

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Abteilung für Nephrologie und Rheumatologie
Direktor: Prof. Dr. B. Grabensee

**Einfluss genetischer Polymorphismen
des Renin-Angiotensin-Systems
auf die primäre chronische Glomerulonephritis**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Christos Bantis

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. P. J. Heering

Korreferent: Prof. Dr. med. M. Kelm

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	S. 1
1.1 Genetische Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems	S. 1
1.1.1 Angiotensin I-Converting Enzym-Gen I/D Polymorphismus	S. 1
1.1.2 Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus	S. 2
1.1.3 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus	S. 3
1.2. Zielsetzung und Fragestellungen	S. 4
2. Patienten und Methoden	S. 5
2.1 Studiendesign	S. 5
2.2 Patienten	S. 6
2.3 Kontrollgruppe	S. 6
2.4 Laborbestimmungen	S. 6
2.4.1 Allgemeine Laborbestimmungen	S. 7
2.4.2 Bestimmung der genetischen Polymorphismen des RAS	S. 7
2.4.2.1 Materialgewinnung	S. 7
2.4.2.2 DNA-Extraktion	S. 7
2.4.2.3 Angiotensin I-Converting Enzym-Gen I/D Polymorphismus	S. 8
2.4.2.4 Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus	S. 12
2.4.2.5 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus	S. 13
2.4.2.6 Qualitätssicherung	S. 18
2.5 Statistik	S. 18
2.6 Ethische Aspekte – Datenschutz	S. 20

3. Ergebnisse	S. 21
3.1 Gesamtes Patientenkollektiv	S. 21
3.1.1 Patientenbeschreibung	S. 21
3.1.2 Progression	S. 22
3.1.3 ACE-Serumaktivität im gesamten Kollektiv und in der Kontrollgruppe	S. 24
3.2 IgA Nephropathie	S. 26
3.2.1 Patientenbeschreibung	S. 26
3.2.2 Progression der Erkrankung	S. 29
3.2.3 Einfluss des ACE-I/D Polymorphismus	S. 34
3.2.4 Einfluss des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus	S. 39
3.2.5 Einfluss des AT ₁ R-Gen A1166C Polymorphismus	S. 46
3.2.6 Kombinierte Analyse des Einflusses der Polymorphismen	S. 48
3.2.7 Zusammenfassung	S. 52
3.3 Fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis	S. 53
3.3.1 Patientenbeschreibung	S. 53
3.3.2 Progression der Erkrankung	S. 53
3.3.3 Einfluss des ACE-I/D Polymorphismus	S. 57
3.3.4 Einfluss des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus	S. 59
3.3.5 Einfluss des AT ₁ R-Gen A1166C Polymorphismus	S. 53
3.3.6 Kombinierte Analyse des Einflusses der Polymorphismen	S. 65
3.3.7 Zusammenfassung	S. 66
3.4 Membranöse Glomerulonephritis	S. 67
3.4.1 Patientenbeschreibung	S. 67
3.4.2 Progression der Erkrankung	S. 67
3.4.3 Einfluss des ACE-I/D Polymorphismus	S. 71
3.4.4 Einfluss des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus	S. 74
3.4.5 Einfluss des AT ₁ R-Gen A1166C Polymorphismus	S. 77
3.4.6 Kombinierte Analyse des Einflusses der Polymorphismen	S. 78
3.2.7 Zusammenfassung	S. 81

4. Diskussion	S. 82
4.1 Das Renin-Angiotensin-System und die Progression der chronischen Nierenerkrankungen	S. 82
4.2 Einfluss der Polymorphismen des RAS auf die Glomerulonephritiden	S. 83
4.2.1 IgA Nephropathie	S. 83
4.2.1.1 Einfluss des ACE-Gen I/D Polymorphismus	S. 84
4.2.1.2 Einfluss des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus	S. 89
4.2.1.3 Einfluss des AT ₁ R-Gen A1166C Polymorphismus	S. 91
4.2.1.4 Kombinierte Analyse der Polymorphismen	S. 91
4.2.2 Fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis	S. 92
4.2.2.1 Einfluss der Polymorphismen	S. 92
4.2.3 Membranöse Glomerulonephritis	S. 94
4.2.3.1 Einfluss der Polymorphismen	S. 94
4.3 Vom Genotyp zum Phänotyp	S. 96
4.3.1 Angiotensin I-Converting Enzym-Gen I/D Polymorphismus	S. 96
4.3.2 Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus	S. 98
4.3.3 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus	S. 99
5. Zusammenfassung und Schlussbetrachtung	S. 102
6. Literatur	S. 106
7. Verwendete Abkürzungen	S. 123
8. Lebenslauf	S. 124
9. Kurzfassung	S. 125

1. Einleitung

Die chronische Glomerulonephritis stellt eine der häufigsten Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz dar. Das Renin-Angiotensin-System (RAS) spielt dabei eine bedeutende Rolle in der Ausprägung der Nierenschäden durch die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie oder auch direkt durch die lokale Auswirkung seiner Produkte auf die Funktion und Architektur der Nephrone. Vor diesem Hintergrund werden genetische Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems im Zusammenhang mit der Progression der chronischen Glomerulonephritis untersucht. Lässt sich eine Korrelation bestätigen, so könnten in Zukunft Patienten mit den entsprechenden Genotypen identifiziert und selektiv therapiert werden.

1.1 Genetische Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems

Abgesehen von den monogenen Erkrankungen, die durch einen Defekt eines einzigen Gens verursacht werden (z.B. autosomal dominant vererbte Zystennieren), ist in den letzten Jahren erkannt worden, dass viele Krankheitsbilder von multifaktoriellen genetischen Einflüssen geprägt werden. Aus dieser Perspektive haben auch als harmlos oder stumm eingestufte Variationen des genetischen Materials an Bedeutung gewonnen. Zur genetischen Analyse von polygenen multifaktoriellen Erkrankungen ist es naheliegend, zunächst die Gene zu untersuchen, deren Produkte bekanntermaßen eine physiologische Bedeutung für den Phänotyp haben.

Wegen der unbestrittenen wichtigen (patho)physiologischen Rolle des RAS, sind die Genloci seiner Komponenten Kandidatengene für die Entwicklung der arteriellen Hypertonie und das Fortschreiten von Nierenerkrankungen¹. Die Forschung nach bedeutenden Genloci war nicht immer erfolgreich; die Suche z.B. nach einem klinisch relevanten Polymorphismus des Renin-Gens erwies sich als negativ^{2, 3, 4}. Auch bei den anderen Kandidatengenen des RAS (Angiotensin I-Converting Enzyme-Gen, Angiotensinogen-Gen, Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen) hatten nur wenige der zahlreichen beschriebenen Polymorphismen eine klinische Bedeutung. Nachfolgend werden die drei wichtigsten von ihnen dargestellt:

1.1.1 Angiotensin I-Converting Enzym-Gen I/D Polymorphismus

Im Jahr 1990 stellten Rigat et al⁵ einen Polymorphismus am Intron 16 des Angiotensin I-Converting Enzym (ACE)-Gens fest: eine 287 Basenpaare lange Sequenz kann entweder anwesend („insertion“, I-Allel) oder abwesend („deletion“, D-Allel) sein. Das D-Allel wurde mit

höheren ACE-Serumspiegeln in der gesunden Bevölkerung assoziiert. Abgesehen vom zirkulierenden ACE konnte auch auf Gewebeebene (lokales RAS) eine erhöhte ACE-Aktivität in T-Lymphozyten⁶, im Myokard⁷ und in der Niere [auf Grund der kleinen Fallzahl (n= 17) nur Tendenz]⁸ beim D-Allel nachgewiesen werden.

Eine Beziehung zwischen dem ACE-I/D Polymorphismus und der arteriellen Hypertonie bestand nicht^{9, 10, 11}. Auf der anderen Seite wurde das D-Allel mit verschiedenen kardiovaskulären Komplikationen assoziiert: festgestellt wurde ein Zusammenhang mit einem höheren Risiko für die koronare Herzkrankheit^{12, 13, 14}, den Myokardinfarkt^{15, 16, 14} und den Hirninfarkt^{17, 18, 19}. Der ACE-I/D Polymorphismus wurde mit der Entwicklung einer Linksherzhypertrophie in der Gesamtpopulation²⁰, bei Patienten^{21, 22} und bei Gesunden nach hartem Training²³ verknüpft. Beobachtet wurde auch eine Assoziation mit der Entwicklung der ischämischen oder idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie²⁴. Ein ungünstiger Einfluss des ACE-D Allels auf die Intima/Media-Relation der Arteria Carotis in der Gesamtpopulation²⁵ und auf die Wandbreite der interlobulären Arterien bei nierenbiopsierten, nicht diabetischen Patienten konnte ebenfalls nachgewiesen werden²⁶. Dem ersten Bericht über eine erhöhte Prävalenz des D-Allels unter insulinpflichtigen Diabetikern mit diabetischer Nephropathie²⁷ folgten zahlreiche widersprüchliche Studien. Selbst großen Metaanalysen ist es nicht gelungen, Klarheit zu verschaffen^{28, 29, 30}. Die meisten Autoren beobachteten einen Effekt des ACE-I/D Polymorphismus auf die Manifestation und den Verlauf der autosomal dominant vererbten Zystennieren^{31, 32, 33}. Ein Einfluss auf das Langzeitorganüberleben nach Nierentransplantation wurde auch beschrieben^{34, 35}, war aber nicht in allen Studien reproduzierbar^{36, 37}. Interessanterweise wurde das I-Allel häufiger unter Hochleistungssportlern nachgewiesen^{38, 39, 40}.

1.1.2 Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus

Jeunemaitre et al beschrieben im Jahr 1992 eine Punktmutation des Angiotensinogen (AGT)-Gens, die mit höheren AGT-Serumspiegeln und mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie assoziiert war⁴¹. Es handelt sich um eine Substitution von Thymin durch Cytosin, die bei der Translation zu einer Änderung der Primärstruktur des produzierten Angiotensinogens führt: bei der Aminosäure 235 wird Methionin (M) gegen Threonin (T) ausgetauscht.

Der AGT-M235T Polymorphismus wurde mit einem erhöhten Risiko für koronare Herzkrankheit^{42, 43, 44} und Myokardinfarkt⁴⁵ verknüpft. Ein höhere Prävalenz des T-Allels unter präeklampsischen Schwangeren wurde beschrieben⁴⁶. Eine vermutete Assoziation des AGT-M235T Polymorphismus mit der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie konnte nicht bestätigt werden^{47, 48}.

1.1.3 Angiotensin II- Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus

Im Jahr 1994 stellten Bonnardeaux et al fest, dass der A1166C Polymorphismus des AT₁R-Gens (Ersatz von Adenosin durch Cytosin im Kodon 1166) vermehrt unter Patienten mit essentieller Hypertonie auftrat. Darüber hinaus wurde das C-Allel mit dem Auftretsalter und dem Schweregrad der arteriellen Hypertonie assoziiert⁴⁹. Obwohl der AT₁R-A1166C Polymorphismus weder die Konzentrationen der Komponenten des RAS^{50, 51} noch die Anzahl oder die Affinität der AT₁Rezeptoren auf Thrombozyten⁵⁰ beeinflusste, wurde eine gesteigerte vasokonstriktive Reaktion der Arterien auf Ang-II beim C-Allel festgestellt⁵², die eine ähnliche Hyperreaktivität auch in anderen Geweben vermuten lässt.

Der AT₁R-A1166C Polymorphismus wurde mit der Entwicklung und dem Schweregrad der koronaren Herzkrankheit assoziiert^{53, 54}, Beschrieben wurde außerdem ein synergistischer Effekt des ACE-I/D und des AT₁R-A1166C Polymorphismus in Bezug auf das Risiko eines Myokardinfarkts⁵⁵ und der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit^{56, 53}; diese Befunde konnten aber nicht von allen Autoren bestätigt werden⁵⁷. Bei normotensiven aber nicht bei hypertensiven Japanern korrelierte der AT₁R-A1166C Polymorphismus mit der linksventrikulären Masse⁵⁸. In anderen Studien war jedoch der AT₁R-A1166C Polymorphismus nicht in die Entwicklung einer Linksherzhypertrophie involviert^{59, 60}. Der Grad der Linksherzhypertrophie bei Patienten mit hypertrophischer⁶¹ aber nicht mit dilatativer⁶² Kardiomyopathie war vom AT₁R-A1166C Genotyp abhängig. Eine verminderte Aortendehnbarkeit wurde bei Hypertonikern^{63, 64, 65}, nicht aber bei normotonen Personen⁶⁵ mit dem C-Allel festgestellt. Die Arterienwandbreite korrelierte nicht mit dem AT₁R-A1166C Genotyp⁶⁶. In den meisten Publikationen fand sich kein Zusammenhang des AT₁R-A1166C Polymorphismus mit der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie^{67, 68, 69}. Das AT₁R-C Allel war nicht vermehrt unter präeklampsischen Frauen nachweisbar⁷⁰.

1.2 Zielsetzung und Fragestellungen

In der vorliegenden Untersuchung galt es, einen potentiellen Einfluss verschiedener genetischer Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems auf die Progression der chronischen Glomerulonephritis zu untersuchen. Betrachtet wurden die drei häufigsten primären Glomerulonephritisformen: IgA Nephropathie, fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis (FSGN) und membranöse Glomerulonephritis (MGN).

Folgende Fragestellungen wurden überprüft:

1. Tragen die drei oben beschriebenen Polymorphismen zum Auftreten der Erkrankung bei?
2. Haben die Polymorphismen eine Auswirkung auf die Progression der untersuchten Glomerulonephritiden?
3. Führen diese Polymorphismen bei Patienten mit einer chronischen Glomerulonephritis zur Entwicklung einer arteriellen Hypertonie?
4. Wird die Effektivität der Therapie mit ACE-Hemmern von diesen Polymorphismen beeinflusst?

Mit Hilfe von genetischen Markern, die mit einem gravierenden Verlauf assoziiert wären, bestünde die Möglichkeit die entsprechenden Patienten in einem früheren Stadium zu identifizieren. Diese Patienten wären dann rechtzeitig aggressiver zu behandeln, z.B. durch Einsatz von ACE-Hemmern auch bei normotensiven Patienten oder durch kombinierte Gabe von ACE-Hemmern und AT₁R-Antagonisten.

2. Patienten und Methoden

2.1 Studiendesign

In der vorliegenden Studie wurden Patienten mit einer bioptisch gesicherten chronischen Glomerulonephritis (IgA Nephropathie, fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis und membranöse Glomerulonephritis) untersucht. Eine sekundäre Form der Erkrankung wurde durch klinische, laborchemische und bildgebende Verfahren ausgeschlossen. Die Entdeckung einer sekundären Ursache der Glomerulonephritis im Laufe der Betrachtung führte zu einem Studienausschluss.

Folgende klinische Daten und Laborparameter wurden für jeden Patienten neu erhoben oder aus den vorliegenden Akten und Arztbriefen entnommen:

- Initialen, Geburtsjahr, Geschlecht
- Größe und Körpergewicht
- Zeitpunkt der ersten klinischen bzw. laborchemischen Manifestation der Nierenerkrankung
- Zeitpunkt der ersten Nierenbiopsie, Befund der Nierenbiopsie(n)
- Serumkreatinin, endogenen Kreatinin Clearance (ECC) und Proteinurie von der ersten Manifestation bis zur Andialyse bzw. bis zum Studienabschluss
- Zeitpunkt der Verdopplung des Serumkreatinins und/oder der Erstdialyse
- Zeitpunkt der Erstdiagnose einer arteriellen Hypertonie
- Systolischer und diastolischer Blutdruck zum Zeitpunkt der Biopsie und im Verlauf
- Antihypertensive Therapie, Gabe von ACE-Hemmern bzw. AT₁R-Antagonisten
- ACE-Serumaktivität vor Verordnung von ACE-Hemmern oder AT₁R-Antagonisten

Als arterielle Hypertonie wurden Blutdruckwerte systolisch >140mmHg oder diastolisch > 90 mmHg bei nicht therapierten Patienten definiert. Patienten, die bereits mit Antihypertensiva behandelt wurden, sind der hypertensiven Gruppe zugeteilt worden. Als nephrotisches Syndrom wurde das klinische Bild bestehend aus der Kombination von Proteinurie (>3.5g/24h), Hypoproteinämie, Ödembildung und Hyperlipidämie bezeichnet. Die Progression wurde für jeden Patienten als Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit mit Hilfe der linearen Regression berechnet (siehe 2.5). Die Überlebenskurven der Niere als funktionierendes Organ wurden vom Zeitpunkt der ersten Nierenbiopsie bis zum Erreichen eines Endpunktes nach Kaplan Meier kalkuliert. Als

Endpunkte wurden eine eingetretene Dialysepflichtigkeit (Dialyse oder präemptive Nierentransplantation) oder eine Verdoppelung des Ausgangsserumkreatinins betrachtet¹⁴⁵. Mit molekularbiologischen Methoden wurden die ACE-Gen I/D, Angiotensinogen-Gen M235T und Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismen bestimmt.

2.2 Patienten

In die Studie wurden n= 213 Patienten (139 Männer und 74 Frauen) mit einer bioptisch gesicherten Glomerulonephritis eingeschlossen, die im Zeitraum von 1968 bis 2001 in der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf nierenbiopsiert und/oder behandelt wurden. Die Patienten wurden anhand der Morphologie in drei Gruppen unterteilt: IgA Nephropathie (n= 107), fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis (n= 62) und membranöse Glomerulonephritis (n= 44).

2.3 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe wurden 120 gesunde Probanden (61 Männer und 59 Frauen) ohne anamnestische oder klinische Hinweise auf eine Nierenerkrankung oder arterielle Hypertonie eingesetzt. Die Mehrheit der Kontrollpersonen waren Mitarbeiter der Klinik. Ihr mittleres Alter (39 ± 14 Jahre) war vergleichbar zum Patientenalter (40 ± 16 Jahre, ns).

2.4 Laborbestimmungen

2.4.1 Allgemeine Laborbestimmungen

Serumkreatinin, Endogene Kreatinin Clearance (ECC), 24-Stunden Eiweißausscheidung im Urin und ACE-Serumaktivität wurden neu ermittelt oder aus den Patientenakten entnommen. Die Bestimmung der o.g. Parameter erfolgte im nephrologischen Labor mit folgenden labortechnischen Standardmethoden: Das Kreatinin im Serum und im Urin wurde mit der Jaffe-Reaktion ohne Enteiweißung und das Gesamteiweiß im Sammelurin mittels einer „fixed-time“ Endproduktbestimmung an einem Synchron CX-System (Beckman Coulter, München) gemessen. Die ECC wurde auf die Körperoberfläche der Patienten korrigiert und in ml/min pro 1.73m^2 angegeben. Die ACE-Aktivität im Serum wurde mit der radioimmunologischen Methode (RIA) bei den Patienten, die keine ACE-Hemmer oder AT₁R-Antagonisten einnahmen, bestimmt.

2.4.2 Bestimmung genetischer Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems

2.4.2.1 Materialgewinnung

Für die molekularbiologischen Bestimmungen wurde venöses Blut mit ACD als Zusatz benötigt (Acid Citrat Dextrose; Acidum citricum purum 2.5%, Dextrose 2.5%, Natrium citricum 2.16%, BD Vacutainer Systems, UK). Die Proben wurden in sterilen 1.5 ml Eppendorf-Cups (Eppendorf, Hamburg) portioniert (400 µl pro Cup) und bei -20°C eingefroren.

2.4.2.2 DNA-Extraktion

Um die DNA aus Leukozyten im ACD-Vollblut zu extrahieren, wurde das QIAGEN-QIAmp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden Deutschland, Januar 1999) angewandt. Das Verfahren bestand aus folgenden Schritten:

Lyse

Die Lyse der Leukozyten erfolgte mit Hilfe der Qiagen Protease. Auf den Boden von 1.5 ml großen Eppendorf-Cups wurden 0.4 mg aufgelöste Protease pipettiert. 200 µl aufgetautes Probenmaterial und 200 µl AL-Puffer wurden dazugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde sofort durch Vortexen vermischt und 10 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol (96-100%) hinzugefügt und die Lösung wurde erneut durch Vortexen homogenisiert.

DNA-Bindung

Das Gemisch wurde in mitgelieferte Säulen pipetiert und 1 min bei 6000 x g (8000 rpm) bei Raumtemperatur zentrifugiert (Eppendorf 5417 R, Hamburg). Die DNA wurde dabei von der QIAamp Silica-Gel-Membran, die in den Säulen enthalten war, absorbiert. Proteine und andere potentielle Störfaktoren durchliefen die Membran und wurden mit dem Filtrat verworfen.

Waschung

Um die DNA-Reinheit zu optimieren, wurden zwei Waschschrte durchgeführt. 500 µl des Waschpuffers 1 (AW1) wurden auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden 1 min bei 6000 x g (8000 rpm) zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Der gleiche Vorgang wurde für den Waschpuffer 2 (AW2) wiederholt. Danach erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 20000 x g (14000 rpm), um auch die letzten Flüssigkeitsreste zu entfernen.

DNA-Freisetzung

Die Qiagen-Säulen wurden in 1.5 ml Eppendorf-Cups umgelagert und mit 50 µl Puffer AE versetzt. Der Puffer AE setzte die an der Säulemembran gebundene reine DNA frei. Diese wurde nach 5 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation [1 min bei 6000 x g (8000 rpm)] eluiert. Die Säulen wurden entsorgt.

Messung der DNA-Konzentration und DNA-Reinheit

Im Spektrophotometer (Gene Quant, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) wurde die Absorption der extrahierten DNA gegen einen Leerwert bei 260 und 280 nm Wellenlänge gemessen. Zur Messung wurde die DNA mit Aqua dest verdünnt. Die DNA-Konzentration wurde aus der Absorption bei 260 nm berechnet. Im Durchschnitt wurden 4-12 µg DNA aus 200 µl Vollblut gewonnen. Um die DNA-Reinheit zu evaluieren, wurde die Relation A_{260}/A_{280} verwendet (reine DNA hat ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm; Proteine bei 280 nm). Gut gereinigte DNA weist Werte im Bereich von 1.7-1.9 auf.

DNA-Verdünnung

Da für die Bestimmung des ACE-Gen I/D Polymorphismus vorzugsweise Proben mit einer sehr geringen DNA-Menge von ca. 15 ng benötigt wurden, wurde ein Teil des gewonnenen Materials entsprechend mit Puffer AE verdünnt.

