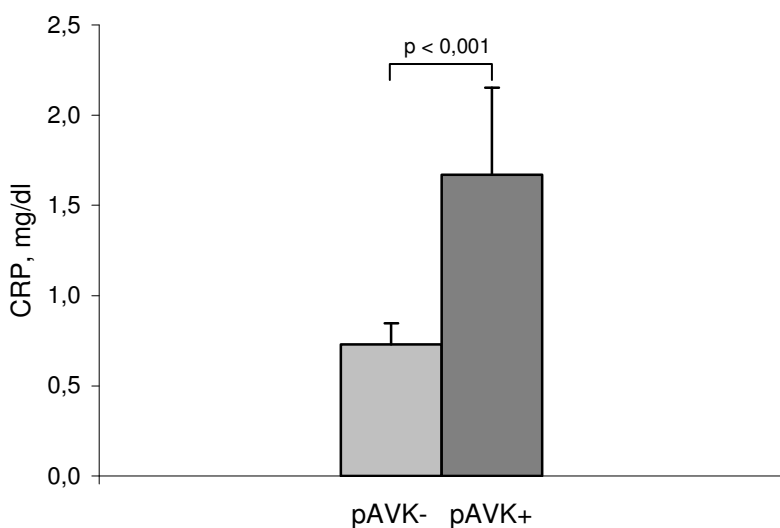


Abb. 25:

Assoziation pAVK und CRP im Patientenkollektiv (Mittelwerte \pm Standardfehler). Die Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

	KHK –	KHK +	pAVK –	pAVK +
C-reaktives Protein [mg/dl]	0,75 ± 1,82	1,20 ± 1,59 ^{***}	0,73 ± 1,64	1,67 ± 2,46 ^{***}
Fibrinogen [g/l]	3,69 ± 1,51	4,66 ± 1,59 ^{***}	3,76 ± 1,48	4,89 ± 1,84 ^{***}
Albumin [g/dl]	3,86 ± 0,61	3,96 ± 0,35	3,89 ± 0,55	3,77 ± 0,65
Kreatinin im Serum [mg/dl]	1,89 ± 1,07	2,44 ± 1,43 ^{**}	1,97 ± 1,18	2,42 ± 1,27 [*]
Harnstoff im Serum [mg/dl]	69,62 ± 40,33	104,10 ± 54,08 ^{***}	73,87 ± 44,39	102,98 ± 51,54 ^{**}
Kreatinin-clearance [ml/min]	62,56 ± 38,22	42,33 ± 32,68 ^{***}	60,28 ± 37,85	43,34 ± 37,18 [*]

Tabelle 8: Zusammenhang von CRP, Fibrinogen, Albumin, Kreatinin, Harnstoff, Kreatinin-clearance mit KHK, pAVK. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen negativer und positiver KHK bzw. pAVK-Anamnese sind durch Sterne markiert * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001. Die Abkürzungen sind im Anhang erläutert.

4. Diskussion

Chronische Inflammationsprozesse bei chronisch nierenkranken Patienten stehen in enger Assoziation zu einem erhöhten kardiovaskulären Risiko sowie zu einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität [44]. Akutphaseproteine als Marker chronischer Inflammationsprozesse - insbesondere das C-reaktive Protein - spielen in der Prädiktion kardiovaskulärer Ereignisse eine zentrale Rolle [1;44]. Bisherige Studien führen zum Ergebnis einer 35 – 40 %igen Heritabilität des CRP-Baselinespiegels [2;73;74] und weisen Interleukin-6 als zentralen Regulator der CRP-Genexpression [64-67] bzw. der Akutphase-Reaktion aus [61-63].

Unter Berücksichtigung der dargelegten wissenschaftlichen Erkenntnisse resultierte die Aufgabenstellung dieser Arbeit in der Untersuchung des Interleukin-6 –174 G→C Polymorphismus hinsichtlich seines vorstellbaren Einflusses auf die Akutphase-Reaktion in einem chronisch nierenkranken (nicht dialysepflichtigen) Patientenkollektiv.

Das untersuchte Prädiaysekollektiv wies im Vergleich zum Kontrollkollektiv eine durch erhöhte CRP-, Fibrinogen- bzw. erniedrigte Albumin-Baselinespiegel charakterisierte Akutphase-Reaktion auf. Abbildungen 3 – 5 verdeutlichen die Unterschiede der Akutphaseprotein-Plasmaspiegel zwischen den beiden Gruppen. Die Wertepaare des Patientenkollektivs zeigen in Bezug zum Kontrollkollektiv eine deutliche Rechts- (s. Abb. 3, 4) bzw. Linksverschiebung (Abb. 5). Weiterhin ist eine vermehrte Streuung mit Ausreißern zu erkennen. Diese Ergebnisse deuten im Prädiaysekollektiv auf vermehrte Inflammationsprozesse hin und bestätigen die Resultate von Shlipak et al. [58].

Die CRP- und Albumin-Spiegel des Patientenkollektivs ließen in der statistischen Auswertung keinen Schluss auf eine signifikante Korrelation zu und zeigten sich nur sehr gering negativ korreliert ($p = -0,07$). Diese überraschende Beobachtung steht im Widerspruch zu anderen Studien [59;91]. Allerdings kamen jedoch Kaysen et al. [92] zum Schluss, dass erhöhte CRP-Spiegel durchaus mit einem fehlenden oder geringen Effekt auf die Albumin-Spiegel einhergehen können.

