

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Direktor: Prof. Dr. B. Isermann

**Der Einfluss des Haptoglobin-Polymorphismus auf die
Gesamtmortalität und das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse
bei Dialysepatienten**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Christiane Anna Riedel
aus Magdeburg
Magdeburg 2018

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Riedel, Christiane Anna:

Der Einfluss des Haptoglobin-Polymorphismus auf die Gesamtmortalität und das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Dialysepatienten. 2018. 62 Bl., 18 Abb., 15 Tab., 2 Anh.

Kurzreferat:

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen dem genetisch determinierten Polymorphismus des Serumproteins Haptoglobin und der Gesamtmortalität sowie dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse, wie z. B. Myokardinfarkt oder Apoplex, bei terminal niereninsuffizienten Patienten besteht. Dabei wird angenommen, dass der homozygote Haptoglobin-Typ 1 aufgrund seiner pathophysiologischen Eigenschaften einen eher positiven Effekt auf das Herzkreislaufsystem nimmt und mit einer geringeren Mortalitäts- und kardiovaskulären Ereignisrate einhergeht, als der homozygote Haptoglobin-Typ 2. Da es aktuell keine Studien gleicher Fragestellung mit ausschließlich Dialysepatienten gibt, diese aber eine deutlich höhere Mortalitäts- und kardiovaskuläre Ereignisrate aufweisen als die Allgemeinbevölkerung, entschieden wir uns zur Untersuchung dieses spezifischen Studienkollektivs. Insgesamt wurden 619 Patienten in die Auswertung einbezogen und mittels Cox-Regressionsmodell analysiert. Hinsichtlich der betrachteten Endpunkte zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang mit dem Haptoglobin-Polymorphismus. Aus unseren statistischen Daten lässt sich schließen, dass die erhöhte Mortalitäts- und kardiovaskuläre Ereignisrate von Dialysepatienten bereits durch deren Multimorbidität und die Dialysepflichtigkeit an sich erklärt wird, wodurch ein statistisch schwächerer Effekt des Haptoglobins womöglich maskiert wird. Weitere Studien mit einem längeren Beobachtungszeitraum und einer höheren Rate an Zielereignissen wären hier wünschenswert.

Schlüsselwörter:

Haptoglobin-Polymorphismus, terminale Niereninsuffizienz, Gesamtmortalität, kardiovaskuläre Ereignisse, Cox-Regressionsanalyse

INHALTSVERZEICHNIS

Dokumentationsblatt und Schlüsselwörter.....	2
Inhaltsverzeichnis.....	3
1. Abkürzungsverzeichnis.....	6
2. Einleitung.....	7
2.1 Terminale Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	7
2.2 Kategorien kardiovaskulärer Risikofaktoren.....	8
2.3 Das Protein Haptoglobin.....	10
2.3.1 Ein "neuer" Risikofaktor für CVD?.....	10
2.3.2 Genetik des Haptoglobins und sein funktioneller Polymorphismus.....	11
2.3.3 Pathophysiologische Eigenschaften des Haptoglobins.....	13
2.3.3.1 Antioxidative Eigenschaften.....	13
2.3.3.2 Inhibition der Prostaglandinsynthese.....	17
2.3.3.3 Wechselwirkungen mit Stickstoffmonoxid.....	17
2.3.3.4 Angiogenetische Eigenschaften.....	17
2.4 Übersicht aktueller Studien.....	20
3. Zielstellung und Arbeitshypothesen.....	21
4. Material und Methoden.....	23
4.1 Patienten.....	23
4.1.1 DNA-Proben.....	23
4.2 Chemikalien der Laborverfahren.....	24
4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	24
4.2.2 Gelelektrophorese.....	25
4.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	26

4.4	Methoden.....	27
4.4.1	Das Grundprinzip der PCR-Analytik.....	27
4.4.2	Vorbereitung und experimentelle Optimierung der Methodik.....	27
4.4.3	PCR-Testdurchführung.....	28
4.4.3.1	Standard Reaktionsansatz für Primerprotokoll ABD.....	28
4.4.3.2	Standard Reaktionsansatz für Primerprotokoll CDB.....	28
4.4.3.3	Thermocyclerbedingungen.....	28
4.4.4	DNA-Gelelektrophorese.....	29
4.5	Statistische Auswertung: Cox-Regressionsanalyse.....	29
5.	Ergebnisse.....	31
5.1	Ergebnisse der Gelelektrophorese und Zuordnung der Genotypen.....	31
5.2	Statistische Basisdaten der Patienten.....	32
5.3	Verteilung der Haptoglobin-Genotypen und Allelfrequenzen.....	34
5.4	Studienzeitraum 2002-2008.....	34
5.4.1	Primärer Endpunkt: Gesamtmortalität.....	34
5.4.2	Sekundärer Endpunkt: Kardiovaskuläre Ereignisse.....	36
5.4.3	Sekundäre Endpunkte: Akuter Myokardinfarkt und Apoplex.....	37
5.4.4	Einfluss von Vitaminsupplementation und Diabetikerstatus.....	39
5.4.4.1	Subgruppenanalyse: Verum vs. Placebo.....	39
5.4.4.2	Subgruppenanalyse: Diabetiker vs. Nicht-Diabetiker.....	40
5.5	Studienzeitraum 2002-2014: Follow-Up.....	42
6.	Diskussion.....	44
6.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	44
6.2	Methodische Aspekte.....	44
6.2.1	Limitationen und Stärken der Arbeit.....	44

6.3	Diskussion der Ergebnisse.....	46
6.	Fazit.....	50
7.	Zusammenfassung.....	52
8.	Literaturverzeichnis.....	53
9.	Eidesstattliche Erklärung.....	57
10.	Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung.....	58
11.	Danksagung.....	59
12.	Curriculum Vitae.....	60
13.	Anhang.....	61

1. Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata
AMI	Akuter Myokardinfarkt
BIRNH	Belgian Interuniversity Research on Nutrition and Health
BMI	Body-Mass Index
Bp	Basenpaare (base pairs)
CI	Konfidenzintervall (Confidence Interval)
CKD	Chronische Nierenerkrankung (Chronic Kidney Disease)
CO	Kohlenstoffmonoxid
CRP	C-reaktives Protein
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankung (Cardiovascular Disease)
Dm	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxy Ribonucleid Acid)
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EP	(Gel-) Elektrophorese
ESRD	Terminale Niereninsuffizienz (End-Stage Renal Disease)
FU	Follow-up
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
Hb	Hämoglobin
HDL	High-Density Lipoprotein
Hp	Haptoglobin
Hp1-1	Homozygoter Haptoglobin-Typ 1
Hp2-2	Homozygoter Haptoglobin-Typ 2
Hp2-1	Heterozygoter Haptoglobin-Typ
HR	Hazard Ratio
HRV	Herzratenvariabilität
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-Density Lipoprotein
LVH	Linksventrikelhypertrophie
min	Minuten
NHS	Nurses Health Study
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide)
p	Signifikanzniveau
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
RF	Risikofaktor
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
SCD	Plötzlicher Herztod (Sudden Cardiac Death)
sec	Sekunden
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleichend
vs.	versus
°C	Grad Celsius
μ l	Mikroliter
%	Prozent
z. B.	zum Beispiel

2. Einleitung

2.1 Terminale Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen

Schätzungen zufolge leiden etwa zwei Millionen Menschen in Deutschland an einer chronischen Nierenerkrankung (Chronic Kidney Disease, CKD), ca. 80 000 davon befinden sich aktuell in einem dialysepflichtigen Stadium. Das geht aus Daten der "Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland" hervor, welche im Auftrag des Robert Koch-Institutes zwischen 2008 und 2011 erhoben wurden (1). Die chronische Niereninsuffizienz ist definiert durch eine glomeruläre Filtrationsrate (GFR) $< 60 \text{ ml / min / } 1,73 \text{ m}^2$, welche länger als drei zusammenhängende Monate anhält (2). Bei einer persistierenden GFR $< 15 \text{ ml / min / } 1,73 \text{ m}^2$ gilt ein Patient als terminal niereninsuffizient. Patienten, welche dieses Stadium der End-Stage Renal Disease (ESRD) erreicht haben, bedürfen im Verlauf entweder einer Nierentransplantation oder eines Nierenersatzverfahrens (Dialyse). Die Begriffe terminale Niereninsuffizienz und Dialysepflichtigkeit werden daher im Folgenden synonym verwendet. Die weltweite Prävalenzrate an CKD zu erkranken liegt bei ca. 10-15 % (3). Dabei haben Patienten mit einer Nierenfunktionsstörung ein 10-30 fach höheres Mortalitätsrisiko als Menschen mit normaler Nierenfunktion (4), (5). Die Risikostratifizierung korreliert dabei im Wesentlichen mit der glomerulären Filtrationsrate, wobei ESRD-Patienten das höchste Risiko besitzen, wie Abbildung 1 zeigt (6). Die jährliche Mortalitätsrate jener Patienten wird auf ca. 20 % beziffert, wobei ca. 50 % dieser Todesfälle auf kardiovaskuläre Erkrankungen (Cardiovascular Disease, CVD) zurückgehen (6), (7). Insbesondere der akute Myokardinfarkt (AMI), welcher häufig durch akzelerierte arteriosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße auftritt, spielt hier eine wesentliche Rolle. Darüber hinaus führen Hypertrophien der Herzkammern, lebensbedrohliche Arrhythmien oder Elektrolytverschiebungen gehäuft zum plötzlichen Herztod von Dialysepatienten (Sudden Cardiac Death, SCD) (5), (7).

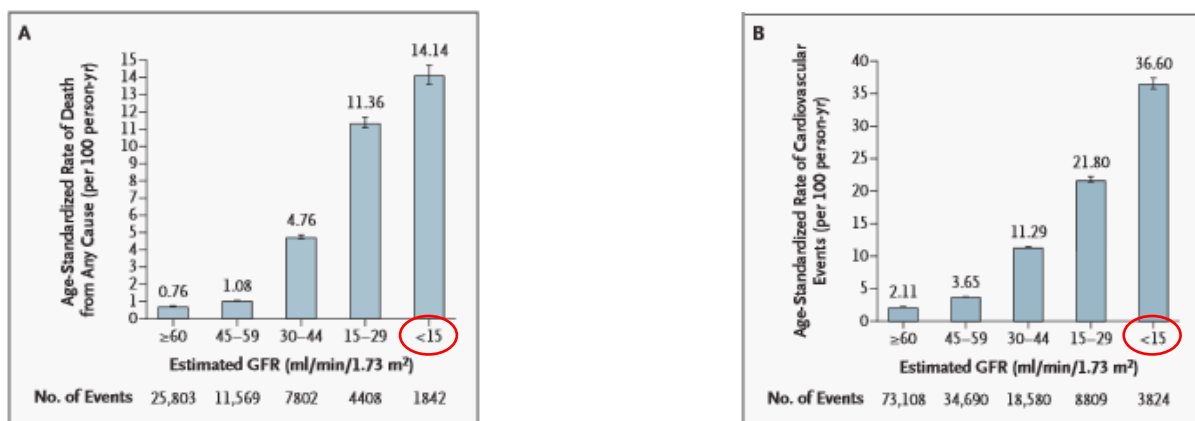


Abbildung 1: Assoziation der Stufen chronischer Niereninsuffizienz mit der Rate kardiovaskulärer Mortalität (A) und kardiovaskulärer Ereignisse (B) (6)

2.2 Kategorien kardiovaskulärer Risikofaktoren

Die Ursachen der hohen kardiovaskulären Morbidität und Mortalität von Dialysepatienten sind sehr vielschichtig und weder in ihren Einzel- noch Wechselwirkungen bisher komplett verstanden. Neben den traditionellen Risikofaktoren, welche auch in der Allgemeinbevölkerung vorkommen, liegen bei ESRD-Patienten häufig spezifische, nephropathiebezogene Risikofaktoren vor, welche sich durch die endokrinologischen und metabolischen Veränderungen im Rahmen der Niereninsuffizienz sowie die Dialysebehandlung an sich ergeben (5). Im Folgenden soll auf beide Gruppen eingegangen werden. Zu den traditionellen Risikofaktoren zählen die arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, Lebensalter und Geschlecht sowie die Familienanamnese. Weitere Risikofaktoren stellen Adipositas, Lipoprotein(a)-Erhöhung, Hypertriglyzeridämie sowie körperliche Inaktivität dar (8). Diese bilden einen wichtigen Pfeiler in der Ätiologie arteriosklerotischer Veränderungen und tragen maßgeblich zu Alterationen des kardiovaskulären Systems bei. Dabei zeigt sich die Arteriosklerose als komplexer multifaktorieller Prozess, welcher meist mit einer Schädigung der Endothelzellschicht (Intima) beginnt und zunächst schleichend verläuft. Durch subendothelial eingewanderte Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten sowie deren entzündungsfördernde Zytokine kommt es anfangs zu lokalisierten inflammatorischen Reaktionen innerhalb der Gefäßwand, welche sich durch die weitere Rekrutierung von Leukozyten und Einlagerung von Lipoproteinen manifestieren und schließlich in die Bildung von Gefäßplaques münden. Im Verlauf führen diese, im Volksmund auch Gefäßkalk genannten Ablagerungen, zur Verhärtung und Stenosierung der Arterien (9).

Die zweite wichtige Gruppe bilden die spezifischen nephropathie- und dialysebezogenen Risikofaktoren. Hier ist neben der urämischen Stoffwechsellage, insbesondere der gestörte Kalzium-Phosphatstoffwechsel mit relativem Kalzium Overload und erhöhter Phosphatretenion problematisch, welcher häufig zu einer prognostisch ungünstigen Mediasklerosierung führt (5). So leiden Dialysepatienten häufiger an valvulären Kalzifikationen und zeigen eine höhere Rate ventrikulärer Arrhythmien als die Allgemeinbevölkerung. Die ventrikuläre Arrhythmie, hervorgerufen durch eine autonome Neuropathie bei chronischer Urämie und häufig co-existentlem Diabetes mellitus, gilt dabei als Hauptrisikofaktor des SCD. Ursache ist eine Imbalance des vegetativen Nervensystems mit Hemmung des vagalen Tonus. Die daraus resultierende Überaktivität des Sympathikus führt zu einer herabgesetzten Herzratenvariabilität (HRV), was wiederum zu lebensbedrohlichen Herzrhythmusstörungen führen kann. Häufig findet sich auch eine

Linksventrikelhypertrophie (LVH), die sich infolge einer arteriellen Hypertonie und Anämie bildet. Die urämischen Toxine führen außerdem zu myokardialen Fibrosierungen und somit zu einer verminderten Reizkonduktion. Es ist nicht selten, dass es im Rahmen des Dialysevorganges zu hämodynamischen Instabilitäten und Verschiebungen des Elektrolythaushaltes kommt, welche ebenfalls zu lebensbedrohlichen Arrhythmien und schließlich zum Herzkreislaufstillstand führen können (10), (11).

Da sowohl die traditionellen als auch die spezifischen, nephropathiebezogenen Risikofaktoren das erhöhte kardiovaskuläre Risiko nur zu einem gewissen Anteil erklären und nicht alle Dialysepatienten das gleiche Risiko kardiovaskulärer Komplikationen zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass noch weitere, bisher unzureichend erforschte Einflussfaktoren, existieren. In den letzten Jahren vermehrt in den Blickpunkt der Wissenschaft gerückt sind dabei verschiedene Biomoleküle, welche über chronische Entzündungsvorgänge und die Induktion von oxidativem Stress einen negativen Einfluss auf das Herzkreislaufsystem nehmen und arteriosklerotische Umbauprozesse an Gefäßen fördern. Hierzu zählen u. a. die Hyperhomozysteinämie, erhöhte Level an Lipoprotein(a), Auto-Antikörper gegen oxidiertes Low-Density Lipoprotein (LDL) sowie das Serumprotein Haptoglobin in seinen verschiedenen Ausprägungen (12). Dabei legen aktuellere Arbeiten nahe, dass Haptoglobin aufgrund seiner biologischen Eigenschaften und genetischen Determinierung als ein weiterer Risikofaktor für CVD anzusehen ist. Einen Überblick relevanter Studien bietet Tabelle 2 auf S. 20. Hier wird deutlich, dass die aktuelle Studienlage bisher nur sehr wenige Daten von ESRD- bzw. Dialysepatienten bereithält, hingegen die Population der Diabetiker bereits gut untersucht scheint (13), (14). So zeigten Levy *et al.* in ihrer 2002 publizierte Studie, dass einer der drei Haptoglobin-Genotypen bei Diabetespatienten mit einem fünffach erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert ist und somit als eigenständiger Risikofaktor für CVD gewertet werden kann (15). Derart eindeutige Daten liegen bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz bisher nicht vor.

Da es sich bei Dialysepatienten um ein besonders sensibles und komplexes Kollektiv mit multiplen Komorbiditäten handelt, ist eine gründliche Erfassung ihres Risikoprofils hier von besonderer Bedeutung. Im Rahmen einer vorangegangenen Studie unserer Kollegen Heinz *et al.* (2010) wurden umfangreiche Daten einer Dialysekohorte gesammelt, welche uns zur weiteren Analyse zur Verfügung standen (38). Auf diese Daten aufbauend, möchte die vorliegende Arbeit den Zusammenhang zwischen dem Serumprotein Haptoglobin und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bei Dialysepatienten untersuchen und damit einen Beitrag zum Verständnis des Einflusses von Biomolekülen leisten.