DNA-Lagerung

Sowohl verdünnte als auch unverdünnte DNA wurde bis zu ihrer Weiterverarbeitung kurzfristig bei +4°C und langfristig bei -20°C gelagert.

2.4.2.3 Angiotensin I-Converting Enzym-Gen I/D Polymorphismus

Das Angiotensin I-Converting Enzym (ACE, EC 3.4.15.1), auch Dipeptidyl-Carboxypeptidase I oder Kininase II genannt, ist eine Zink-Metallopeptidase. Es handelt sich um ein membrangebundenes Ektoenzym, geankert an der Zelloberfläche mit Hilfe einer karboxyterminalen hydrophoben Region. Durch proteolytisches Schneiden der Membrananker wird von den Endothelzellen der Gefäßwand eine lösliche zirkulierende Form des Enzyms ins Plasma freigesetzt⁷¹. Die membrangebundene ACE-Isoform ist auf der Oberfläche von Endothelzellen, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten weit verbreitet⁷². In der Niere wird ACE vor allem im Bürstensaum der Epithelzellen des proximalen Tubulus exprimiert⁷³. ACE entfernt als Peptidase karboxyterminale Dipeptide von

Substraten wie Ang-I oder Bradykinin und nimmt eine bedeutende Rolle in der vaskulären Homeostase ein, indem es die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II, einen potenten Vasokonstriktor, und die Inaktivierung von Bradykinin, einem Vasodilatator, katalysiert.

Das ACE-Gen liegt im Chromosom 17 in q23, ist ca. 21kb lang und enthält 26 Exone^{74, 75, 76}. Aus der Transkription aller Exone von 1-26 bis auf Exon 13 entsteht ein 4.3 kb langes mRNA, das für das übliche 1306 Aminosäuren lange ACE-Protein kodiert. Dieses somatische ACE-Molekül weist zwei Reaktionszentren auf, die in zwei homologen Regionen liegen und beide funktionell sind⁷⁷. Diese Struktur ist durch eine ursprüngliche Verdoppelung des ACE-Gens entstanden (Exone 4-11 und 17-24 enthalten homologe Sequenzen). In den Keimzellen führt die Aktivierung eines sich im Intron 12 befindenden Promoters zur einer kürzeren (3kb) mRNA, die für das 732 Aminosäuren lange testikuläre ACE kodiert (Exone 13-26)⁷⁶. Diese kleinere ACE-Isoform verfügt nur über ein Reaktionszentrum und entspricht der evolutionär älteren Form^{78, 79}; ein entsprechendes Gen wurde in *Drosophila melanogaster* identifiziert⁸⁰. Die Expression der zwei unterschiedlichen Promoter unterliegt vermutlich einer hormonellen Kontrolle (Glukokortikoide vs. Androgene)⁷⁶.

Die ACE-Serumaktivität zeigt sich bei gesunden Erwachsenen bei mehrfacher Bestimmung in unterschiedlichen Zeitpunkten sehr stabil bei der selben Person⁸¹. Im Gegensatz dazu variiert sie bis zu 500% in der gesunden Population, ohne dass diese interindividuelle Schwankung durch hormonelle oder exogene Einflüsse zu erklären wäre⁸². Eine Studie von 87 Familien ergab eine große intrafamiliäre Ähnlichkeit der ACE-Serumaktivität, die gut mit der Existenz eines autosomal codominanten Gens vereinbar wäre⁸³, so dass der Verdacht geäußert wurde, dass eine Variation des ACE-Gens für dieses Phänomen verantwortlich sein könnte.

Im Jahr 1990 wurde festgestellt, dass eine 287 Basenpaare lange Sequenz innerhalb des Introns 16 entweder anwesend (= „insertion“, I-Allel) oder abwesend (= „deletion“, D-Allel) sein kann. Drei Genotypen des ACE-Gens wurden definiert: II, DI und DD. Dieser Polymorphismus wurde für 47% der interindividuellen Schwankungen des ACE-Serumspiegels in der gesunden Bevölkerung verantwortlich gemacht⁵. Personen mit dem DD-Genotyp hatten im Durchschnitt den doppelten ACE-Serumspiegel im Vergleich zum II-

Genotyp. Heterozygoten (DI-Genotyp) wiesen Werte im mittleren Bereich auf, ein Zeichen dafür, dass D- und I-Allel codominant sind.

Eine mögliche Erklärung für die Entstehung dieses Polymorphismus konnte durch DNA-Sequenzanalyse des I- und des D-Allels gegeben werden: eine 14 bp lange Sequenz wiederholt sich direkt am Anfang und gleich nach den 287 Basenpaaren, die beim D-Allel abwesend sind. Während einer Meiose könnte es zu einer Hybridisierung zwischen der Sequenz am Anfang und der Sequenz nach dem Ende der 287 Basenpaaren am anderen DNA-Strang und dadurch zur Entstehung des D-Allels gekommen sein¹⁴¹. Ist diese Hypothese wahr, resultiert daraus, dass das I-Allel den ursprünglichen „wilden“ Status und das D-Allel die Mutation darstellen.

Laborbestimmung

Die Bestimmung des ACE-I/D Polymorphismus erfolgte durch Amplifikation mittels PCR (Polymerase Kettenreaktion)⁸⁴ eines 597 bp langen Fragmentes des ACE-Gens, das die beim D-Allel nicht vorhandenen 287 Basenpaare umfasste. Deswegen war beim D-Allel das Amplifikationsprodukt statt 597 nur noch 310bp lang.

PCR-Protokoll

Der Reaktionsansatz für die Amplifikation einer Probe setzte sich folgendermaßen zusammen: DNA: 15 ng, Tris-HCl (pH 8.4): 20 mM, KCl 50 mM, MgCl₂: 1.5 mM, dNTP-mix [Mischung aus den Desoxynukleotidtriphosphaten dTTP, dCTP, dGTP, dATP (Roche Diagnostics, Mannheim)]: 0.2 mM, Primer sense (5' GCC CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT 3'): 20 pM, Primer antisense (5' GGA TGG CTC TCC CCG CCT TGT CTC 3', MWG Biotech AG, Ebersberg): 20 pM, Taq-Polymerase (thermostabile DNA-Polymerase gewonnen aus dem *Thermus aquaticus*, Life Technologies, Karlsruhe): 1.2 Units. Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Thermocycler (Personal Cycler, Biometra, Göttingen) wie folgt ausgeführt: Zu Beginn wurden die DNA-Stränge für 5 min bei 94°C vordenaturiert. Es folgten 31 Zyklen, die jeweils aus einem 30 sec dauernden Denaturierungsschritt bei 94°C, einem Hybridisierungsschritt (Primeranlagerung) von 25 sec bei 64°C und dem 2 min währenden Syntheseschritt (Polymerisierung) bei 70°C bestanden. Im letzten Zyklus wurde der Syntheseschritt um 7 Min verlängert, um alle Stränge vollständig zu synthetisieren (Endamplifikation).

Gelelektrophorese

Die Amplifikate wurden elektrophoretisch in 1.5%-Agarose-Gelen (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim) entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und durch Zusatz von Ethidiumbromid (Roche Diagnostics, Mannheim, 0.05 µg/ml pro Gel), einem Fluoreszenzfarbstoff, und UV-Anregung sichtbar gemacht. Die PCR-Produkte wurden mit einem Ladepuffer aus Xylencyanol, Ficoll 400, Glycerin und TAE-Puffer (Tris 0.04 M, Essigsäure 0.04 M, EDTA 0.05 M pH 8.0) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5V / cm in TAE-Puffer. Anschließend wurden die entstandenen Banden unter UV-Licht (312 nm, Herolab, Wiesloch) photographisch festgehalten. Die theoretisch erwartete Länge der amplifizierten Fragmente (I-Allel: 597 bp, D-Allel: 310 bp) wurde mit einem mitgeführten sogenannten Längenstandard [DNA-Marker IX (Roche Diagnostics, Mannheim)] verglichen (Abb. 1).

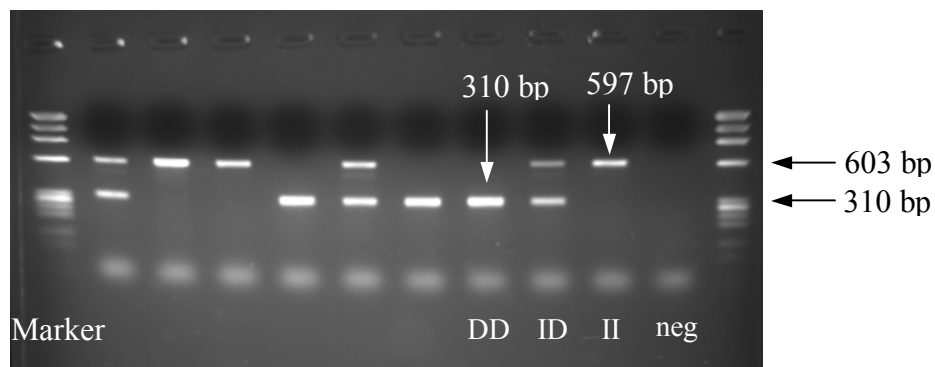


Abbildung 1: Angiotensin I-Converting Enzym-Gen I/D Polymorphismus: Darstellung der PCR-Produkte in der Elektrophorese; I-Allel bei 597 und D-Allel bei 310 Basenpaaren

Insertionsspezifische PCR

Da in der obenbeschriebenen PCR zur Bestimmung des ACE-I/D Genotyps oft die Amplifikation des I-Allels bei DI-Heterozygote unterdrückt wird⁸⁵ (und sie fälschlicherweise als DD-Homozygoten gedeutet werden), wurde für alle Proben mit einem DD-Ergebnis eine I-spezifische Kontroll-PCR durchgeführt. Das amplifizierte DNA-Fragment befand sich zum Teil in der Variationssequenz. Deswegen konnte ein Amplifikationsprodukt nur bei den Patienten mit mindestens einem I-Allel entstehen.

PCR-Protokoll

Benutzt wurde ein PCR-Ansatz mit folgenden Reaktionspartnern: DNA: 15 ng, Tris-HCl (pH 8.4): 20 mM, KCl: 50 mM, MgCl₂: 1.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Primer sense: 20 pM, Primer

antisense: 20 pM, Taq-Polymerase 0.6 Units. Die insertionsspezifischen Primersequenzen lauteten: sense: 5' TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC 3' , antisense: 5' TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA 3' (MWG Biotech AG, Ebersberg).

Im Thermoblock wurden folgende Schritte für 33 Zyklen durchgeführt:

Vordenaturierung:	5 min bei 94°C
1. Schritt: Denaturierung:	30 sec bei 94°C
2. Schritt: Hybridisierung (Primeranlagerung):	25 sec bei 64°C
3. Schritt: Amplifikation (Polymerisierung):	2 min bei 72°C
Endamplifikation:	7 min bei 72°C

Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer 1.5%gen Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen (siehe oben). Beim Vorhandensein mindestens eines I-Allels (ID-Heterozygote und ID- und II-Kontrollen) war eine Bande bei 335 bp sichtbar. Bei den DD-Homozygoten war kein Amplifikationsprodukt nachweisbar (Abb. 2).

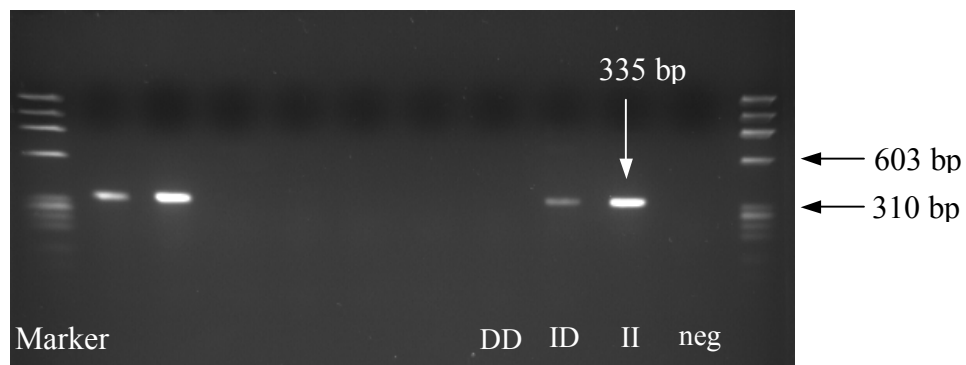


Abbildung 2: Angiotensin I-Convertig Enzym-Gen I/D Polymorphismus: I-spezifische PCR zur Identifizierung von DI-Heterozygoten bei unterdrückter Amplifikation des I-Alleles. Bei den zwei ersten Proben kommt bei 335 Basenpaaren ein I-Allel zum Vorschein (obwohl sie in der üblichen PCR als DD-Homozygoten erschienen). Die vier letzten Proben sind die Kontrollen.

2.4.2.4 Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus

Angiotensinogen (AGT) ist ein aus 452 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein⁸⁶. Zirkulierendes AGT wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert. AGT wird auch in anderen Geweben -zumindest im Rahmen von lokalen Renin-Angiotensin-Systemen- exprimiert. Renin spaltet aus dem karboxyterminalen Ende des AGT das Dekapeptid Ang-I ab.

Bei Mehrfachbestimmung der AGT Serumkonzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten zeigt sich nur eine geringe Varianz bei der einen und selben Person⁸⁷. Diese Beobachtung

unterstützt die Annahme, dass die individuelle AGT-Basisproduktion genetisch festgelegt ist. Dazu kommen sekundäre Einflüsse, die diese Basisproduktion steigern, z.B. im Rahmen einer akuten-Phase-Reaktion. Die AGT-Synthese wird nämlich von Glykokortikoiden, TNF α , IL 1, Östrogenen, Schilddrüsenhormonen und Ang-II (positives „feedback“) stimuliert^{88,89}. Das menschliche AGT-Gen befindet sich im Chromosom 1 in q42-43^{90, 91}, ist 12000 bp lang und setzt sich aus 5 Exonen und 4 Intronen zusammen^{92, 93}. Jeunemaitre et al beschrieben 15 Polymorphismen des AGT-Gens innerhalb der fünf Exone und in der 5' „flanking“ Region, stellten aber nur für den M235T Polymorphismus eine klinische Relevanz fest. Es handelt sich um eine Substitution von Thymin durch Cytosin am Kodon 702 im zweiten Exon. Diese Punktmutation führt bei der Translation zu einer Änderung der Primärstruktur des produzierten Angiotensinogens: bei der Aminosäure Nummer 235 wird Methionin (M) gegen Threonin (T) ausgetauscht. Das T-Allel wurde mit höheren AGT-Serumspiegeln (stufenweise direkt proportional zur Anzahl der T-Allele) und mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie assoziiert⁴¹.

Laborbestimmung

Zur Genotypisierung des AGT-M235T Polymorphismus wurde zuerst eine PCR durchgeführt, bei der eine 104 bp lange Sequenz des Angiotensinogen-Gens amplifiziert wurde. Das durch eine Gelelektrophorese dokumentierte PCR-Produkt wurde anschließend mit der Endonuklease MSP I versetzt. Durch die Punktmutation entstand beim T-Allel eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym, welches das 104 Basenpaare lange PCR-Produkt in zwei Teile (jeweils 73 und 31 bp lang) spaltete. Das Endergebnis wurde mit Hilfe einer erneuten Gelelektrophorese erkannt.

PCR Protokoll

Benutzt wurde ein PCR-Ansatz mit folgenden Reaktionspartnern:

unverdünnte DNA	0.1-0.5 μ g
Tris-HCl (pH 8.4)	20 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	1.5 mM
DMSO	5% (Dimethyl Sulphoxid, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)
dNTP-Mix	0.2 mM
Primer sense	30 pM

Primer antisense 30 pM

Taq-Polymerase 1.2 Units

Die benutzten Primersequenzen lauteten: sense: 5' TGA CAG GAT GGA AGA CTG GCT GCT CCC TGC 3', antisense: 5' AGC AGA GAG GTT TGC CTT ACC TTG 3' (MWG Biotech AG, Ebersberg).

Folgendes PCR-Programm wurde für 30 Zyklen durchgeführt:

Vordenaturierung: 5 min bei 94°C

1. Schritt: Denaturierung: 1 min bei 94°C

2. Schritt: Hybridisierung (Primeranlagerung): 40 sec bei 63°C

3. Schritt: Amplifikation (Polymerisierung): 40 sec bei 72°C

Endamplifikation: 5 min bei 72°C

Gelelektrophorese

Zur Dokumentierung des PCR Produkts wurde eine Elektrophorese mit 1.5% Agarose-Gelen (siehe 2.4.2.3) durchgeführt. Zum Längenvergleich wurde ein 50 bp DNA-Marker (Life Technologies, Karlsruhe) eingesetzt.

Restriktion

Das PCR-Produkt wurde über Nacht (16h) mit der Restriktionsendonuklease MSP I (Promega, Mannheim; Erkennungssequenz: 5' C/CGG 3') bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch setzte sich aus folgenden Materialien zusammen:

PCR-Produkt

Tris-HCl (pH 7.5) 6 mM

NaCl 50 mM

MgCl₂ 6 mM

DTT 1 mM

BSA 0.1 µg

MSP I 12 Units

Gelelektrophorese

Da es sich um relativ kleine Fragmente handelte (vgl. ACE-Gen Polymorphismus 597 und 310 bp) wurde bei der Elektrophorese der Restriktionsprodukte ein dazu besser geeignetes 2.5% Metaphor-Agarose-Gel (BMA, Rockland, USA) mit TBE-Puffer (89 mM Tris-borate pH 8.3, 2 mM Na₂EDTA) verwendet. Zum Längenvergleich wurde ein 25 bp DNA-Marker (Life Technologies, Karlsruhe) benutzt. Beim MM-Genotyp war nur die ursprüngliche 104 bp

Bande nachweisbar. Beim TT-Genotyp entstanden durch die Spaltung (Restriktion) des 104 bp PCR-Produkts zwei Banden, jeweils 73 und 31 bp lang. Bei den Heterozygoten (MT-Genotyp) wurden sowohl die ursprüngliche 104 bp Bande (M-Allel) als auch die Spaltprodukte (73 und 31 bp, T-Allel) nachgewiesen (Abb. 3).

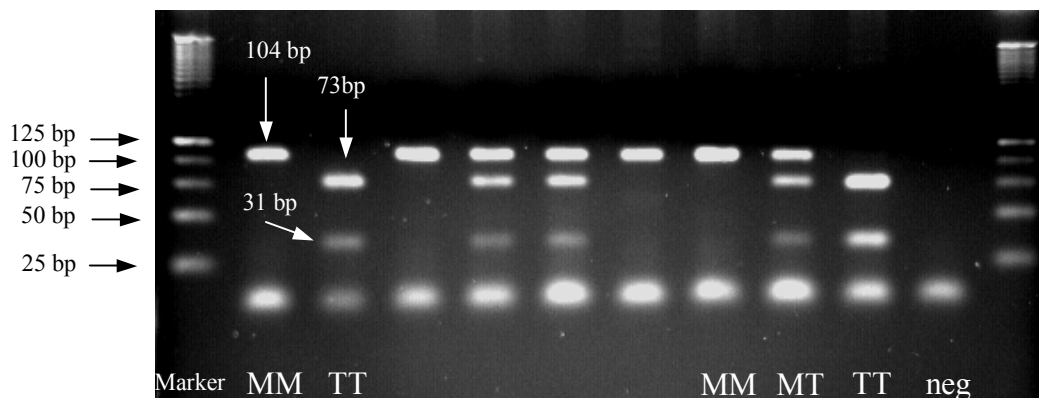


Abbildung 3: Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus: Elektrophorese der PCR-Produkte nach der Restriktionsphase. Beim T-Allel wurde das 104 bp lange PCR-Produkt vom Restriktionsenzym in zwei Teile (jeweils 73 und 31 bp) gespalten.

2.4.2.5 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus

Angiotensin-II (Ang-II) ist ein Oktapeptid mit mehreren Funktionen: Vasokonstriktion, Steuerung der Aldosteronproduktion, Freisetzung von Noradrenalin, hypertrophische und hyperplastische Wirkung auf glatte Muskelzellen und Kardiomyozyten, Synthese von extrazellulärem Kollagenmatrix. Die erste Klassifizierung der Ang-II Rezeptoren in Typ 1 und Typ 2 erfolgte im Jahr 1989 mit Hilfe der ersten selektiven Ang-II-Antagonisten⁹⁴. Beim Erwachsenen werden die Wirkungen des Ang-II größtenteils über den Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT₁R) ausgeübt. AT₁R wird in vielen Zellarten exprimiert, unter anderem in den glatten Muskelzellen der Gefäße, in Kardiomyozyten und in der Niere, vorwiegend im Messangium und im juxtaglomerulären Apparat⁹⁵.

Das Gen, das für den aus 359 Aminosäuren bestehenden AT₁Rezeptor kodiert, befindet sich im Chromosom 3 in q21-q25^{96, 97}. Seine Länge beträgt 55kb und es enthält fünf Exone und vier Introne. Die vier ersten Exone stehen für die 5' „untranslated“ Region, während die gesamte kodierende Region im fünften Exon enthalten ist^{98, 99, 100}. Im Jahr 1994 entdeckten Bonnardeux et al fünf Punktmutationen des AT₁R-Gens. Zwei davon liegen in der kodierenden Sequenz und drei in der 3' „untranslated“ Region. Eine Änderung der primären Struktur des Rezeptors wird von keiner dieser Mutationen hervorgerufen. Der A1166C Polymorphismus (Ersatz von Adenosin durch Cytosin im Kodon 1166 in der 3' „untranslated“

Region des fünften Exons) wurde mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie assoziiert⁴⁹.

Laborbestimmung

Für die Bestimmung des AT₁R-Gen A1166C Polymorphismus wurde mittels PCR ein Fragment bestehend aus 856 Basenpaaren vervielfältigt. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit der Endonuklease Dde I behandelt. In der amplifizierten Sequenz existierte bei allen Proben eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym, welches das PCR-Produkt zunächst in zwei Teile (601 und 255 bp) spaltete. Durch die Punktmutation entstand beim C-Allel eine zusätzliche Erkennungssequenz bzw. Schnittstelle: die 250 bp Bande wurde weiter in zwei Teile (143 und 112 bp) aufgetrennt. Die Restriktionsprodukte wurden mit Hilfe einer Elektrophorese erkannt.