Der Interleukin-6 Polymorphismus –174 G→C zeigte unter Annahme eines kodominanten Modells (GG, GC, CC) keinen signifikanten Zusammenhang mit den Serum-/Plasmaspiegeln der Akutphaseproteine CRP, Fibrinogen, Homocystein, Ferritin, Transferrin und Albumin. Die Hypothese eines dominant-rezessiven Modells (G+, G- /

C+, C-) konnte ebenfalls nicht bestätigt werden. Ein Einfluss des Interleukin-6 Polymorphismus auf die Akutphase-Reaktion war somit in dieser Arbeit nicht signifikant nachweisbar.

Studien zur Untersuchung der Auswirkung des IL-6 Polymorphismus -174 G→C auf die Modulation der Interleukin-6 Spiegel bzw. Akutphase-Reaktion sowie dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse zeigen widersprüchliche Resultate. So decken sich die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit denen von Nauk et al. [93]. Nauk et al. konnten in ihrer Fall-Kontroll-Studie (2559 KHK-Patienten mit 729 Kontrollen) gleichfalls keine Assoziation zwischen dem Interleukin-6 Polymorphismus und den CRP-, Fibrinogen-Spiegeln bzw. dem kardiovaskulären Risiko nachweisen. Weiterhin stellten Margaglione et al. [94] bei 598 gesunden Probanden keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Interleukin-6 Polymorphismus sowie den CRP-, Fibrinogen-, Interleukin-6-Spiegeln fest. Vergleichbare Ergebnisse beschreiben Brull et al. [95] bei 127 Patienten (vor elektiver koronarer Bypass-Operation) zwischen Interleukin-6 Polymorphismus und Interleukin-6 Baselinespiegeln sowie Burzotta et al. [96] bei 111 Patienten in Bezug auf CRP, Fibrinogen-Spiegeln.

Hingegen beobachteten Jenny et al. [97] in einer Fall-Kontroll-Studie mit 1724 Patienten (bei bestehender kardiovaskulärer Vorerkrankung) einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Existenz des C-Allels und erhöhten CRP- und Fibrinogenspiegeln sowie einen Trend ($p = 0,16$) zu erhöhten IL-6-Spiegeln. Desgleichen zeigten Vickers et al. [2] bei 588 gesunden Probanden eine signifikante Assoziation zwischen dem Vorliegen des C-Allels und erhöhten CRP-Baselinespiegeln. Ergänzend fanden Rea et al. [98] bei 375 gesunden Probanden einen Zusammenhang zwischen dem C-Allel und erhöhten Interleukin-6 Baselinespiegeln. Die bisher dargelegten Ergebnisse erörtern einerseits eine fehlende Assoziation zwischen dem Interleukin-6 Polymorphismus und der Akutphase-Reaktion sowie andererseits den Einfluss des C-Allels auf erhöhte Akutphaseproteine-Spiegel.

Im Gegensatz hierzu beschreiben Giacconi et al. [99] in einer Fall-Kontroll-Studie mit 80 Carotisstenose-Patienten sowie 77 gesunden Kontrollprobanden einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp GG und erhöhten Interleukin-6 Baselinespiegeln. Dies steht im direkten Gegensatz zu dem Ergebnis von Rea et al. [98]. Auch unter der Voraussetzung, dass Interleukin-6 den entscheidenden Regulator der Akutphase-Reaktion darstellt, erscheinen die Resultate von Jenny et al. [97] und Vickers et al. [2] hierzu widersprüchlich. Eine signifikante Beziehung zwischen Genotyp GG und erhöhten

Interleukin-6 Baselinespiegeln konnten wie Giacconi et al. [99] auch Bonafe et al. [100] bei 269 gesunden Probanden feststellen. Entsprechend beobachteten Fishman et al. [75] bei 102 gesunden Probanden eine Assoziation des C-Allels mit signifikant niedrigeren Interleukin-6 Baselinespiegeln.

Die weitere Annahme eines kodominanten Modells hinsichtlich einer vorstellbaren Assoziation zwischen dem Interleukin-6 Polymorphismus und dem Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit bzw. einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit kann in dieser Arbeit statistisch nicht bestätigt werden. Auch die Hypothese eines dominant-rezessiven Modells lässt sich aufgrund eines fehlenden signifikanten Zusammenhangs zwischen dem Interleukin-6 Polymorphismus und einer KHK bzw. pAVK hierbei nicht belegen.

Basso et al. [101] fanden bei 498 Patienten mit kardiovaskulärer Vorerkrankung keine erkennbare Beziehung zwischen dem IL-6 Polymorphismus und CRP-, Fibrinogen-, IL-6-Spiegeln. Allerdings zeichnete sich für den Genotyp CC ein signifikant niedrigeres kardiovaskuläres Risiko ab. Desgleichen beschrieben Humphries et al. [102] bei 2751 gesunden Probanden keine Assoziation zwischen dem IL-6 Polymorphismus und den CRP-, Fibrinogen-Spiegeln. Im Gegensatz zu Basso et al. [101] ergab sich bei Vorliegen des C-Allels ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko. Jones et al. [103] zeigten bei 466 Patienten mit abdominalem Aortenaneurysma eine signifikante Assoziation zwischen dem C-Allel und einer erhöhten kardiovaskulären Mortalität. Sie konnten ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem IL-6 Polymorphismus und den CRP- bzw. Fibrinogenspiegeln feststellen. Vergleichbare Resultate weisen die Untersuchungen von Bruunsgaard et al. [104] bei 324 Probanden zwischen dem Genotyp CC und einer höheren Prävalenz an kardiovaskulären Erkrankungen auf.