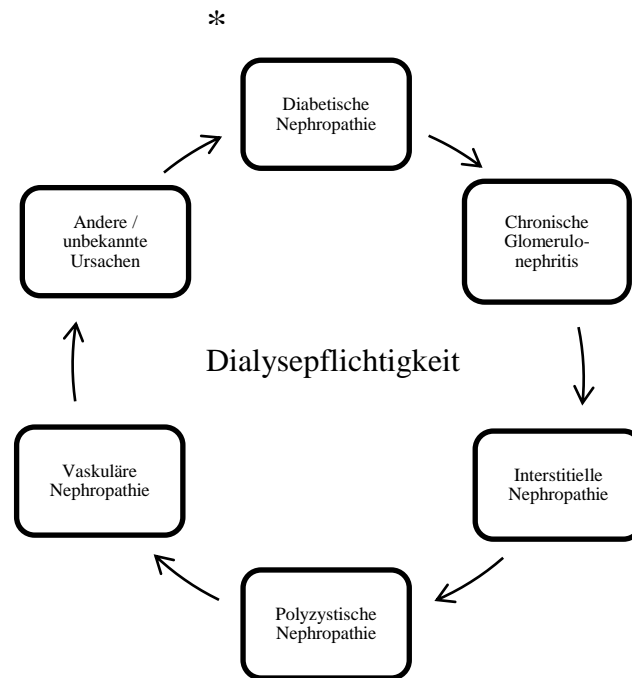


Abbildung 2: Die Grafik veranschaulicht die Pathologien, welche der Dialysepflichtigkeit der Studienkohorte von Heinz *et al.* zugrunde lagen. Beginnend mit der diabetischen Nephropathie sind diese im Uhrzeigersinn in absteigender Häufigkeit dargestellt (38)

2.3 Das Protein Haptoglobin

2.3.1 Ein „neuer“ Risikofaktor für CVD?

Das Protein Haptoglobin (griechisch *Haptein* für Binden) wurde zum ersten Mal 1938 von Polonovski und Jayle beschrieben und 1955 durch Smithies mittels Gelelektrophorese in seinen strukturellen Varianten nachgewiesen (16). Es zählt zu den α_2 -Glykoproteinen und wird von Hepatozyten synthetisiert. Seine Plasmahalbwertszeit beträgt zwischen 3-5 Tagen. Die Aufgaben des Haptoglobins im Organismus sind vielfältig. Seine wichtigste Funktion besteht in der irreversiblen Bindung und konsekutiven Entfernung von freiem Hämoglobin (Hb), welches durch seine Häm-Untereinheit ein hohes Redox-Potenzial besitzt. Durch die Bindung an Haptoglobin kann die Bildung freier Radikale verhindert und das Gewebe, einschließlich des sensiblen Gefäß- und Nierengewebes, vor oxidationsbedingten Schäden und Entzündungsreaktionen geschützt werden. Da die Synthese von Haptoglobin in Gegenwart proinflammatorischer Zytokine zunimmt, wird es auch als positives Akut-Phase Protein bezeichnet (17). Die genetische Grundlage für die Proteinsynthese von Haptoglobin bilden zwei Allele, aus denen drei Genotypen hervorgehen. Die daraus gebildeten Proteine (= Phänotypen), unterscheiden sich wesentlich in Ihrer Form und Größe sowie ihrer pathophysiologischen Wirkweise. Sie besitzen zudem verschiedene molekulare

Eigenschaften, weshalb auch vom funktionellen Polymorphismus des Haptoglobins gesprochen wird.

Dieser ist seit längerem Bestandteil wissenschaftlicher Studien und wurde bereits mit Prädispositionen gegenüber verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert, wobei die Studien hier häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen gelangten (vgl. Tabelle 2 auf S. 20) (17), (18).

2.3.2 Genetik des Haptoglobins und sein funktioneller Polymorphismus

Das Haptoglobinogen befindet sich auf dem Abschnitt q 22 des Chromosoms 16 und besitzt die zwei autosomalen, co-dominanten Hauptallele Hp^1 und Hp^2 , welche die Genotypen $Hp1-1$ und $Hp2-2$ als homozygote Varianten und $Hp2-1$ als heterozygote Variante, bilden. Während Hp^1 aus 5 Exonen besteht, besitzt Hp^2 insgesamt 7 Exone, wobei die Exone 3 und 4 doppelt vorhanden sind und einer durch irreguläres Crossing-over entstandenen Duplikation entsprechen (Abbildung 3). Das Allel Hp^2 konnte bisher ausschließlich beim Menschen nachgewiesen werden, wobei angenommen wird, dass es aus evolutionsbiologischer Sicht zunächst einen Selektionsvorteil gegenüber Infektionskrankheiten vermittelte (18), (19).

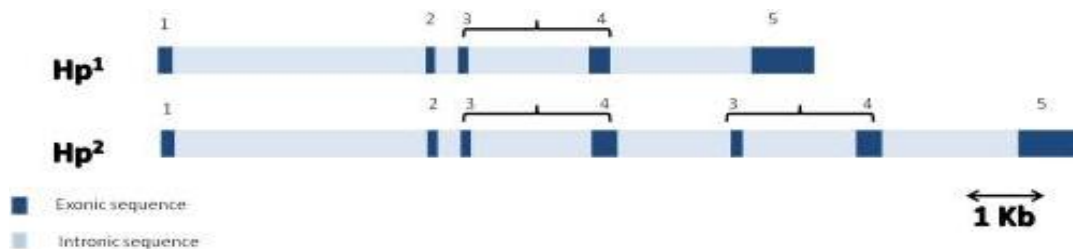


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Hp^1 und Hp^2 Allele mit den duplizierten Exonen 3 und 4 des ersten Allels (19)

Die sich daraus ergebenden Valenzen der Allele (Hp^1 ist monovalent und Hp^2 bivalent) nehmen wiederum Einfluss auf die Polymerstrukturen der gebildeten Proteine. Die tetrameren Haptoglobinmoleküle bestehen aus jeweils zwei Alpha- (leicht) und zwei Beta- (schwer) Polypeptidketten, wodurch sie Ähnlichkeit zu einigen Immunglobulinen haben. Während die Beta-Kette bei Hp^1 und Hp^2 identisch ist, unterscheiden sich die Haptoglobinproteine aufgrund ihres genetischen Polymorphismus in ihrer Alpha-Kette ($Hp^1 = \alpha^1$ und $Hp^2 = \alpha^2$). Hierdurch ergeben sich folgende Proteinfaltblattstrukturen (Abbildung 4).

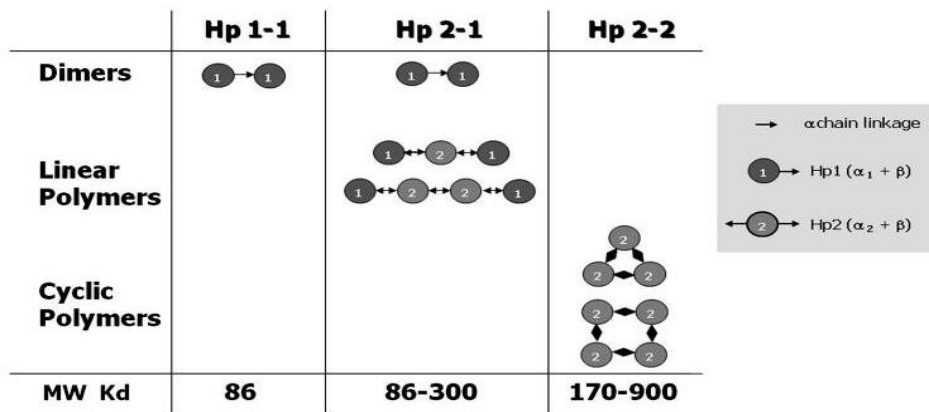


Abbildung 4: Die Abbildung zeigt die Proteinprodukte der drei Genotypen Hp1-1, Hp2-1 und Hp2-2. Der homozygote Typ Hp1-1 formt ausschließlich Dimer Strukturen aus zwei Hp-1 Untereinheiten. Der heterozygote Typ Hp2-1 bildet lineare Polymere aus einer variablen Anzahl von Hp-2 Untereinheiten sowie zwei flankierenden Hp-1 Untereinheiten. Der homozygote Typ Hp2-2 bildet zyklische Polymere aus einer variablen Anzahl an Hp-2 Untereinheiten (19)

Die unterschiedlichen Strukturvarianzen der Proteine bilden in Kombination mit den Molekulargewichten die Grundlage für die molekularbiologische Klassifizierung mittels Elektrophorese (EP), welche 1955 durch Smithies erstmalig beschrieben wurde (16). Neben den oben genannten Hauptvarianten des Haptoglobins, wird in der Literatur auch über vererbte bzw. erworbenen Fälle von Hypo- oder Ahaptoglobinämie (Hp^{Del}) berichtet, welche vornehmlich im ostasiatischen Raum zu finden sind und hier nicht weiter betrachtet werden sollen. Demnach zählt Haptoglobin nicht zu den lebensnotwendigen Proteinen (20).

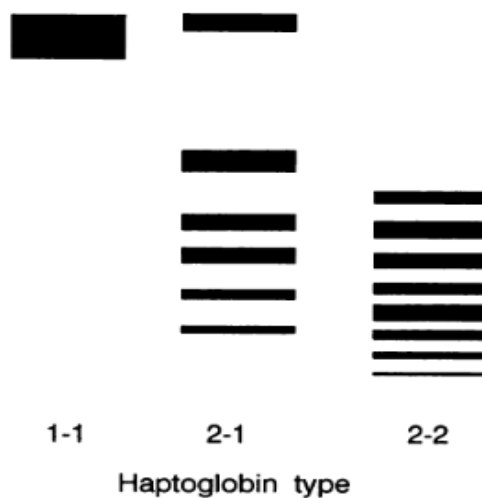


Abbildung 5: Darstellung der typischen Fragmentmuster der drei Genotypen in der Gelelektrophorese. Während Hp1-1 ein einziges, sich schnell bewegendes Fragment besitzt, zeigt Hp2-2 multiple Fragmente, welche sich in Größe und elektrophoretischer Mobilität unterscheiden (21)

2.3.3 Pathophysiologische Eigenschaften des Haptoglobins

Die Molekularratio von Haptoglobin zu Hämoglobin im Blut eines gesunden Menschen liegt bei etwa 400:1. Dabei wird durch den physiologischen "Hämoglobin-turnover" täglich ca. 1 % des Gesamthämoglobins als ungebundenes Hämoglobin freigesetzt. Durch die sofortige Bindung an Haptoglobin ist das Vorkommen von freiem Hämoglobin unter physiologischen Bedingungen sehr selten. Kommt es jedoch zu einem akzelerierten Zerfall von Erythrozyten, wie beispielsweise durch die Filtrationsvorgänge während der Hämodialyse, steigt der Anteil freien Hämoglobins im Blut sprunghaft an (22), (23). Es ist daher anzunehmen, dass die gesteigerte Menge ungebundenen Hämoglobins dazu beitragen kann, den qualitativen Einfluss des Haptoglobin-Polymorphismus auf das kardiovaskuläre System sichtbar zu machen.

2.3.3.1 Antioxidative Eigenschaften

Da extrakorpuläres Hämoglobin durch seine Häm-Fe²⁺-Fraktion zu Redox-Reaktionen mit Sauerstoff bzw. Wasserstoffperoxid befähigt ist, kann es zur Entstehung freier Radikale via Fenton Reaktion ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}^\cdot$) kommen. Die entstehenden Hydroxid- und Hydroxyl-Radikale führen durch Erhöhung des oxidativen Stresses zu Schäden an endothelialen Zellen der Blutgefäße, indem sie die Oxidation von Low-Density Lipoproteinen und High-Density Lipoproteinen (HDL) fördern und dadurch die Bildung arteriosklerotischer Plaques beschleunigen (24), (25).

Nebenbei bietet freies Hämoglobin als eisenhaltiges Protein eine Nahrungsquelle für pathogene Bakterien und kann so zu einer Aggravation bakterieller Infektionen führen (26). Die Aufgabe des Haptoglobins besteht darin, diesen pathologischen Prozessen entgegenzuwirken, indem es eine irreversible Verbindung mit freiem Hämoglobin eingeht und so dessen Oxidationspotential unterbindet. Durch Formung von Hp/Hb-Komplexen wird das Häm-Fe²⁺ Molekül innerhalb des Hämoglobins stabilisiert, sodass dessen Einfluss auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) vermieden wird. Der Großteil der Komplexe (ca. 90 %) wird über die Hepatozyten sowie die ortsständigen Makrophagen der Leber (Kupfferzellen) abgebaut, der kleinere Anteil (ca. 10 %) wird über das besonders im extravasalen Bereich arbeitende mobile Monozyten-/Makrophagen-System eliminiert. Eine zentrale Rolle beim Abbau spielt der von aktivierten Makrophagen exprimierte CD163-Rezeptor, welcher auch als Scavenger-Rezeptor des Hp/Hb-Komplexes bezeichnet wird (24), (27). Rezeptorvermittelt werden die Hp/Hb-Komplexe identifiziert, gebunden und mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen und lysosomal gespalten. Das freiwerdende Häm wird

durch die Häm-Oxygenase zu Biliverdin und weiter zu Bilirubin abgebaut, Fe^{2+} und Kohlenstoffmonoxid (CO) werden aus dem Komplex herausgelöst. Das freie Eisen verbleibt entweder intrazellulär und wird als Ferritin gespeichert oder mittels Ferroportin-1 ins Plasma transportiert, wo es an der Synthese neuer Proteine (u. a. Hämoglobin) beteiligt ist. Durch die Ankopplung des Hp/Hb-Komplexes an den CD163-Rezeptor wird eine intrazelluläre Signalkaskade angestoßen, welche die Häm-Oxygenase Aktivität stärkt und zur Freisetzung verschiedener Zytokine führt. Diese fördern im Sinne eines positiven Feedbacks wiederum die Expression von CD163 (21). Dieser Mechanismus erfüllt zwei Aufgaben: Freies Hämoglobin wird unschädlich gegenüber Gefäßen und Nierengewebe gemacht. Außerdem dient es durch die Rückführung der Häm-Einheit der Wiederverwertung wertvoller Proteinbausteine. Diesen Prozess zeigt die Abbildung 6.

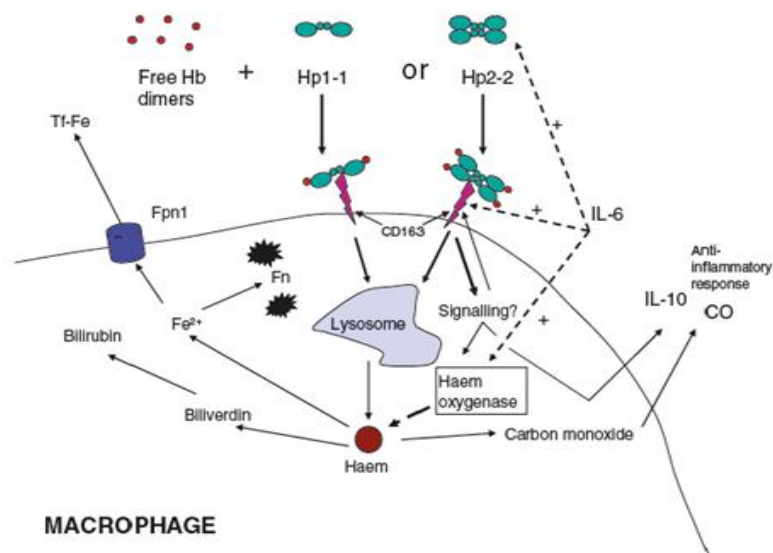


Abbildung 6: Schematische Darstellung der verschiedenen Schritte des Hp/Hb-Komplexabbaus. Gezeigt werden die Ankopplung der Hp/Hb-Komplexe an den CD163-Rezeptor eines Makrophagen, das Auslösen verschiedener Signalkaskaden in Abhängigkeit des Haptoglobulin-Typs sowie der intrazelluläre Abbau der Hp/Hb-Komplexe in ihre Einzelprodukte (21)

Welcher Haptoglobin-Typ (Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2) schützt den Organismus nun besser vor oxidativem Stress und warum? Um diese Frage zu beantworten, müssen die Prozesse der Haptoglobin-Hämoglobin Interaktion sowie der Wechselwirkung mit dem CD163-Rezeptor aktivierter Makrophagen genauer betrachtet werden. Zudem spielt die Molekülgröße des Proteins eine wesentliche Rolle. Auf folgende Aspekte und molekularbiologische Teilschritte soll dabei besonders Bezug genommen werden.

1. Binden des freien Hämoglobins durch Haptoglobin (Bildung der Hp/Hb-Komplexe)
2. Ankopplung und Ingestion der Hp/Hb-Komplexe an/durch den Makrophagen
3. Möglichkeit der Migration der Hp/Hb-Komplexe in extravasales Gewebe

1. Der Hp1-1 Typ besitzt die stärkste Bindungskapazität gegenüber freiem Hämoglobin und bindet dieses effektiver als Hp2-1 oder Hp2-2. Zudem erfolgt die Isolierung der redoxbereiten Fe^{2+} -Einheit aus dem Hämoglobinmolekül durch Hp1-1 wesentlich schneller, als durch die anderen beiden Typen, was deutlich zur Verminderung des Oxidationspotenzials beiträgt (28).

2. Die Hp2-2/Hb-Komplexe zeigen eine höhere Affinität zum CD163-Rezeptor als die anderen beiden, was am ehesten durch die höhere Anzahl an Bindungsstellen der zyklischen Polymere zu erklären ist (Abbildungen 4 und 7). Durch die Bindung kommt es zu einer vermehrten Makrophagenaktivierung, verbunden mit einer gesteigerten Effektivität der Hp/Hb-Komplexentfernung. Jedoch werden durch die Hp2-2/Hb-Komplexe in erster Linie proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6) sowie Tumornekrosefaktor α (TNF- α) induziert, welche den Entzündungsvorgang weiter fördern und unterhalten. Im Gegenzug verstärkt der Hp1-1/Hb-Komplex über seine Ankopplung an den Makrophagen seine antioxidative Wirkung, indem er die Produktion antiinflammatorischer und antiatherogener Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) induziert (17), (20), (27), (28), (29).

3. Da die Genese der Arteriosklerose maßgeblich durch Gefäßwandveränderungen und Bildung gefäßwandständiger Plaques gekennzeichnet ist, ist neben der intravasalen Hb-Bindung, auch die extravasale Hp/Hb-Komplexierung von wesentlicher Bedeutung zur Vermeidung von oxidativem Stress. Während die Hp1-1 Dimere aufgrund ihrer Molekülgröße problemlos in subendotheliales Gewebe und arteriosklerotische Plaques migrieren können, werden die vergleichsweise großen Hp2-2 und Hp2-1 Polymere zurückgehalten. Im Falle von Gefäßwandschädigungen oder Plaquerupturen, ist es den Hp1-1 Molekülen so möglich, die redoxaktiven Fe^{2+} -Einheiten auch innerhalb der Gefäßwand bzw. des Plaques zu binden und so zur Plaquestabilisierung beizutragen (30). Da Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und Dialysetherapie meist von arteriosklerotischen Veränderungen betroffen sind und/oder Schädigungen des Gefäßwandendothels aufweisen, ist dieser Aspekt in der vorliegenden Arbeit als besonders wichtig zu erachten (31).