PCR Protokoll

Das Reaktionsgemisch enthielt:

unverdünnte DNA	0.1-0.5 µg
Tris-HCl (pH 8.4)	20 mM
KCl	50 mM
MgCl ₂	1.5 mM
dNTP-Mix	0.2 mM
Primer sense	40 pM
Primer antisense	40 pM
Taq-Polymerase	1.2 Units

Benutzt wurden folgende Primersequenzen: sense: 5' AAT GCT TGT AGC CAA AGT CAC CT 3', antisense: 5' GGC TTT GCT TTG TCT TGT TG 3' (MWG Biotech AG, Ebersberg).

Im Thermocycler wurden folgende Schritte für 34 Zyklen durchgeführt:

Vordenaturierung:	5 min bei 94°C
1. Schritt: Denaturierung:	1 min bei 94°C
2. Schritt: Hybridisierung (Primeranlagerung):	1 min bei 60°C
3. Schritt: Amplifikation (Polymerisierung):	1 min bei 72°C
Endamplifikation:	7 min bei 72°C

Gelelektrophorese

Die erfolgreiche Amplifikation der 856 bp langen Sequenz wurde mit einer 1.5% Agarose-Gelelektrophorese bestätigt (Ladepuffer: Bromphenolblau, Ficoll 400, Glycerin, TAE Puffer). Als Längenstandard wurden zwei DNA-Marker verwendet: 100 bp (Peqlab-Biothechnologie, Erlangen) und IX (Roche Diagnostics, Mannheim).

Restriktion

Das PCR-Produkt wurde über Nacht (16h) bei 37°C mit der Restriktionsendonuklease Dde I (Promega, Mannheim, USA; Erkennungssequenz: 5' C/TNAG 3') inkubiert. Für die Reaktion wurden eingesetzt:

PCR Produkt

Tris-HCl (pH 7.9)	6 mM
NaCl	0.15 mM
MgCl ₂	6 mM
DTT	1 mM
BSA	0.1 µg
Dde I	5 Units

Gelelektrophorese

Die Fragmente wurden auf 2% Metaphor-Agarose-Gele aufgetrennt (Ladepuffer: Bromphenolblau, Ficoll 400, Glycerin, TBE Puffer) und konnten durch Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen werden. Zum Längenvergleich wurde ein 50 bp DNA-Marker (Life Technologies, Karlsruhe) verwendet. Beim AA-Genotyp waren zwei Banden nachweisbar (601 und 255 bp). Beim CC-Genotyp war die 255 bp Bande in zwei weitere kleinere Spaltprodukte geschnitten (601, 143 und 112 bp). Schließlich waren bei AC-Heterozygoten alle vier Banden zu erkennen: 601, 255, 143, 112 bp (Abb. 4).

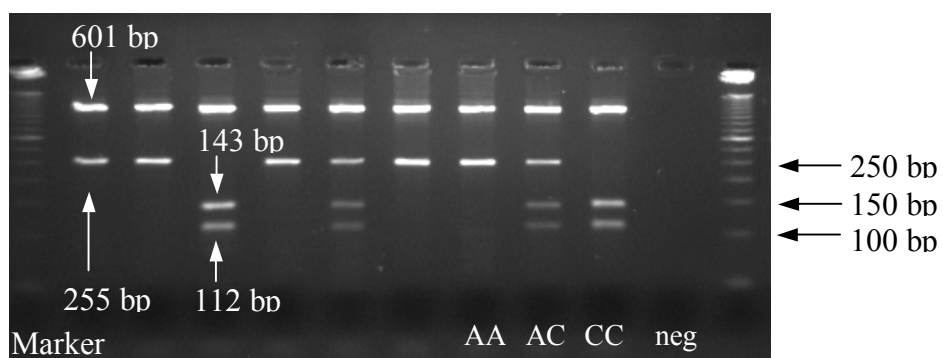


Abbildung 4: Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus: Elektrophorese der PCR-Produkte nach der Restriktionsphase. Beim C-Allel wurde die 255 bp Bande vom Restriktionsenzym in zwei kleinere (143 und 112 bp) geschnitten.

2.4.2.6 Qualitätssicherung

Die Elektrophoresefotos wurden von zwei Untersuchern bewertet. Bei unterschiedlicher Bewertung der Genotypisierung einer Probe wurde die Bestimmung wiederholt. In jeder PCR bzw. Restriktion liefen interne Kontrollen mit allen Allelkombinationen mit.

Um eine Kontamination zu verhindern, wurden folgende Maßnahmen eingeleitet: Die Asservierung erfolgte über das Vacutainer System nach gründlicher Hautdesinfektion. Während der Blutabnahme und der gesamten Aufarbeitung herrschte Handschuhpflicht. Es gab je einen Arbeitsplatz für die DNA-Extraktion, DNA-Messung und Verdünnung, PCR und Elektrophorese. Für jeden Bereich standen separate Pipetten und Pipettenspitzen zur Verfügung. Benutzt wurden nur sterile Pipettenspitzen mit Filter (bis auf die Elektrophoresen; Biozym, Oldendorf). Um eine potentielle Kontamination frühzeitig zu erkennen, wurde in jeder PCR bzw. Restriktion eine negative Kontrolle eingesetzt.

2.5 Statistik

Die untersuchten Parameter wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Variablen wurden in jeder Gruppe mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test für eine Stichprobe auf Normalverteilung getestet. Bei normalverteilten Variablen wurden Mittelwerte mit dem t-Test nach Student für unabhängige Stichproben zwischen zwei Gruppen verglichen. Die einfaktorielle ANOVA wurde eingesetzt, wenn mehr als zwei Gruppen vorhanden waren. Bei nicht normalverteilten Variablen wurden entsprechend folgende nicht parametrische Tests verwendet: bei zwei Gruppen der U-Test nach Mann-Whitney und bei mehr als zwei Gruppen der H-Test nach Kruskal Wallis. Kreuztabellen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson und dem exakten Test nach Fisher ausgewertet. Der Korrelationsgrad zweier Variablen wurde mit dem Produkt-Moment-Korrelationskoeffizient nach Pearson, wenn beide Variablen intervallskaliert und normalverteilt waren, und in allen anderen Fällen mit dem Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman evaluiert. Die beobachteten Genotypverteilungen in der Patienten- und Kontrollgruppe wurden zum Ausschluss einer Selektion mit den anhand des Hardy Weinberg Gesetzes¹⁰¹ erwarteten Frequenzen verglichen. Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SSPS GmbH, München, Landeslizenz NRW) ausgeführt. Bei den angegebenen Signifikanzen handelt es sich um explorative Werte; eine α -Korrektur nach

Bonferroni wurde nicht durchgeführt. Wahrscheinlichkeitswerte $p < 0.05$ wurden als signifikant erachtet.

Berechnung der Kurve des reziproken Serumkreatinins

Im Verlauf der chronisch progredienten Nierenerkrankungen kommt es zu einem nicht linearen Anstieg des Serumkreatinins (Abb. 5). Deswegen ist seine Darstellung über die Zeit für den Vergleich zwischen verschiedenen Patienten ungeeignet. Das reziproke Serumkreatinin dagegen zeigt einen linearen Abfall mit der Zeit¹⁰² (Abb. 6). Mit Hilfe der linearen Regression lässt sich die Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins berechnen. Sie kann als Maß der Progression der chronischen Nierenerkrankungen verwendet werden und zum Vergleich der Progression zwischen Patientengruppen eingesetzt werden.

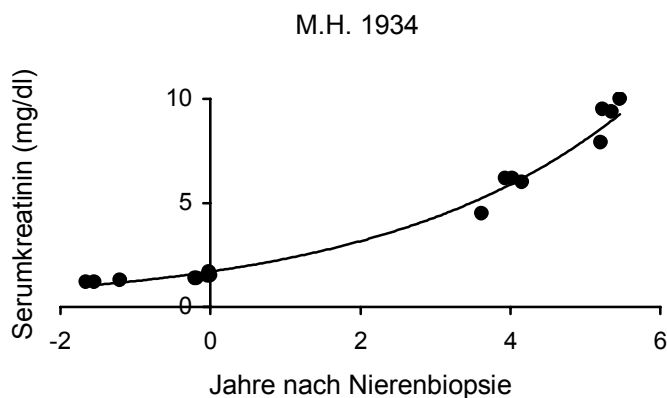


Abbildung 5: Darstellung des zeitlichen Verlaufs des Serumkreatinins (in mg/dl) des Patienten M.H. geboren im Jahr 1934.

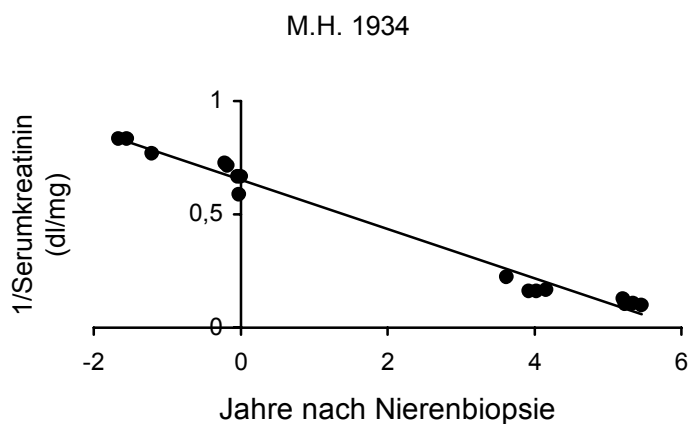


Abbildung 6: Darstellung des zeitlichen Verlaufs des reziproken Serumkreatinins (in dl/mg) des Patienten M.H. geboren im Jahr 1934.

2.6 Ethische Aspekte - Datenschutz

Die vorliegende Studie wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt (Studien-Nr.: 1643; 21/8/2000). Die Blutprobenentnahme erfolgte nach detaillierter Aufklärung und Einwilligung der Patienten. Die Patienten konnten auf eigenen Wunsch in jedem Stadium der Untersuchung aus der Studie aussteigen. Ein Ausscheiden brauchte nicht vom Patienten gerechtfertigt zu werden. Die erhobenen klinischen Daten und die Befunde der Laboruntersuchungen wurden in anonymisierter Form elektronisch gespeichert und ausgewertet. Die Bestimmungen des Datenschutzgesetzes fanden Anwendung und wurden beachtet. Nach Abschluss der Studie wurden die patientenbezogenen Daten eliminiert.

3. Ergebnisse

3.1 Gesamtes Patientenkollektiv

3.1.1 Patientenbeschreibung

Unser Kollektiv setzte sich aus n= 213 Patienten (139 Männer und 74 Frauen) mit einer bioptisch gesicherten primären Glomerulonephritis zusammen [IgA Nephropathie: n= 107; fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis (FSGN): n= 62; membranöse Glomerulonephritis (MGN): n= 44]. Die Patienten wurden im Zeitraum von 1968 bis 2001 in der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf nierenbiopsiert und/oder behandelt. Die mittlere Beobachtungsdauer betrug 6.3 ± 5.2 Jahre (Zeitspanne: 1-30 Jahre). Im Durchschnitt wurden 21.2 ± 18 Serumkreatininmessungen pro Patient vorgenommen.

Die untersuchten Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie im gesamten Patientenkollektiv und in den einzelnen Glomerulonephritisformen sind auf Tabelle 1 aufgelistet. Die Patienten mit IgA Nephropathie waren jünger bei Diagnosestellung im Vergleich zu den Patienten mit FSGN oder MGN ($p < 0.05$). Das männliche Geschlecht war signifikant häufiger unter den Patienten mit IgA Nephropathie vertreten ($p < 0.01$). Außerdem wiesen Patienten mit IgA Nephropathie eine schlechtere Nierenfunktion (Serumkreatinin und ECC) zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie im Vergleich zu Patienten mit FSGN oder MGN auf ($p < 0.001$). Die Proteinurie dagegen war signifikant höher unter Patienten mit FSGN bzw. MGN ($p < 0.001$). Schließlich wurden unter den Patienten mit IgA Nephropathie höhere Blutdruckwerte als bei den Patienten mit FSGN oder MGN gemessen ($p < 0.01$).

	IgA	FSGN	MGN	Signifikanz	Gesamtes Kollektiv
Patienten (n)	107	62	44	-	213
Auftrettsalter (Jahre)	38.1 ± 14	42.9 ± 17	45.0 ± 16	p<0.05 †	40.1 ± 16
Männlich (%)	75.7	51.6	59.1	p<0.01#	65.3
Kreatinin (mg/dl)	2.0 ± 1.2	1.4 ± 0.6	1.2 ± 0.7	p<0.001 ‡	1.7 ± 1.0
ECC (ml/min/1.73m ²)	72.5 ± 36	92.2 ± 34	90.6 ± 38	p< 0.01 †	82.5 ± 37
Proteinurie (g/24h)	3.9 ± 2.9	11.7 ± 10.3	9.7 ± 4.9	p<0.001 ‡	7.4 ± 7.2
MAP (mmHg)	111.7 ± 12	108.7 ± 11	105.5 ± 9	p<0.01 †	109.6 ± 11
Antihypertensiva (n)	2.2 ± 1.2	1.8 ± 1.1	2.1 ± 1.2	ns	2.1 ± 1.2

Tabelle 1: Klinische und laborchemische Parameter (Mittelwert ± SD) zum Zeitpunkt der Biopsie bei Patienten mit verschiedenen Glomerulonephritisformen. Vergleich der drei Glomerulonephritisformen untereinander: (†) einfaktorische ANOVA, (‡) Kruskal Wallis H-Test, (#) $\chi^2 = 11.0$.

3.2.2 Progression im gesamten Patientenkollektiv

Zum Zeitpunkt der Genotypisierung hatten 110 Patienten eine erhaltene primäre Nierenfunktion, während 103 Patienten bereits eine terminale Niereninsuffizienz erreicht hatten. Davon wurden 38 hämodialysiert, 15 wurden mit der Peritonealdialyse behandelt und 50 waren bereits nierentransplantiert. Patienten mit IgA Nephropathie wiesen eine schnellere Progression auf (p<0.001, Tab. 2, Abb. 7)

	IgA	FSGN	MGN	Signifikanz	Gesamtes Kollektiv
ESRD (%)	66.4	33.9	25.0	p<0.001 †	48.4

Tabelle 2: Prozentsatz der Patienten mit verschiedenen Glomerulonephritisformen, die im Laufe der Betrachtung eine terminale Niereninsuffizienz (ESRD) erreichten. (†) $\chi^2 = 27.7$

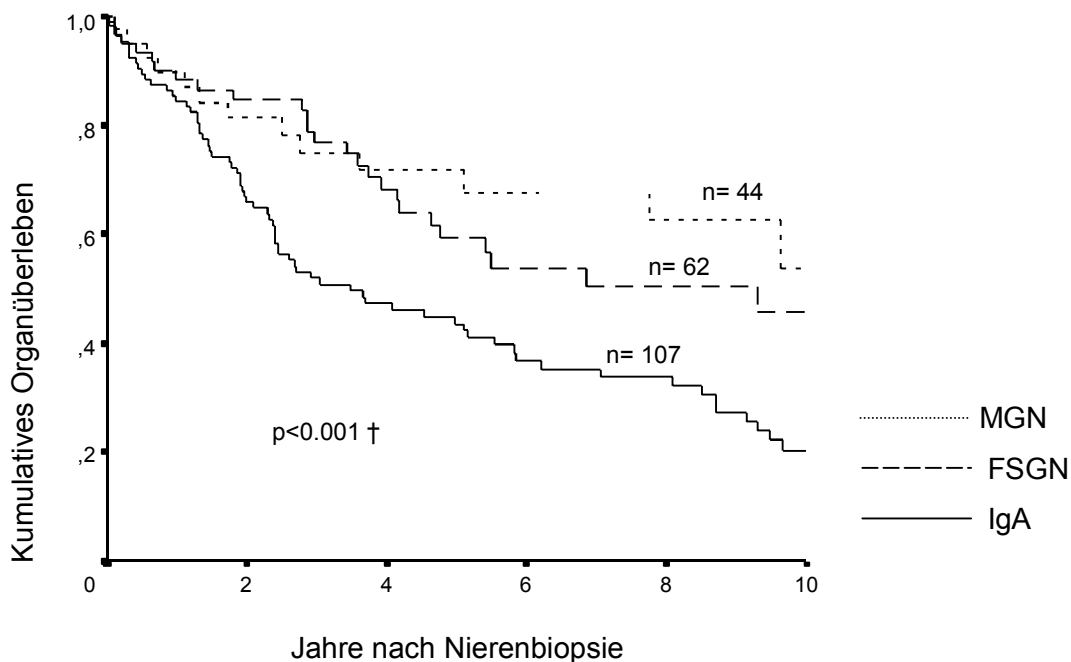


Abbildung 7: Kaplan Meier Analyse des 10 Jahre Organüberlebens bei $n = 213$ Patienten mit bioptisch gesicherter primärer Glomerulonephritis in Abhängigkeit von der Glomerulonephritisform (MGN: membranöse Glomerulonephritis, FSGN: fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis, IgA: IgA Nephropathie). (†) Log Rank

Einfluss der Therapie mit ACE-Hemmern auf die Progression

Im gesamten Patientenkollektiv war eine nephroprotektive Wirkung der ACE-Hemmung nicht nachweisbar. Behandelte Patienten zeigten kein signifikant besseres Organüberleben zehn Jahre nach Nierenbiopsie (ns, Abb. 8) und ihre Progressionsrate (anhand der Steigung des reziproken Serumkreatinins, siehe 2.5) war nicht signifikant langsamer im Vergleich zu unbehandelten Patienten ($1/\text{Cr}$ Steigung: mit ACE-Hemmung: -0.101 ± 0.16 , ohne ACE-Hemmung: $-0.146 \pm 0.12 \text{ dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$, ns). Bei dieser Auswertung wurden $n = 9$ Patienten, die mit AT_1R -Antagonisten therapiert wurden, nicht berücksichtigt.

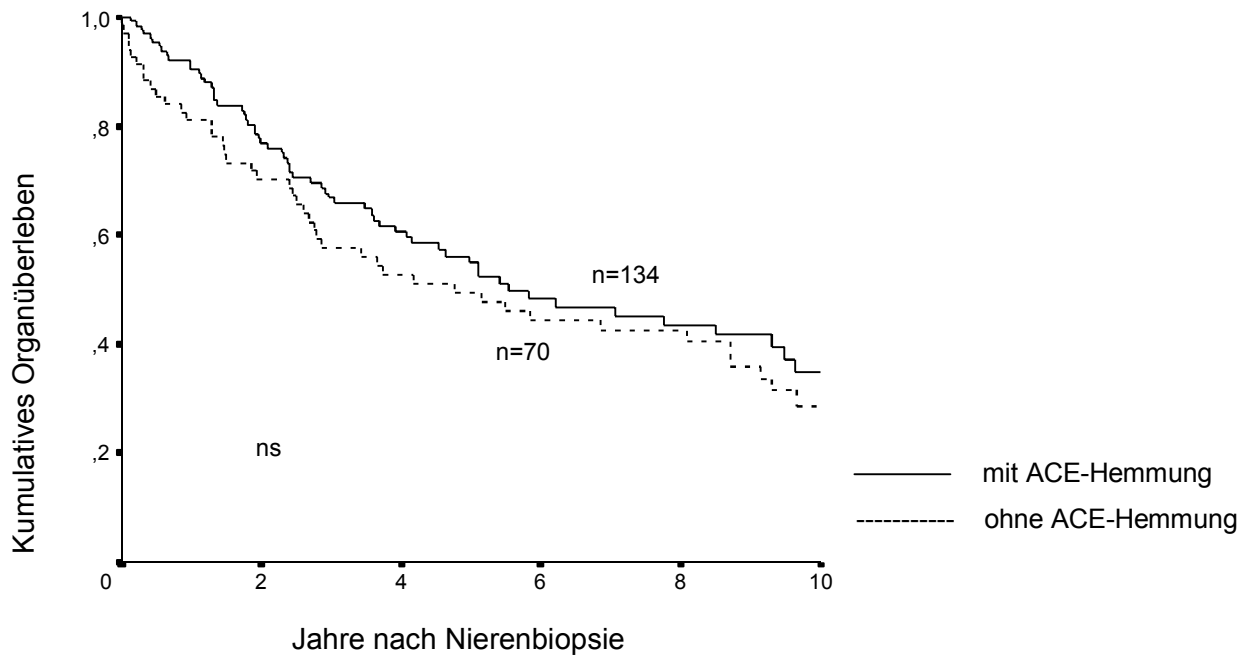


Abbildung 8: Kaplan Meier Analyse des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie bei n= 204 Patienten mit bioptisch gesicherter Glomerulonephritis in Abhängigkeit von der Therapie mit ACE-Hemmern.

3.2.3 ACE-Serumaktivität im gesamten Patientenkollektiv und in der Kontrollgruppe

Die ACE-Serumaktivität wurde in n= 92 Patienten (vor Verordnung von ACE-Hemmern oder AT₁R-Antagonisten) und n= 104 Kontrollpersonen bestimmt. Sie unterschied sich nicht signifikant zwischen der Patienten- und der Kontrollgruppe (ns). In beiden Gruppen war sie aber stark mit dem ACE-I/D Genotyp assoziiert (p<0.001, Tab. 3, Abb. 9a und b).