In der Zusammenschau lassen die in dieser Arbeit erzielten Resultate den Schluss zu, dass der Interleukin-6 Polymorphismus keinen signifikanten Einfluss auf chronische Inflammationsprozesse sowie auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko nimmt. Zusätzlich deuten die dargelegten widersprüchlichen Studienergebnisse auf einen geringen Einfluss des Interleukin-6 Polymorphismus als Modulator der Akutphase-Reaktion hin. Im untersuchten Prädialysekollektiv findet diese Annahme aufgrund einer nicht vorhandenen genotypischen Variation der Akutphaseproteine eine Bestätigung.

Eine vorstellbare Ursache für die Vielzahl sich widersprechender Studienergebnisse könnte in einer sehr komplexen Regulation der Promotorfunktion begründet sein [93]. So konnten Terry et al. [76] nachweisen, dass vier Polymorphismen der Promotorregion des Interleukin-6 Gens (darunter auch der Interleukin-6 -174 G→C Polymorphismus) nicht unabhängig voneinander agieren, sondern sich gegenseitig in ihrem funktionellen Einfluss auf die Transkription beeinflussen. Ihre Auswirkung auf die Interleukin-6 Gentranskription stellt sich also nicht als einfacher additiver, sondern vielmehr als interagierender Effekt dar.

Die in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Auswertungen ergeben einen signifikanten Zusammenhang in Bezug auf das Vorkommen einer koronaren Herzkrankheit (KHK) und erhöhten CRP- [44;51;105;106] bzw. Fibrinogen-Spiegeln [107-109]. Die von Foley et al. [110] beschriebene Assoziation zwischen dem Vorliegen einer koronaren Herzkrankheit und erniedrigten Albumin-Spiegeln kann in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Der gefundene signifikante Zusammenhang zwischen einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) und erhöhten CRP- und Fibrinogen-Spiegeln wird auch von Ridker et al. aufgezeigt [14;111].

Inwieweit das C-reaktive Protein einen Surrogatmarker oder einen Mediator der Genese der KHK/pAVK darstellt ist noch nicht geklärt. Aktuelle Erkenntnisse zur Pathogenese der Atherosklerose deuten jedoch auf eine kausale Beteiligung des C-reaktiven Proteins bei der Atherogenese hin. So weist die CRP-mRNA im atherosklerotischen Plaque einen 10,2 fach höheren Spiegel im Vergleich zu einer gesunden Arterie auf [112]. Entsprechend dieser Tatsache lassen sich auch gesteigerte CRP-Level im Plaquegewebe nachweisen [112]. Das C-reaktive Protein zeigt hierbei eine enge Kollokalisierung zum Membranangriffskomplex des Komplementsystems [112;113]. Aufgrund des bekannten Umstandes, dass C-reaktive Proteine Komplemente aktivieren und aktivierte Komplemente Zellen des Plaquegewebes attackieren, könnte hier ein kausaler Zusammenhang zwischen dem CRP und einer Atherogenese abgeleitet werden [112]. Weiterhin induziert das CRP die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle (u.a. VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin, MCP-1) in den Endothelzellen [114;115] und fördert auf diese Weise die Leukozytenemigration. Aufgrund einer LDL-Opsonierung begünstigt CRP die Makrophagentransformation in Schaumzellen des Plaquegewebes [113;116]. Zusätzlich bewirkt CRP eine Reduktion der eNOS- [117] sowie eine Erhöhung der Angiotensin-1-Rezeptor-Expression [118]. Induktion des Plasminogenaktivator-

Inhibitors [119] und Stimulierung der Synthese von Tissue factor in Makrophagen [120] durch das C-reaktive Protein fördern die Thrombusbildung. Paul et al. [121] untersuchten bei Apolipoprotein E defizienten Mäusen den Effekt einer transgenen Expression von Human-CRP auf die Atherogenese. Ihr Ergebnis einer durch Human-CRP beschleunigten Atherosklerose-Progression bestärkt die Hypothese, dass das C-reaktive Protein nicht nur als Risikomarker, sondern auch als Risikofaktor der Atherosklerose einzuschätzen ist.

5. Zusammenfassung

Chronisch nierenkranke Menschen weisen im Vergleich zur gesunden Allgemeinbevölkerung eine stark erhöhte Prävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen auf. Die jährliche kardiovaskuläre Mortalität ist nach statistischer Korrektur des Mortalitätsrisikos für Alter, Geschlecht und Diabetes mellitus um 10 bis 20fach höher als in der gesunden Bevölkerung. Chronische Inflammationsprozesse spielen eine zentrale Rolle in der Atherogenese und stehen in enger Assoziation zum erhöhten kardiovaskulären Risiko sowie zur erhöhten kardiovaskulären Mortalität. Akutphaseproteinen - insbesondere dem C-reaktiven Protein - kommen als Marker chronischer Inflammationsprozesse in der Prädiktion kardiovaskulärer Ereignisse eine besondere Bedeutung zu. Bisherige Studien führen zum Ergebnis einer 35 – 40 %igen Heritabilität des CRP-Baselinespiegels und weisen Interleukin-6 als zentralen Regulator der CRP-Genexpression bzw. der Akutphase-Reaktion aus.