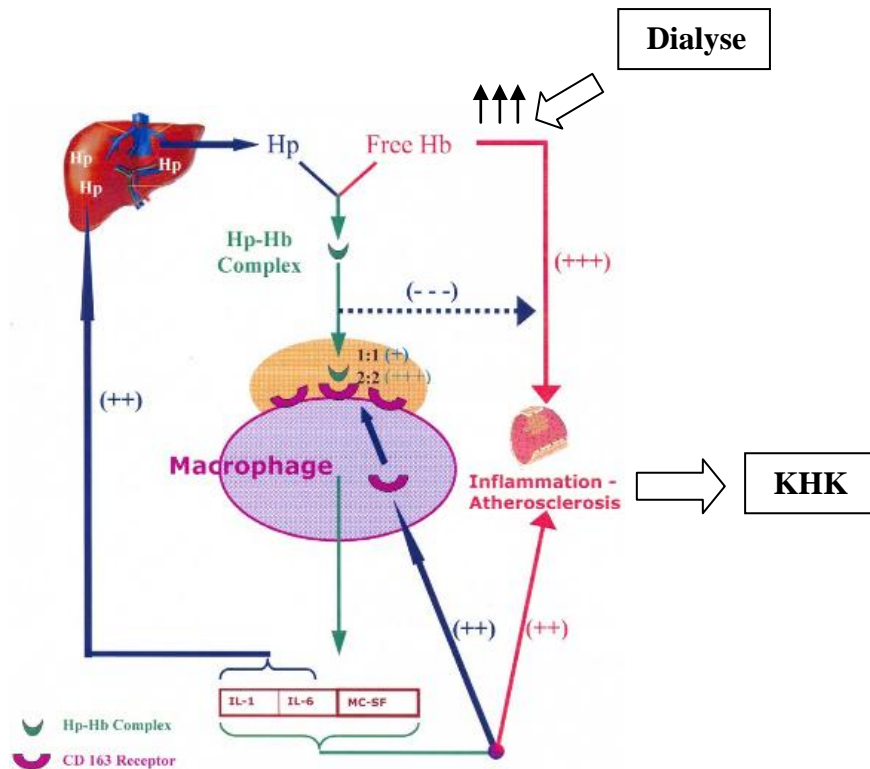


Abbildung 7: Das Schema veranschaulicht die Komplexierung von freiem Hämoglobin und Haptoglobin sowie deren unterschiedliche Affinität bei Kopplung an den CD163-Rezeptor. Während der homozygote Typ 1 (Hp1:1) eine geringe Affinität (+) zum Scavenger-Rezeptor aufweist, zeigt der homozygote Typ 2 (2:2) aufgrund seiner zyklischen Polymere eine hohe Affinität (+++) (28)

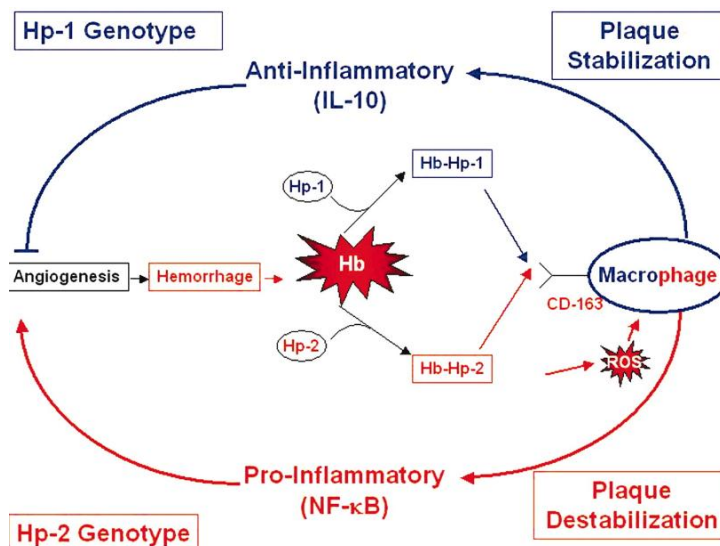


Abbildung 8: Darstellung der gegensätzlichen Wirkweisen des Hp1-1 und Hp2-2 Genotyps bei extravasaler Hämorrhagie. Während der Hp1-1/Hb-Komplex antiinflammatorische Zytokine generiert, verursacht der Hp2-2/Hb-Komplex die vermehrte Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und fördert dadurch die Entzündungsreaktion und Plaqueinstabilität (32)

2.3.3.2 *Inhibition der Prostaglandinsynthese*

Die Haptoglobinsynthese steigt im Falle von Entzündungsprozessen und/oder Karzinomprogress im Körper um 200-500 % an, weshalb dem Akut-Phase Protein auch immunregulatorische Eigenschaften zugeschrieben werden. Langlois und Delanghe fanden, dass Haptoglobin die mikrosomale Konversion von Arachidonsäure zu Prostaglandin-E2 inhibiert und so die Prostaglandinsynthese unterdrückt. In Abhängigkeit des Haptoglobin-Typs kommt es dadurch zu unterschiedlich stark ausgeprägten antiinflammatorischen Effekten. Hp2-2 zeigt dabei die geringsten antiinflammatorischen Eigenschaften (18).

2.3.3.3 *Wechselwirkungen mit Stickstoffmonoxid*

Stickstoffmonoxid (NO), auch Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) genannt, ist ein freies Radikal, welches u. a. von den Endothelzellen der Gefäße und Makrophagen synthetisiert wird und über seinen vasodilatativen Effekt, einen essentiellen Einfluss auf die Homöostase von Gefäßtonus und Blutfluss nimmt (33). Zudem moduliert es die Funktionen von Neurotransmittern des zentralen sowie peripheren Nervensystems und beeinflusst die Thrombozytenaggregation sowie die zelluläre Abwehrfunktion (33). Im Gegensatz zu ungebundenem Haptoglobin, sind Hp/Hb-Komplexe und freies Hämoglobin in der Lage, die Bildung von NO zu unterdrücken und somit einen adversen Effekt auf die Endotheliumrelaxation auszuüben. Da die verminderte Vasodilatation respektive induzierte Vasokonstriktion das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse steigern kann, ist eine schnelle Eliminierung des freien Hämoglobins bzw. der Hp/Hb-Komplexe von wesentlicher Bedeutung für einen ausgeglichenen Vasotonus (34). Der Hp1-1 Genotyp zeigt sich aufgrund seiner schnelleren Clearance aus dem Plasma hier im Vorteil (22).

2.3.3.4 *Angiogenetische Eigenschaften*

Haptoglobin spielt eine wichtige Rolle in der Endothelzellproliferation und -differenzierung, indem es in die Zellmigration und Umstrukturierungsprozesse der Gefäße eingreift. Im Falle chronisch entzündlicher Zustände und systemischer Vaskulitiden, trägt es maßgeblich zur Gewebereparatur bei und verhindert durch die Neubildung kollateraler Gefäße u. a. ischämische Zustände des Gewebes (36), (37). Einen interessanten Aspekt konnten Delanghe *et al.* bereits 1999 nachweisen, als sie zeigten, dass bei Patienten mit einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK), eine Überrepräsentation des Hp2-2 Genotypen vorliegt. Diese Verteilung spricht zum einen für eine Prädisposition des Hp2-2 Typs, eine pAVK zu entwickeln. Zum anderen zeichneten sich diese Patienten gleichzeitig durch eine

längere Laufristanz aus, als Patienten der Typen Hp1-1 und Hp2-1. Patienten mit Hp2-2 zeigten im Vergleich zu den Anderen mehr Kollateralgefäße, was wiederum für eine größere angiogenetische Potenz des Hp2-2 Typs spricht. Hp2-2 fördert demnach die Neoangiogenese in höherem Maße als Hp1-1 und Hp2-1 (37).

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen pathophysiologischen Wirkweisen des Haptoglobin-Polymorphismus bezüglich der Entstehung von CVD (28)

Eigenschaften des Haptoglobins	Hp1-1	Hp2-1	Hp2-2
Antioxidative Fähigkeiten	+++	++	+
Bindung freien Hämoglobins	+++	++	+
Ankopplung des Hp/Hb-Komplexes an den CD163-Rezeptor und Makrophagenaktivierung	+	++	+++
Plasma Clearance der Hp/Hb-Komplexe	+++	++	+
Extravasale Migration und Plaquestabilisierung	+++	++	+
Inhibition der Prostaglandinsynthese	+++	++	+
Vasodilatation über Wechselwirkung mit NO	+++	++	+
Angiogenetische Eigenschaften/ Neoangiogenese	+	++	+++

Legende: +++ stark ++mittel +schwach

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Hp1-1 Typ aufgrund seiner molekularbiologischen Struktur und interaktiven Wirkweise mit freiem Hämoglobin, das höhere antioxidative und antiatherogene Potential besitzt und im Wesentlichen einen protektiven Effekt auf das Herzkreislaufsystem ausübt. Hp2-2 dagegen birgt aufgrund seiner geringeren Hb-Bindungskapazität und seines Unvermögens bei Gefäßwandschädigungen und Plaquerupturen auch extravasal freies Hämoglobin zu binden, ein höheres Risikopotenzial gegenüber kardiovaskulären Erkrankungsbildern. Der heterozygote Typ Hp2-1 zeigt sich in seiner Funktionalität mittig der beiden homozygoten Typen und besitzt prinzipiell ein "intermediäres" Risikoprofil für CVD.

Trotz der bekannten pathophysiologischen Funktionen des Haptoglobin-Polymorphismus, liegen aktuell keine verlässlichen Daten bezüglich deren Relevanz bei dialysepflichtigen Patienten vor. Um diese Lücke zu schließen, möchte sich die vorliegende Arbeit der Fragestellung widmen, ob es eine Assoziation zwischen dem Haptoglobin-Polymorphismus und dem Auftreten fest definierter kardiovaskulärer Ereignisse bzw. der Mortalitätsrate bei ESRD-Patienten gibt.

2.4 Übersicht aktueller Studien

Tabelle 2: Übersicht relevanter Studien, welche die Assoziation zwischen dem Haptoglobin-Polymorphismus und CVD untersucht haben

Studie/ Arbeits- gruppe	Studienpo- pulation	Studiendesign	FU (in Jah- ren)	Ergebnisse	p-Wert
De Bacquer <i>et al.</i> (2001)	Normalpopu- lation mit und ohne Diabetes	Fall-Kontroll Studie innerhalb einer populationsbasierten Longitudinalstudie	10	Hp1-1 hat höheres Risiko für koronare Ereignisse -> unabhängiger RF	p = 0,00
Levy <i>et al.</i> (2002)	Normalpopu- lation mit und ohne Diabetes	Fall-Kontroll Studie innerhalb der Strong- Heart-Studie	6	Hp2-2 Diabetiker haben 5- fach erhöhtes Risiko für CVD gegenüber Hp1-1 Diabetikern -> unabhängiger RF	p = 0,00
Levy <i>et al.</i> (2004)	Normalpopu- lation mit und ohne Diabetes	Querschnittsuntersu- chung innerhalb der Framingham-Heart Offspring Studie	3	<u>Ohne Diabetes:</u> Hp1-1 hat niedrigeres Risiko für CVD gegenüber Hp2-1, nicht jedoch gegenüber Hp2-2 <u>Mit Diabetes:</u> Hp1-1 hat höheres Risiko für CVD gegenüber Hp2-1 und Hp2- 2	p < 0,05
Strandhave <i>et al.</i> (2013)	Patienten CKD-Stadium 2-5	Querschnittstudie	kein FU	Hp2-2 zeigt signifikante Assoziation mit CVD- Markern "Herzratenvariabilität" (HRV) und "high-sensitive CRP" (hsCRP)	$P_{HRV} =$ 0,02 $P_{hsCRP} =$ 0,00
Pernod <i>et al.</i> (2004)	Dialysepatien- ten mit und ohne Diabetes	Querschnittstudie	k. A.	Hp2-2 hat höheres Risiko gegenüber CVD ohne Assoziation zum Diabetes Status	p = 0,01
Chapelle <i>et</i> <i>al.</i> (1982)	Patienten mit gesichertem Myokardin- farkt	Fall-Kontroll Studie	2	Hp2-2 zeigt keine erhöhtes Risiko für Myokardinfarkte vgl. mit gesunden Probanden, jedoch zeigen Hp2-2 Patienten schwerwiegendere Infarkte als Hp2-1 und Hp1-1	p = 0,05

3. Zielstellung und Arbeitshypothesen

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Zusammenhang zwischen Haptoglobin-Polymorphismus und Mortalität bzw. Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse an einem Kollektiv von Dialysepatienten zu untersuchen. Da Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz nachweislich eine deutlich höhere Mortalitätsrate als die Allgemeinbevölkerung aufweisen sowie ein erhöhtes Risiko besitzen, in ihrem Leben an CVD zu erkranken, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich neben den bereits etablierten Risikofaktoren, noch ein weiterer eigenständiger kardiovaskulärer Risikofaktor identifizieren lässt. In den Fokus der Untersuchung gestellt wird dabei das Protein Haptoglobin mit seinen funktionell verschiedenen Geno- bzw. Phänotypen Hp1-1, -2-1 und -2-2, deren Relevanz als kardiovaskulärer Risikofaktor bereits in mehreren Studien innerhalb verschiedener Patientenpopulationen nachgewiesen wurde. Da in diesem Zusammenhang aktuell keine publizierten Daten zu ESRD-Patienten vorliegen, besteht das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, die Haptoglobin-Genotypen unseres Kollektivs von Dialysepatienten zu ermitteln und diese retrospektiv in Bezug auf die Gesamtmortalität bzw. in Bezug auf das Auftreten fest definierter CVD Ereignisse auszuwerten. Folgende Fragstellungen sollen damit beantwortet werden:

Welche Verteilung der Haptoglobin-Genotypen liegt in einer Population von ausschließlich Dialysepatienten vor?

Nimmt der Haptoglobin-Polymorphismus überhaupt einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtmortalität und/oder das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse in einem Kollektiv mit ausschließlich Dialysepatienten?

Lässt sich nachweisen, dass der Hp1-1 mit längeren Überlebenszeiten sowie einem verminderten Auftreten von CVD einhergeht (protektiver Typ), während der Hp2-2 ein schlechteres Outcome der Patienten bedingt (Risikotyp)? Der Hp2-1 sollte sich intermediär zeigen.

Welchen Einfluss nimmt der Haptoglobin-Genotyp innerhalb der Subgruppen "Diabetiker vs. Nicht-Diabetiker" und Vitaminsupplementation "Verum vs. Placebo" hinsichtlich des Auftretens von CVD?

Statistische Endpunkte der Auswertung bilden die **Gesamtmortalität**¹, das Auftreten einer **kardiovaskulären Erkrankung**² (tödlich / nicht tödlich) sowie das Auftreten der Einzelereignisse **akuter Myokardinfarkt** und **Apoplex** (tödlich / nicht tödlich) während des Beobachtungszeitraums. Des Weiteren soll der Einfluss des Diabetikerstatus sowie der verabreichten Vitaminsupplementation (im Rahmen der vorangegangenen klinischen Studie desselben Studienkollektivs) mittels Subgruppenanalyse untersucht werden. Langfristig soll die vorliegende Studie einen Beitrag zur Verbesserung der Risikostratifizierung bei Dialysepatienten leisten und idealerweise zu deren Therapieoptimierung beitragen.

¹ Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod, Apoplex, Thrombosen, Lungenarterienembolie, Lungenödem, Karzinom, Sepsis, Diabetes Folgeerkrankung, Mesenterialinfarkt, Hirnblutung, rupturiertes Aortenaneurysma, unklare Ursachen

² Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod, Apoplex, Angina pectoris, pAVK, herzchirurgische Eingriffe

4. Material und Methoden

4.1 Patienten

Die vorliegende Arbeit stützt sich u. a. auf Patientendaten, welche im Rahmen der Studie von Heinz *et al.* (2010) erhoben wurden und untersuchen wollte, ob sich durch die Supplementierung von B-Vitaminen (Folsäure, Vitamin B₆, Vitamin B₁₂) das Mortalitätsrisiko und Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Dialysepatienten reduzieren lässt. Die Daten dieser randomisierten kontrollierten Studie wurden zwischen Juli 2002 und Juli 2008 an 33 kooperierenden Dialysezentren Nord- und Ostdeutschlands erhoben und schlossen neben der Gewinnung von Blutproben, auch eine umfassende Erhebung epidemiologischer sowie medizinischer Daten ein. Innerhalb des Beobachtungszeitraums wurden die Patienten einmal jährlich zu einem Follow-up Interview geladen, bei welchem jegliche Änderungen ihrer Krankengeschichte detailliert dokumentiert wurden. Die Patienten waren zum Zeitpunkt der Datenerhebung seit mindestens einem Monat dauerhaft dialysepflichtig. Ausschlusskriterien waren ein innerhalb der letzten sechs Wochen vor Studienbeginn aufgetretenes koronares Ereignis, die Diagnose eines aktiv malignen Tumors sowie die Abhängigkeit von alkoholischen und/oder toxischen Substanzen. Schwangere Frauen sowie Frauen, die aktuell stillten, waren ebenfalls ausgeschlossen.

Heinz *et al.* fanden, dass die erhöhte Zufuhr der von Ihnen verabreichten Vitamine (Verumgruppe vs. Placebogruppe) keinen signifikanten Effekt auf die Mortalität oder das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen innerhalb ihres Studienkollektivs hatte (38).

4.1.1 DNA-Proben

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Patientenproben bestanden aus genomischer DNA, welche nach der initialen Blutentnahme mittels Purification Kit gewonnen wurde (Puregene Isolations-Kit, Qiagen Sciences, Maryland, USA). Die Lagerung der DNA-Proben erfolgte bei -19 °C und ununterbrochener Kühlung in einem luftdicht verschlossenen Behältnis. Insgesamt wurden 654 DNA-Proben analysiert. Bei 619 Proben konnte der Haptoglobin-Genotyp eindeutig bestimmt werden, so dass sie in die statistische Auswertung eingingen.

4.2 Chemikalien der Laborverfahren

4.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

A. Go Taq®Green Master Mix der Firma Promega Corporation, Madison, WI, USA bestehend aus:

- Go Taq®DNA-Polymerase (mit fehlender 5' → 3' Exonukleaseaktivität)
- 2X Go Taq®Reaction buffer (pH 8,5) incl. blauem und gelbem Farbstoff
- 400 µM dATP
- 400 µM dGTP
- 400 µM dCTP
- 400 µM dTTP
- 3 mM MgCl₂

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotid Primer (Firma JenaGen, Jena, D)

Primer	Oligo-Sequenz (5' → 3')	Hp-spezifische Sequenz der Basenpaare
A	5'-GAGGGGAGCTTGCCTTTCCATTG-3'	} Hp¹ spezifisch: 1757bp (AB)
B	5'-GAGATTTTTGAGCCCTGGCTGGT-3'	
C	5'-CCTGCCTCGTATTAAGTGCACCAT-3'	} Hp² spezifisch: 1923bp (AD)
D	5'-CCGAGTGCTCCACATAGCCATGT-3'	
		} Hp² spezifisch: 349bp (CD)

Gezeigt werden die verwendeten Oligonucleotid Primer zur Amplifizierung der allelspezifischen Sequenzen von Hp¹ und Hp². Die Hp¹-spezifischen Sequenzen werden durch die Primer A und B, die Hp²-spezifischen Sequenzen durch Primer A, C und D amplifiziert. Angegeben sind die entsprechenden Basenpaarfragmente (basepairs, bp).

Die Tabelle 3 zeigt die für die Haptoglobin-Genotypisierung notwendigen allelspezifischen Primersequenzen sowie deren entsprechende Basenpaarfragmente. Für die Genotypisierung waren insbesondere die Hp¹-spezifische Sequenz von 1757bp (Primerpaar AB) sowie die Hp²-spezifischen Sequenzen von 349bp (CD) und 1923bp (AD) von Bedeutung. Außerdem entstanden im Reaktionsansatz allelunspezifische Amplifikationsprodukte von 196bp (Primer AD) und 195bp (Primer BC).