	ACE-Gen I/D Polymorphismus			Signifikanz
	II	DI	DD	
Patienten (n= 92)	64.3 ± 19	90.9 ± 24	106.2 ± 22	p<0.001 †
Probanden (n= 104)	69.5 ± 18	90.8 ± 21	100.0 ± 23	p<0.001 †

Tabelle 3: Angiotensin I-Converting Enzym Serumaktivität (Mittelwert ± SD in U/l, Normwert: 50-120 U/l) bei n= 92 Patienten mit bioptisch gesicherter primärer Glomerulonephritis und n= 105 gesunden Kontrollpersonen in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D Polymorphismus (keine Gabe von ACE-Hemmern oder AT₁R Antagonisten). (†) Kruskal Wallis H-Test

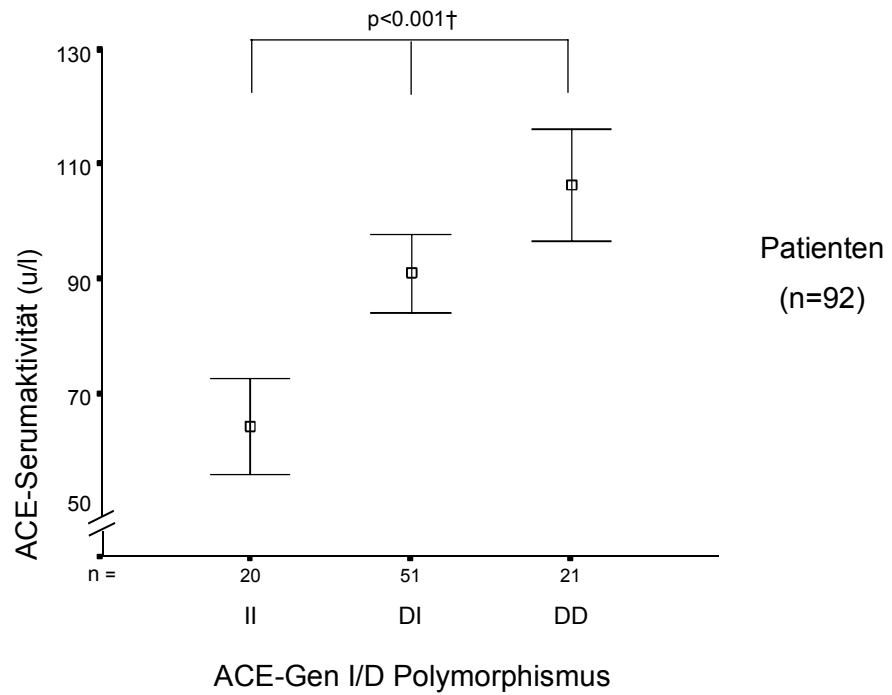


Abbildung 9a: Angiotensin I-Converting Enzym Serumaktivität (Mittelwert \pm SE in U/l, Normwert: 50-120 U/l) bei n= 92 Patienten mit bioptisch gesicherter Glomerulonephritis in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D Polymorphismus (keine Gabe von ACE-Hemmern oder AT₁R Antagonisten). (†) einfaktorische ANOVA

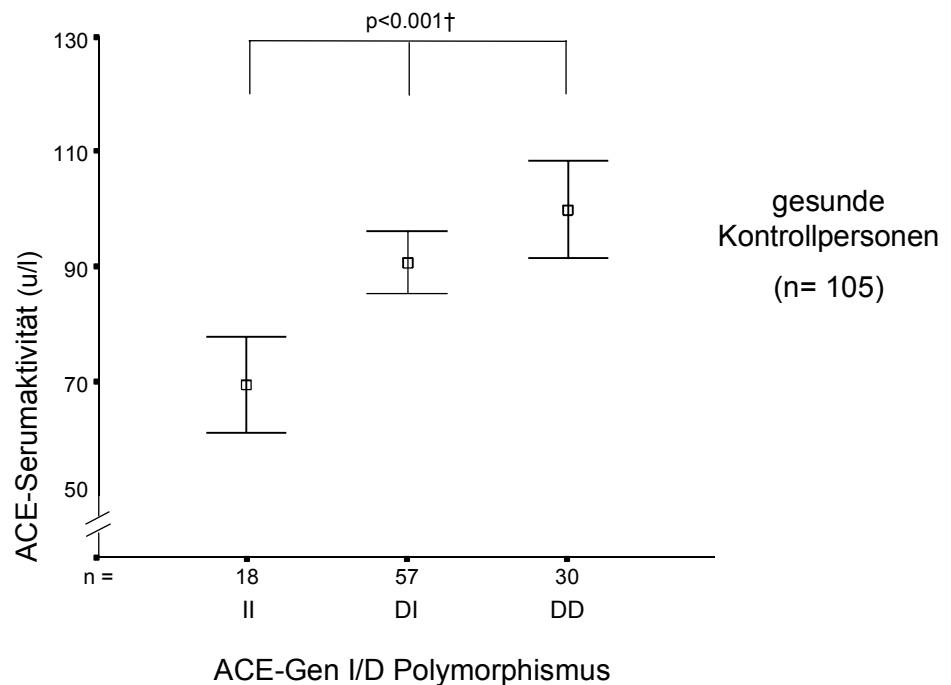


Abbildung 9b: Angiotensin I-Converting Enzym Serumaktivität (Mittelwert \pm SE in U/l, Normwert: 50-120 U/l) bei n= 105 gesunden Kontrollpersonen in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D Polymorphismus. (†) einfaktorische ANOVA

3.2 IgA Nephropathie

3.2.1 Patientenbeschreibung

Untersucht wurden n= 107 Patienten mit einer bioptisch gesicherten IgA Nephropathie, die im Zeitraum von 1968 bis 2001 in der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf nierenbiopsiert wurden und/oder in Behandlung waren. Die mittlere Beobachtungsdauer betrug 6.6 ± 5.8 Jahre (Zeitspanne: 1-30 Jahre). Im Durchschnitt wurden 16.2 ± 13 Serumkreatininwerte pro Patient erhoben. Unser Patientenkollektiv setzte sich aus 81 Männer und 26 Frauen zusammen. Eine schnellere Progression bei männlichen Patienten wurde nicht festgestellt (1/Cr Steigung bei Männern: -0.128 ± 0.14 , bei Frauen: -0.110 ± 0.11 dl * mg⁻¹* Jahr⁻¹, ns). Das mittlere Patientenalter zum Zeitpunkt der Biopsie betrug 38.1 ± 14.2 Jahre und war nicht mit der Progression der Erkrankung verknüpft (Korrelation mit der 1/Cr Steigung: ns).

Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Biopsie

Zum Zeitpunkt der Biopsie lag das mittlere Serumkreatinin bei 2.0 ± 1.1 mg/dl und die endogene Kreatinin Clearance bei 72.5 ± 36 ml/min/1.73m². Die Nierenfunktion zum Zeitpunkt der Biopsie war nicht mit der Progression der IgA Nephropathie assoziiert (Korrelation mit der 1/Cr Steigung: ns).

Proteinurie

Die mittlere Proteinurie betrug zum Zeitpunkt der Biopsie 3.9 ± 2.9 g/24h. Das Ausmaß der Proteinurie korrelierte mit der Progression der Erkrankung (p=0.001, Abb. 10).

Einfluss der Therapie mit ACE-Hemmern auf die Proteinurie

Bei n= 29 Patienten mit IgA Nephropathie lagen die Werte der Proteinurie kurz vor und 3-6 Monate nach Therapiebeginn mit ACE-Hemmern vor. Die ACE-Hemmung bewirkte eine hoch signifikante Reduktion der Eiweißausscheidung (p<0.001, Abb. 11). Als Kontrollgruppe wurden n= 22 Patienten ausgewertet, die zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie und im ersten Halbjahr danach nicht mit ACE-Hemmern oder AT₁R-Antagonisten behandelt wurden. Bei diesen Patienten wurde keine signifikante Änderung der Proteinurie innerhalb der ersten zwei Quartale nach der Nierenbiopsie festgestellt (ns).

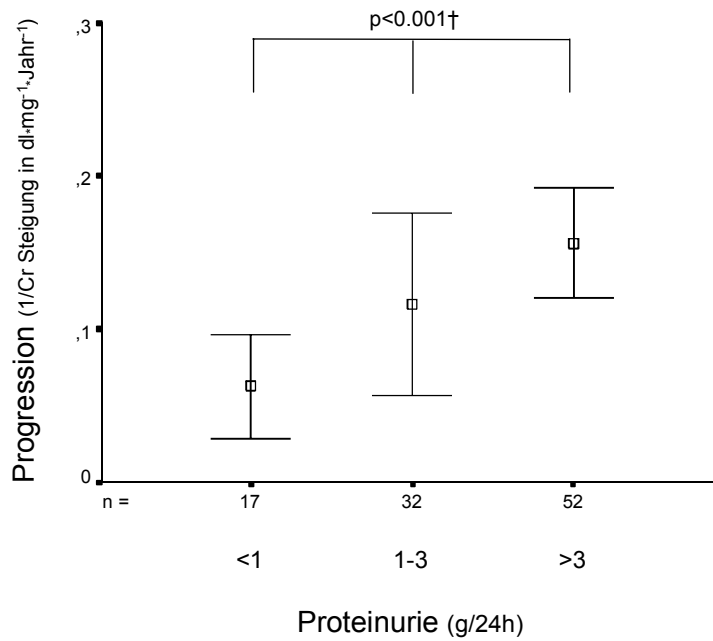


Abbildung 10: Progression abgelesen an der Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (Mittelwert \pm SE in $\text{dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$) in Abhängigkeit vom Ausmaß der Proteinurie zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie (g/24h). (\dagger) Kruskal Wallis H-Test

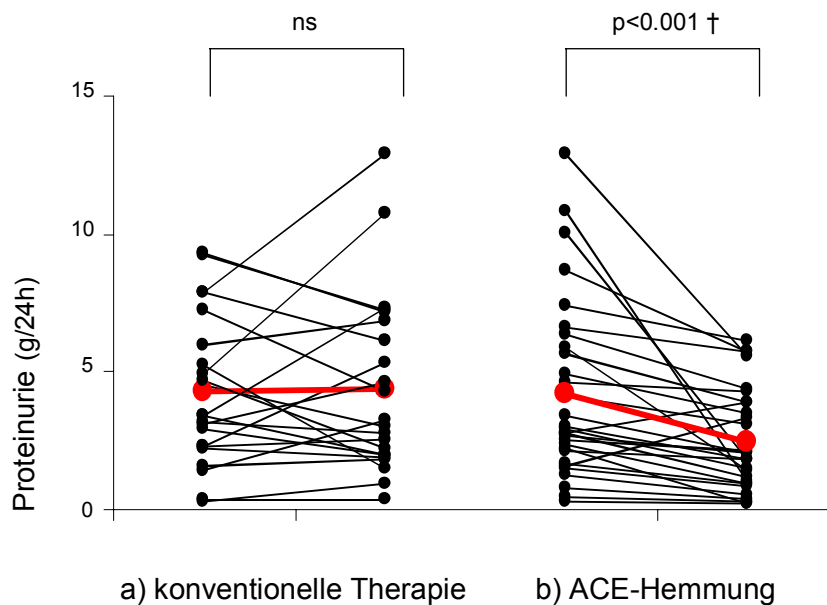


Abbildung 11: Proteinurie (in g/24h) a) bei $n = 22$ mit konventioneller Therapie ohne ACE-Hemmer oder AT_1R -Antagonisten behandelten Patienten zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie und nach 3-6 Monate und b) bei $n = 29$ Patienten mit IgA Nephropathie vor und 3-6 Monate nach Therapiebeginn mit ACE-Hemmern. (\dagger) Student's t-Test für gepaarte Stichproben

Nephrotisches Syndrom

Ein nephrotisches Syndrom lag bei 29 Patienten (27%) vor. Diese Subgruppe zeigte eine deutlich schnellere Progression (1/Cr Steigung: nephrotisch: -0.173 ± 0.13 vs. nicht nephrotisch: -0.105 ± 0.14 dl \cdot mg⁻¹ \cdot Jahr⁻¹, $p < 0.01$; Kaplan Meier Analyse des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie bei nephrotischen gegenüber nicht nephrotischen Patienten: $p < 0.01$, Abb. 12).

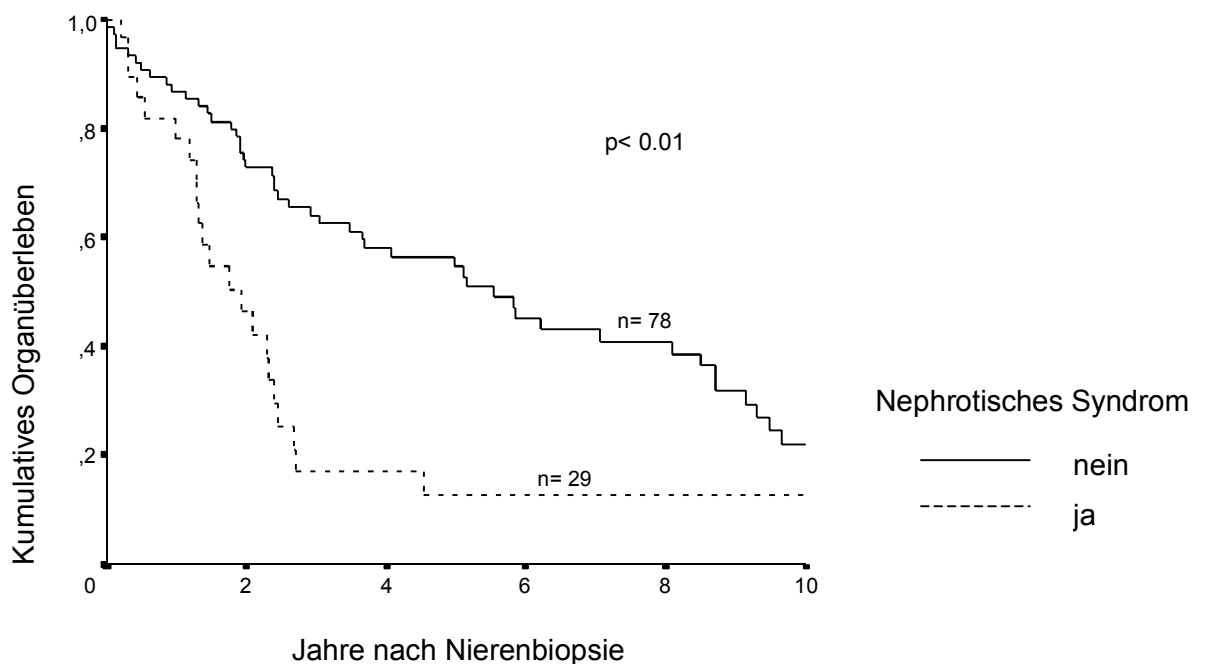


Abbildung 12: Kaplan Meier Analyse des zehnjährigen Organüberlebens bei $n = 107$ Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit vom Vorliegen eines nephrotischen Syndroms. (†) Log Rank

Arterielle Hypertonie

Bei 86 Patienten (80%) bestand bei der nephrologischen Erstvorstellung eine arterielle Hypertonie. In den meisten Fällen ($n = 67$) wurde sie im Zusammenhang mit der Glomerulonephritis erstdiagnostiziert, in einigen Fällen wurde die Nierenerkrankung sogar im Rahmen der Hypertonieabklärung festgestellt. Nur 21 Patienten (20%) waren zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie normotensiv, die Mehrheit von ihnen ($n = 15$) entwickelte allerdings im weiteren Verlauf eine arterielle Hypertonie und nur 6 Patienten blieben bis zum Zeitpunkt der Genotypisierung normotensiv. Das mittlere Alter bei Erstdiagnose einer arteriellen

Hypertonie betrug 36.1 ± 13 Jahre. Die Patienten wurden im Durchschnitt mit 2.2 ± 1.2 Antihypertensiva (0-6) therapiert.

Die Patienten, die zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie normotensiv waren ($n=21$), zeigten ein besseres Organüberleben zehn Jahre nach Nierenbiopsie ($p=0.011$, Abb. 13). Diese Patienten zeigten außerdem eine tendenziell stabilere Nierenfunktion, wie aus dem Vergleich der $1/\text{Cr}$ Steigung hervorgeht (normotensiv zum Zeitpunkt der Biopsie: -0.068 ± 0.05 , hypertensiv: $-0.137 \pm 0.15 \text{ dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$; $p=0.071$). Der mittlere arterielle Blutdruck war mit $114.5 \pm 10 \text{ mmHg}$ signifikant höher bei den Patienten ($n=47$), die innerhalb der ersten drei Jahre einen Organverlust erlitten, im Vergleich zu $108.9 \pm 14 \text{ mmHg}$ bei Patienten ($n=46$) mit einer erhaltenen Nierenfunktion ($p<0.05$).

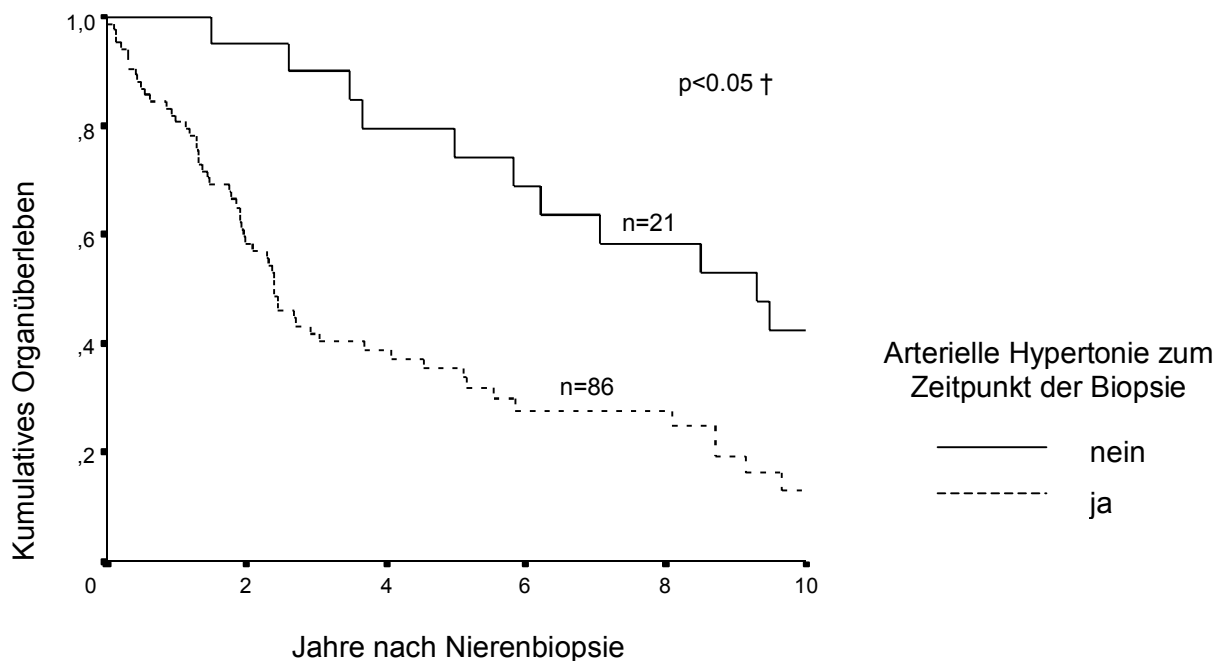


Abbildung 13: Kaplan Meier Analyse des zehnjährigen Organüberlebens bei $n=107$ Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit vom Vorliegen einer arteriellen Hypertonie zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie. (\dagger) Log Rank

3.2.2 Progression der IgA Nephropathie

Zum Zeitpunkt der Genotypisierung hatten 36 Patienten (33.6%) eine ausreichende Nierenfunktion, während 71 Patienten (66.3%) eine terminale Niereninsuffizienz erreicht hatten. Von ihnen wurden 21 hämodialysiert, 12 mit der Peritonealdialyse behandelt und 38 waren nierentransplantiert. Als Maß der Progression wurde die Steigung der Kurve des

reziproken Serumkreatinins pro Zeit verwendet (siehe 2.5). Die mittlere $1/Cr$ Steigung betrug unter den Patienten mit IgA Nephropathie $-0.124 \pm 0.14 \text{ dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$ (entspricht einer Erhöhung des Serumkreatinins von 1.0 auf 2.0 mg/dl innerhalb von vier Jahren). Drei Jahre nach der Nierenbiopsie hatten bereits 47% der Patienten (47 der 93 so lange betrachteten Patienten) einen Organverlust erlitten (Abb. 14).

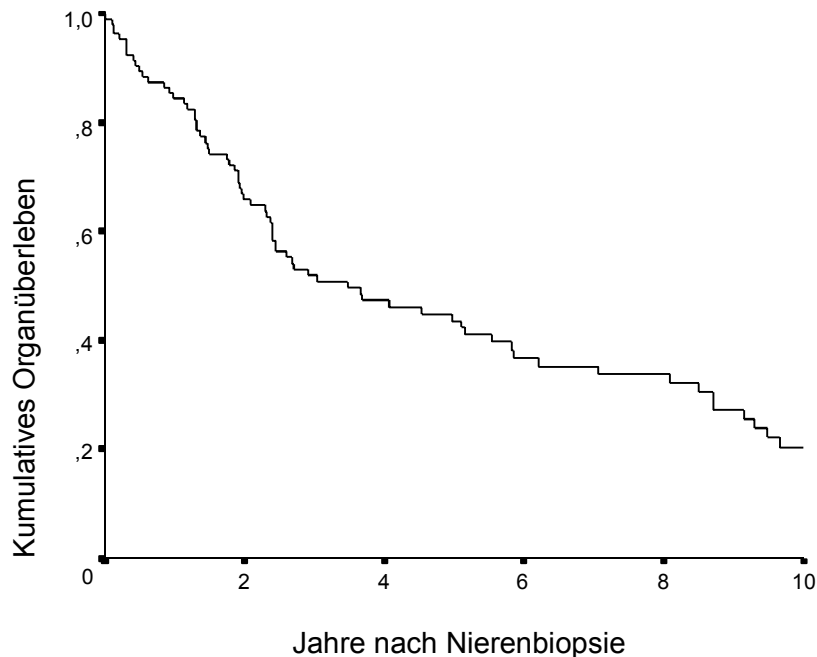


Abbildung 14: Kaplan Meier Analyse des zehnjährigen Organüberlebens bei $n=107$ Patienten mit IgA Nephropathie.

Einfluss der ACE-Hemmer Therapie auf die Progression der IgA Nephropathie

Eine durch ACE-Hemmung erzielte Nierenprotektion konnte bei Patienten mit IgA Nephropathie festgestellt werden. Patienten, die über längere Zeit mit einem ACE-Hemmer behandelt wurden ($n=64$) zeigten drei Jahre nach Nierenbiopsie ein besseres Organüberleben im Vergleich zu den nicht behandelten Patienten ($n=38$; $p<0.05$, Abb. 15). Bei dieser Auswertung wurden $n=5$ Patienten, die mit einem AT_1R -Antagonisten therapiert wurden, nicht berücksichtigt.