Unter Berücksichtigung der dargelegten wissenschaftlichen Erkenntnisse resultierte die Aufgabenstellung dieser Arbeit in der Untersuchung des Interleukin-6 –174 G→C Polymorphismus hinsichtlich seines vorstellbaren Einflusses auf die Akutphase-Reaktion in einem chronisch nierenkranken, nicht dialysepflichtigen Patientenkollektiv (n = 224). Die Genotypisierung erfolgte durch Heteroduplexanalyse. In der Zusammenschau lassen die erzielten Resultate aus der Sicht eines kodominanten bzw. dominant-rezessiven Modells den Schluss zu, dass der Interleukin-6 –174 G→C Polymorphismus keinen signifikanten Einfluss auf die Modulation der Akutphase-Reaktion sowie auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko nimmt. Ein signifikanter Zusammenhang konnte allerdings zwischen bestehender koronarer Herzkrankheit bzw. peripherer arterieller Verschlusskrankheit und erhöhten CRP-, Fibrinogen-, Kreatinin-, Harnstoff-Spiegeln bzw. erniedrigter Kreatininclearance nachgewiesen werden. Aus diesem Grund sollte die Bestimmung des C-reaktiven Proteins als sensitiver kardiovaskulärer Risikomarker in die Routinekontrolle chronisch nierenkranker Patienten aufgenommen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* 1997; 336(14):973-979.
2. Vickers MA, Green FR, Terry C, Mayosi BM, Julier C, Lathrop M et al. Genotype at a promoter polymorphism of the interleukin-6 gene is associated with baseline levels of plasma C-reactive protein. *Cardiovasc Res* 2002; 53(4):1029-1034.
3. Koenig W, Sund M, Frohlich M, Fischer HG, Lowel H, Doring A et al. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999; 99(2):237-242.
4. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342(12):836-843.
5. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998; 98(8):731-733.
6. Danesh J, Whincup P, Walker M, Lennon L, Thomson A, Appleby P et al. Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses. *BMJ* 2000; 321(7255):199-204.
7. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 1997; 349(9050):462-466.
8. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN. Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am J Epidemiol* 1996; 144(6):537-547.
9. Harris TB, Ferrucci L, Tracy RP, Corti MC, Wacholder S, Ettinger WH, Jr. et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. *Am J Med* 1999; 106(5):506-512.
10. Tice JA, Browner W, Tracy RP, Cummings SR. The relation of C-reactive protein levels to total and cardiovascular mortality in older U.S. women. *Am J Med* 2003; 114(3):199-205.

11. Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2000; 343(16):1139-1147.
12. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med* 1994; 331(7):417-424.
13. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 2002; 347(20):1557-1565.
14. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA* 2001; 285(19):2481-2485.
15. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. *Circulation* 1998; 97(20):2007-2011.
16. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, III, Criqui M et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003; 107(3):499-511.
17. Ridker PM, Cook N. Clinical usefulness of very high and very low levels of C-reactive protein across the full range of Framingham Risk Scores. *Circulation* 2004.
18. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32(5 Suppl 3):S112-S119.
19. Locatelli F, Pozzoni P, Tentori F, Del Vecchio L. Epidemiology of cardiovascular risk in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 Suppl 7:vii2-vii9.
20. Levin A. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic kidney disease prior to dialysis. *Semin Dial* 2003; 16(2):101-105.
21. The USRDS Dialysis Morbidity and Mortality Study: Wave 2. United States Renal Data System. *Am J Kidney Dis* 1997; 30(2 Suppl 1):S67-S85.

22. Locatelli F, Marcelli D, Conte F, D'Amico M, Del Vecchio L, Limido A et al. Cardiovascular disease in chronic renal failure: the challenge continues. Registro Lombardo Dialisi e Trapianto. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15 Suppl 5:69-80.
23. Mann JF, Gerstein HC, Pogue J, Bosch J, Yusuf S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: the HOPE randomized trial. *Ann Intern Med* 2001; 134(8):629-636.
24. Shlipak MG, Simon JA, Grady D, Lin F, Wenger NK, Furberg CD. Renal insufficiency and cardiovascular events in postmenopausal women with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2001; 38(3):705-711.
25. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC et al. Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy. *Kidney Int* 1995; 47(1):186-192.
26. Greaves SC, Gamble GD, Collins JF, Whalley GA, Sharpe DN. Determinants of left ventricular hypertrophy and systolic dysfunction in chronic renal failure. *Am J Kidney Dis* 1994; 24(5):768-776.
27. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. Outcome and risk factors for left ventricular disorders in chronic uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11(7):1277-1285.
28. Shinohara K, Shoji T, Tsujimoto Y, Kimoto E, Tahara H, Koyama H et al. Arterial stiffness in predialysis patients with uremia. *Kidney Int* 2004; 65(3):936-943.
29. Jungers P, Massy ZA, Khoa TN, Fumeron C, Labrunie M, Lacour B et al. Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12(12):2597-2602.
30. Jungers P, Khoa TN, Massy ZA, Zingraff J, Labrunie M, Descamps-Latscha B et al. Incidence of atherosclerotic arterial occlusive accidents in predialysis and dialysis patients: a multicentric study in the Ile de France district. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(4):898-902.
31. Tonelli M, Bohm C, Pandeya S, Gill J, Levin A, Kiberd BA. Cardiac risk factors and the use of cardioprotective medications in patients with chronic renal insufficiency. *Am J Kidney Dis* 2001; 37(3):484-489.
32. Levin A, Singer J, Thompson CR, Ross H, Lewis M. Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: identifying opportunities for intervention. *Am J Kidney Dis* 1996; 27(3):347-354.