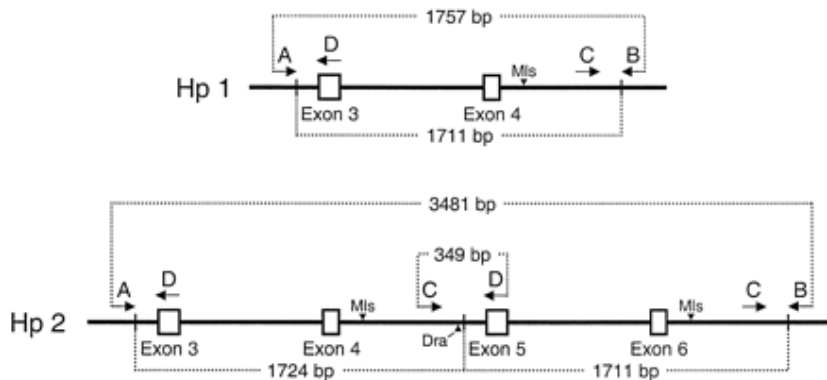


Abbildung 9: Veranschaulicht werden die Abschnitte des Hp¹- und Hp²-Allels und deren spezifische Primerbindungsstellen innerhalb der DNA-Sequenz. Die Richtung der Pfeile indiziert die Orientierung der Primer. Die Haptoglobin spezifischen PCR-Produkte werden über die Sequenz der Basenpaare veranschaulicht (42)

4.2.2 Gelelektrophorese

A. Agarosegel 1 %, hergestellt aus:

- 1 g Agarose-Standardpulver, Roti@garose, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, D
- 5 µl Ethidiumbromid 1 %, MP Biomedicals, LLC, Ohio, USA
- 100 ml 0.5X TBE-Puffer (hergestellt aus 5X TBE-Puffer in Verdünnung 1:10)
→ 5X TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA Puffer), bestehend aus 54 gm Tris, 27,5 gm Borsäure, 20 ml EDTA (0,5 M) → Auffüllen der Lösung mit 1000 ml *Aqua destillata* (*Aqua dest.*)

B. DNA-Standardmarker (Fermentas/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)

1. O'Range Ruler 200bp DNA-Ladder Ready-to-use (200-3000bp), beinhaltet:
 - 6X Orange DNA Loading Dye (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0.15 % orange G, 0.03 % Xylene Cyanol FF, 60 % glycerol, and 60 mM EDTA).
 - Storage and Loading Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM EDTA, 0,025 % orange G, 0,005 % Xylene Cyanol FF, 10 % glycerol)
2. MassRuler Low Range DNA-Ladder Ready-to-use (80-1031bp), beinhaltet:
 - 6X MassRuler DNA Loading Dye (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03 % Bromophenol-Blau, 60 % Glycol, 60 mM EDTA)
 - Storage and Loading Buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM EDTA, 0,005 % Bromophenol Blau, 10 % Glycerol)

4.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien für PCR und Elektrophorese

Geräte	Modell	Hersteller
Elektrophoreseeinheit/ Spannungsgeber	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories, München
Filterpapier	Standard	Standard
Horizontale Gel- elektrophoresekammer mit Kämmen	Sub-Cell® GT cell	Bio-Rad Laboratories, München
Pipettenspitzen	Präzisionsspitzen (1-10 µl, 2- 20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 250-2500 µl)	Eppendorf AG, Wesseling- Berzdorf, D
Präzisionspipetten	"Research" (1-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 250- 2500 µl)	Eppendorf AG, Wesseling- Berzdorf, D
Software zur Bildbearbeitung des UV-Illuminators	BioDocAnalyze Software	Biometra® GmbH, Göttingen, D
Sterilwerkbank	DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T	Biosan, Riga, LV
Thermocycler	T3-Thermocycler	Biometra® GmbH, Göttingen, D
UV-Illuminator	BioDocAnalyze Transilluminator	Biometra® GmbH, Göttingen, D
Vortex-Gerät	Vortex-2-Genie	Scientific Industries, Inc.
Waage	Analysewaage	Kern ABS•ABJ
Zentrifuge	Tischzentrifuge Hettich Mikro 20, 2004	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D
Zentrifugenröhrchen/ "tubes"	Standard	Eppendorf AG, Wesseling- Berzdorf, D

4.4 Methoden

4.4.1 Das Grundprinzip der PCR-Analytik

Das Grundprinzip der Polymerase-Kettenreaktion beruht auf der *in-vitro* Amplifizierung eines definierten Abschnitts der Ziel-DNA, welche als Matrize fungiert. Dabei wird der Vorgang in mehrere Zyklen unterteilt. Zunächst erfolgt die vollkommene Trennung der DNA-Doppelhelix sowie der Primer, so dass nur noch Einzelstränge vorliegen (Denaturierung). Das anschließende abrupte Abkühlen auf ca. 65 °C verhindert die Rückbildung der Doppelstränge und erlaubt gleichzeitig das Anlagern spezifischer Primer an der Target-Sequenz der Ziel-DNA in 3' → 5' Richtung (Primer Annealing). Im darauffolgenden Schritt der Elongation erfolgt die Anlagerung der DNA-Polymerase an das 3'-Ende des Primers sowie die Synthese des Komplementärstranges in Richtung der Matrizen-DNA aus frei vorliegenden Nukleotiden. Die Zyklen wiederholen sich nach definierten Vorgaben (zwischen 30 und 60 Mal), wobei die Produkte des vorherigen Zyklus als Ausgangssubstanz des nächsten Zyklus dienen. So kann eine exponentielle Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz erreicht werden. Nach Vollendung aller Zyklen stehen die Probenansätze der weiteren Analyse zur Verfügung (39).

4.4.2 Vorbereitung und experimentelle Optimierung der Methodik

Da sowohl die Patientenproben, als auch PCR-Verbrauchsmaterialien bei -19 °C tiefgefroren waren, wurden sie vor Pipettierung des Reaktionsansatzes für ca. 10 min bei Raumtemperatur angewärmt, anschließend 5 sec auf dem Vortexgerät geschüttelt und für 10 sec zentrifugiert. Alle verwendeten Primer wurden vor Erstbenutzung unter sterilen Bedingungen mit *Aqua dest.* (im Verhältnis 1:10) verdünnt, so dass die Arbeitskonzentration der Primer bei jeweils 10 µM lag. Zur Kalkulierung der optimalen Versuchsbedingungen wurden mehrere Testläufe durchgeführt. Dazu wurden die Menge und Kombination der verwendeten Primer sowie die Menge der applizierten DNA und die PCR-Bedingungen variiert und optimiert. Es wurden jeweils 2 µl DNA pro Probe in die PCR eingesetzt. Um eine bevorzugte Amplifizierung der kurzen Fragmente zu unterbinden, entschieden wir uns für die separate Durchführung der PCR's entsprechend der allelspezifischen Sequenzen von Hp¹ und Hp². Für jeden Patienten wurden dementsprechend zwei Ansätze durchgeführt (vgl. Tabelle 5 und 6, S. 28). Zunächst führten wir Testläufe mit den Primerpaaren A und B (= Primerset AB) sowie C und D (= Primerset CD) durch, entschieden uns dann jedoch zusätzlich einen Kontrollprimer pro Set hinzuzufügen, um somit eine interne Kontrolle zu generieren.

4.4.3 PCR-Testdurchführung

4.4.3.1 Standard Reaktionsansatz für Primerprotokoll ABD

Tabelle 5: Reaktionsansatz mit Reagenzien zur Darstellung der Hp¹-spezifischen Bande von 1757bp

Reagenzien	Volumen	
Go Taq® Green Master Mix	25 µl	
Primer A (10 µM)	1,5 µl	
Primer B (10 µM)	1,0 µl	= 50 µL pro Test Tube
Primer D (10 µM) (Interne Kontrolle)	0,5 µl	
Nuklease freies H ₂ O	20 µl	
DNA	2 µl	

4.4.3.2 Standard Reaktionsansatz für Primerprotokoll CDB

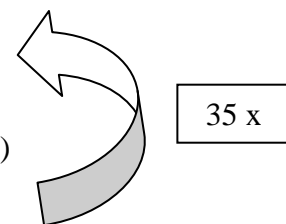
Tabelle 6: Reaktionsansatz mit Reagenzien zur Darstellung der Hp²-spezifischen Bande von 349bp

Reagenzien	Volumen	
Go Taq® Green Master Mix	25 µl	
Primer C (10 µM)	1,5 µl	
Primer D (10 µM)	1,0 µl	= 50 µL pro Test Tube
Primer B (10 µM) (Interne Kontrolle)	0,5 µl	
Nuklease freies H ₂ O	20 µl	
DNA	2 µl	

4.4.3.3 Thermocyclerbedingungen

Die einzelnen PCR-Zyklen wurden unter folgenden Bedingungen in einem T3-Thermocycler der Firma Biometra durchgeführt:

1. Denaturierung bei 95 °C für 5 min
2. Annealing bei 64 °C für 30 sec
3. Elongation bei 72 °C für 120 sec (für lange PCR Produkte)
4. Finale Elongation bei 72 °C für 7 min
5. Nach Abschluss Herunterkühlen auf 4 °C ∞



Initial wurden DNA und Primer für 5 min bei 95 °C denaturiert bevor anschließend bei 64 °C das Annealing der Primer an ihre DNA Zielsequenzen für 30 sec stattfand. Anschließend erfolgte die Amplifikation der Zielprodukte bei 72 °C für 120 sec. Die finale Extension fand erneut bei 72 °C statt und dauerte 7 min. Anschließend kühlte der Thermocycler auf 4 °C und verblieb bis zum Ende bei dieser Temperatur.

4.4.4 DNA-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden auf ein 1 % es Agarosegel aufgetragen. Hierzu wurden 1 g Standardagarose abgemessen, mit 100 ml TBE-Puffer (0.5X TBE) vermischt und in der Mikrowelle kurz erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde das noch flüssige Gel mit 5 µg Ethidiumbromid versetzt und in die horizontale Elektrophoresekammer gegeben. Den einzelnen PCR-Produkten wurde 5 µg des entsprechenden DNA-Loads (O`Range Ruler 200bp DNA-Ladder für Primerpaar ABD und MassRuler Low Range DNA-Ladder für Primerpaar CDB) hinzugefügt bevor sie vorsichtig in die einzelnen Wells pipettiert wurden. Hier wurde immer nach dem gleichen Schema vorgegangen. Der erste Slot wurde mit 5 µl der DNA-Standardleiter versehen, die nächsten 17 Slots wurden mit 5 µl PCR-Produkten + 5 µl DNA Load geladen, der 19 Slot enthielt 10 µl *Aqua dest.* und fungierte als Leerwert (LW), der letzte Slot enthielt erneut 5 µl der entsprechenden Standardleiter. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer mit 100 ml 0.5X TBE-Running Puffer gefüllt, so dass die Gelschlitten knapp bedeckt waren. Anschließend wurde die EP bei 80 V für 60 min lang laufen gelassen. Nach Ende der EP wurde das Gel vorsichtig aus der Gelkammer herausgenommen und im BioDoc Analyze Transilluminator abfotografiert. Für jeden Patienten wurden die allelspezifischen Sequenzen separat untersucht und dokumentiert.

4.5 Statistische Auswertung: Cox-Regressionsanalyse

Da wir in dieser Arbeit den Effekt mehrerer Einflussgrößen auf unsere Zielvariablen untersuchen wollten, entschieden wir uns zur Anwendung der Cox-Regressionsanalyse als multivariates Rechenmodell. Zentraler Begriff ist hier die Hazard Ratio (HR), welche die Wahrscheinlichkeit bzw. das Risiko einer Person beschreibt, innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls, ein definiertes Zielereignis zu zeigen. Sie wird auch als Schätzer für die Größe des Einflusses bzw. die geschätzte Gefährdungsrate bezeichnet (51). Im Folgenden ist daher der Begriff "Überlebenskurve" bzw. "Überlebenszeit" gleichzusetzen mit der Zeitspanne zwischen Beobachtungsbeginn und Ereigniszeitpunkt, unabhängig davon ob das Zielereignis tödlich oder nicht-tödlich verlief. Die definierten Zielereignisse bilden in diesem Falle die auf S. 22 genannten statistischen Endpunkte Gesamtmortalität, CVD, Myokardinfarkt und Apoplex. Um die Nullhypothese verwerfen zu können, wurde als statistisch signifikant ein p-Wert < 0,05 angenommen.

Insgesamt flossen neben Haptoglobin, noch sieben andere Variablen (= Kovariaten) ins Modell, welche als prognostisch relevant für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen

auf Basis arteriosklerotischer Veränderungen erachtet werden (8). Diese werden im Folgenden, inklusive ihrer Abstufungen, genannt.

- Haptoglobin-Polymorphismus (Hp1-1 / Hp2-1 / Hp2-2)
- Alter
- Geschlecht (männlich / weiblich)
- Arterielle Hypertonie (RR > 140/90mmHg)
- Diabetes mellitus (ja / nein)
- Body-Maß Index (BMI)
- Nikotin (aufgehört / aktiv / nie)
- Fettstoffwechselstörung (Statineinnahme ja / nein)

Die Auswertung und Zuordnung der Gelbilder erfolgte mittels Microsoft Office Excel 2007. Für die statistischen Berechnungen wurde das Programm SPSS, Version 21 von IBM® SPSS Statistics® verwendet.

5. Ergebnisse

Der Ergebnisteil setzt sich aus zwei Abschnitten zusammen. Im größeren, ersten Abschnitt erfolgt eine retrospektive Auswertung unter Einbeziehung der Studiendaten aus dem Zeitraum Juli 2002 bis Juli 2008. Im zweiten Abschnitt werden zusätzlich Follow-up Daten analysiert, welche den Zeitraum bis Februar 2014 erweitern. Zunächst erfolgt eine Beschreibung der Rohdatenauswertung mittels PCR und EP.

5.1 Ergebnisse der Elektrophorese und Zuordnung der Genotypen

Da für jeden Patienten die allelspezifischen Sequenzen separat mittels zweier PCR-Ansätze untersucht wurden, gab es letztlich zwei korrespondierende Bandenmuster, welche entsprechend ihrer Verläufe einem Genotypen zugeordnet wurden. Im Folgenden werden exemplarisch zwei Gelbilder gezeigt, in denen jede fortlaufende Nummer einem anonymisierten Patienten entspricht. Die relevanten Amplifikate sind hier durch Pfeile markiert, wobei das obere Bild durch Primerprotokoll ABD (PCR 1) und das untere Bild durch Primerprotokoll CDB (PCR 2) generiert wurde. Die Zuordnung der Genotypen wird durch die folgenden Abbildungen und Tabellen veranschaulicht (Abbildung 10 und 11, Tabelle 7).

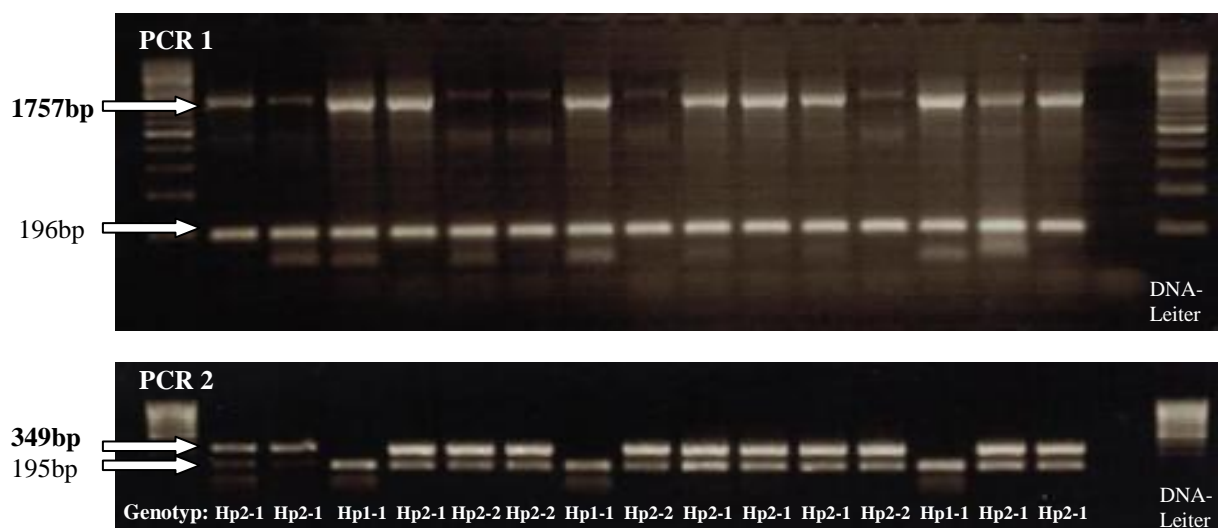


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung zweier Gelbilder, wie sie für alle Patienten angefertigt wurden. Anhand der Fragmentmuster erfolgte die Haptoglobin-Genotypisierung wie folgt: Hp1-1 ist gekennzeichnet durch die Anwesenheit des DNA-Fragments 1757bp sowie Abwesenheit des Fragments 349bp. Hp2-1 ist gekennzeichnet durch die Anwesenheit der Fragmente 1757bp und 349bp. Hp2-2 ist gekennzeichnet durch die Anwesenheit der Fragmente 1923bp und 349bp sowie die Abwesenheit von Fragment 1757bp. Die sich daraus ergebenden Genotypen zeigt die letzte Zeile

Tabelle 7: Zuordnungshilfe für die Haptoglobin-Genotypisierung entsprechend der spezifischen Fragmentmuster

Fragment	1757bp	1923bp	349bp
Phänotyp			
Hp1-1	Ja	Nein	Nein
Hp2-1	Ja	Nein	Ja
Hp2-2	Nein	Ja	Ja

Die Auswertung der Gelbilder und die entsprechende Zuordnung der Genotypen erfolgte zunächst in einer Excel-Tabelle, wie sie in Abbildung 11 ausschnittsweise dargestellt ist. Hier erfolgte auch die Umkodierung der Genotypen in ein statistisch verwertbares Format, welches wie folgt aussah: Hp1-1 = 1, Hp2-2 = 2 und Hp2-1 = 0. Die resultierenden Ergebnisse wurden zur statistischen Auswertung schließlich in eine SPSS-Tabelle übertragen, welche auch die übrigen Kovariaten sowie die zu untersuchenden Zielereignisse enthielt.

		PCR1(ABD)		interne Kontrolle	PCR2(CDB)		interne Kontrolle	
		Hp1 (A/B)	Hp2 (A/D)	Hp1/2 (A/D)	Hp2 (C/D)	Hp2 (B/C)	Hp1/2 (B/C)	
Proben-Numme	Primer	1757bp	1923 bp	196 bp	349 bp	1910 bp	195 bp	Haptoglobin-Typ
517		x		x	x		x	0
518		x		x	x		x	0
519		x		x	n		x	1
520		x		x	x		x	0
521			x	x	x		x	2
522			x	x	x		x	2
523		x		x	n		x	1
524			x	x	x		x	2
525		x		x	x		x	0
526		x		x	x		x	0
527		x		x	x		x	0
528			x	x	x		x	2
529		x		x	n		x	1
530		x		x	x		x	0
531		x		x	x		x	0

Abbildung 11: Die Klassifizierung und Zuordnung der Haptoglobin-Genotypen entsprechend ihrer Fragmentmuster wurde zunächst in einer Excel-Tabelle vorgenommen. Als Auszug der Gesamttabelle sind hier exemplarisch die Patienten mit den fortlaufenden Nummern 517-531 dargestellt. Die letzte Spalte zeigt den Haptoglobin- Genotypen in einer SPSS kompatiblen Codierung (0-2).