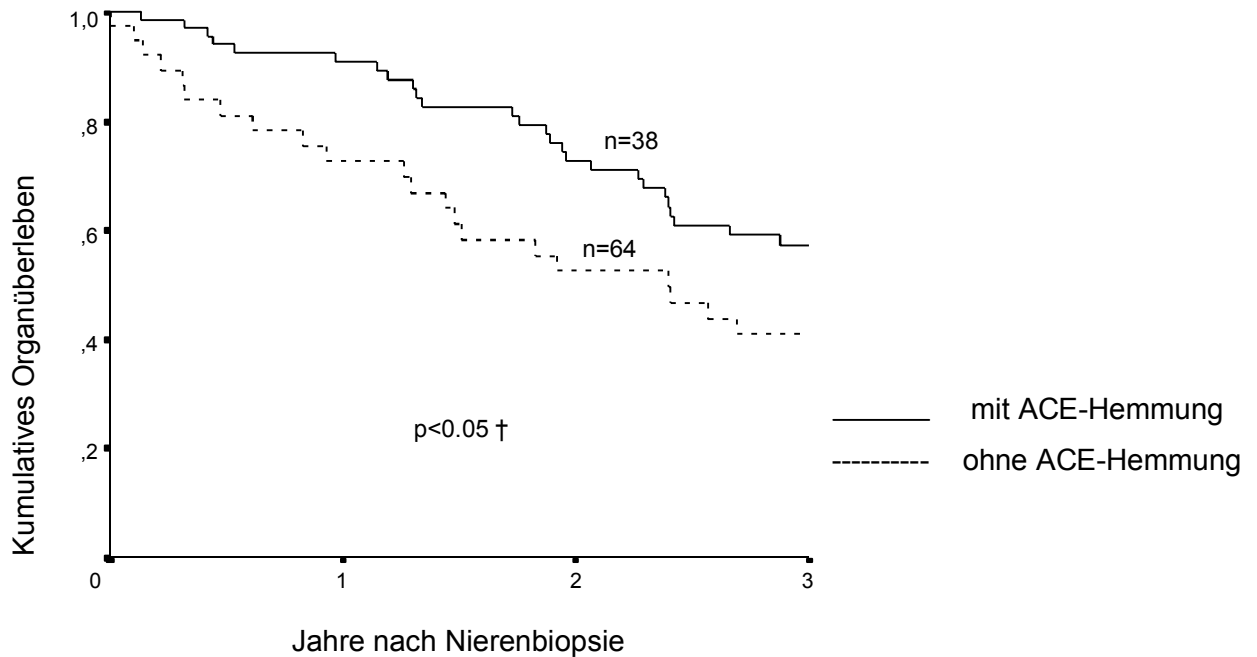


Abbildung 15: Kaplan Meier Analyse des drei Jahre Organüberlebens bei n= 102 Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit von der Therapie mit ACE-Hemmern. (†) Log Rank

Gruppeneinteilung anhand der Progression der Erkrankung

Anhand der Steigung des reziproken Serumkreatinins (\geq oder $< -0,05 \text{ dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$) wurden die Patienten in Gruppe A (n= 30) mit langsamer Progression und Gruppe B (n= 77) mit schneller Progression unterteilt (Abb. 16a und b). Die beiden Gruppen waren bezüglich der Geschlechtsverteilung, Nierenfunktion, Proteinurie und des arteriellen Blutdrucks vergleichbar (ns, Tab. 4). Die Patienten der Gruppe B (fast progressors) wurden tendenziell in einem jüngeren Alter nierenbiopsiert ($p=0,062$). Ein nephrotisches Syndrom war signifikant häufiger in der Gruppe B (fast progressors) als in der Gruppe A (slow progressors, $\chi^2= 4,0$, $p<0,05$). Im Laufe der Betrachtung wurden n= 60 Patienten (77,9%) aus der Gruppe B (fast progressors) und n= 11 (36,7%) aus der Gruppe A (slow progressors) terminal niereninsuffizient ($\chi^2=16,5$, $p<0,001$). Die mittlere ACE-Serumaktivität (vor Verordnung von ACE-Hemmern oder AT_1R Antagonisten) war signifikant höher in der Gruppe B (fast progressors) im Vergleich zur Gruppe A (slow progressors) zu beobachten ($p<0,05$, Abb. 17). Die Kaplan Meier Analyse des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie erbrachte ein hoch signifikant besseres Ergebnis in der Gruppe A im Vergleich zur Gruppe B ($p<0,001$).

	Gruppe A slow progressors	Gruppe B fast progressors	Signifikanz
Patienten (n)	37	70	
Alter (Jahre)	42.2 ± 13	36.4 ± 15	ns
Männliches Geschlecht (%)	70.0	77.9	ns
Kreatinin (mg/dl)	1.8 ± 0.8	2.1 ± 1.3	ns
ECC (ml/min/1.73m ²)	70.8 ± 34	73.2 ± 37	ns
Proteinurie (g/24h)	3.1 ± 3.3	4.2 ± 2.7	ns
MAP (mmHg)	110.6 ± 13	112.1 ± 12	ns
Antihypertensiva (n)	2.2 ± 1.5	2.2 ± 1.1	ns
Nephrotisches Syndrom (%)	13	35	p<0.05 †
ACE-Serumaktivität (U/l)	79.5 ± 27	100.3 ± 28	p<0.05 ‡
ESRD (%)	36.7%	77.9%	p<0.001 †

Tabelle 4: Klinische und laborchemische Parameter (Mittelwert ± SD) zum Zeitpunkt der Biopsie in der Gruppe A und der Gruppe B bei Patienten mit IgA Nephropathie. (†) Chi Quadrat Test (‡) Student's t-Test

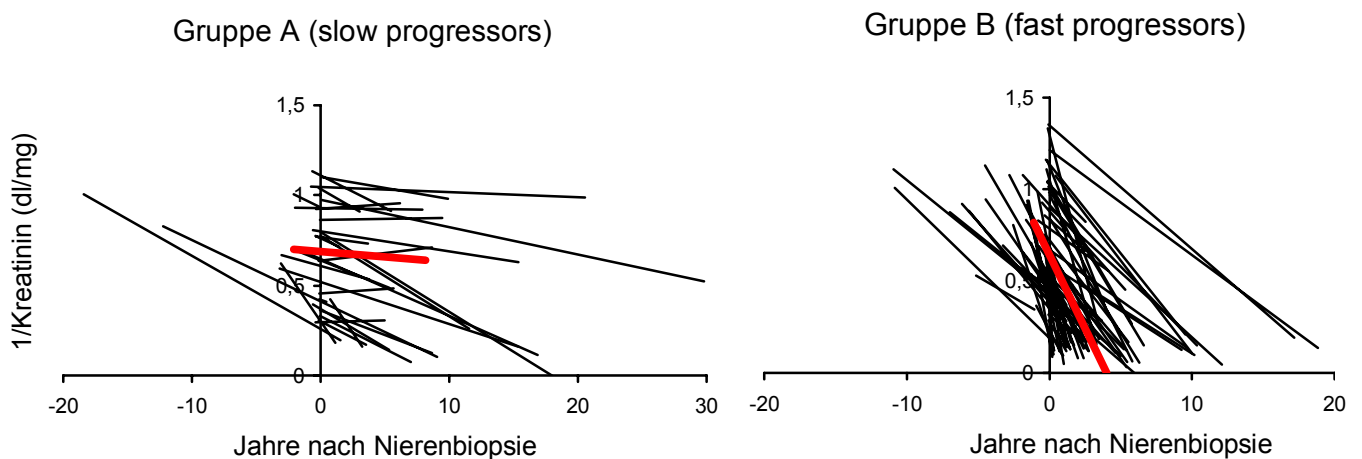


Abbildung 16a und b: Kurven des reziproken Serumkreatinins pro Zeit jeweils in Gruppe A (slow progressors, n= 30) und Gruppe B (fast progressors, n= 77) bei Patienten mit IgA Nephropathie.

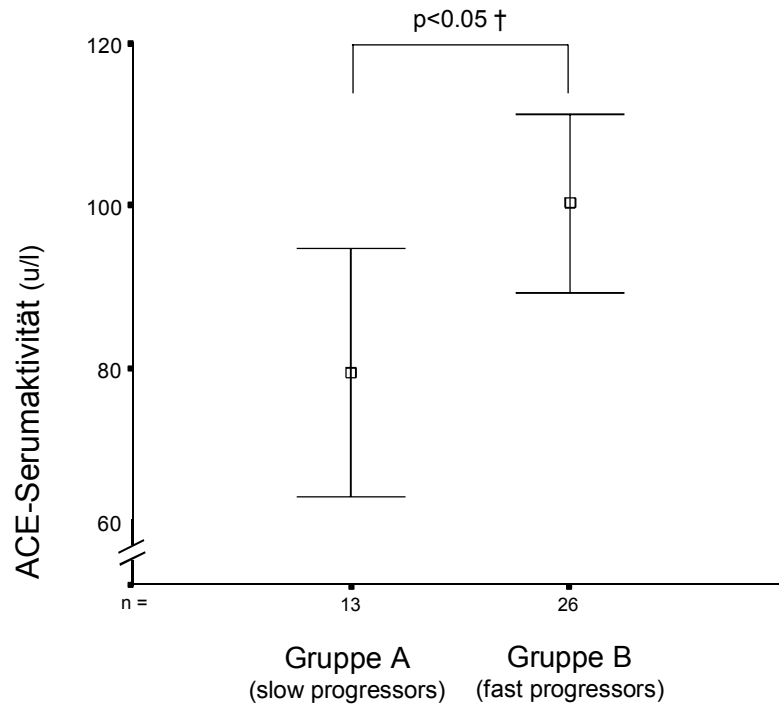


Abbildung 17: Angiotensin I-Converting Enzym Serumaktivität (Mittelwert \pm SE in U/l, Normwert: 50-120 U/l) in der Gruppe A und der Gruppe B bei n= 39 Patienten mit IgA Nephropathie (vor Verordnung von ACE-Hemmern oder AT₁R-Antagonisten). (†) Student's t-Test

3.2.3 Einfluss des Angiotensin-I Converting Enzyme Gen I/D Polymorphismus auf die IgA Nephropathie

Prävalenz

Die Genotypverteilung und die Allelfrequenzen des Angiotensin I-Converting Enzym (ACE)-Gen I/D Polymorphismus unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Patienten und den nierengesunden Probanden (Tab. 5). Bei der Prüfung der Genotyphäufigkeiten durch das Hardy Weinberg Gesetz zeigte sich sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe ein stabiles Gleichgewicht.

ACE-Gen I/D Polymorphismus							
	II	ID	DD	ns	I-Allel	D-Allel	ns
Patienten	17.7 %	53.3 %	29.0 %		0.44	0.56	
Probanden	18.3 %	51.7 %	30.0 %		0.44	0.56	

Tabelle 5: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des ACE-Gen I/D Polymorphismus bei n= 107 Patienten mit IgA Nephropathie und n= 120 Kontrollpersonen.

Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie

Der ACE-I/D Polymorphismus war mit keinem der untersuchten klinischen und laborchemischen Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie assoziiert (Tab. 6).

	ACE-Gen I/D Polymorphismus			Signifikanz
	II	ID	DD	
Alter (Jahre)	40.0 ± 12	37.2 ± 15	38.5 ± 14	ns
Kreatinin (mg/dl)	2.2 ± 1.0	2.0 ± 1.4	1.7 ± 0.7	ns
ECC (ml/min/1.73m ²)	57.2 ± 27	76.7 ± 41	74.7 ± 29	ns
Proteinurie (g/24h)	3.9 ± 2.9	4.2 ± 3.0	3.5 ± 2.8	ns
MAP (mmHg)	115.1 ± 9	110.6 ± 13	111.6 ± 12	ns
Antihypertensiva (n)	2.3 ± 0.8	2.2 ± 1.4	2.1 ± 1.0	ns
Nephrotisches Syndrom (%)	21.4	29.8	25.8	ns

Tabelle 6: Klinische und laborchemische Parameter (Mittelwert ± SD) zum Zeitpunkt der Biopsie in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D Polymorphismus bei Patienten mit IgA Nephropathie

Progression

Ein Einfluss des ACE-I/D Polymorphismus auf die Progression der IgA Nephropathie war anhand der Genotypverteilung und der Allelfrequenzen in Gruppe A und Gruppe B im gesamten Patientenkollektiv nicht nachweisbar (ns, Tab. 7).

ACE-Gen I/D Polymorphismus							
	II	ID	DD		I-Allel	D-Allel	
Gruppe A (slow)	23.3 %	53.4 %	23.3 %	ns	0.50	0.50	ns
Gruppe B (fast)	15.6 %	53.2 %	31.2 %		0.42	0.58	

Tabelle 7: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des ACE-Gen I/D Polymorphismus in der Gruppe A (slow progressors, n= 37) und der Gruppe B (fast progressors n= 70) bei Patienten mit IgA Nephropathie.

In der Subgruppe (n= 38) der Patienten, die nicht mit ACE-Hemmern (bzw. AT₁R-Antagonisten) behandelt wurden, war das D-Allel mit einer Allelfrequenz von 0.83 häufiger unter den fast progressors (Gruppe B₁) als unter den slow progressors (Gruppe A₁, Allelfrequenz: 0.37) vertreten (p<0.05, Abb. 18). Patienten mit mindestens einem D-Allel neigten zu einer schnelleren Progression in dieser nicht mit ACE-Hemmern therapierten Subgruppe (n= 38, 1/Cr Steigung beim II-Genotyp: -0.103 ± 0.09 vs. ID/DD: -0.190 ± 0.20 dl * mg⁻¹ * Jahr⁻¹, p=0.182) aber nicht in der behandelten Subgruppe oder im gesamten Kollektiv (ns)

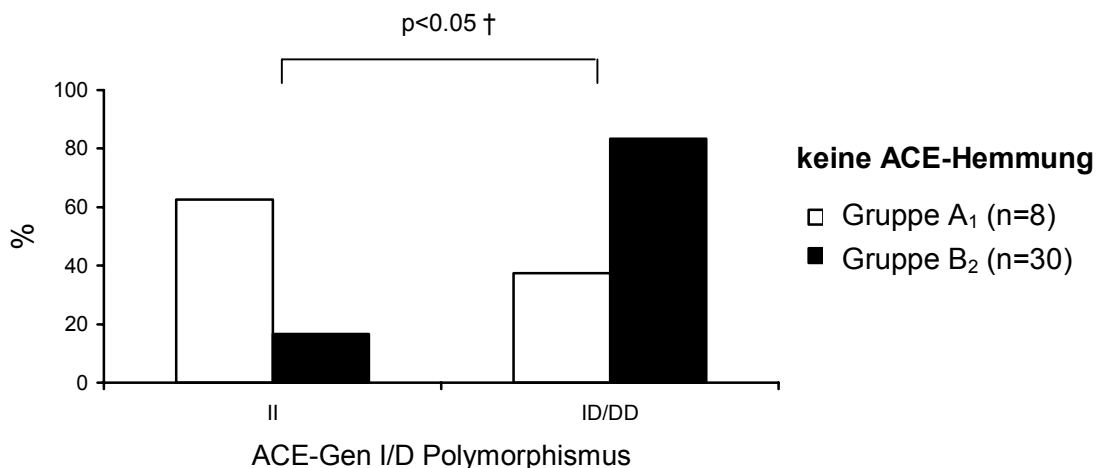


Abbildung 18: Genotypverteilung des ACE-Gen I/D Polymorphismus in der Gruppe A₁ (slow progressors) und der Gruppe B₂ (fast progressors) bei n= 38 nicht mit ACE-Hemmern (bzw. AT₁R-Antagonisten) behandelten Patienten. (†) exakter Test nach Fisher

Die Analyse nach Kaplan Meier des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie erbrachte kein signifikantes Ergebnis zwischen Patienten mit und ohne das ACE-D Allel (ns, Abb. 19).

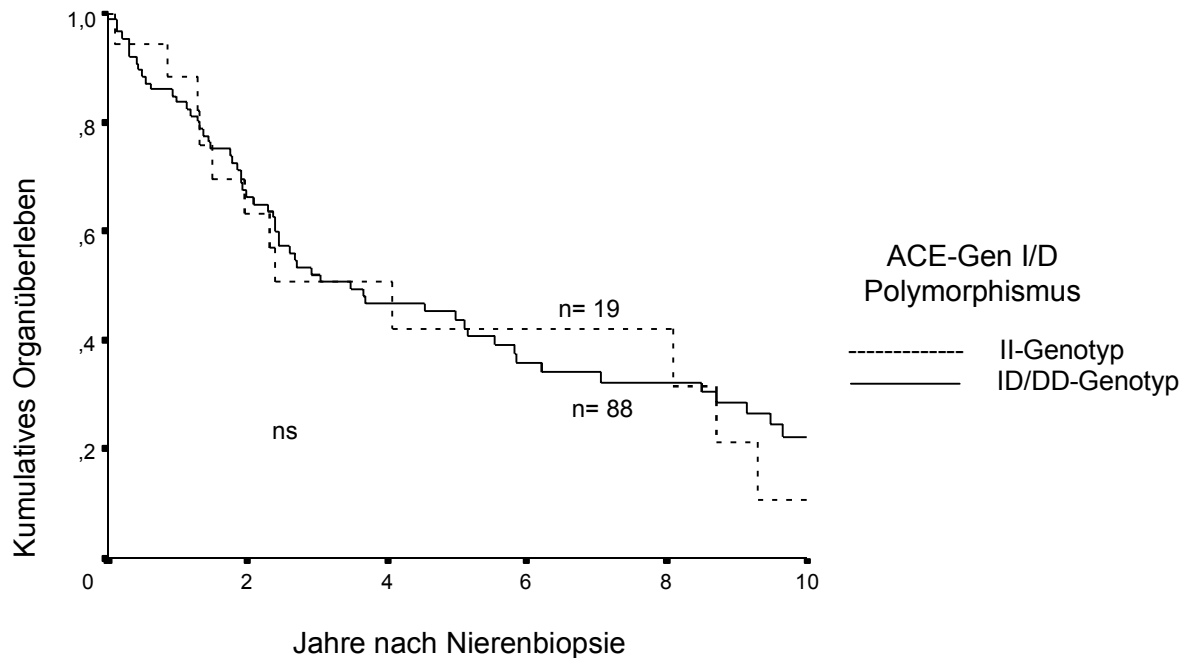


Abbildung 19: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D Polymorphismus bei n= 107 Patienten mit IgA Nephropathie.

Ansprechen auf die Therapie mit ACE-Hemmern

Eine nephroprotektive Wirkung der ACE-Hemmung war nur unter den Patienten mit mindestens einem ACE-D Allel nachweisbar. Die Therapie mit ACE-Hemmern hatte nur bei den ID- und DD-Genotypen eine signifikante Reduktion der Proteinurie 3-6 Monate nach Therapiebeginn zur Folge ($p < 0.05$, Abb. 20 und 21). Bei den ID- und DD-Genotypen wurde eine Verlangsamung der Progression durch die ACE-Hemmung festgestellt ($p < 0.05$), während bei Patienten mit dem II-Genotyp kein signifikanter Vorteil von der Therapie mit ACE-Hemmern nachgewiesen werden konnte (Abb. 22).

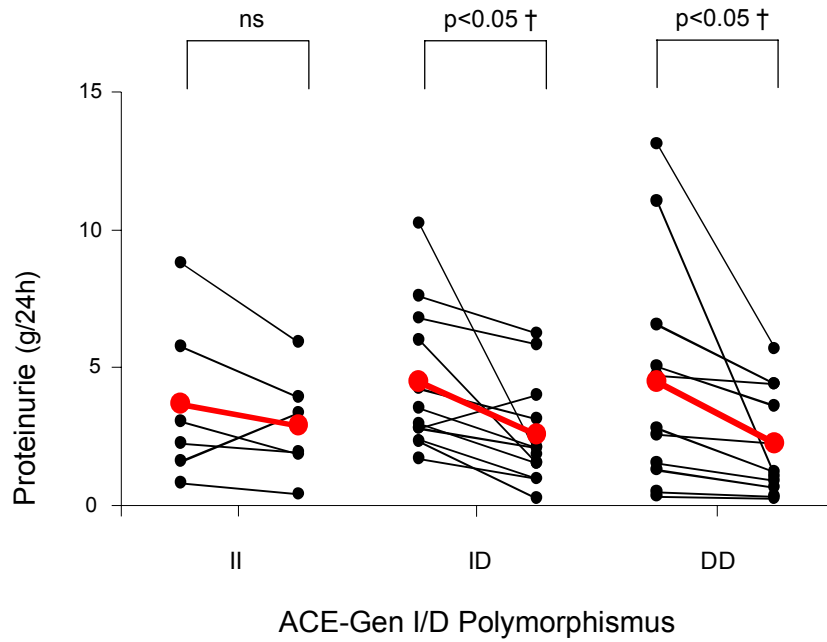


Abbildung 20: Proteinurie (in g/24h) vor und 3-6 Monate nach Therapiebeginn mit ACE-Hemmern bei n= 29 Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D Polymorphismus. (†) Student's t-Test für gepaarte Stichproben