33. Tucker B, Fabbian F, Giles M, Thuraisingham RC, Raine AE, Baker LR. Left ventricular hypertrophy and ambulatory blood pressure monitoring in chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12(4):724-728.
34. Locatelli F, Marcelli D, Conte F, Del Vecchio L, Limido A, Malberti F et al. Patient selection affects end-stage renal disease outcome comparisons. *Kidney Int* 2000; 57(s74):94-99.
35. Culeton BF, Larson MG, Wilson PW, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int* 1999; 56(6):2214-2219.
36. Wheeler DC, Townend JN, Landray MJ. Cardiovascular risk factors in predialysis patients: baseline data from the Chronic Renal Impairment in Birmingham (CRIB) study. *Kidney Int Suppl* 2003;(84):S201-S203.
37. Kohlhagen J, Kelly J. Prevalence of vascular risk factors and vascular disease in predialysis chronic renal failure. *Nephrology (Carlton)* 2003; 8(6):274-279.
38. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV et al. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int* 2000; 58(1):353-362.
39. Longenecker JC, Coresh J, Powe NR, Levey AS, Fink NE, Martin A et al. Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(7):1918-1927.
40. Sarnak MJ, Coronado BE, Greene T, Wang SR, Kusek JW, Beck GJ et al. Cardiovascular disease risk factors in chronic renal insufficiency. *Clin Nephrol* 2002; 57(5):327-335.
41. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culeton B, Hamm LL et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003; 108(17):2154-2169.
42. Galle J, Seibold S, Wanner C. Inflammation in uremic patients: what is the link? *Kidney Blood Press Res* 2003; 26(2):65-75.
43. Galle J, Quaschnig T, Seibold S, Wanner C. Endothelial dysfunction and inflammation: what is the link? *Kidney Int Suppl* 2003;(84):S45-S49.
44. Zimmermann J, Herrlinger S, Pruy A, Metzger T, Wanner C. Inflammation enhances cardiovascular risk and mortality in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999; 55(2):648-658.

45. Stenvinkel P, Wanner C, Metzger T, Heimbürger O, Mallamaci F, Tripepi G et al. Inflammation and outcome in end-stage renal failure: does female gender constitute a survival advantage? *Kidney Int* 2002; 62(5):1791-1798.
46. Arici M, Walls J. End-stage renal disease, atherosclerosis, and cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link? *Kidney Int* 2001; 59(2):407-414.
47. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler TA, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62(5):1524-1538.
48. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407(6801):233-241.
49. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340(2):115-126.
50. Qureshi AR, Alvestrand A, Divino-Filho JC, Gutierrez A, Heimbürger O, Lindholm B et al. Inflammation, malnutrition, and cardiac disease as predictors of mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13 Suppl 1:S28-S36.
51. Yeun JY, Levine RA, Mantadilok V, Kaysen GA. C-Reactive protein predicts all-cause and cardiovascular mortality in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2000; 35(3):469-476.
52. Iseki K, Tozawa M, Yoshi S, Fukiyama K. Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(8):1956-1960.
53. Wanner C, Zimmermann J, Schwedler S, Metzger T. Inflammation and cardiovascular risk in dialysis patients. *Kidney Int Suppl* 2002;(80):99-102.
54. Wanner C, Metzger T. C-reactive protein a marker for all-cause and cardiovascular mortality in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17 Suppl 8:29-32.
55. Wang AY, Woo J, Lam CW, Wang M, Sea MM, Lui SF et al. Is a single time point C-reactive protein predictive of outcome in peritoneal dialysis patients? *J Am Soc Nephrol* 2003; 14(7):1871-1879.
56. Herzig KA, Purdie DM, Chang W, Brown AM, Hawley CM, Campbell SB et al. Is C-reactive protein a useful predictor of outcome in peritoneal dialysis patients? *J Am Soc Nephrol* 2001; 12(4):814-821.
57. Noh H, Lee SW, Kang SW, Shin SK, Choi KH, Lee HY et al. Serum C-reactive protein: a predictor of mortality in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* 1998; 18(4):387-394.

58. Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation* 2003; 107(1):87-92.
59. Panichi V, Migliori M, De Pietro S, Taccola D, Bianchi AM, Giovannini L et al. C-reactive protein and interleukin-6 levels are related to renal function in predialytic chronic renal failure. *Nephron* 2002; 91(4):594-600.
60. Bergstrom J, Lindholm B, Lacson E Jr, Owen W, Jr., Lowrie EG, Glasscock RJ et al. What are the causes and consequences of the chronic inflammatory state in chronic dialysis patients? *Semin Dial* 2000; 13(3):163-175.
61. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340(6):448-454.
62. Heinrich PC, Castell JV, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 1990; 265(3):621-636.
63. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R et al. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *FEBS Lett* 1989; 242(2):237-239.
64. Toniatti C, Arcone R, Majello B, Ganter U, Arpaia G, Ciliberto G. Regulation of the human C-reactive protein gene, a major marker of inflammation and cancer. *Mol Biol Med* 1990; 7(3):199-212.
65. Ganapathi MK, Rzewnicki D, Samols D, Jiang SL, Kushner I. Effect of combinations of cytokines and hormones on synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in Hep 3B cells. *J Immunol* 1991; 147(4):1261-1265.
66. Szalai AJ, van Ginkel FW, Wang Y, McGhee JR, Volanakis JE. Complement-dependent acute-phase expression of C-reactive protein and serum amyloid P-component. *J Immunol* 2000; 165(2):1030-1035.
67. Ganapathi MK, Schultz D, Mackiewicz A, Samols D, Hu SI, Brabenec A et al. Heterogeneous nature of the acute phase response. Differential regulation of human serum amyloid A, C-reactive protein, and other acute phase proteins by cytokines in Hep 3B cells. *J Immunol* 1988; 141(2):564-569.
68. Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(4):972-978.
69. Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000; 101(15):1767-1772.