5.2 Statistische Basisdaten der Patienten

Insgesamt konnten 589 Patienten mit vollständigen Datensätzen in die statistische Auswertung aufgenommen werden. Als vollständig wurden Datensätze gewertet, wenn eine Zuordnung des Haptoglobin-Genotyps eindeutig möglich war und wenn die Angaben aller acht relevanten Einflussgrößen komplett waren. Die im folgenden ermittelten epidemiologischen Daten entsprechen im Wesentlichen den Kovariaten unseres multivariablen Modells, von denen angenommen wird, dass sie einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen und damit auf CVD haben. Von den beobachteten Patienten waren 244 weiblichen und 345 männlichen Geschlechts.

Die Altersverteilung reichte von 20 bis 80 Jahre, mit einem Durchschnittsalter von 61 Jahren. Insgesamt litten 523 Personen an einem arteriellen Hypertonus, 236 Patienten waren an einem Diabetes mellitus erkrankt. Von den untersuchten Patienten gaben 100 an einen aktiven Nikotinabusus zu haben, 229 hatten aufgehört zu rauchen und 260 gaben an, nie aktiver Raucher gewesen zu sein. Im Durchschnitt lag der Body-Mass Index der Patienten bei 26,7 kg/m². Von den 589 Patienten nahmen aktuell 209 Personen Statine aufgrund eines zu hohen LDL-Cholesterinspiegels zu sich. Die Tabelle 8 gibt einen Überblick über die statistischen Basisdaten der Patienten unterteilt nach Haptoglobin-Genotyp.

Tabelle 8: Statistische Basisdaten der Patienten

Kovariaten	Hp1-1 (n = 100)	Hp2-1 (n = 281)	Hp2-2 (n = 208)	Gesamt (n = 589)
Alter, $\bar{x} \pm SD$	61,1 ± 13,3	61,2 ± 12,9	61,0 ± 12,8	61,1 ± 12,9
Geschlecht				
Weiblich, n (%)	46 (46,0 %)	110 (39,1 %)	88 (42,3 %)	244 (41,4 %)
Männlich, n (%)	54 (54,0 %)	171 (60,9 %)	120 (57,7 %)	345 (58,6 %)
Arterielle Hypertension (> 140/90 mmHg), n (%)	86 (86 %)	254 (90,4 %)	183 (88 %)	523 (88,8 %)
Diabetes mellitus, n (%)	41 (41,0 %)	108 (38,4 %)	87 (41,8 %)	236 (40,1 %)
Nikotin				
Nie, n (%)	52 (52,0 %)	119 (42,3 %)	89 (42,8 %)	260 (44,1 %)
Aktiv, n (%)	17 (17,0 %)	48 (17,1 %)	35 (16,8 %)	100 (17,0 %)
Aufgehört, n (%)	31 (31,0 %)	114 (40,6 %)	84 (40,4 %)	229 (38,9 %)
Body-Mass Index (in kg/m ²), $\bar{x} \pm SD$	26,2 ± 5,3	26,7 ± 4,9	27,1 ± 5,3	26,7 ± 5,1
Statine, n (%)	30 (30,0 %)	102 (36,3 %)	77 (37,0 %)	209 (35,5 %)

Abgebildet sind die Einflussgrößen, von denen angenommen wird, dass sie in entsprechender Ausprägung einen negativen Einfluss auf das kardiovaskuläre System nehmen \bar{x} = Mittelwert SD = Standardabweichung

5.3 Verteilung der Haptoglobin-Genotypen und Allelfrequenzen

Die Verteilung der drei Haptoglobin-Genotypen zeigte sich im Patientenkollektiv wie folgt. Hp1-1 17,0 % (n = 100), Hp2-1 47,7 % (n = 281) und Hp-2-2 35,3 % (n = 208). In unserer Stichprobe lag die Frequenz des Hp¹ Allels bei 0,41. Damit zeigt sich die Verteilung der Genotypen im Hardy-Weinberg Equilibrium ($X^2 = 0,04$) und kann als repräsentative Gruppe bzgl. des zu untersuchenden Merkmals Haptoglobin betrachtet werden (40). Eine diesbezüglich aufgetretene "Pre-selection Bias" der Stichprobe kann ausgeschlossen werden.

5.4 Studienzeitraum 2002-2008

5.4.1 Primärer Endpunkt: Gesamtmortalität

Von den insgesamt betrachteten 589 Patienten, verstarben während des ersten Beobachtungszeitraumes insgesamt 177 (30,1 %). Innerhalb der verstorbenen Patienten besaßen 34 den Genotypen Hp1-1 (19,2 %), 79 den Genotypen Hp2-1 (44,6 %) und 64 den Genotypen Hp2-2 (36,2 %). Der Haptoglobin-Genotyp zeigt nach Adjustierung für die anderen Einflussgrößen keinen signifikanten Einfluss auf die Mortalitätsrate von Dialysepatienten ($p = 0,72$). Man erhält als Trend einen Überlebensvorteil des heterozygoten Genotyps Hp2-1 gegenüber den beiden homozygoten Varianten, wobei der Überlebensvorteil gegenüber dem Hp1-1 Genotypen (REF) am größten ist (HR = 0,85, 95 % CI, CI = 0,57-1,27; $p = 0,43$). Einen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben nimmt das Alter mit einer HR = 1,07 (95 % CI, 1,05-1,09; $p = 0,00$), wobei mit jedem Lebensjahr die Wahrscheinlichkeit zu versterben, um ca. 7 % steigt. Außerdem zeigt das Vorhandensein eines Diabetes mellitus einen signifikanten Einfluss auf die Gesamtmortalität von Dialysepatienten, wobei hier eine HR von 0,49 (95 % CI, 0,35-0,69; $p = 0,00$) für die Gruppe der Nicht-Diabetiker gefunden wurde. Nicht-Diabetiker haben demnach im Vergleich zu Diabetespatienten, ein nur halb so hohes Risiko (49 %) im Beobachtungszeitraum zu versterben. Die Tabelle 9 zeigt die wichtigsten statistischen Eckdaten, das Diagramm die Überlebenskurven innerhalb des Beobachtungszeitraums separiert nach Haptoglobin-Genotyp (Abbildung 12).

Tabelle 9: Gesamtmortalität 2002-2008

Variablen	Signifikanz (p < 0,05)	Hazard Ratio (95 % CI)
Hp1-1	0,72	REF
Hp2-1	0,43	0,85 (0,57-1,27)
Hp2-2	0,51	0,87 (0,57-1,32)
Alter	0,00*	1,07 (1,05-1,09)
Geschlecht	0,11	0,74 (0,51-1,07)
Arterielle Hypertonie	0,41	0,82 (0,52-1,31)
Diabetes mellitus	0,00*	0,49 (0,35-0,69)
Nikotin (nie)	0,65	REF
Nikotin (aufgehört)	0,38	1,15 (0,82-1,71)
Nikotin (aktiv)	0,93	1,03 (0,58-1,80)
Body-Mass Index (BMI)	0,26	0,98 (0,95-1,01)
Statine	0,12	1,30 (0,94-1,79)

Übersicht der einfließenden Kovariaten und ihrer wichtigsten statistischen Werte Hazard Ratio mit dazugehörigem Konfidenzintervall und Signifikanz (p). Die signifikanten Variablen sind hervorgehoben und mit einem * markiert. Als REF wird die Referenzvariable bezeichnet, auf welche sich die Hazard Ratios der beiden übrigen Ausprägungen der Variablen beziehen * signifikant REF = Referenzvariable

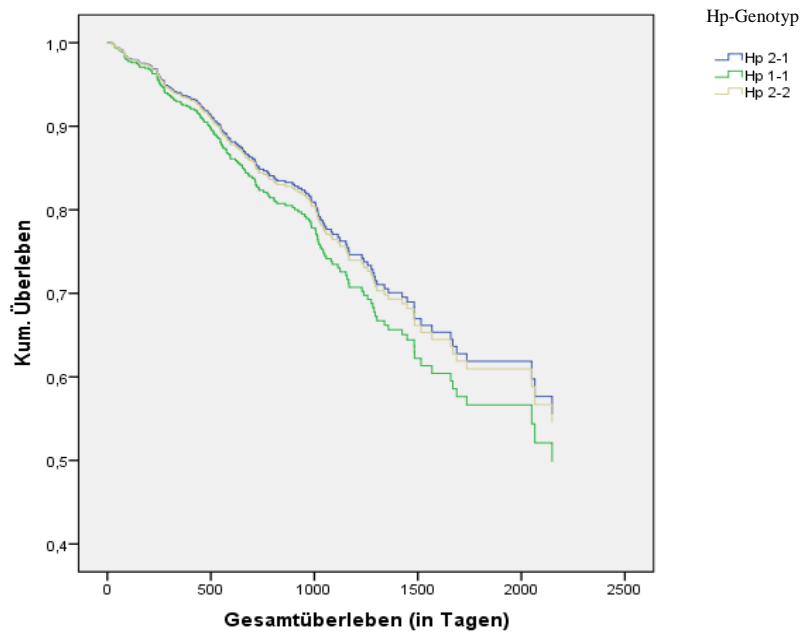


Abbildung 12: Die Graphik veranschaulicht die Überlebenskurven der Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes getrennt nach Haptoglobin-Genotyp. Die Y-Achse indiziert das Gesamtüberleben der beobachteten Stichprobe in Abhängigkeit der Zeit (X-Achse). Der Haptoglobin-Polymorphismus zeigt sich dabei als nicht signifikante Einflussgröße (p = 0,72). Es lässt sich, nach Adjustierung der übrigen Einflussgrößen, ein tendenzieller Überlebensvorteil des Hp2-1 Typen gegenüber dem Hp2-2 und dem Hp1-1 Typen erkennen, wobei der homozygote Typ 1 das schlechteste Overall-Survival besitzt

5.4.2 Sekundärer Endpunkt: Kardiovaskuläre Ereignisse

Im Folgenden wird der kombinierte Endpunkt "kardiovaskuläre Ereignisse" betrachtet, wobei nicht zwischen tödlich und nicht-tödlich verlaufenden Ereignissen unterschieden wird. Unter dem Endpunkt CVD sind folgende Krankheitsbilder subsummiert: akuter Myokardinfarkt, Apoplex, Angina pectoris, pAVK, plötzlicher Herztod und Z. n. Durchführung eines herzchirurgischen Eingriffes. Von den beobachteten Patienten, erfuhren während des Studienzeitraumes insgesamt 153 (26.0 %) Patienten ein kardiovaskuläres Ereignis. Der Haptoglobin-Genotyp zeigt auch hier keinen signifikanten Einfluss ($p = 0,46$). Tendenziell besitzen Personen mit dem homozygoten Typ 2 eine geringere Wahrscheinlichkeit im Beobachtungszeitraum an CVD zu erkranken, als Patienten mit den übrigen zwei Genotypen. Der Unterschied zum Hp1-1 (REF) ist hier mit einer $HR = 0,80$ (95 % CI, 0,50-1,29; $p = 0,37$) am größten. Das heißt, dass Personen des Genotyps Hp2-2 verglichen mit Hp1-1, ein nur 80 % es Risiko besitzen, im Beobachtungszeitraum eine CVD zu entwickeln (nicht signifikant). Einen signifikanten Einfluss zeigen erneut das Alter ($HR=1,04$, 95 % CI, CI = 1,02-1,06; $p = 0,00$) sowie ein Diabetes mellitus ($HR = 0,59$, 95 % CI, CI = 0,41-0,85; $p = 0,01$). Als ebenfalls signifikanter Parameter erweist sich der Nikotinstatus ($p = 0,03$). Patienten, die in der Vergangenheit geraucht hatten, zeigten ein bis zu 71 % höheres Risiko im Beobachtungszeitraum eine CVD zu entwickeln, als Patienten, welche nie (REF) geraucht hatten ($HR = 1,71$, 95 % CI, 1,15-2,56; $p = 0,01$). Der Vergleich zu den aktiven Rauchern erbrachte keinen signifikanten Unterschied (Tabelle 10, Abbildung 13).

Tabelle 10: Kardiovaskuläre Ereignisse

Variablen	Signifikanz ($p < 0,05$)	Hazard Ratio (95 % CI)
Hp1-1	0,46	REF
Hp2-1	0,99	0,99 (0,64-1,55)
Hp2-2	0,37	0,80 (0,50-1,29)
Alter	0,00*	1,04 (1,02-1,06)
Diabetes mellitus	0,01*	0,59 (0,41-0,85)
Geschlecht	0,89	0,97 (0,67-1,42)
Arterielle Hypertonie	0,62	0,88 (0,52-1,49)
Nikotin (nie)	0,03*	REF
Nikotin (aufgehört)	0,01*	1,71 (1,15-2,56)
Nikotin (aktiv)	0,10	1,55 (0,92-2,62)
Body-Mass Index (BMI)	0,20	0,98 (0,94-1,01)
Statine	0,31	0,84 (0,60-1,17)

Übersicht der einfließenden Kovariaten und ihrer wichtigsten statistischen Werte Hazard Ratio mit dazugehörigem Konfidenzintervall und Signifikanz (p) * signifikant REF = Referenzvariable

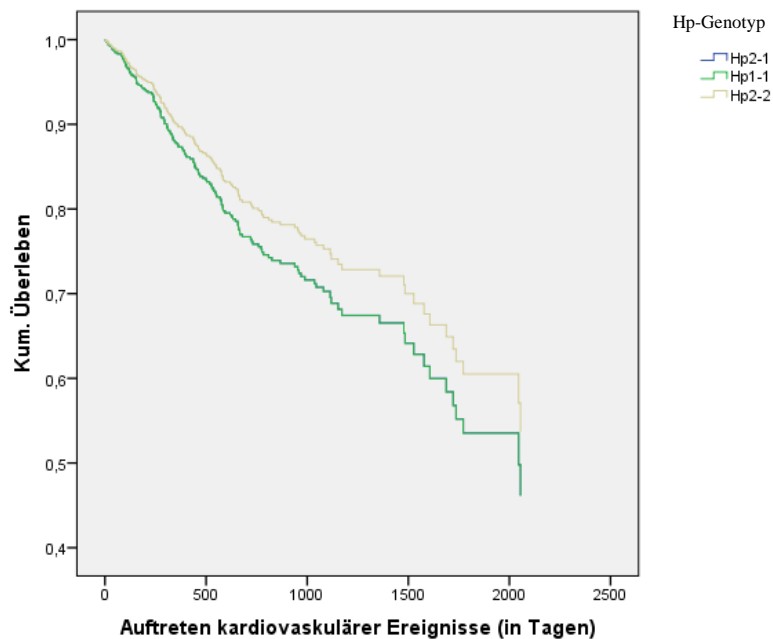


Abbildung 13: Die Graphik veranschaulicht die Überlebenskurven der Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes getrennt nach Haptoglobin-Genotyp. Die Y-Achse indiziert das Auftreten von CVD innerhalb der beobachteten Stichprobe in Abhängigkeit der Zeit (X-Achse). Der Haptoglobin-Polymorphismus zeigt sich dabei als nicht signifikante Einflussgröße ($p = 0,46$). Es lässt sich, nach Adjustierung der übrigen Einflussgrößen, ein tendenzieller Überlebensvorteil des Hp2-2 Typs gegenüber den anderen Genotypen erkennen, wobei der homozygote Typ 1-1 das schlechteste Outcome zeigt

5.4.3 Sekundäre Endpunkte: Akuter Myokardinfarkt und Apoplex

Insgesamt erlitten 37 (6,3 %) Patienten während des Beobachtungszeitraumes einen Myokardinfarkt ($p = 0,63$) und 25 (4,2 %) Patienten einen Apoplex ($p = 0,83$). Auf beide Endpunkte nahm der Haptoglobin-Genotyp keinen signifikanten Einfluss. Im Trend zeigten Patienten mit Hp1-1 (REF) das geringste Risiko im Beobachtungszeitraum einen Myokardinfarkt zu entwickeln, während Personen mit Hp2-1 das höchste Risiko besaßen. Einen signifikanten Einfluss nimmt allein das Alter, mit einer HR = 1,04 (95 % CI, 1,01-1,07; $p = 0,02$), wobei mit jedem Lebensjahr die Wahrscheinlichkeit, einen Myokardinfarkt zu erleiden, um 4 % steigt. Betrachtet man den Endpunkt Apoplex, zeigten Patienten des homozygoten Hp1-1 (REF) ebenfalls das geringste Risiko, ein Ereignis dieser Art zu entwickeln, wohingegen Hp2-1 das höchste Risiko zeigte (HR = 1,48, 95 % CI, 0,42-5,24; $p = 0,55$). Einen signifikanten Einfluss nehmen hier das Alter, mit einer HR = 1,05 (95 % CI, 1,01-1,10; $p = 0,02$) sowie der Body-Mass Index mit einer HR = 0,09 (95 % CI, 0,81-0,99; $p = 0,03$). Um zu untersuchen, ob die Trends bei höherem N signifikante Werte erbringen, erfolgte schließlich noch die gemeinsame Betrachtung der beiden Endpunkte. Trotz höherer Fallzahl zeigte sich weiterhin kein signifikanter Einfluss des Haptoglobin-Polymorphismus ($p = 0,59$). Jedoch setzt sich der Trend fort, den homozygoten Hp1-1 als risikoärmsten

Genotypen zu betrachten, wenn es um das Auftreten eines Myokardinfarkts oder Apoplex geht. Im Vergleich zum homozygoten Typ 1, hat der heterozygote Typ ein um 53 % höheres Risiko im Beobachtungszeitraum ein Ereignis zu entwickeln (HR = 1,53, 95 % CI, 0,67-3,48; p = 0,32). Signifikante Einflussfaktoren sind auch hier das Alter (HR = 1,05, 95 % CI, 1,02-1,07; p = 0,00) und der BMI (HR = 0,92, 95 % CI, 0,87-0,98; p = 0,01). Aus Gründen der Übersichtlichkeit zeigt die folgende Tabelle lediglich die relevanten statistischen Eckpunkte für den Haptoglobin-Polymorphismus sowie die signifikant gewordenen Einflussfaktoren.