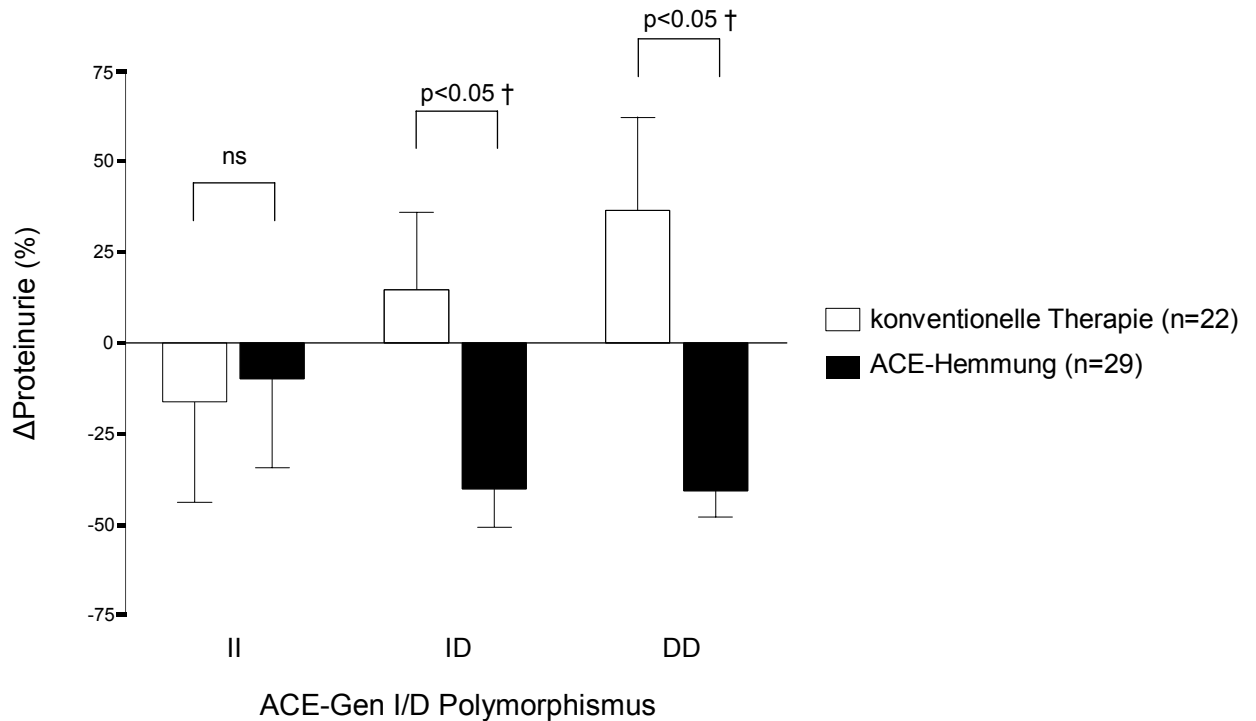


Abbildung 21: Prozentuale Änderung der Proteinurie (Mittelwert ± SE) 3-6 Monate nach Nierenbiopsie bzw. nach Therapiebeginn mit ACE-Hemmern bei n= 51 Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit von der Behandlung mit ACE-Hemmern und dem ACE-Gen I/D Polymorphismus. (†) Student's t-Test für ungepaarte Stichproben

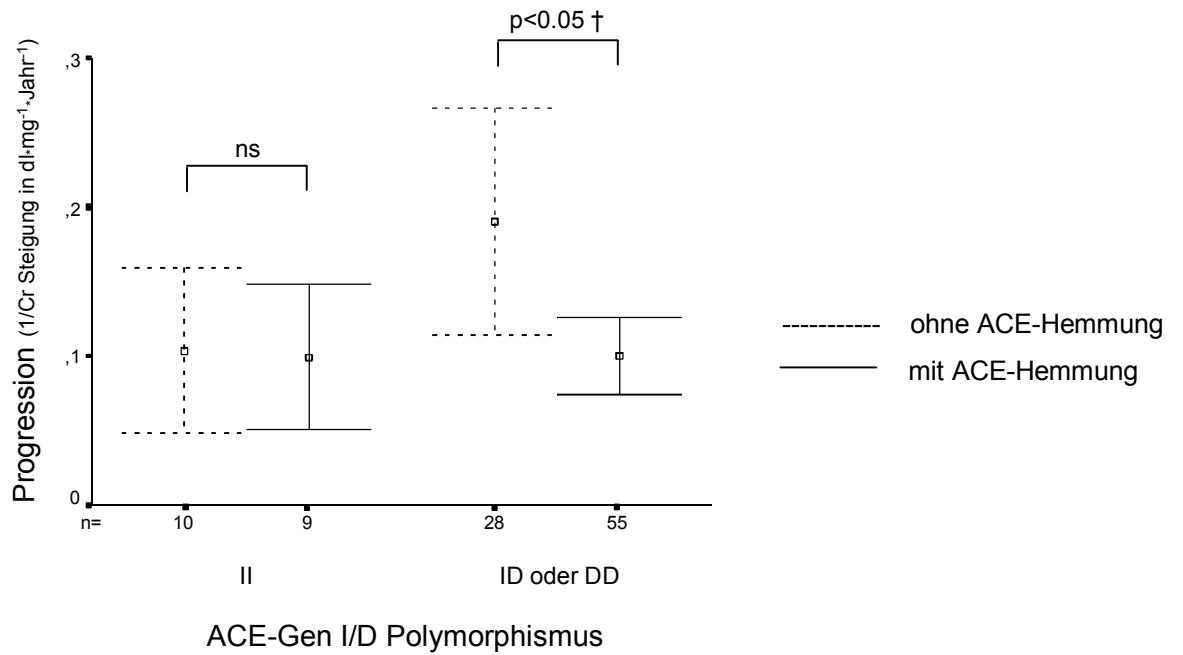


Abbildung 22: Progression abgelesen an der Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (Mittelwert \pm SE in $\text{dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$) bei $n=102$ Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D Polymorphismus und der Behandlung mit ACE-Hemmern. (†): Mann Whitney U-Test

3.2.4 Einfluss des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus auf die IgA Nephropathie

Prävalenz

Die Angiotensinogen (AGT)-MT und TT Genotypen wurden häufiger bei Patienten mit IgA Nephropathie als in der Kontrollgruppe nachgewiesen ($\chi^2=7.0$, $p<0.05$; Abb. 23). Bei den Patienten mit langsamer Progression (Gruppe A) war die Genotypverteilung vergleichbar mit der Kontrollgruppe (ns), es bestand jedoch ein hoch signifikanter Unterschied ($\chi^2=11.1$, $p<0.01$) zwischen Kontrollgruppe und den Patienten mit einer schnellen Progression (Gruppe B). Ein grenzwertiger Unterschied der Allelfrequenzen zwischen den Patienten (M-Allel: 0.47, T-Allel: 0.53) und den nierengesunden Probanden (M-Allel: 0.56, T-Allel: 0.44, $\chi^2= 3.7$, $p=0.054$) wurde ebenfalls festgestellt. Die beobachtete Genotypverteilung unterschied sich nicht signifikant von den erwarteten Häufigkeiten anhand des Hardy Weinberg Gesetzes sowohl in der Patienten- als auch in der Kontrollgruppe.

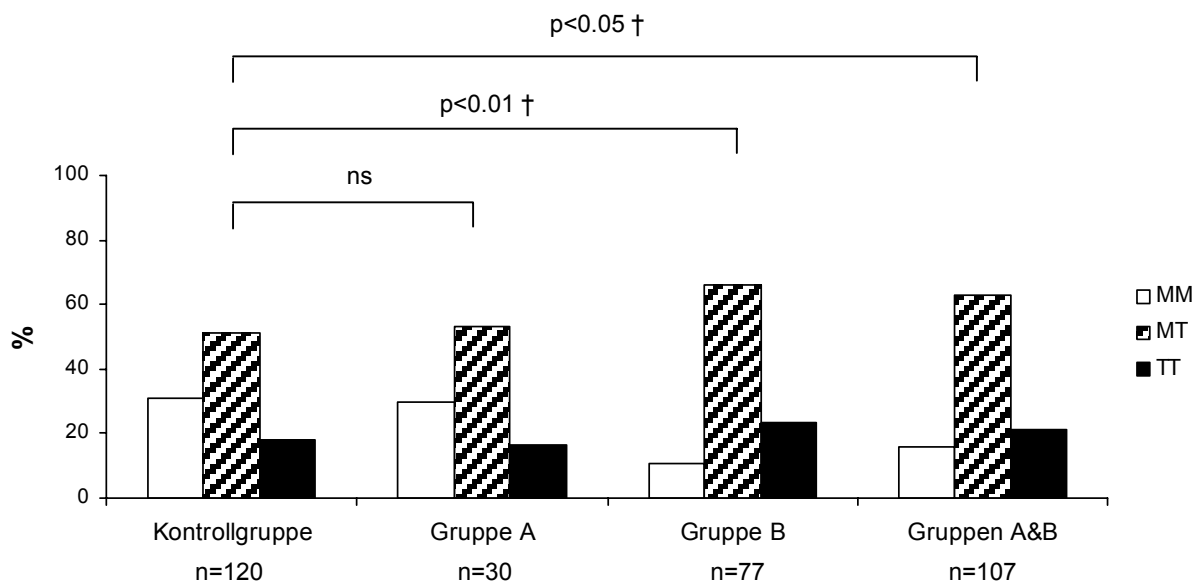


Abbildung 23: Genotypverteilung in der Gruppe A (slow progressors), Gruppe B (fast progressors) und im gesamten Patienten Kollektiv im Vergleich zur Kontrollgruppe bei Patienten mit IgA Nephropathie. (†) Chi Quadrat Test

Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie

Patienten mit einem AGT-T Allel (MT- und TT-Genotypen) waren zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie relativ jünger als Patienten mit dem MM-Genotyp, eine Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht (ns, Tab. 8). Die Nierenfunktion (Serumkreatinin und ECC) und die Proteinurie wiesen vergleichbare Werte unter Patienten mit verschiedenen AGT-Genotypen zum Zeitpunkt der Biopsie auf (ns).

	Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus			Signifikanz
	MM	MT	TT	
Alter (Jahre)	44.9 ± 12	38.1 ± 15	34.3 ± 13	ns
Kreatinin (mg/dl)	2.0 ± 0.8	2.0 ± 1.1	2.0 ± 1.7	ns
ECC (ml/min/1.73m ²)	60.3 ± 31	75.2 ± 36	76.4 ± 41	ns
Proteinurie (g/24h)	3.3 ± 2.0	4.0 ± 3.0	4.2 ± 3.1	ns

Tabelle 8: Nierenfunktion und Proteinurie zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie bei Patienten mit IgA Nephropathie (Mittelwert ± SD).

Nephrotisches Syndrom

Ein nephrotisches Syndrom lag häufiger unter den Patienten mit dem MT- oder TT-Genotyp vor ($\chi^2 = 7.0$, $p < 0.05$, Abb. 24).

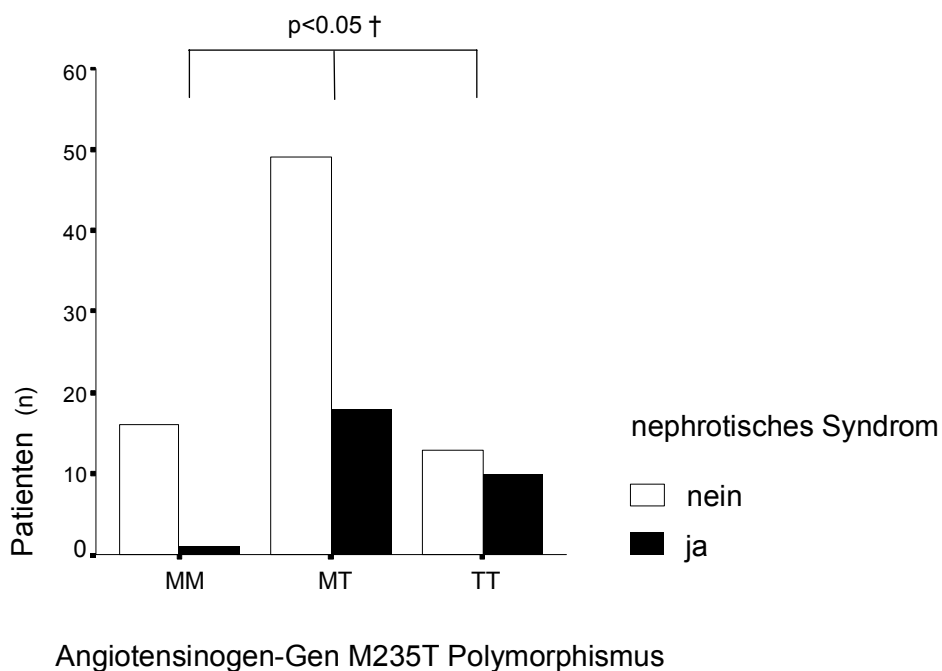


Abbildung 24: Vorliegen eines nephrotischen Syndroms in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei n= 107 Patienten mit IgA Nephropathie. (†) Chi Quadrat Test

Arterielle Hypertonie

Patienten mit einem AGT-T Allel waren tendenziell jünger bei Erstdiagnose einer arteriellen Hypertonie (MM: 41.7 ± 12 , MT: 35.9 ± 13 , TT: 32.8 ± 11 Jahre, $p=0.103$). Der AGT-M235T Polymorphismus war ebenfalls nur tendenziell mit den absoluten Blutdruckwerten bei Erstvorstellung assoziiert (MM: 106.8 ± 13 , MT: 111.9 ± 12 , TT: 114.9 ± 12 mmHg, $p=0.109$). Viele Patienten wurden jedoch zu diesem Zeitpunkt bereits mit Antihypertensiva behandelt. Die Anzahl der Antihypertensiva, die erforderlich für eine ausreichende Blutdruckeinstellung war, korrelierte stark zur Anzahl der vorhandenen T-Allele ($p<0.01$, Abb. 25).

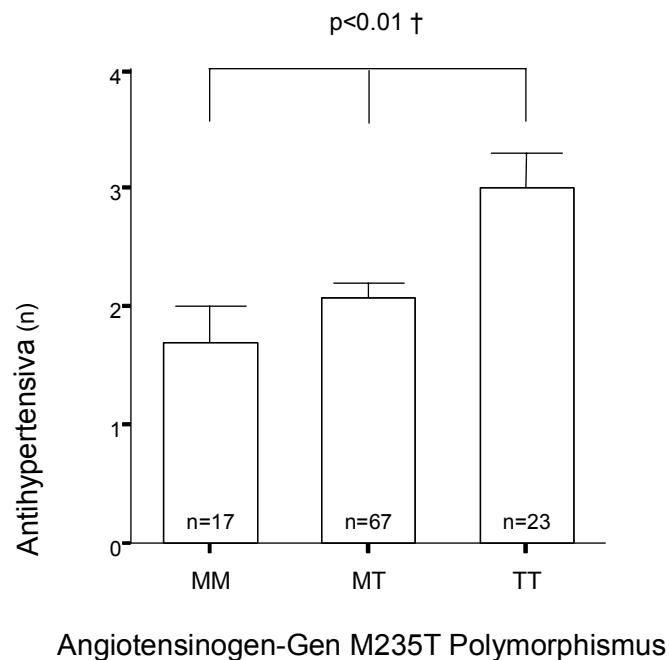


Abbildung 25: Anzahl der eingenommenen Antihypertensiva (Mittelwert \pm SE) in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei $n=107$ Patienten mit IgA Nephropathie. (†) Kruskal Wallis H-Test

Progression

Der Angiotensinogen-Gen Polymorphismus hatte einen signifikanten Einfluss auf die Progression der IgA Nephropathie. Die AGT-MT und TT Genotypen kamen häufiger in der Gruppe B (fast progressors) als in der Gruppe A (slow progressors) vor ($p < 0.05$, Abb. 26). Der AGT-M235T Genotyp war auch direkt mit der Progression anhand der $1/\text{Cr}$ Steigung assoziiert ($p < 0.05$, Abb. 27).

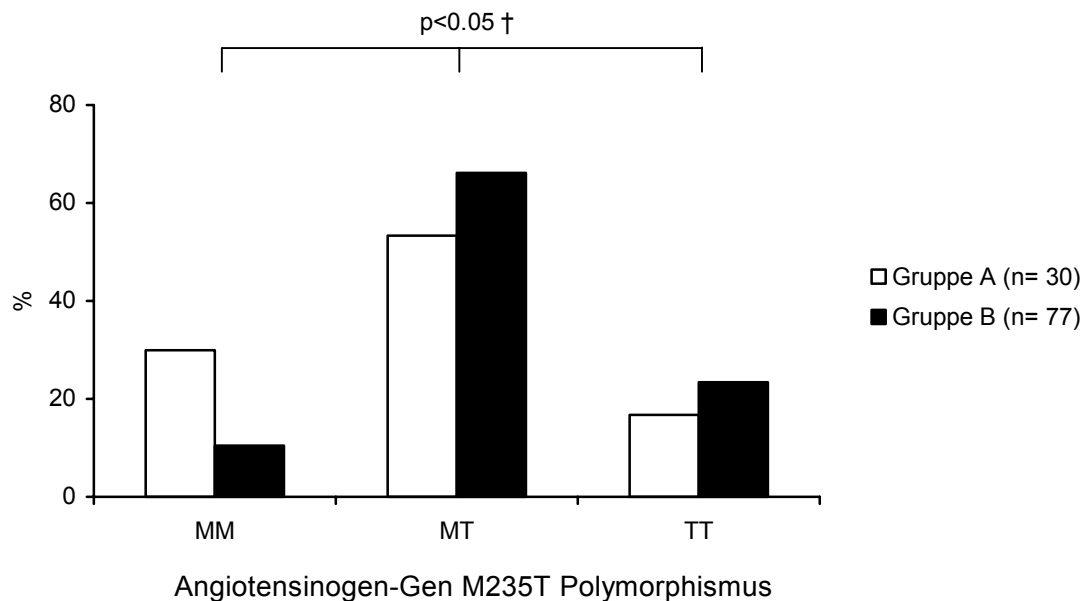


Abbildung 26: Genotypverteilung des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus in der Gruppe A (slow progressors) und der Gruppe B (fast progressors) bei $n = 107$ Patienten mit IgA Nephropathie. (†) Chi Quadrat Test

Innerhalb der ersten drei Jahren nach Nierenbiopsie erlitten 47 der so lange betrachteten 93 Patienten (50.5%) einen Organverlust. Unter diesen Patienten war das T-Allel häufiger vertreten: MM: 3 von 13 Patienten (23%), MT: 30 von 59 (51%), TT: 14 von 21 Patienten (67%); $\chi^2 = 6.1$, $p < 0.05$. Die Kaplan Meier Analyse des Organüberlebens drei Jahre nach der Nierenbiopsie erbrachte einen Vorteil zu Gunsten der Patienten ohne ein T-Allel ($p < 0.05$, Abb. 28).

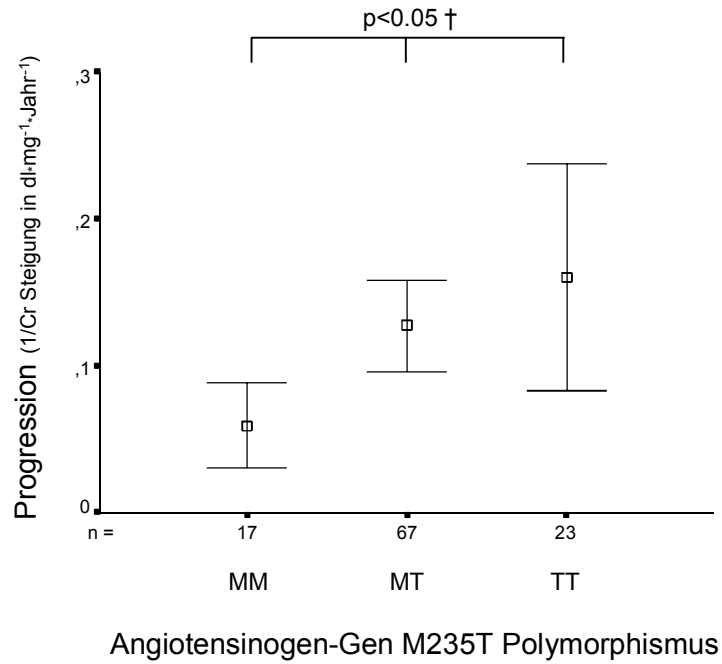


Abbildung 27: Progression abgelesen an der Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (Mittelwert \pm SE in $\text{dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$) in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus. (†) Kruskal Wallis H-Test

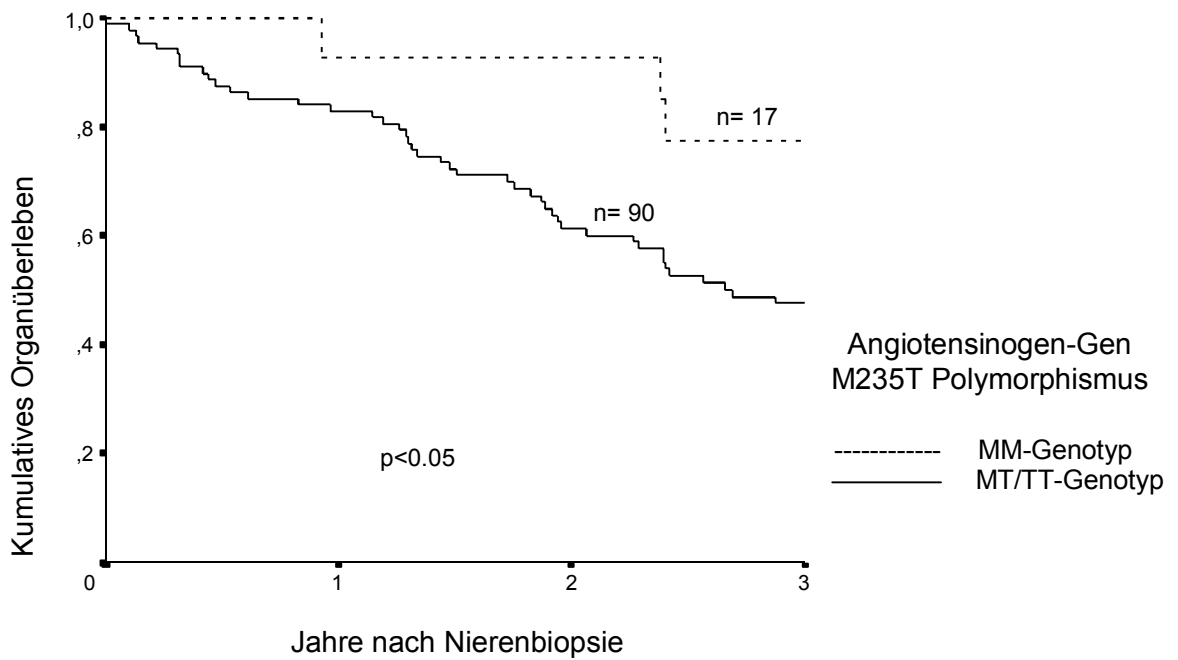


Abbildung 28: Kaplan Meier Analyse des drei Jahre Organüberlebens bei $n = 107$ Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus. (†) Log Rank

Ansprechen auf die Therapie mit ACE-Hemmern

Patienten mit dem T-Allel des AGT-M235T Polymorphismus profitierten mehr von der Therapie mit ACE-Hemmern. Nur bei den MT- und TT-Genotypen wurde eine signifikante Reduktion der Proteinurie durch die ACE-Hemmung 3-6 Monate nach Therapiebeginn festgestellt (Abb. 29 und 30). Eine signifikante Progressionsverlangsamung war nur bei Patienten mit dem TT-Genotyp nachweisbar ($p < 0.05$, Abb. 31). Nur bei Patienten mit dem TT-Genotyp zeigte die Kaplan Meier Analyse des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie einen Nutzen der ACE-Hemmung (behandelte gegen nicht behandelte Patienten mit dem TT-Genotyp: $p < 0.05$).