70. Volanakis JE. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Mol Immunol* 2001; 38(2-3):189-197.
71. Hirschfield GM, Pepys MB. C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *QJM* 2003; 96(11):793-807.
72. Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* 1993; 91(4):1351-1357.
73. Pankow JS, Folsom AR, Cushman M, Borecki IB, Hopkins PN, Eckfeldt JH et al. Familial and genetic determinants of systemic markers of inflammation: the NHLBI family heart study. *Atherosclerosis* 2001; 154(3):681-689.
74. MacGregor AJ, Gallimore JR, Spector TD, Pepys MB. Genetic effects on baseline values of C-reactive protein and serum amyloid a protein: a comparison of monozygotic and dizygotic twins. *Clin Chem* 2004; 50(1):130-134.
75. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 1998; 102(7):1369-1376.
76. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative influence of genetic polymorphisms on interleukin 6 transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2000; 275(24):18138-18144.
77. Ockene IS, Matthews CE, Rifai N, Ridker PM, Reed G, Stanek E. Variability and classification accuracy of serial high-sensitivity C-reactive protein measurements in healthy adults. *Clin Chem* 2001; 47(3):444-450.
78. Meier-Ewert HK, Ridker PM, Rifai N, Price N, Dinges DF, Mullington JM. Absence of diurnal variation of C-reactive protein concentrations in healthy human subjects. *Clin Chem* 2001; 47(3):426-430.
79. Macy EM, Hayes TE, Tracy RP. Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications. *Clin Chem* 1997; 43(1):52-58.
80. Frohlich M, Sund M, Thorand B, Hutchinson WL, Pepys MB, Koenig W. Lack of seasonal variation in C-reactive protein. *Clin Chem* 2002; 48(3):575-577.
81. Sothorn RB, Roitman-Johnson B, Kanabrocki EL, Yager JG, Roodell MM, Weatherbee JA et al. Circadian characteristics of circulating interleukin-6 in men. *J Allergy Clin Immunol* 1995; 95(5 Pt 1):1029-1035.

82. Kanabrocki EL, Sothorn RB, Messmore HL, Roitman-Johnson B, McCormick JB, Dawson S et al. Circadian interrelationships among levels of plasma fibrinogen, blood platelets, and serum interleukin-6. *Clin Appl Thromb Hemost* 1999; 5(1):37-42.
83. Vgontzas AN, Papanicolaou DA, Bixler EO, Lotsikas A, Zachman K, Kales A et al. Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(8):2603-2607.
84. Kayaba K, Ishikawa S, Gotoh T, Nago N, Kajii E, Nakamura Y et al. Five-year intra-individual variability in C-reactive protein levels in a Japanese population-based study: the Jichi Medical School Cohort Study at Yamato, 1993-1998. *Jpn Circ J* 2000; 64(4):303-308.
85. Morse HR, Olomolaiye OO, Wood NA, Keen LJ, Bidwell JL. Induced heteroduplex genotyping of TNF-alpha, IL-1beta, IL-6 and IL-10 polymorphisms associated with transcriptional regulation. *Cytokine* 1999; 11(10):789-795.
86. Nataraj AJ, Olivos-Glander I, Kusakawa N, Highsmith WE, Jr. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. *Electrophoresis* 1999; 20(6):1177-1185.
87. Wood N, Bidwell J. Genetic screening and testing by induced heteroduplex formation. *Electrophoresis* 1996; 17(1):247-254.
88. Clark ZE, Bowen DJ, Whatley SD, Bellamy MF, Collins PW, McDowell IF. Genotyping method for methylenetetrahydrofolate reductase (C677T thermolabile variant) using heteroduplex technology. *Clin Chem* 1998; 44(11):2360-2362.
89. Savage DA, Wood NA, Bidwell JL, Hui KM. HLA-DRB1*01 subtyping by heteroduplex analysis. *Tissue Antigens* 1995; 45(2):120-124.
90. Olomolaiye O, Wood NA, Bidwell JL. A novel NlaIII polymorphism in the human IL-6 promoter. *Eur J Immunogenet* 1998; 25(2-3):267.
91. Eustace JA, Astor B, Muntner PM, Ikizler TA, Coresh J. Prevalence of acidosis and inflammation and their association with low serum albumin in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004; 65(3):1031-1040.
92. Kaysen GA, Greene T, Daugirdas JT, Kimmel PL, Schulman GW, Toto RD et al. Longitudinal and cross-sectional effects of C-reactive protein, equilibrated normalized protein catabolic rate, and serum bicarbonate on creatinine and albumin levels in dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(6):1200-1211.
93. Nauck M, Winkelmann BR, Hoffmann MM, Bohm BO, Wieland H, Marz W. The interleukin-6 G(-174)C promoter polymorphism in the LURIC cohort: no association with plasma interleukin-6, coronary artery disease, and myocardial infarction. *J Mol Med* 2002; 80(8):507-513.