Tabelle 11: Akuter Myokardinfarkt und Apoplex

Variablen	Signifikanz (p < 0,05)	Hazard Ratio (95 % CI)
Myokardinfarkt		
Hp1-1	0,63	REF
Hp2-1	0,33	1,70 (0,58-5,02)
Hp2-2	0,46	1,53 (0,50-4,70)
Alter	0,02*	1,04 (1,01-1,07)
Apoplex		
Hp1-1	0,83	REF
Hp2-1	0,55	1,48 (0,42-5,24)
Hp2-2	0,60	1,42 (0,38-5,29)
Alter	0,02*	1,05 (1,01-1,10)
BMI	0,03*	0,90 (0,81-0,99)
Myokardinfarkt + Apoplex		
Hp1-1	0,59	REF
Hp2-1	0,32	1,53 (0,67-3,48)
Hp2-2	0,35	1,50 (0,64-3,52)
Alter	0,00*	1,05 (1,02-1,07)
BMI	0,01*	0,92 (0,87-0,98)

Übersicht der relevanten Kovariaten und ihrer wichtigsten statistischen Werte Hazard Ratio mit dazugehörigem Konfidenzintervall und Signifikanz (p) * signifikant REF = Referenzvariable

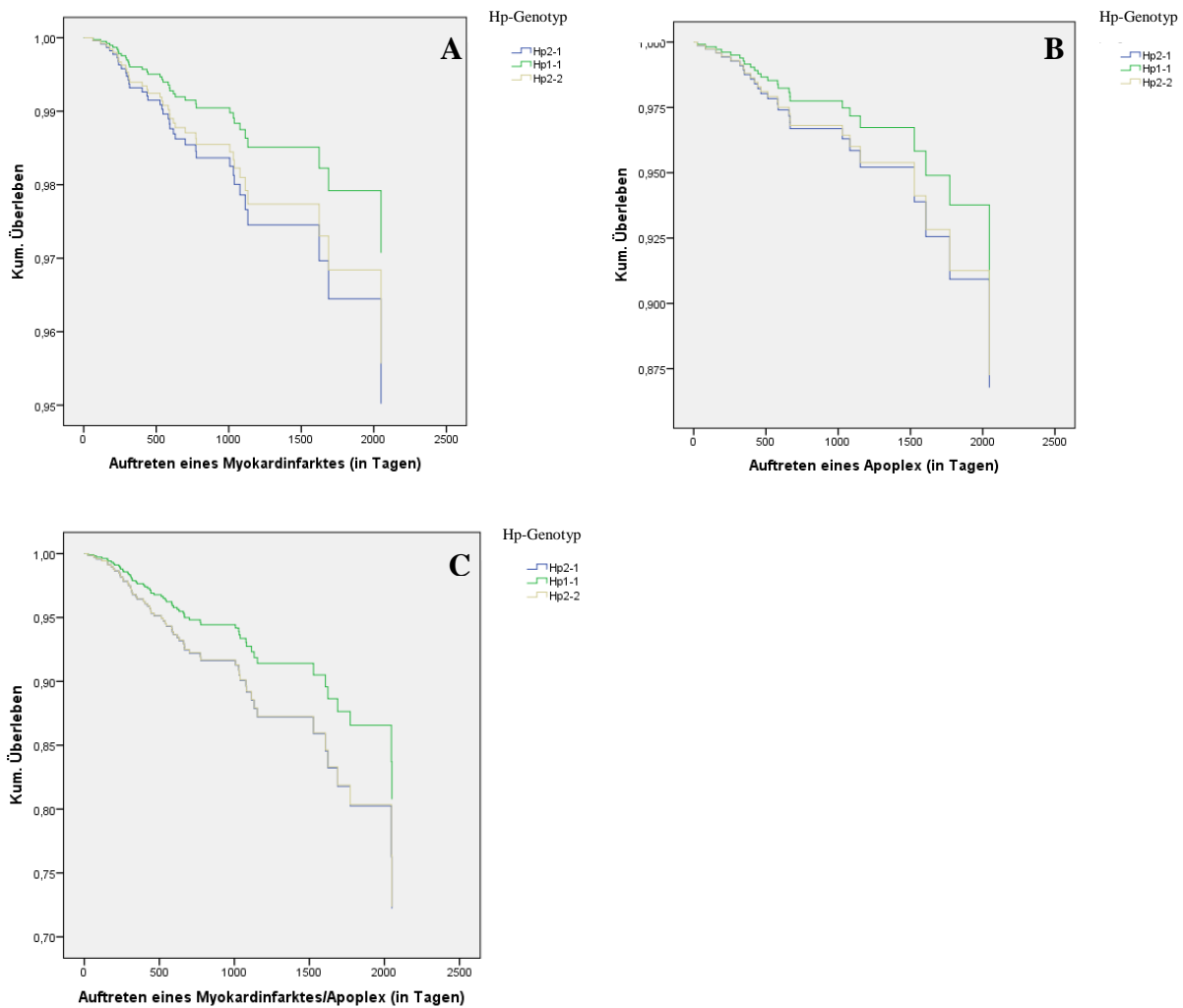


Abbildung 14: Die Graphiken A-C veranschaulichen die Überlebenskurven innerhalb des Beobachtungszeitraumes getrennt nach Haptoglobin-Genotyp. Die Y-Achse indiziert das Auftreten des definierten Ereignisses 1-3 innerhalb der beobachteten Stichprobe in Abhängigkeit der Zeit (X-Achse). Gezeigt werden die Endpunkte Myokardinfarkt (A), Apoplex (B) und der additive Endpunkt Myokardinfarkt + Apoplex (C). Der Haptoglobin-Polymorphismus zeigt sich dabei als nicht-signifikante Einflussgröße. Im Trend zeigt jedoch der homozygote Typ 1 das beste Outcome in allen drei Endpunkten

5.4.4 Einfluss von Vitaminsupplementation und Diabetikerstatus

5.4.4.1 Subgruppenanalyse: Verum vs. Placebo

Innerhalb der Verumgruppe (Supplementation von Vitaminen) zeigten im Beobachtungszeitraum 69 Patienten eine CVD, innerhalb der Placebogruppe waren es 83 Patienten. In beiden Subgruppen zeigte sich der Haptoglobin-Typ als nicht signifikante Einflussgröße. Die signifikanten Variablen und ihre statistischen Eckdaten sind in der Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Subgruppenanalyse Vitaminsupplementation

Subgruppe		Signifikanz (p < 0,05)	Hazard Ratio (95 % CI)
Verum	Hp1-1	0,49	REF
	Hp2-1	0,95	1,03 (0,52-2,04)
	Hp2-2	0,42	0,73 (0,35-1,60)
	Alter	0,03*	1,03 (1,00-1,06)
Placebo	Hp1-1	0,84	REF
	Hp2-1	0,71	1,12 (0,62-2,02)
	Hp2-2	0,93	0,97 (0,51-1,84)
	Alter	0,00*	1,05 (1,02-1,07)
	Diabetes mellitus	0,02*	0,55 (0,34-0,90)

Übersicht der relevanten Kovariaten und ihrer wichtigsten statistischen Werte Hazard Ratio mit dazugehörigem Konfidenzintervall und Signifikanz (p) * signifikant REF = Referenzvariable

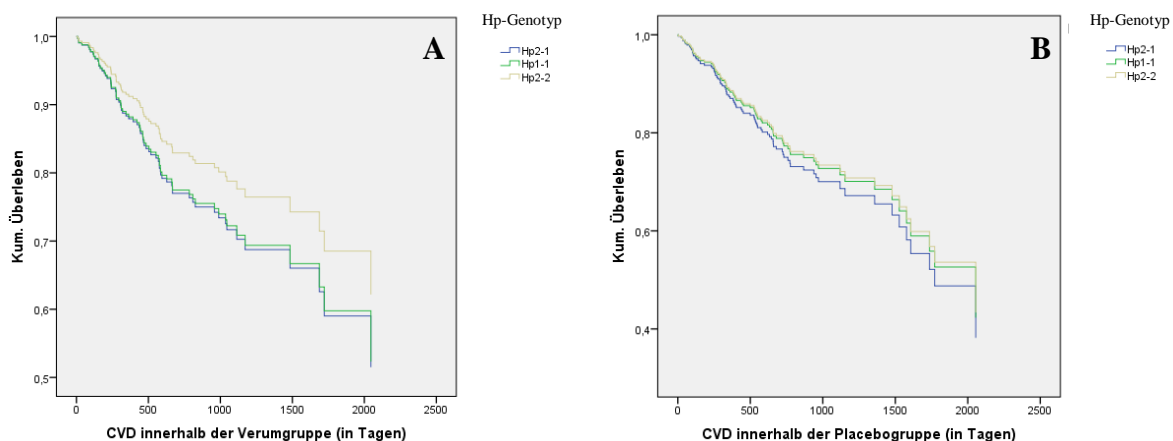


Abbildung 15: Die Graphiken A und B veranschaulichen die Überlebenskurven innerhalb der Vitaminverum- (A) und Placebogruppe (B) während des Beobachtungszeitraumes getrennt nach Haptoglobin-Genotyp. Die Y-Achse indiziert das Overall-Survival innerhalb der beobachteten Subgruppe in Abhängigkeit der Zeit (X-Achse). Der Haptoglobin-Polymorphismus zeigt sich dabei als nicht-signifikante Einflussgröße

5.4.4.2 Subgruppenanalyse: Diabetiker vs. Nicht-Diabetiker

Insgesamt zeigten im Beobachtungszeitraum 84 Diabetiker und 69 Nicht-Diabetiker ein CVD Ereignis, ein signifikanter Einfluss des Haptoglobin-Genotyps konnte weder innerhalb der Diabetikergruppe noch innerhalb der Nicht-Diabetikergruppe nachgewiesen werden. Im Trend zeigt sich das geringste CVD-Risiko innerhalb der Diabetikergruppe bei Patienten mit Hp2-2, innerhalb der Nicht-Diabetikergruppe waren es Personen mit Hp2-1. Innerhalb der Nicht-Diabetiker zeigten das Alter sowie der Nikotinstatus einen relevanten Einfluss auf das Auftreten von CVD.

Tabelle 13: Subgruppenanalyse Diabetikerstatus

Subgruppe		Signifikanz (p < 0,05)	Hazard Ratio (95 % CI)
Diabetiker	Hp1-1	0,32	REF
	Hp2-1	0,73	1,11 (0,62-2,01)
	Hp2-2	0,40	0,76 (0,40-1,44)
Nicht-Diabetiker	Hp1-1	0,53	REF
	Hp2-1	0,38	0,74 (0,38-1,44)
	Hp2-2	0,91	0,96 (0,47-1,96)
	Alter	0,00*	1,06 (1,03-1,08)
	Nikotin (nie)	0,03*	REF
	Nikotin (aufgehört)	0,01*	2,28 (1,24-4,19)
	Nikotin (aktiv)	0,19	1,65 (0,78-3,47)

Übersicht der relevanten Kovariaten und ihrer wichtigsten statistischen Werte Hazard Ratio mit dazugehörigem Konfidenzintervall und Signifikanz (p) * signifikant REF = Referenzvariable

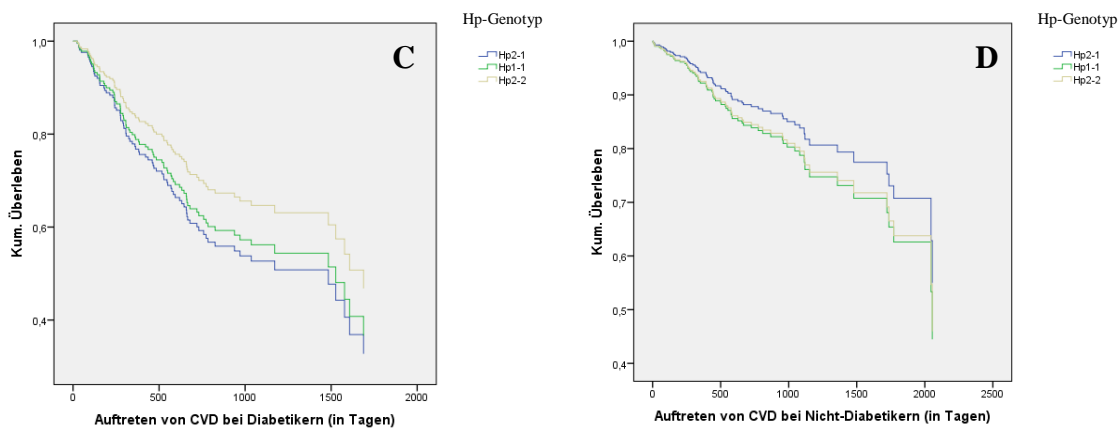


Abbildung 16: Die Graphiken C und D veranschaulichen die Überlebenskurven innerhalb der Diabetiker-(C) und Nicht-Diabetikergruppe (D) während des Beobachtungszeitraumes getrennt nach Haptoglobin-Genotyp. Die Y-Achse indiziert das Overall-Survival innerhalb der beobachteten Subgruppe in Abhängigkeit der Zeit (X-Achse). Der Haptoglobin-Polymorphismus zeigt sich dabei als nicht-signifikante Einflussgröße

5.5 Studienzeitraum 2002-2014: Follow-up

Um den Beobachtungszeitraum zu erweitern und damit die Fallzahlen zu erhöhen, erfolgte eine Nacherhebung, welche die Überlebenszeiten der Stichprobe bis zum Februar 2014 nachverfolgte. Das Follow-up betrachtet demnach alle Patienten, welche bis zum Enddatum der Ursprungsstudie im Juli 2008 nicht verstorben oder aus anderweitigen Gründen (z. B. Transplantation) aus der Studie ausgeschieden waren. Insgesamt wurden Daten von 241 Patienten aller 33 Dialysezentren nacherhoben, wobei zu 217 Patienten auswertbare Angaben durch die Dialyseärzte gemacht wurden. Das entspricht einer Rücklaufquote von 90,04 %. Aufgrund teils unpräziser, teils fehlender Angaben zur Todesart des Patienten, konnte letztlich nur die Zielgröße "Gesamtmortalität" betrachtet werden. Zwischen 2008 und 2014 verstarben insgesamt 123 Patienten, von diesen Patienten wiesen 106 Personen einen kompletten Datensatz auf und konnten in die statistische Auswertung einfließen. Kumuliert man beide Zeiträume, steigt die Anzahl der Verstorbenen auf insgesamt 283 (177 + 106) Patienten (48.0 %). Davon besaßen 49 den Hp1-1 Typen (17.3 %), 137 den Hp2-1 Typen (48.4 %) und 97 den Hp2-2 Typen (34.3 %). Der Haptoglobin-Genotyp zeigte weiterhin keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtmortalität der beobachteten Kohorte ($p = 0,87$). Einen signifikanten Einfluss nahmen das Alter (HR = 1,06, 95 % CI, CI = 1,05-1,08; $p = 0,00$), das Vorliegen einer Diabetes-Erkrankung (HR = 0,47, 95 % CI, CI = 0,36-0,62; $p = 0,00$) und das Geschlecht (HR = 0,70, 95 % CI, CI = 0,53-0,93; $p = 0,02$).

Tabelle 14: Gesamtmortalität 2002-2014

Variablen	Signifikanz ($p < 0,05$)	Hazard Ratio (95 % CI)
Hp1-1	0,87	REF
Hp2-1	0,74	1,06 (0,76-1,47)
Hp2-2	0,95	0,99 (0,70-1,40)
Alter	0,00*	1,06 (1,05-1,08)
Diabetes mellitus	0,00*	0,47 (0,36-0,62)
Geschlecht	0,02*	0,70 (0,53-0,93)
Arterielle Hypertonie	0,73	0,93 (0,63-1,39)
Nikotin (nie)	0,25	REF
Nikotin (aufgehört)	0,44	1,12 (0,84-1,51)
Nikotin (aktiv)	0,10	1,38 (0,94-2,03)
Body-Mass Index	0,22	0,98 (0,96-1,01)
Statine	0,66	1,06 (0,83-1,36)

Übersicht der relevanten Kovariaten und ihrer wichtigsten statistischen Werte Hazard Ratio mit dazugehörigem Konfidenzintervall und Signifikanz (p) * signifikant REF = Referenzvariable

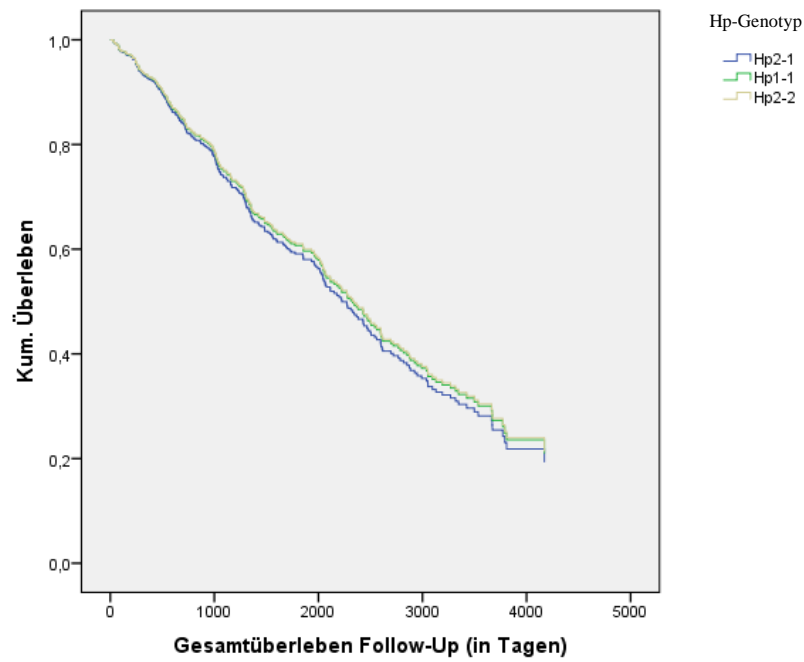


Abbildung 17: Die Graphik veranschaulicht die Überlebenskurven der Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes getrennt nach Haptoglobin-Genotyp. Die Y-Achse indiziert das Gesamtüberleben der beobachteten Stichprobe in Abhängigkeit der Zeit (X-Achse). Die starke Annäherung der Kurven verdeutlicht die statistische Irrelevanz des Haptoglobin-Genotyps hinsichtlich des Gesamtüberlebens unserer Kohorte trotz höherer Fallzahlen

6. DISKUSSION

6.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht und beschreibt den Zusammenhang zwischen dem Haptoglobin-Polymorphismus und der Gesamtmortalität bzw. dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Dialysepatienten. Vorausgegangene Studien konnten bereits anhand unterschiedlicher Patientenkohorten zeigen, dass das Protein Haptoglobin in Abhängigkeit seiner genetischen Ausprägung und den damit einhergehenden molekularbiologischen Eigenschaften, entweder einen protektiven oder einen schädigenden Effekt auf das Herz-Kreislaufsystem nimmt (28). Trotz widersprüchlicher Ergebnisse verschiedener Studien dominiert aktuell die Annahme, dass der homozygote Typ 1 (Hp1-1) aufgrund seiner höheren antioxidativen Potenz einen Vorteil hinsichtlich der Ausbildung arteriosklerotischer Veränderungen vermittelt, während der homozygote Typ 2 (Hp2-2) als Risikofaktor für CVD angesehen wird (28), (41). Basierend auf Daten einer groß angelegten Studie zur Vitaminsupplementation bei Dialysepatienten aus dem Jahr 2010, re-analysierten wir 654 DNA-Proben dieses Patientenkollektivs und untersuchten die Verteilung des Haptoglobin-Genotypen. Insgesamt gelang uns die Zuordnung bei 589 Patientenproben, welche wir in Beziehung zu fest definierten klinischen Ereignissen setzten.