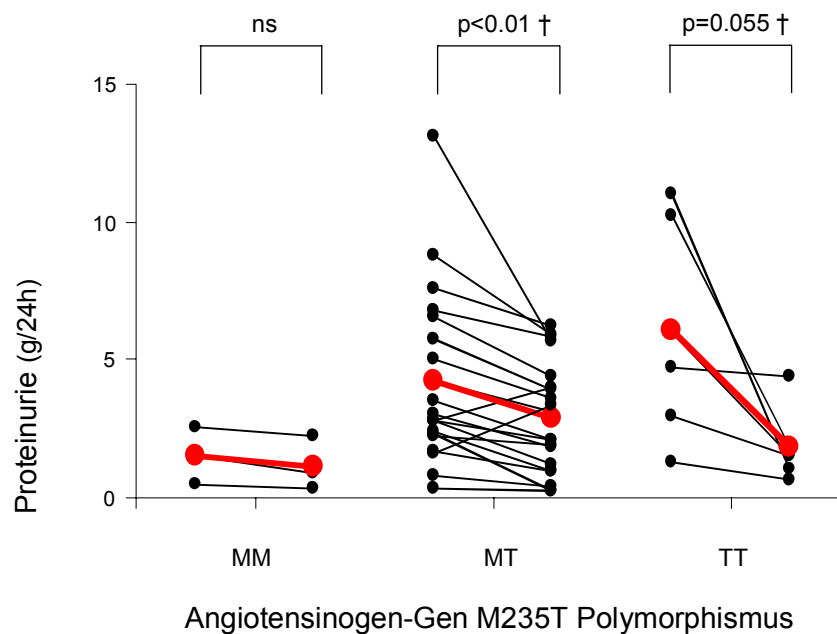


Abbildung 29: Proteinurie (in g/24h) vor und 3-6 Monate nach Therapiebeginn mit ACE-Hemmern bei $n = 29$ Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus. (†) Student's t-Test für gepaarte Stichproben

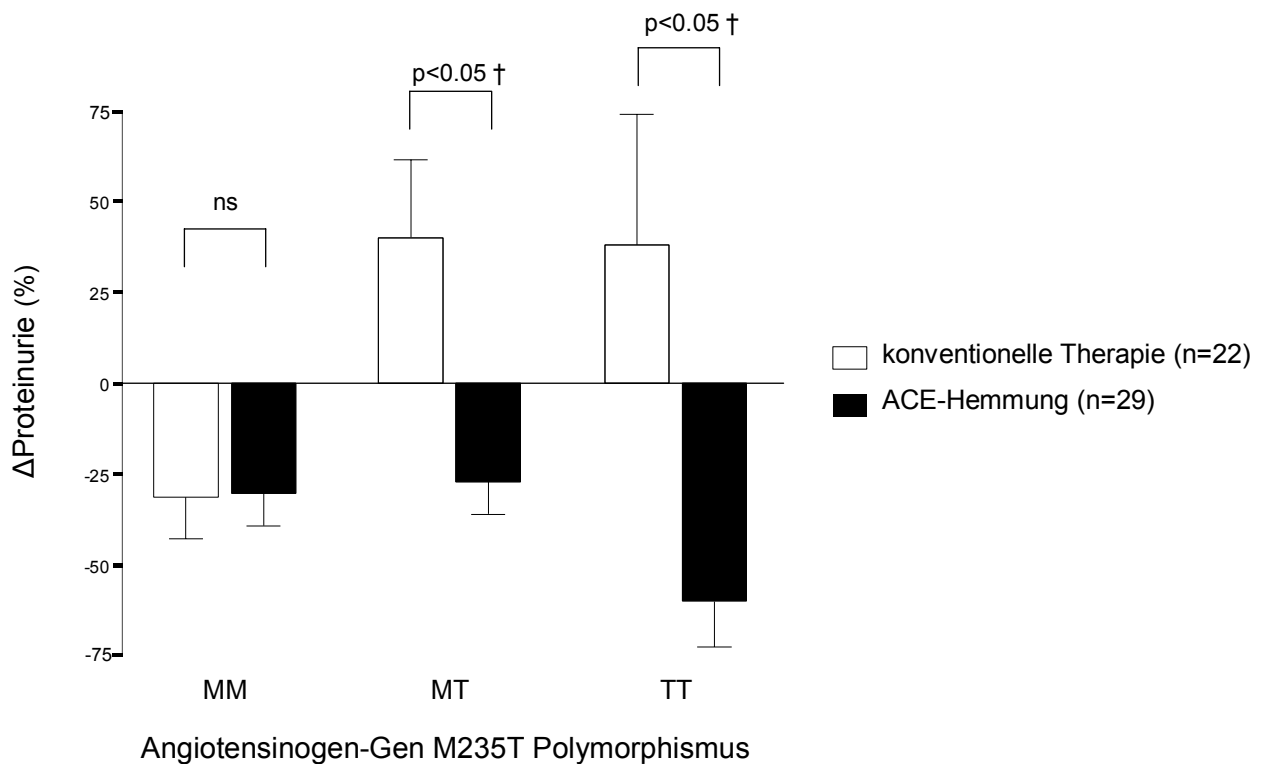


Abbildung 30: Prozentuale Änderung der Proteinurie (Mittelwert \pm SE) 3-6 Monate nach Nierenbiopsie bzw. nach Therapiebeginn mit ACE-Hemmern bei n= 51 Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit von der Behandlung mit ACE-Hemmern und dem Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus. (†) Student's t-Test für ungepaarte Stichproben

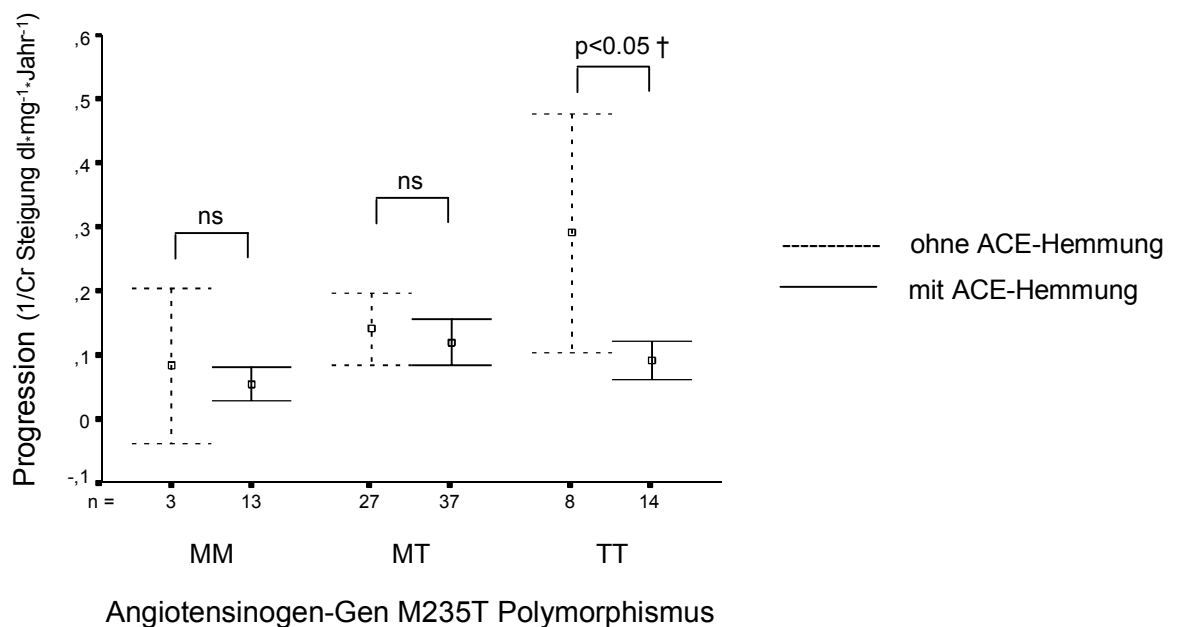


Abbildung 31: Progression abgelesen an der Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (Mittelwert \pm SE in dl \cdot mg⁻¹ \cdot Jahr⁻¹) bei n= 102 Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus und der Behandlung mit ACE-Hemmer. (†): Mann Whitney U-Test

3.2.5 Einfluss des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus auf die IgA Nephropathie

Prävalenz

Die Genotypverteilung und die Allelfrequenzen des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT₁R)-Gen A1166C Polymorphismus waren in der Patienten- und der Kontrollgruppe vergleichbar (Tab. 9). In beiden Gruppen wurde das Hardy Weinberg Gesetz erfüllt.

Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus							
	AA	AC	CC	ns	A-Allel	C-Allel	Ns
Patienten	54.2 %	36.4 %	9.4 %		0.72	0.28	
Probanden	57.1 %	37.5 %	10.8 %		0.70	0.30	

Tabelle 9: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus bei n= 107 Patienten mit IgA Nephropathie und n= 120 Kontrollpersonen.

Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem AT₁R-A1166C Polymorphismus und den untersuchten Parametern zum Zeitpunkt der Biopsie aufgedeckt werden (Tab. 10).

	Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor Polymorphismus			Signifikanz
	AA	AC	CC	
Alter (Jahre)	36.5 ± 14	40.6 ± 15	36.8 ± 12	ns
Kreatinin (mg/dl)	2.0 ± 1.1	2.1 ± 1.3	1.7 ± 0.6	ns
ECC (ml/min/1.73m ²)	72.3 ± 35	75.6 ± 40	63.4 ± 26	ns
Proteinurie (g/24h)	3.7 ± 2.5	4.3 ± 3.6	4.1 ± 1.9	ns
MAP (mmHg)	112.1 ± 12	110.2 ± 12	114.2 ± 10	ns
Antihypertensiva (n)	2.2 ± 1.1	2.2 ± 1.4	2.1 ± 0.7	ns
Nephrotisch (%)	25.9	30.8	20.0	ns

Tabelle 10: Klinische und laborchemische Parameter (Mittelwert ± SD) zum Zeitpunkt der Biopsie in Abhängigkeit vom Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus bei Patienten mit IgA Nephropathie.

Progression

Das AT₁R-C Allel kam vermehrt in der Gruppe A (slow progressors) vor (p<0.05, Tab. 11). Es schien also mit einer besseren Prognose assoziiert zu sein. Die Progressionsrate (anhand der 1/Cr Steigung) wurde allerdings nicht vom AT₁R-A1166C Polymorphismus beeinflusst (1/Cr Steigung beim AA-Genotyp: -0.133 ± 0.15, AC: -0.111 ± 0.13, CC: -0.123 ± 0.12 dl * mg⁻¹ * Jahr⁻¹, ns). Die Analyse nach Kaplan Meier des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit und ohne das AT₁R-C Allel. (ns, Abb. 32).

Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen Polymorphismus							
	AA	AC	CC	$\chi^2=7.3$ p<0.05	A-Allel	C-Allel	$\chi^2=6.5$ p<0.05
Gruppe A (slow)	33.3 %	53.3 %	13.3 %			0.60	
Gruppe B (fast)	62.3 %	29.9 %	7.8 %		0.77	0.23	

Tabelle 11: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus in der Gruppe A (slow progressors, n= 37) und der Gruppe B (fast progressors n= 70) bei Patienten mit IgA Nephropathie.

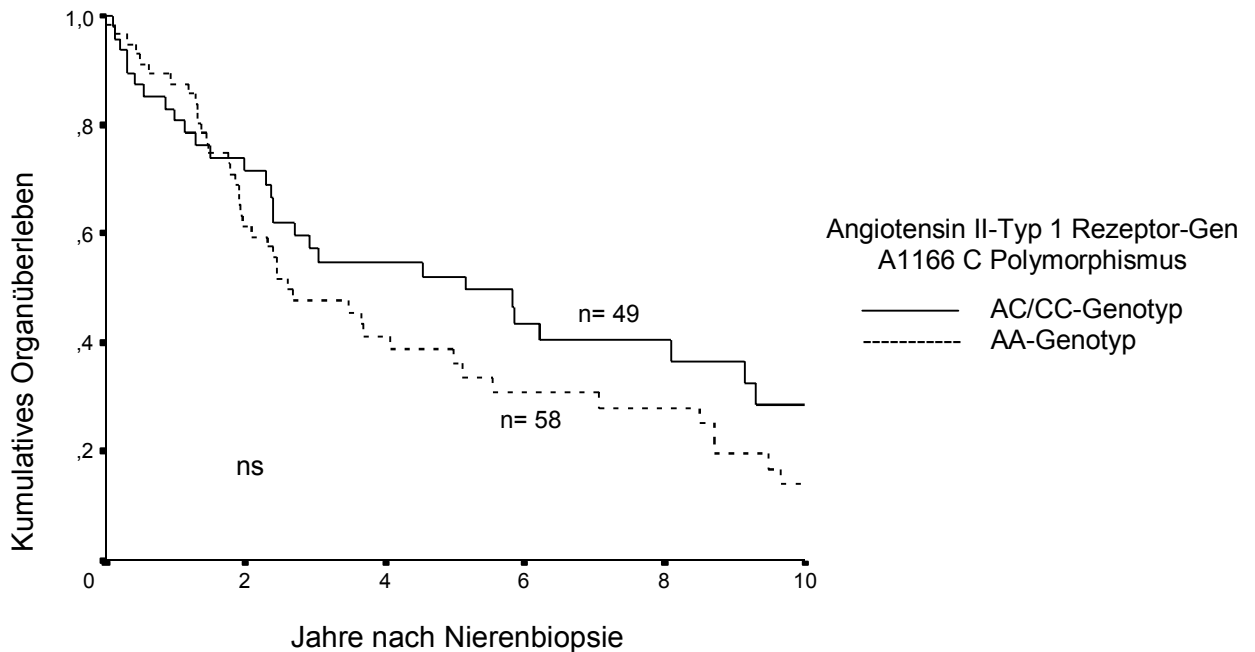


Abbildung 32: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier bei n= 107 Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit vom Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus

Ansprechen auf die Therapie mit ACE-Hemmern

Ein Einfluss des AT₁R-A1166C Polymorphismus auf die Effektivität der ACE-Hemmung war nicht nachweisbar. Keiner der AT₁R-A1166C-Genotypen zeigte eine signifikante Reduktion der Proteinurie, eine signifikante Progressionsverlangsamung oder ein signifikant besseres Organüberleben durch die ACE-Hemmung im Vergleich zu den anderen Genotypen (ns).

3.2.6 Kombinierte Analyse des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAS auf die IgA Nephropathie

Progression

In der kombinierten Analyse der ACE-I/D und AGT-M235T Polymorphismen wurde ein synergistischer Effekt bezüglich ihrer Auswirkung auf die Progression der IgA Nephropathie festgestellt. Der AGT-M235T Polymorphismus beeinflusste die Progression der Erkrankung nur beim Vorhandensein mindestens eines ACE-D Allels (Tab. 12, Abb. 33).

		Angiotensinogen-Gen Polymorphismus			Signifikanz
		MM	MT	TT	
ACE-Gen	II	0.058 ± 0.04	0.117 ± 0.09	0.059 ± 0.08	ns
Polymorphismus	ID/DD	0.059 ± 0.06	0.130 ± 1.36	1.755 ± 0.19	p<0.05 †

Tabelle 12: Progression anhand der Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (Mittelwert ± SD in dl · mg⁻¹ · Jahr⁻¹) bei n= 107 Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit von den ACE-Gen I/D und Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismen. (†) Kruskal Wallis H-Test

Weiterhin war die Progression der IgA Nephropathie mit der Anzahl der vorhandenen ACE-D und AGT-T Allele assoziiert. Mit zunehmender Anzahl der ACE-D und AGT-T Allele fiel der Anteil der Patienten mit einer langsamen Progression (Gruppe A) ab und der Anteil der Patienten mit schneller Progression (Gruppe B) stieg an ($\chi^2=6.8$, p<0.05, Abb. 34).

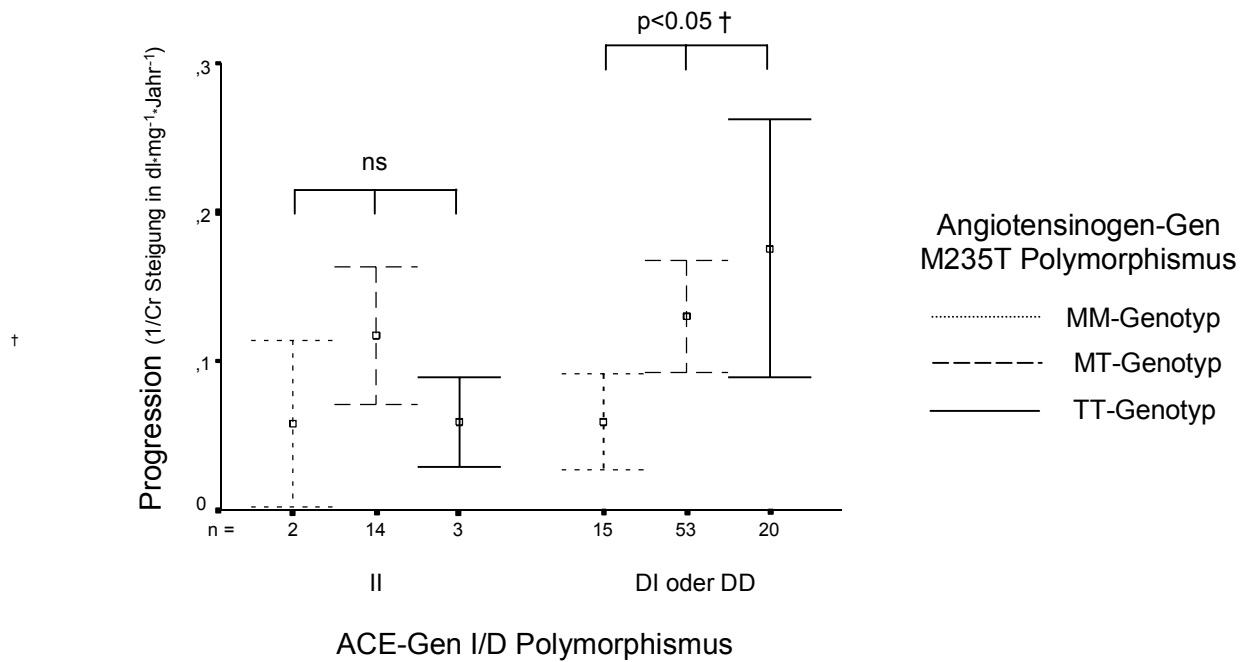


Abbildung 33: Progression abgelesen an der Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (Mittelwert ± SE in dl·mg⁻¹·Jahr⁻¹) bei n= 107 Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit von den ACE-Gen I/D und Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismen. (†) Kruskal Wallis H-Test

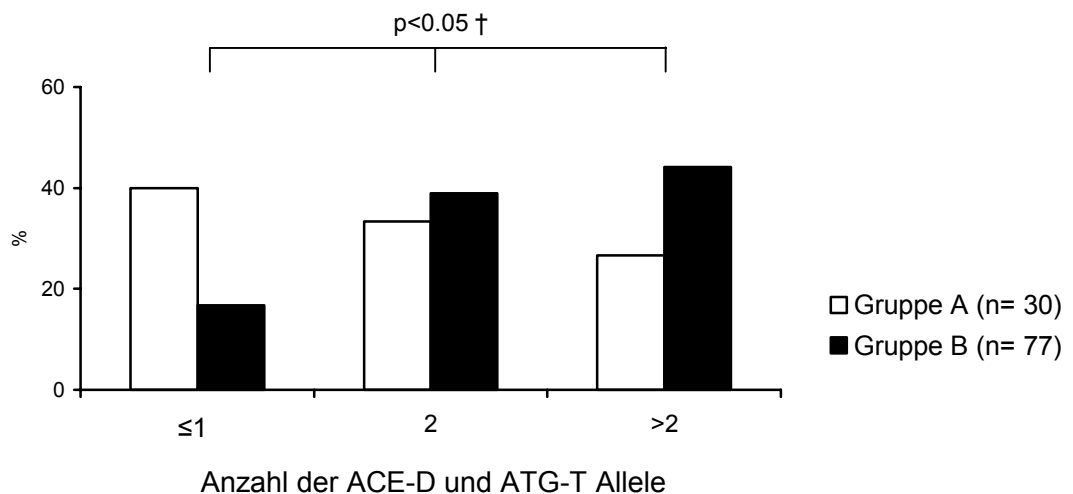


Abbildung 34: Kombinierte Darstellung der Anzahl der ACE-D und AGT-T Allele in der Gruppe A (slow progressors) und der Gruppe B (fast progressors) bei n= 107 Patienten mit IgA Nephropathie. (†) Chi Quadrat Test

Ansprechen auf die Therapie mit ACE-Hemmern

Die kombinierte Analyse zeigte einen synergistischen Effekt der ACE-I/D und AGT-M235T Polymorphismen auf die Effektivität der ACE-Hemmung. Der Nutzen von der Therapie mit ACE-Hemmern nahm mit der Anzahl der vorhandenen ACE-D und AGT-T Allele proportional zu. Das traf sowohl für die Reduktion der Proteinurie (Abb. 35 und 36) als auch für die erzielte Progressionsverlangsamung (Abb. 37) zu.