94. Margaglione M, Bossone A, Cappucci G, Colaizzo D, Grandone E, Di Minno G. The effect of the interleukin-6 c/g-174 polymorphism and circulating interleukin-6 on fibrinogen plasma levels. *Haematologica* 2001; 86(2):199-204.
95. Brull DJ, Montgomery HE, Sanders J, Dhamrait S, Luong L, Rumley A et al. Interleukin-6 gene -174g>c and -572g>c promoter polymorphisms are strong predictors of plasma interleukin-6 levels after coronary artery bypass surgery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(9):1458-1463.
96. Burzotta F, Iacoviello L, Di Castelnuovo A, Gliuca F, Luciani N, Zamparelli R et al. Relation of the -174 G/C polymorphism of interleukin-6 to interleukin-6 plasma levels and to length of hospitalization after surgical coronary revascularization. *Am J Cardiol* 2001; 88(10):1125-1128.
97. Jenny NS, Tracy RP, Ogg MS, Luong IA, Kuller LH, Arnold AM et al. In the elderly, interleukin-6 plasma levels and the -174G>C polymorphism are associated with the development of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(12):2066-2071.
98. Rea IM, Ross OA, Armstrong M, McNerlan S, Alexander DH, Curran MD et al. Interleukin-6-gene C/G 174 polymorphism in nonagenarian and octogenarian subjects in the BELFAST study. Reciprocal effects on IL-6, soluble IL-6 receptor and for IL-10 in serum and monocyte supernatants. *Mech Ageing Dev* 2003; 124(4):555-561.
99. Giacconi R, Cipriano C, Albanese F, Boccoli G, Saba V, Olivieri F et al. The -174G/C polymorphism of IL-6 is useful to screen old subjects at risk for atherosclerosis or to reach successful ageing. *Exp Gerontol* 2004; 39(4):621-628.
100. Bonafe M, Olivieri F, Cavallone L, Giovagnetti S, Mayegiani F, Cardelli M et al. A gender--dependent genetic predisposition to produce high levels of IL-6 is detrimental for longevity. *Eur J Immunol* 2001; 31(8):2357-2361.
101. Basso F, Lowe GD, Rumley A, McMahon AD, Humphries SE. Interleukin-6 -174G>C polymorphism and risk of coronary heart disease in West of Scotland coronary prevention study (WOSCOPS). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(4):599-604.
102. Humphries SE, Luong LA, Ogg MS, Hawe E, Miller GJ. The interleukin-6 -174 G/C promoter polymorphism is associated with risk of coronary heart disease and systolic blood pressure in healthy men. *Eur Heart J* 2001; 22(24):2243-2252.
103. Jones KG, Brull DJ, Brown LC, Sian M, Greenhalgh RM, Humphries SE et al. Interleukin-6 (IL-6) and the prognosis of abdominal aortic aneurysms. *Circulation* 2001; 103(18):2260-2265.

104. Bruunsgaard H, Christiansen L, Pedersen AN, Schroll M, Jorgensen T, Pedersen BK. The IL-6 -174G>C polymorphism is associated with cardiovascular diseases and mortality in 80-year-old humans. *Exp Gerontol* 2004; 39(2):255-261.
105. Zebrack JS, Anderson JL, Beddhu S, Horne BD, Bair TL, Cheung A et al. Do associations with C-reactive protein and extent of coronary artery disease account for the increased cardiovascular risk of renal insufficiency? *J Am Coll Cardiol* 2003; 42(1):57-63.
106. Ducloux D, Bresson-Vautrin C, Kribs M, Abdelfatah A, Chalopin JM. C-reactive protein and cardiovascular disease in peritoneal dialysis patients. *Kidney Int* 2002; 62(4):1417-1422.
107. Koch M, Kutkuhn B, Trenkwalder E, Bach D, Grabensee B, Dieplinger H et al. Apolipoprotein B, fibrinogen, HDL cholesterol, and apolipoprotein(a) phenotypes predict coronary artery disease in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8(12):1889-1898.
108. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS et al. Fibrinogen, mortality and incident cardiovascular complications in end-stage renal failure. *J Intern Med* 2003; 254(2):132-139.
109. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Parlongo S, Malatino LS et al. Fibrinogen, mortality and incident cardiovascular complications in end-stage renal failure. *J Intern Med* 2003; 254(2):132-139.
110. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE. Hypoalbuminemia, cardiac morbidity, and mortality in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7(5):728-736.
111. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Plasma concentration of C-reactive protein and risk of developing peripheral vascular disease. *Circulation* 1998; 97(5):425-428.
112. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL. Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 2001; 158(3):1039-1051.
113. Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich M, Koenig W, Waltenberger J et al. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(9):1386-1392.
114. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 2000; 102(18):2165-2168.
115. Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET, Chang J. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human

- endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001; 103(21):2531-2534.
116. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 2001; 103(9):1194-1197.
 117. Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV et al. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 2002; 106(8):913-919.
 118. Wang CH, Li SH, Weisel RD, Fedak PW, Dumont AS, Szmitko P et al. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle. *Circulation* 2003; 107(13):1783-1790.
 119. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation* 2003; 107(3):398-404.
 120. Cermak J, Key NS, Bach RR, Balla J, Jacob HS, Vercellotti GM. C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. *Blood* 1993; 82(2):513-520.
 121. Paul A, Ko KW, Li L, Yechoor V, McCrory MA, Szalai AJ et al. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004; 109(5):647-655.