Als zentrale Aussage dieser Arbeit lässt sich festhalten, dass sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Haptoglobin-Genotypen und der Mortalitätsrate sowie dem Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz finden ließ. Ein protektiver bzw. Risikotyp wie er zuvor bei Diabetikern beschrieben wurde, konnte innerhalb unserer Stichprobe nicht gefunden werden (15). Auch eine Gruppenunterteilung (Diabetiker- vs. Nicht-Diabetiker und Vitaminsupplementation: Verum vs. Placebo) erbrachte keine signifikanten Unterschiede. Die Patienten befanden sich hinsichtlich der Verteilung des zu untersuchenden Merkmals Haptoglobin im Hardy-Weinberg Equilibrium.

6.2 Methodische Aspekte

6.2.1 Limitationen und Stärken der Arbeit

Unsere Arbeit stützt sich auf Vorarbeiten der Studie von Heinz *et al.* (2010), im Einzelnen auf klinische Daten und DNA-Proben, welche bereits vorlagen. Vereinzelt kam es bei der Analyse der DNA-Proben daher vor, dass trotz sorgfältiger Aufbewahrung der Proben keine

ausreichende Menge analysierfähigen Materials vorlag und diese Patienten daher nicht in die Analyse einbezogen werden konnten. Da nur Patienten mit vollständigem Datensatz im multivariaten Rechenmodell berücksichtigt werden können, führten fehlende Angaben bei den für uns relevanten Kovariaten, zu einer geringen Reduktion der Datensätze. Trotz der primär guten Rücklaufquote der Follow-up Befragung, ergaben sich durch die fehlende Präzision in der Beantwortung zur Todesursache des Patienten, Einschränkungen hinsichtlich ihrer Auswertbarkeit. So konnte letztlich nur die Gesamtmortalität, nicht jedoch wie ursprünglich geplant, die kardiovaskulären Ursachen bis 2014 nachuntersucht und ausgewertet werden.

Bei dem von uns untersuchten Studienkollektiv handelt es sich, gemessen an der Komplexität des Erkrankungsbildes, um eine verhältnismäßig große (589 Patienten) und sehr gut beschriebene Stichprobe, welche durch eine Vielzahl von Variablen (> 100) definiert ist. Dabei wurde der von uns untersuchte Haptoglobin-Polymorphismus mittels PCR bestimmt, einem molekularbiologischen Verfahren, welches als gut validiertes und spezifisches Verfahren zur Analyse genomischer DNA gilt und bei Studien ähnlicher Fragestellung standardmäßig zum Einsatz kommt (42), (43). Die sichere Zuordnung der Genotypen mittels Gelelektrophorese gelang in 98 % der Fälle. Die Allelfrequenz von Hp¹ betrug 0,41 und zeigte sich im Hardy-Weinberg Equilibrium. Vergleicht man unsere Werte mit denen anderer Forschungsgruppen, findet sich hier eine gute Übereinstimmung mit der Haptoglobin-Verteilung unseres Studienkollektivs, womit dieses als repräsentativ für das untersuchte Merkmal angesehen werden kann wie Tabelle 15 und Abbildung 18 vergleichend zeigen (13), (18).

Tabelle 15: Verteilung der Haptoglobin-Genotypen innerhalb Europas

Genotyp/ Land	Hp1-1	Hp2-1	Hp2-2	Hp¹
Vorliegende Studie	17,0 %	47,1 %	35,4 %	0,41
Langlois & Delanghe (1996):				
Deutschland	14,0 %	48,0 %	38,0 %	0,46
Belgien	13,0 %	53,0 %	34,0 %	0,40
Frankreich	15,3 %	49,7 %	35 %	0,40
Ungarn	12,6 %	47,2 %	40,2 %	0,36
Schweden	13,5 %	47,5 %	39,0 %	0,37
Vereinigtes Königreich	10,1 %	55,5 %	31,7 %	0,43

Geografische Verteilung der Haptoglobin-Genotypen sowie der Hp¹-Allelfrequenzen innerhalb West-Europas (vorliegende Studie vs. Langlois & Delanghe, 1996 (18))

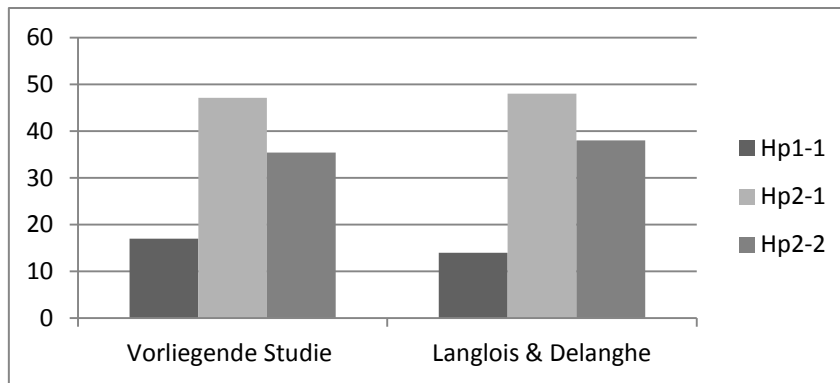


Abbildung 18: Grafische Darstellung der Verteilung der Haptoglobin-Genotypen innerhalb Deutschlands (vorliegende Studie vs. Langlois & Delanghe, 1996 (18))

Zur Bestimmung des Einflusses des Haptoglobin-Genotyps auf die Endpunkte Gesamtmortalität und CVD wählten wir die im Cox-Modell zu adjustierenden Kovariaten entsprechend bereits etablierter kardiovaskulärer Risikofaktoren, welche in ähnlicher Ordnung auch von Autoren anderer Studien mit ähnlicher Fragestellung gewählt wurden. So wurden Patienten der umfangreichen Nurses Health Study (NHS) hinsichtlich der Faktoren Alter, Geschlecht, BMI, Raucherstatus, Diabetes mellitus, LDL-Hypercholesterinämie, arterielle Hypertension und Alkohol adjustiert, welche sich zum Großteil mit unseren Einflussgrößen decken (45).

6.3 Diskussion der Ergebnisse

Bezogen auf das Gesamtkollektiv lag die Mortalität der untersuchten Dialysepatienten innerhalb des ersten Beobachtungszeitraums bei fast einem Drittel (30.1 %). Unter der Annahme, dass bei einer hohen Anzahl verstorbener Patienten auch schwächere Variableneinflüsse statistisch sichtbar würden, differenzierten wir zunächst nicht nach Todesart, sodass neben den tödlichen CVD auch Todesursachen wie Pneumonie, Karzinom, Lungenödem etc. summiert betrachtet wurden. Haptoglobin und sein Polymorphismus zeigten hier nach Adjustierung für die übrigen Einflussgrößen keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate, einzig das Alter und ein manifester Diabetes mellitus wirkten sich statistisch relevant auf die Gesamtmortalität aus. Schaut man vergleichend in die Literatur, zeigt sich als einzig aktuell vergleichbare Studie, eine Fall-Kontroll Studie der belgischen Forschergruppe um DeBacquer, welche den Zusammenhang zwischen Haptoglobin und CVD-Mortalität untersuchten und entgegen ihrer Hypothese, den Hp1-1 Typen als unabhängigen Risikofaktor für eine höhere Sterberate ihrer Patienten identifizierten (44). Als wesentlicher Unterschied der beiden Studien ist, neben dem längeren Beobachtungszeitraum der Belgier von insgesamt

10 Jahren (vgl. mit unserem ersten Beobachtungszeitraum) zu beachten, dass die dort untersuchte Kohorte keine Dialysepatienten beinhaltete. Die Untersuchung umfasste Patienten, welche im Rahmen der bevölkerungsbasierten Langzeitstudie BIRNH (Belgian Interuniversity Research on Nutrition and Health) hinsichtlich ihres Ernährungsverhaltens, klinischer und biochemischer Charakteristika und der damit assoziierten Mortalitätsursachen beobachtet wurden. Da Dialysepatienten jedoch meist eine wesentlich höhere Rate an Komorbiditäten aufweisen als die Allgemeinbevölkerung, sind die Ergebnisse nur schwer miteinander vergleichbar (44), (46). Aufgrund der Länge der Beobachtungszeit sind die für die statistische Auswertung relevanten Ereignisse zudem höher, was die Wahrscheinlichkeit eines signifikanten Einflusses entsprechend vergrößert. Um sich der Fragestellung zu nähern, ob der Haptoglobin-Genotyp explizit Einfluss auf das Auftreten von CVD nimmt, untersuchten wir im Folgenden das Auftreten von Myokardinfarkt, plötzlicher Herztod, Apoplex, Angina pectoris, pAVK, und/oder herzchirurgischer Eingriffe als kombinierten Endpunkt. Auch hier konnten wir keinen signifikanten Einfluss des Haptoglobin-Genotyps feststellen. Signifikant zeigten sich das Alter sowie das Vorliegen einer Diabetes Erkrankung. Auch wirkte sich ein vorrangegangener Nikotinabusus negativ aus. Aktuelle Literaturrecherchen zu Folge wurde der Einfluss des Haptoglobin-Genotyps auf die kardiovaskuläre Mortalität bereits in verschiedenen Patientenkollektiven untersucht, jedoch widmete sich bisher lediglich eine Studiengruppe ausschließlich dialysepflichtigen Patienten. So gingen Pernod *et al.*, 2004 der Fragestellung nach, welche möglichen biologischen Einflüsse als Indikatoren eines erhöhten CVD-Risikos innerhalb einer umschriebenen Stichprobe von Dialysepatienten fungieren. Neben der Betrachtung von Homozystein, Apolipoprotein(a), antioxidiertem Low-Density Lipoprotein etc., analysierten sie auch das genetisch polymorphe Haptoglobinprotein und identifizierten den Hp2-2 Typen als einen möglichen Risikofaktor für CVD. Demnach zeigte sich in einer Gruppe von Dialysepatienten, welche bereits mindestens ein kardiovaskuläres Ereignis in Ihrem Leben hatten ("Hochrisikogruppe CVD"), eine signifikante Verdopplung des Hp2-2 Typen vgl. mit Dialysepatienten ohne CVD im Lebenslauf ("Kontrollgruppe"). Der Diabetiker-Status zeigte dabei keinen Einfluss (47).

Eine weitere Studiengruppe, welche Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CKD Stadium 2-5) untersuchte, waren die dänischen Forscher um Strandhave *et al.* Sie gingen in Ihrer 2013 publizierten Studie der Frage nach, welcher Zusammenhang zwischen Haptoglobin und den CVD-assoziierten Markern "Herzratenvariabilität" (HRV), gemessen über eine 24 h Holter Aufzeichnung, und "high-sensitive C-reactive Protein" (hs-CRP)

besteht. Sie konnten zeigen, dass Hp2-2 einen signifikanten Risikofaktor möglicher kardiovaskulärer Ereignisse darstellt, indem dieser negativ mit HRV und positiv mit hs-CRP korreliert. Zu beachten ist, dass es sich bei HRV und hs-CRP lediglich um indirekte Risikomarker handelt und manifeste Endpunkte wie Myokardinfarkt, Apoplex oder plötzlicher Herztod nicht direkt abgebildet werden (48). Zudem bestand das Patientenkollektiv nicht ausschließlich aus dialysepflichtigen Personen, sondern umfasste Patienten im CKD Stadium 2-5.

Um explizit nur die Ereignisse zu betrachten, die gesichert auf arteriosklerotische Veränderungen zurückzuführen sind, grenzten wir die relevanten Endpunkte auf die Events "Myokardinfarkt" und "Apoplex" ein und betrachteten diese sowohl einzeln, als auch kumuliert. Auch hier konnten wir keinen signifikanten Einfluss des Haptoglobin-Genotyps feststellen. Jedoch zeigte sich in beiden Endpunkten sowie in der kumulierten Betrachtung ein hypothesenkonformer Trend, nach welchem Personen mit Hp1-1 das geringste Risiko für die entsprechenden Events besitzen. Vergleicht man unsere Erkenntnisse mit denen von Levy *et al.* (2004), zeigen sich zunächst zwar Parallelen in den Ergebnissen, jedoch muss beachtet werden, dass das signifikant verminderte CVD-Risiko des homozygoten Hp-1 in der Levy-Studie, nur nicht-dialysepflichtige, Nicht-Diabetiker betraf (49). Ein direkter Vergleich oder gar Übertragung der Ergebnisse auf unsere Stichprobe ist somit nicht möglich. Eine ebenfalls interessante Entdeckung machte die belgische Forschungsgruppe um Chapelle *et al.* (1982) bereits vor über 30 Jahren, als sie den Zusammenhang zwischen dem Haptoglobin-Genotyp und myokardspezifischer Serumenzyme untersuchten. In die Studie einbezogen wurden alle Patienten, welche innerhalb von zwei Jahren mit einem manifesten Myokardinfarkt im Universitätsklinikum Lüttich hospitalisiert wurden. Angaben zum Diabetikerstatus oder Dialysepflichtigkeit wurden nicht gemacht. Die Forscher fanden, dass der Hp2-2 Typ im Vergleich zum -1-1 und -2-1, mit höheren Serumleveln myokardspezifischer Enzyme einhergeht sowie mit einer signifikant höheren Anzahl klinischer Komplikationen wie z.B. Herzversagen assoziiert ist. Da es zwischen den Probanden mit Myokardinfarkt und der Vergleichsstichprobe gesunder Probanden keine Unterschiede in der Haptoglobin-Verteilung gab, kamen die Forscher zu dem Schluss, dass der Hp2-2 sich lediglich negativ auf die Schwere eines Myokardinfarkts auswirkt, nicht jedoch auf das Ereignisrisiko an sich (50).

Da man bisher angenommen hatte, dass der Haptoglobin-Polymorphismus insbesondere innerhalb der Gruppe der Diabetiker zum Tragen kommt, betrachteten wir im Folgenden die Subgruppen Diabetiker/Nicht-Diabetiker getrennt voneinander. Auch hier ergab sich kein signifikanter Einfluss des Haptoglobin-Typs auf CVD, weder in der Diabetiker- noch in der

Nicht-Diabetikergruppe. Überhaupt zeigte innerhalb der Diabetikergruppe keine der betrachteten Einflussgrößen einen signifikanten Einfluss auf CVD. Demgegenüber stehen die eindrücklichen Ergebnisse der Studiengruppe um Levy *et al.* (2002), welche fanden, dass der Hp2-2 Typ im Vergleich zu Hp1-1 mit einem fünffach erhöhten CVD-Risiko einhergeht und damit neben den klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, als hoch signifikanter, unabhängiger Risikofaktor für CVD bei Diabetespatienten betrachtet werden kann (15). Jedoch zeigt sich auch hier, wie konträr und teils widersprüchlich die einschlägige Literatur bis dato ist. Denn bereits zwei Jahre später sollte die gleiche Studiengruppe ihre 2002 publizierten Ergebnisse wieder zum Diskurs stellen, als sie Patienten der bevölkerungsbasierten Framingham Heart Offspring-Studie hinsichtlich ihres Haptoglobin-Genotyps und koronaren Risikos untersuchten. Diesmal verblieb der Haptoglobin-Typ bei Betrachtung aller drei Ausprägungen zunächst ohne signifikanten Einfluss innerhalb der Gesamtstichprobe, welche mit 3273 Patienten, davon 433 Diabetiker, sehr umfangreich ausfiel. Wurden Diabetiker und Nicht-Diabetiker jedoch getrennt voneinander betrachtet, kam es überraschenderweise, und im Vergleich zur Vorstudie, zu einer reziproken Verteilung der Haptoglobin-Typen nach Diabetikerstatus. Innerhalb der Diabetikergruppe mit CVD ergab sich eine signifikante Überrepräsentation des Hp1-1 Typs während in der Nicht-Diabetikergruppe mit CVD der Hp1-1 Typ deutlich unterrepräsentiert war. Zurückgeführt wurde dies von Levy *et al.* auf eine möglicherweise verbesserte Prognose und Überlebensrate des diabetischen Hp1-1 Typen. Als weiterer Grund für die diskrepanten Ergebnisse wurde die Diversität in der ethnischen Zugehörigkeit der verschiedenen Studienkohorten und die damit verbundenen Unterschiede in der Haptoglobin-Verteilung angeführt, welche Studien ähnlicher Fragestellung häufig schwer miteinander vergleichbar macht (49).

Interessant wird es bei der Betrachtung der kumulierten Zeiträume (Studienzeitraum 2002-2014). Hier zeigt sich nicht nur, dass der Haptoglobin-Polymorphismus trotz gesteigener Fallzahlen keinen signifikanten Einfluss auf die Mortalitätsrate hat, sondern, dass die Hazard Ratios fast identisch sind. Betrachtet man die dazugehörigen Diagramme (Abbildung 12, S. 35 vs. Abbildung 17, S. 43), wird deutlich, dass sich die Überlebenskurven mit zunehmendem N deutlich annähern und dadurch signalisieren, dass der Haptoglobin-Polymorphismus als Einflussgröße hier absolut keine Rolle mehr spielt. Ursächlich für diesen Trend könnte die Diversität der betrachteten Todesursachen sein, welche in ihrer Pathophysiologie größtenteils wohl keine Assoziation mit Haptoglobin und seinem Polymorphismus besitzen. Ergo scheint dieser im Hinblick auf die Mortalität sowie das Vorkommen von CVD in unserer Stichprobe keine Relevanz zu besitzen.

6.4 Fazit

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass abgesehen von den Zielereignissen Myokardinfarkt und Apoplex, keines unserer Ergebnisse mit den von uns postulierten Hypothesen sowie mit den bis dato existierenden Studien in Einklang zu bringen ist. Die unterschiedlichen Ergebnisse sind zumindest teilweise auf die jeweils zugrundeliegenden Studiendesigns sowie unterschiedlichen Studienpopulationen zurückzuführen. Während wir auf Daten einer klinischen Interventionsstudie mit fest definiertem, zufällig ausgewählten Patientenkollektiv zurückgriffen, bedienten sich andere Forschergruppen zumeist Fall-Kontrollstudien (DeBacquer *et al.*, 2001; Levy *et al.*, 2002) oder cross-sectional Designs (Levy *et al.*, 2004, Strandhave *et al.*, 2013). Hier liegt womöglich auch der größte Verzerrungseffekt hinsichtlich möglicher Ergebnisinterpretationen. Während unser Studienkollektiv durch seine multiplen Vorerkrankungen als sehr spezifisches und, verglichen mit der Allgemeinbevölkerung, nicht-repräsentatives Studienkollektiv zu betrachten ist, werden in den meisten anderen Studien häufig Personen der normalen Bevölkerung betrachtet oder innerhalb einer Fall-Kontroll Studie mit Personen einer Erkrankungsgruppe gematcht. Dabei ist anzunehmen, dass die Multimorbidität unserer Stichprobe sowie die Dialysepflichtigkeit an sich bereits einen Großteil des CVD Risikos erklären und ein statistisch schwächerer Effekt des Haptoglobins möglicherweise verdeckt wird. Diesbezüglich relevant sind die Studienergebnisse von Tonelli *et al.* (2012), welche zeigen, dass die terminale Niereninsuffizienz, ähnlich eines Diabetes mellitus, bereits als eigenständiger Risikofaktor für CVD angesehen werden sollte ("Coronary heart disease risk equivalent") (46). Weitere Ergebnisdifferenzen sind womöglich auch in der geografisch bedingten, unterschiedlichen Verteilung der Haptoglobin-Genotypen und der sich daraus ergebenden ethnischen Unterschiede der Studiengruppen zu suchen (41). Eine länderübergreifende Generalisierung der Ergebnisse ist daher nicht problemlos möglich, Vergleiche sollten nur innerhalb der ethnischen Zugehörigkeit erfolgen. Für zukünftige Studien mit ähnlicher Fragestellung wäre zudem ein Studienkollektiv mit einer höheren Anzahl relevanter Zielereignisse wünschenswert, um die von uns gefundenen, bisher nicht-signifikanten Trends, statistisch zu untermauern. Dabei sollte streng darauf geachtet werden, die interessierenden Zielgrößen so präzise wie möglich zu definieren und "Sammelvariablen" wie die von uns untersuchte "Gesamtmortalität" zu vermeiden. Ein längerer Beobachtungszeitraum wäre hinsichtlich der Ereignisanzahl hier sicher hilfreich.

Trotz der zuvor genannten kritischen Punkte soll abschließend darauf hingewiesen werden, dass es zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Arbeiten gibt, die den Haptoglobin-Polymorphismus im Hinblick auf die Gesamtmortalität sowie das kardiovaskuläre Risiko bei Dialysepatienten schwerpunktmäßig untersuchen. Dabei sollte gerade die vorherrschende "Ergebnis-Kontroversität" der aktuelleren Studien zum Ansporn genommen werden, zukünftige Forschungsprojekte mit ähnlicher Fragestellung zu behandeln, insbesondere im regionalen Raum. Hier können die von uns gefundenen Trends zumindest eine grobe Richtung markieren.

7. Zusammenfassung

Um das unterschiedlich hohe kardiovaskuläre Risiko verschiedener Patientenpopulationen besser erklären und ggf. eine Therapieoptimierung erzielen zu können, rückten in den vergangenen Jahren zunehmend genetisch determinierte Biomoleküle in den Blickpunkt der Wissenschaftler (23). Zu diesen zählt auch das Protein Haptoglobin, von welchem angenommen wird, dass es über seinen funktionellen Polymorphismus (Hp1-1, Hp2-1 und Hp2-2) u. a. an der Genese arteriosklerotischer Veränderungen beteiligt ist und daher als möglicher Risikofaktor für CVD in Betracht kommt. Dabei wird angenommen, dass der homozygote Typ Hp-1 aufgrund seiner höheren antioxidativen Potenz einen positiven Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko nimmt, während der homozygote Hp-2 als Risikofaktor gilt (28), (41). Die vorliegende Arbeit wollte untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen den verschiedenen Haptoglobin-Typen und der Mortalität sowie dem Auftreten definierter kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz gibt. Es gilt zu überprüfen, ob sich die Annahme eines protektiven vs. Risikotyps bestätigen lässt. Hierzu analysierten wir DNA-Proben von 589 Dialysepatienten, welche bereits im Rahmen einer kontrolliert randomisierten Studie (2002-2008) erhoben und durch verschiedene klinische Parameter gut charakterisiert waren (38). Die Bestimmung des Haptoglobin-Genotyps erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion sowie Gelelektrophorese und wurde patientengenau zugeordnet. Die Ergebnisse wurden einem multivariaten Regressionsmodell zugeführt und unter Adjustierung von definierten, kardiovaskulär relevanten Einflussgrößen mit den klinischen Endpunkten "Gesamtüberleben", "kardiovaskuläre Ereignisse" sowie "Myokardinfarkt/Apoplex" assoziiert. Außerdem erfolgte ein Subgruppenvergleich zwischen Diabetikern und Nicht-Diabetikern sowie eine Follow-up Analyse des Gesamtüberlebens bis in das Jahr 2014. In keinem der betrachteten Endpunkte zeigte sich der Haptoglobin-Polymorphismus als signifikante Einflussgröße. Abgesehen von den Einzelereignissen Myokardinfarkt ($p = 0,63$) und Apoplex ($p = 0,83$), bei welchen sich lediglich ein hypothesenkonformer, nicht-signifikanter Trend zeigte, der den Hp1-1 als günstigsten der drei Genotypen hervorhebt, konnte keine unserer postulierten Hypothesen bestätigt werden. Auch bei isolierter Betrachtung der Diabetespatienten und im Follow-up zeigte Haptoglobin keinen relevanten Einfluss ($p = 0,32$), ($p = 0,87$), respektive. Mögliche Ursachen für unsere teils konträren Ergebniskonstellationen sind zum Einen in Unterschieden der verwendeten Studiendesigns und untersuchten Studienkohorten zu suchen, zum Anderen sind geografische Unterschiede in der Haptoglobin-Verteilung sowie eine zu geringe Anzahl an Zielereignissen anzuführen. Ein längerer Beobachtungszeitraum wäre hier sicher sinnvoll.

8. Literaturverzeichnis

1. Gößwald A, Lange M, Kamtsiuris P, Kurth BM. DEGS: Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland. Bundesweite Quer- und Längsschnittstudie im Rahmen des Gesundheitsmonitorings des Robert Koch-Instituts. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz. Juni 2012;55:775-780.
2. Kücükköylü, S, Rump LC. Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen. Der Internist. Juni 2012;53:791–801.
3. Eckardt, KU. Chronische Nierenerkrankung - (nicht) im Fokus. Dtsch Ärztebl Int 2016; 113(6):83-4.
4. Locatelli F, Marcelli D, Conte F, D'Amico M, Del Vecchio L, Limido A, u. a. Survival and development of cardiovascular disease by modality of treatment in patients with end-stage renal disease. J Am Soc Nephrol JASN. November 2001;12(11):2411–7.
5. Weidtmann B, Schunkert, H. Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen. Der Internist. August 2007;48(8): 770-778.
6. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. N Engl J Med. 23. September 2004;351(13):1296–305.
7. Frei, U, Schober-Halstenberg H-J. Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2005/2006. QuaSi Niere GmbH.
8. Herold G. Innere Medizin-eine vorlesungsorientierte Darstellung. Herold, G. Köln, 2011; S. 231-232.
9. Heuer JC. Arteriosklerose. Pharmakologie Journal. März 2009. URL: <https://pharmakologie.wordpress.com/2009/03/13/arteriosklerose/>. Abruf am 14.03.2018.
10. Wang AY-M, Lam CW-K, Chan IH-S, Wang M, Lui S-F, Sanderson JE. Sudden Cardiac Death in End-Stage Renal Disease Patients: A 5-Year Prospective Analysis. Hypertension. 1. August 2010;56(2):210–6.
11. Kanbay M, Afsar B, Goldsmith D, Covic A. Sudden Death in Hemodialysis: An Update. Blood Purif. 2010;30(2):135–45.
12. Pernod G, Bosson J-L, Golshayan D, Barro C, Forneris G, Martina G, u. a. Phenotypic and genotypic risk factors for cardiovascular events in an incident dialysis cohort. Kidney Int. 2. April 2006;69(8):1424–30.
13. Adams JN, Cox AJ, Freedman BI, Langefeld CD, Carr JJ, Bowden DW. Genetic analysis of haptoglobin polymorphisms with cardiovascular disease and type 2 diabetes in the diabetes heart study. Cardiovasc Diabetol. 11. Februar 2013;12:31.
14. Costacou T, Levy AP. Haptoglobin Genotype and Its Role in Diabetic Cardiovascular Disease. J Cardiovasc Transl Res. August 2012;5(4):423.

15. Levy AP, Hochberg I, Jablonski K, Resnick HE, Lee ET, Best L, u. a. Haptoglobin phenotype is an independent risk factor for cardiovascular disease in individuals with diabetes: The Strong Heart Study. *J Am Coll Cardiol.* 4. Dezember 2002;40(11):1984–90.
16. Smithies O. Zone electrophoresis in starch gels: group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem J.* Dezember 1955;61(4):629–41.
17. Putnam F. *The Plasma Proteins V4: Structure, Function, and Genetic Control.* Elsevier; 2012. 439 S.
18. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. *Clin Chem.* Oktober 1996;42(10):1589–600.
19. Goldenstein H, Levy NS, Levy AP. Haptoglobin genotype and its role in determining heme-iron mediated vascular disease. *Pharmacol Res.* Juli 2012;66(1):1–6.
20. Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, Shimada E, Nishimura M, Morishita K, u. a. Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anhaploglobinemic patients with antihaptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood.* 15. Februar 2000;95(4):1138–43.
21. Carter K, Worwood M. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. *Int J Lab Hematol.* April 2007;29(2):92–110.
22. Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI, Szafrank T, Levy NS, Ricklis RM, u. a. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood.* 15. Dezember 2001;98(13):3693–8.
23. Farbstein D, Levy AP. The Genetics of Vascular Complications in Diabetes Mellitus. *Cardiol Clin.* August 2010;28(3):477–96.
24. Sadrzadeh SM, Graf E, Panter SS, Hallaway PE, Eaton JW. Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *J Biol Chem.* 12. Oktober 1984;259(23):14354–6.
25. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1. Dezember 1995;41(12):1819–28.
26. Eaton JW, Brandt P, Mahoney JR, Lee JT. Haptoglobin: a natural bacteriostat. *Science.* 5. Februar 1982;215(4533):691–3.
27. Graversen JH, Madsen M, Moestrup SK. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin–hemoglobin complexes from plasma. *Int J Biochem Cell Biol.* 1. April 2002;34(4):309–14.
28. Zvi B, Levy AP. Haptoglobin phenotypes, which one is better and when? *Clin Lab.* 2006;52(1–2):29–35.
29. Asleh R, Marsh S, Shilkrot M, Binah O, Guetta J, Lejbkowitz F, u. a. Genetically Determined Heterogeneity in Hemoglobin Scavenging and Susceptibility to Diabetic Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 13. Juni 2003;92(11):1193–200.

30. Lange V. [Haptoglobin polymorphism--not only a genetic marker]. *Anthropol Anz Ber Uber Biol-Anthropol Lit.* Dezember 1992;50(4):281–302.
31. Dane MJC, Khairoun M, Lee DH, Berg BM van den, Eskens BJM, Boels MGS, u. a. Association of Kidney Function with Changes in the Endothelial Surface Layer. *Clin J Am Soc Nephrol.* 4. Juli 2014;9(4):698–704.
32. Moreno PR, Purushothaman K-R, Sirol M, Levy AP, Fuster V. Neovascularization in Human Atherosclerosis. *Circulation.* 9. Mai 2006;113(18):2245–52.
33. Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 30. November 1988;157(1):87–94.
34. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 1. Januar 2006;147(S1):S193–201.
35. De Kleijn DPV, Smeets MB, Kemmeren PPCW, Lim SK, Van Middelaar BJ, Velema E, u. a. Acute-phase protein haptoglobin is a cell migration factor involved in arterial restructuring. *FASEB J.* 21. Mai 2002;16(9):1123–5.
36. Cid MC, Grant DS, Hoffman GS, Auerbach R, Fauci AS, Kleinman HK. Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest.* 1. März 1993;91(3):977–85.
37. Delanghe J, Langlois M, Duprez D, De Buyzere M, Clement D. Haptoglobin polymorphism and peripheral arterial occlusive disease. *Atherosclerosis.* 1. August 1999;145(2):287–92.
38. Heinz J, Kropf S, Domröse U, Westphal S, Borucki K, Luley C, u. a. B Vitamins and the Risk of Total Mortality and Cardiovascular Disease in End-Stage Renal Disease: Results of a Randomized Controlled Trial. *Circulation.* 30. März 2010;121(12):1432–8.
39. Team E. Polymerase Chain Reaction (PCR) : Principle, Procedure, Components, Types and Applications [Internet]. *LaboratoryInfo.com.* 2015 [zitiert 6. April 2018]. Verfügbar unter: <https://laboratoryinfo.com/polymerase-chain-reaction-pcr/>
40. Santiago Rodriguez, Tom R. Gaunt and Ian N. M. Day. Hardy-Weinberg Equilibrium Testing of Biological Ascertainment for Mendelian Randomization Studies. *American Journal of Epidemiology* Advance Access published on January 6, 2009, DOI 10.1093/aje/kwn359.
41. Wobeto VP de A, Zaccariotto TR, Sonati M de F. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance. *Genet Mol Biol.* 2008;31(3):602–20.
42. Koch W, Latz W, Eichinger M, Roguin A, Levy AP, Schömig A, u. a. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. *Clin Chem.* September 2002;48(9):1377–82.
43. Chen Y-C, Lee C-C, Huang C-Y, Huang H-B, Yu C-C, Ho Y-C, u. a. Haptoglobin polymorphism as a risk factor for chronic kidney disease: a case-control study. *Am J Nephrol.* 2011;33(6):510–4.

44. De Bacquer D, De Backer G, Langlois M, Delanghe J, Kesteloot H, Kornitzer M. Haptoglobin polymorphism as a risk factor for coronary heart disease mortality. *Atherosclerosis*. Juli 2001;157(1):161–6.
45. Cahill LE, Levy AP, Chiuve SE, Jensen MK, Wang H, Shara NM, u. a. Haptoglobin Genotype Is a Consistent Marker of Coronary Heart Disease Risk Among Individuals With Elevated Glycosylated Hemoglobin. *J Am Coll Cardiol*. 19. Februar 2013;61(7):728–37.
46. Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns BJ, Klarenbach S, Pannu N, u. a. Risk of coronary events in people with chronic kidney disease compared with those with diabetes: a population-level cohort study. *Lancet Lond Engl*. 1. September 2012;380(9844):807–14.
47. Pernod G, Bosson J-L, Golshayan D, Barro C, Alloatti S, Turc-Baron C, u. a. The Diamant Alpin Dialysis cohort study: clinico-biological characteristics and cardiovascular genetic risk profile of incident patients. *J Nephrol*. Februar 2004;17(1):66–75.
48. Strandhave C, Svensson M, Krarup H, Christensen JH. Haptoglobin Genotype and Risk Markers of Cardiovascular Disease in Patients with Chronic Kidney Disease [Internet]. *International Journal of Nephrology*. 2013 [zitiert 6. April 2018]. Verfügbar unter: <https://www.hindawi.com/journals/ijn/2013/650847/>
49. Levy AP, Larson MG, Corey D, Lotan R, Vita JA, Benjamin EJ. Haptoglobin phenotype and prevalent coronary heart disease in the Framingham offspring cohort. *Atherosclerosis*. 1. Februar 2004;172(2):361–5.
50. Chapelle J-P, Albert A, Smeets J-P, Heusghem C, Kulbertus HE. Effect of the Haptoglobin Phenotype on the Size of a Myocardial Infarct. *N Engl J Med*. 19. August 1982;307(8):457–63.
51. Ziegler A, Lange S, Bender R. Überlebenszeitanalyse: Die Cox-Regression. *Dtsch med Wochenschr*. 2007; 132:e42-e44.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Der Einfluss des Haptoglobin-Polymorphismus auf die Gesamtmortalität und das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse bei Dialysepatienten

im Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie

mit Unterstützung durch Prof. B. Isermann und Frau Dr. J. Hoffmann

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, 15.11.2018

10. Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die Wissenschaftsbezug hat.

Magdeburg, 15.11.2018

11. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle dem Direktor des Instituts für klinische Chemie und Pathobiochemie, Herrn Prof. B. Isermann, für die Überlassung meines Dissertationsthemas und die Möglichkeit in seiner Abteilung zu promovieren.

Mein besonderer Dank gebührt Frau Dr. J. Hoffmann, welche mir mit ihrer Hilfsbereitschaft und ihren zahlreichen aufmunternden Worten von Beginn bis Fertigstellung der Arbeit stets zur Seite stand und dadurch Ansporn- und Motivationsgeber war. Danke auch für die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskripts. Ein herzlicher Dank geht ebenso an Herrn Prof. S. Kropf, der mir mit seiner geduldigen Art eine große Hilfe bei der Aufarbeitung der statistischen Daten war.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeitern der AG Isermann des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie sowie den medizinisch-technischen Assistentinnen für ihre Hilfestellung und geduldige Unterstützung während der Laborarbeiten bedanken. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die konstruktive und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein herzlicher Dank geht nicht zuletzt an meine lieben Eltern Beatrix und Uwe Riedel, welche mir dieses Studium erst ermöglicht haben und mir während der Anfertigung dieser Arbeit stets mit aufmunternden Worten zur Seite standen.

12. Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

13. Anhang

Sehr geehrte Frau Kollegin, sehr geehrter Herr Kollege,

kardiovaskuläre Ereignisse zählen immer noch zu den wichtigsten Morbiditäts- und Mortalitätsursachen bei Dialysepatienten. Diesem Thema widmete sich zwischen 2002 und 2008 eine überregionale Studie des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg. An dieser Studie nahmen auch von Ihnen betreute Patienten teil. Der Titel lautete:

„Untersuchung zum Einfluss einer Multivitaminsupplementation auf Morbidität und Mortalität bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Eine multizentrische, randomisierte Doppel-blind Studie“ (Heinz *et al.*, 2010).

Im Rahmen eines Follow-ups möchten wir die bereits gewonnenen Daten erweitern und aktuelle Informationen zu den **Überlebenszeiten** der verbliebenen Patienten erheben, um so einen eventuell nachhaltigen Einfluss der Vitaminsupplementation zu ermitteln. Dazu würden wir Sie bitten, das beigelegte Formular möglichst vollständig auszufüllen und an uns zurückzuschicken. Befindet sich der genannte Patient gegenwärtig noch in ihrer Behandlung? Wenn ja, tragen Sie bitte das **Datum der letzten Dialyse** bzw. des **letzten Kontaktes** zum Patienten ein. Sollte der Patient verstorben sein, sind das **Sterbedatum** sowie die **Todesursache** von Interesse. Bei Transplantation oder Wechsel des Dialysezentrums ist diese Möglichkeit anzukreuzen. Die gewonnenen Patientendaten werden selbstverständlich vertraulich behandelt und nach Zuordnung zu den bereits vorhandenen Datensätzen anonym ausgewertet. Ein Rückschluss auf die Identität einzelner Personen wird nicht möglich sein. Die Initiierung des Follow-ups erfolgt im Einvernehmen mit dem Leiter der Geschäftsstelle Ethik-Kommission Herrn Dr. Beck sowie der Stelle für Datenschutz der medizinischen Fakultät. Für eventuelle Rückfragen stehe ich Ihnen selbstverständlich jederzeit unter 0176-32810260 oder christiane.anna.riedel@gmail.com zur Verfügung. Ich werde Sie zeitnah kontaktieren, um ein kurzes Feedback einzuholen. Da die Qualität und Aussagekraft dieser Untersuchung wesentlich von Ihrer Mitarbeit abhängt, danke ich bereits jetzt herzlich für die Kooperation und verbleibe mit freundlichen Grüßen,

Christiane Anna Riedel

Ärztin

Prof. Dr. med. B. Isermann

Direktor des Instituts für Klinische Chemie und
Pathobiochemie