7. Anhang

7.1 Liste der verwendeten Abkürzungen

APP	Akutphaseproteine
art. Hypertonie	arterielle Hypertonie
BMI	Body Mass Index
C+	Genotypen CC, GC
C-	Genotyp GG
CRP	C-reaktives Protein
G+	Genotypen GG, GC
G-	Genotyp CC
h	Stunde(n)
IL-6	Interleukin-6
KHK	koronare Herzkrankheit
Krea-Clearance	Kreatininclearance
Lp(a)	Lipoprotein (a)
min	Minute(n)
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RR Dia.	diastolischer Blutdruck
RR Sys.	systolischer Blutdruck
s	Sekunde(n)
V	Volt

7.2 Verwendete Chemikalien und molekularbiologische Produkte

Chemikalien:

Acrylamid (40%)	Bio-Rad Laboratories, München
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Mallinckrodt Baker, Griesheim

7.3 Verwendete Geräte und Einmalartikel

<i>Geräteart</i>	<i>Modellbezeichnung</i>	<i>Hersteller / Lieferant</i>
Elektrophoresegerät (horizontal)	Model B3 Buffer Puffer	OWL, Portsmouth, USA
Elektrophoresegerät (vertikal)	MGV-102-33	C.B.S. Scientific Co., Del Mar, USA
Kreisschüttler	Allégro Rotator	Nichols Institute Diagnostika, Bad Vilbel
Laborzentrifugen	Centrifuge 5417 C Hettich Rotixa/P	Eppendorf, Hamburg Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen
Magnetrührer	REO	IKA-Werke, Staufen
Membranpumpe	Laboport, N86 KN.18	KNF Neuberger, Freiburg
Mikroliterpipetten	Multipette Plus 1 - 10 µl Multipette Plus 10 - 100 µl Multipette Plus 100 - 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	HF 22023	Siemens, Deutschland
Mini- Zentrifuge/Vortex	Microspin FV-2400	Hartenstein, Würzburg
pH-Meter	CG 825	Schott, Mainz
Pipettierhelfer	accu-jet	Brand, Wertheim/Main
Polaroid Kamera	Direct Screen Instant Camera DS 34	Polaroid, Offenbach/Main
Schüttler	VF2	Janke&Kunkel, IKA-Werke, Staufen
Spannungsgerät	Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences, Freiburg
Thermocycler	Mastercycler Gradient T1 Thermocycler	Eppendorf, Hamburg Biometra, Göttingen
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436 Thriller	Eppendorf, Hamburg Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Universalschrank	UE500	Memmert, Schwabach
UV/VIS-Spektrometer	Lambda 12	Perkin Elmer, Überlingen
UV-Transilluminator	TFX-35M	Vilber Lourmat, Marine la

Waagen	PM6100 AE240	Vallee CDX 1, France Mettler-Toledo, Gießen
--------	-----------------	--

Einmalartikel:

Artikelbezeichnung

PCR-Reaktionsgefäße PCR 8-Strip Tubes 0,2 ml

Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes 2,0 ml

Reaktionsgefäße Schraub-Reaktionsgefäße,
steril 2 ml

Zentrifugenröhrchen Falcon (15 ml)

Falcon (50 ml)

Hersteller / Lieferant

Eppendorf, Hamburg

Eppendorf, Hamburg

Hartenstein, Würzburg

Becton Dickinson, Heidelberg

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. C. Wanner für die Überantwortung des vielschichtigen Themas sowie die Möglichkeit zum selbstständigen Experimentieren.

Des weiteren danke ich sehr meinem Betreuer Herrn Thomas Metzger für die umfassende wissenschaftliche und auch sehr freundliche Betreuung sowie für seine wertvolle Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Stefan Seibold für seine sehr hilfreichen Tipps und auch Aufmunterungen bedanken.

Für die gute, humorvolle Atmosphäre und die ständige Hilfsbereitschaft bedanke ich mich beim gesamten Personal des nephrologischen Labors der Medizinischen Klinik Würzburg.

Mein Dank gilt der Gemeinschaftspraxis von Dres. med. Schramm, Zimmermann, Netzer für Innere Medizin, Nephrologie und Diabetologie in Würzburg.

Weiterhin gilt mein Dank auch den Patienten und Kontrollpersonen, die sich für diese Studie zur Verfügung gestellt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name, Vorname:	Schmid, Jan Stefan
Geburtsdatum, -ort:	2. August 1978, Würzburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Vater	Dr. Schmid, Günther
Beruf	Studiendirektor
Mutter	Schmid-Bourne, Hélène
Beruf	Hausfrau

Schulbildung:

1985 - 1989	Johannes-Kepler-Grundschule, Würzburg
1989 - 1998	Röntgen-Gymnasium, Würzburg

Zivildienst:

1998 - 1999	Onkologie der Universitäts-Kinderklinik Würzburg
-------------	--

Hochschulausbildung:

Okt. 1999 bis vor. Okt./Nov. 2006	Studium der Humanmedizin an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
August 2001	Ärztliche Vorprüfung
August 2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
voraussichtlich Okt./Nov. 2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr:

1. Tertial (Okt. 2005 - Febr. 2006) Innere Medizin am Klinikum Coburg
2. Tertial (Febr. 2006 - Mai 2006) Diagnostische Radiologie am Institut für Röntgen-
diagnostik der Universitätsklinik Würzburg
3. Tertial (Mai 2006 - Sept. 2006) Chirurgie an der Missionsärztlichen Klinik Würzburg

Jan Stefan Schmid