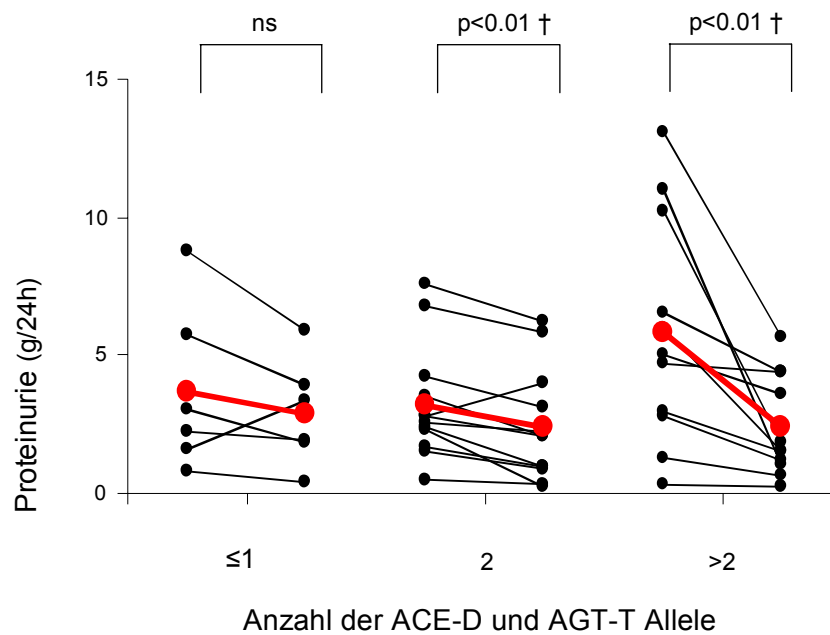


Abbildung 35: Proteinurie (in g/24h) vor und 3-6 Monate nach Therapiebeginn mit ACE-Hemmern bei n= 29 Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit von der Anzahl der ACE-D und AGT-T Allele. (†) Student's t-Test für gepaarte Stichproben

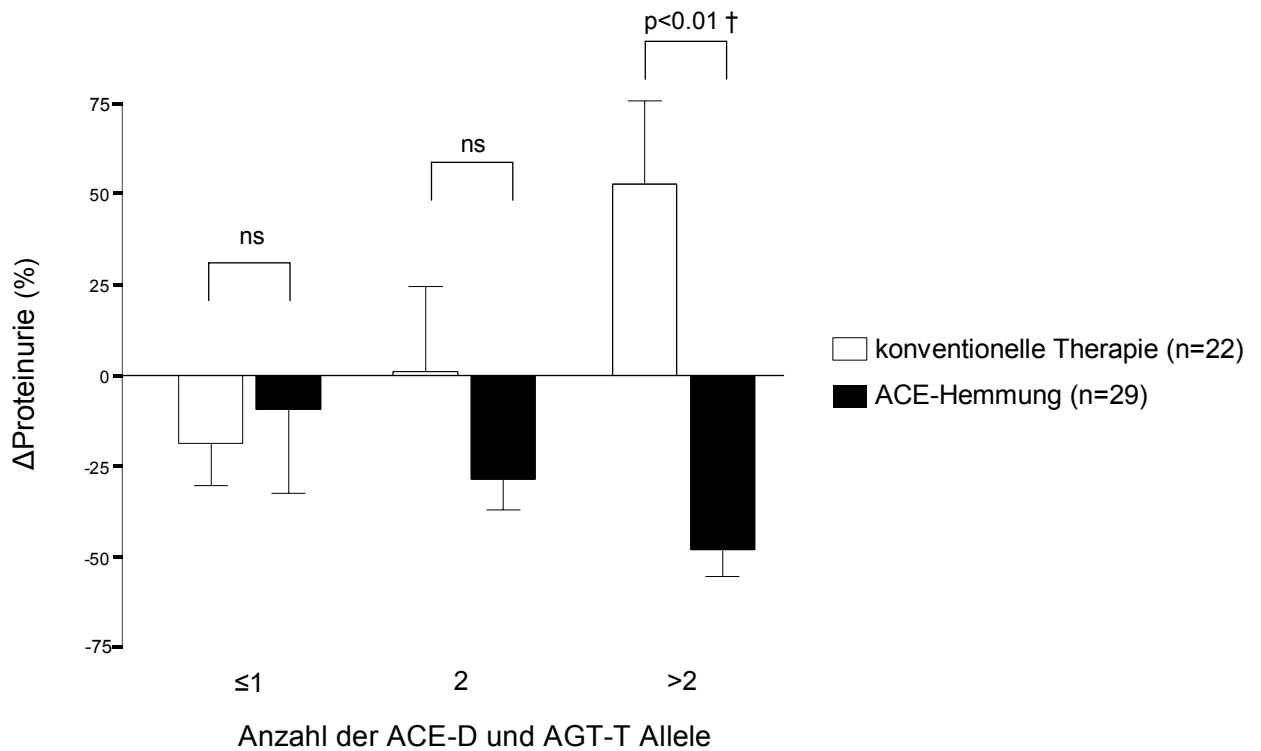


Abbildung 36: Prozentuale Änderung der Proteinurie (Mittelwert \pm SE) 3-6 Monate nach Nierenbiopsie bzw. nach Therapiebeginn mit ACE-Hemmern bei n= 51 Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit von der Behandlung mit ACE-Hemmern und der Anzahl der ACE-Gen D- und Angiotensinogen-Gen T-Allele. (†) Student's t-Test für ungepaarte Stichproben

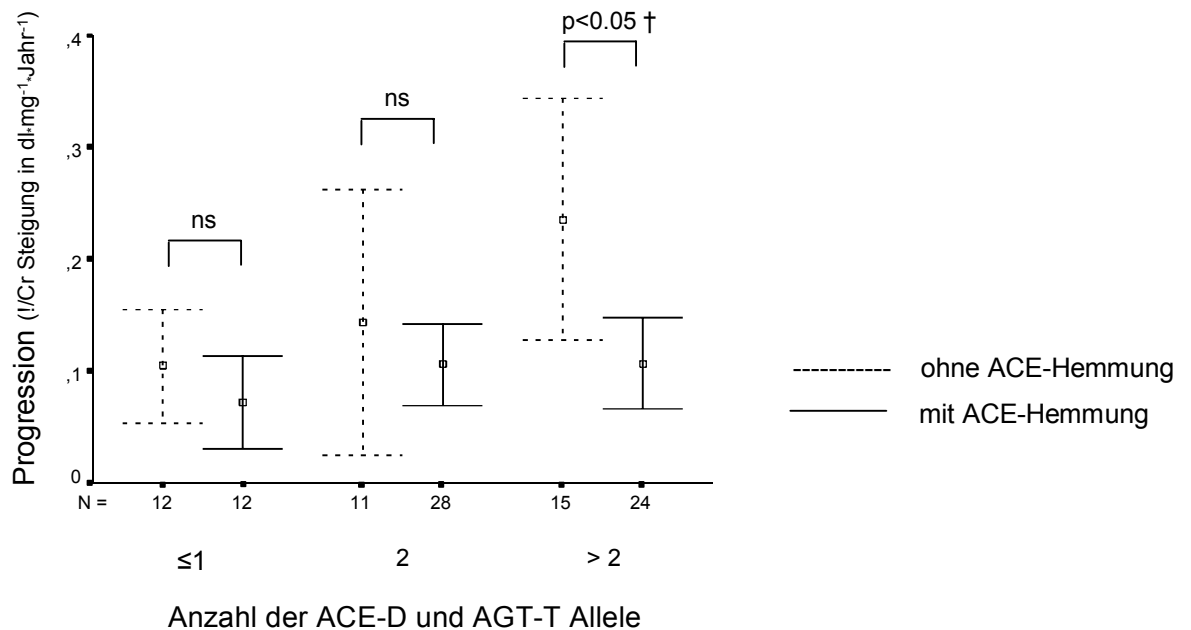


Abbildung 37: Progression abgelesen an der Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (Mittelwert \pm SE in $\text{dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$) bei n= 102 Patienten mit IgA Nephropathie in Abhängigkeit von der Anzahl der ACE-Gen D- und Angiotensinogen-Gen T-Allele und der Behandlung mit ACE-Hemmern. (†) Mann Whitney U-Test

3.2.7 Zusammenfassung des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAS auf die IgA Nephropathie

Der Einfluss der Polymorphismen des RAS auf die Manifestation der IgA Nephropathie wird zusammenfassend in der Tabelle 13 dargestellt. Das T-Allel des AGT-M235T Polymorphismus war mit einer stärker ausgeprägten arteriellen Hypertonie assoziiert. Ein nephrotisches Syndrom lag signifikant häufiger unter den Patienten mit mindestens einem AGT-T Allel vor. Bei den MT- und TT-Genotypen des AGT-M235T Polymorphismus wurde eine schnellere Progression festgestellt. Das ACE-D Allel war auch mit einer schlechteren Prognose assoziiert, allerdings nur in der nicht mit ACE-Hemmern behandelten Subgruppe. Die nephroprotektive Wirkung der Therapie mit ACE-Hemmern war nur bei bestimmten Genotypen der ACE-I/D bzw. AGT-M235T Polymorphismen nachweisbar. Die kombinierte Analyse der ACE-I/D und AGT-M235T Polymorphismen zeigte einen synergistischen Einfluss auf die Progression der IgA Nephropathie und die Effektivität der ACE-Hemmung. Das AT₁R-C Allel war weder mit der arteriellen Hypertonie noch mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

	ACE-I/D	AGT-M235T	ACE I/D + AGT-M235T(†)	AT₁R-A1166C
Nephrotisches Syndrom	–	+	–	–
Hypertonie	–	+	–	–
Progression	+(‡)	+	+	–
Ansprechen auf die ACE-Hemmung	+	+	+	–

Tabelle 13: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAS auf die klinischen Parameter der IgA Nephropathie. (†) kombinierte Analyse der ACE-Gen I/D und Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismen (‡) signifikant nur in der nicht mit ACE-Hemmern (bzw. AT₁R-Antagonisten) therapierten Subgruppe

3.3 Fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis

3.3.1 Patientenbeschreibung

Untersucht wurden n= 62 Patienten (32 Männer und 30 Frauen) mit bioptisch gesicherter fokaler und segmentaler sklerosierender Glomerulonephritis (FSGN), die im Zeitraum von 1978 bis 2001 in der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf nierenbiopsiert wurden und/oder in Behandlung waren. Die Patienten wurden durchschnittlich über 5.9 ± 4.3 Jahre betrachtet (Zeitspanne: 1-17 Jahre) und 24.9 ± 18 Serumkreatininwerte wurden pro Patient bestimmt. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der ersten Nierenbiopsie betrug 42.8 ± 17.1 Jahre. Ein jüngeres Alter bei Nierenbiopsie war mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Alter der Patienten, die im Laufe der Betrachtung einen Organverlust erlitten (n= 28): 35.0 ± 16 vs. 49.3 ± 16 Jahre bei Patienten mit einer erhaltenen Nierenfunktion, $p < 0.001$).

Nierenfunktion und Proteinurie zum Zeitpunkt der Biopsie

Bei Diagnosestellung hatten die Patienten ein mittleres Serumkreatinin von 1.4 ± 0.6 mg/dl, eine ECC von 92.2 ± 34 ml/min/1.73m² und eine Proteinurie von 11.7 ± 10.3 g/24h. Diese Parameter beeinflussten die Progression der Erkrankung nicht (Korrelation mit der 1/Cr Steigung: ns).

Arterielle Hypertonie

Bei n= 45 (72.6%) Patienten bestand zum Zeitpunkt der Biopsie eine arterielle Hypertonie. Der mittlere arterielle Blutdruck betrug 108.7 ± 11 mmHg. Er war mit 111.7 ± 10 signifikant höher unter den Patienten (n= 28), die einen Organverlust erlitten, im Vergleich zu 106.2 ± 10 mmHg bei Patienten mit einer erhaltenen Nierenfunktion ($p < 0.05$). Die Patienten wurden im Durchschnitt mit 1.8 ± 1.1 Antihypertensiva behandelt. Patienten mit keiner oder mit milder Hypertonie zeigten eine langsamere Progression [1/Cr Steigung bei Patienten (n= 27), die mit weniger als zwei Antihypertensiva therapiert wurden: 0.057 ± 0.11 vs. -0.215 ± 0.39 dl * mg⁻¹ * Jahr⁻¹ bei Patienten, die mit zwei oder mehr Antihypertensiva behandelt wurden, $p < 0.05$].

3.3.2 Progression der fokalen und segmentalen sklerosierenden Glomerulonephritis

Zum Zeitpunkt der Genotypisierung hatten n= 41 Patienten (66%) eine erhaltene primäre Nierenfunktion, während n= 21 (34%) eine terminale Niereninsuffizienz erreicht hatten. Vierzehn Patienten wurden hämodialysiert, zwei mit der Peritonealdialyse behandelt und fünf

Patienten waren nierentransplantiert. Die mittlere Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (als Maß der Progression, siehe 2.5) betrug $-0.146 \pm 0.31 \text{ dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$ (entspricht einer Erhöhung des Serumkreatinins von 1.0 auf 2.5 mg/dl innerhalb von vier Jahren). Drei Jahre nach Nierenbiopsie hatten 24% (13 der 51 so lange betrachteten Patienten) einen Organverlust erlitten (Abb. 38).

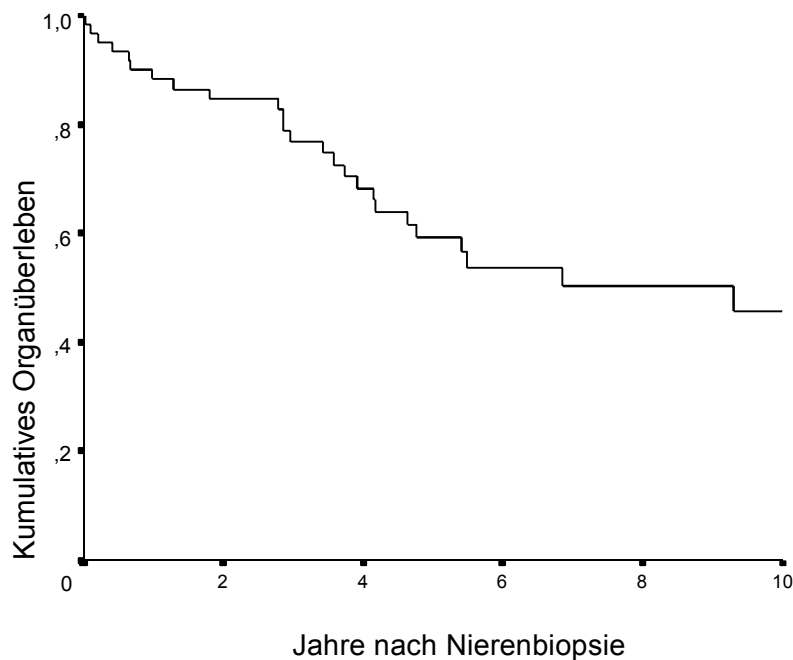


Abbildung 38: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier bei n= 62 Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis.

Einfluss der Therapie mit ACE-Hemmern auf die Progression

Unter Patienten mit FSGN war in unserem Kollektiv kein signifikanter Vorteil von der Therapie mit ACE-Hemmern nachweisbar. Das Organüberleben zehn Jahre nach Nierenbiopsie und die Progression (anhand der $1/\text{Cr}$ Steigung) waren vergleichbar zwischen behandelten und unbehandelten Patienten (ns, Abb. 39). Von dieser Auswertung wurden n= 2 Patienten ausgeschlossen, die mit AT_1R -Antagonisten therapiert wurden.

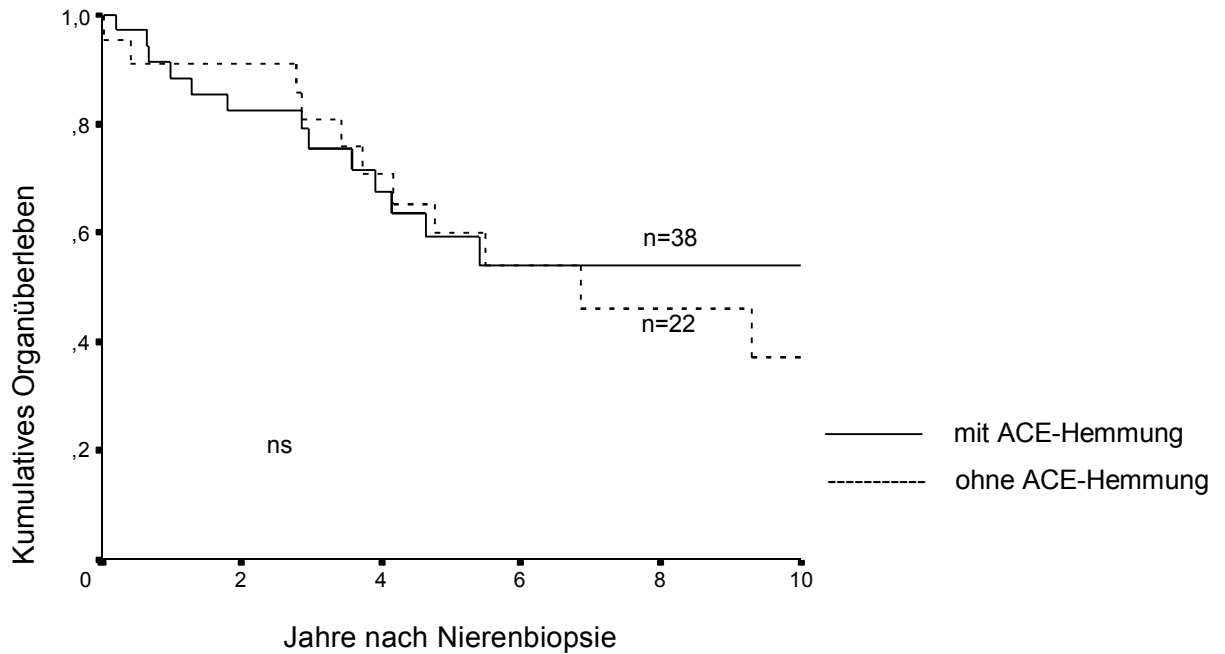


Abbildung 39: Kaplan Meier Analyse des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie bei n= 60 Patienten mit fokal und segmental sklerosierender Glomerulonephritis in Abhängigkeit von der Therapie mit ACE-Hemmern.

Gruppeneinteilung anhand der Progression der Erkrankung

Anhand der Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (\geq oder $< 0.1 \text{ dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$) wurden Gruppe A mit langsamer und Gruppe B mit schneller Progression unterschieden. Die Gruppe A (slow progressors) bestand aus n= 41 und die Gruppe B (fast progressors) aus n= 21 Patienten (Abb. 40a und b). Zum Zeitpunkt der Biopsie waren die Patienten der Gruppe A und B vergleichbar bezüglich aller untersuchten Parameter bis auf das Auftretsalter: die Patienten der Gruppe B waren signifikant jünger ($p < 0.05$, Tab. 14). Im Laufe der Betrachtung wurden n= 15 (71.4%) Patienten aus der Gruppe B und nur n= 6 (14.6%) aus der Gruppe A terminal niereninsuffizient ($\chi^2 = 20.0$, $p < 0.001$). Die Kaplan Meier Analyse des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie erbrachte ein hoch signifikant besseres Ergebnis in der Gruppe A im Vergleich zur Gruppe B ($p < 0.001$).

	Gruppe A slow progressors	Gruppe B fast progressors	Signifikanz
Anzahl (n)	41	21	
Alter (Jahre)	46.2 ± 17	36.4 ± 17	p<0.05 †
Kreatinin (mg/dl)	1.4 ± 0.5	1.5 ± 0.8	ns
ECC (ml/min/1.73m ²)	90.4 ± 32	96.5 ± 37	ns
Proteinurie (g/24h)	12.1 ± 10	10.7 ± 11	ns
Art. Hypertonie (%)	73.2%	71.4%	ns
MAP (mmHg)	108.5 ± 9	109.1 ± 14	ns
Antihypertensiva (n)	1.7 ± 1.1	2.1 ± 1.2	ns
ESRD (%)	14.6%	71.4%	p<0.001 ‡

Tabelle 14: Vergleich der untersuchten Parameter (Mittelwert ± SD) in Gruppe A (slow progressors) und Gruppe B (fast progressors) bei Patienten mit fokal und segmental sklerosierender Glomerulonephritis. (†) Student's t-Test (‡) Chi Quadrat Test

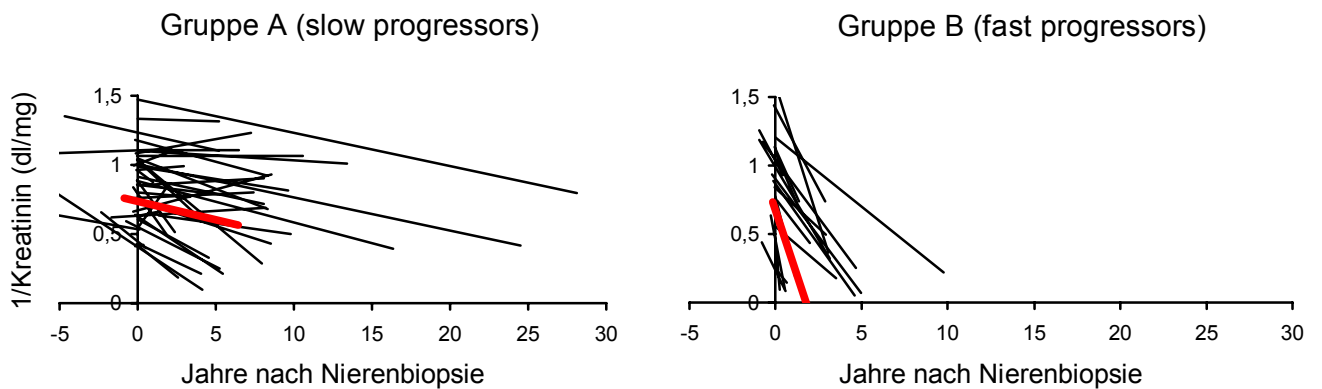


Abbildung.: 40a und b : Kurven des reziproken Serumkreatinins (dl/mg) pro Zeit jeweils in der Gruppe A (n= 41) und Gruppe B (n= 21) bei Patienten mit fokal und segmental sklerosierender Glomerulonephritis.

3.3.3 Einfluss des Angiotensin I-Converting Enzym-Gen I/D Polymorphismus auf die fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis

Prävalenz

Bei der Genotypverteilung des ACE-Gen I/D Polymorphismus in der Kontroll- und Patientengruppe wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Das I-Allel kam signifikant häufiger unter den Patienten als unter den gesunden Probanden vor (Tab. 15). Die beobachteten Genotyphäufigkeiten waren vergleichbar mit den erwarteten im Rahmen des Hardy Weinberg Gleichgewichts.

ACE-Gen I/D Polymorphismus							
	II	ID	DD	ns	I-Allel	D-Allel	$\chi^2=4.3$ p<0.05
Patienten	27.4 %	56.5 %	16.1 %		0.56	0.44	
Probanden	18.3 %	51.7 %	30.0 %		0.44	0.56	

Tabelle 15: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des ACE-Gen I/D Polymorphismus bei n= 62 Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis und n= 120 Kontrollpersonen.

Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie

Der ACE-Gen I/D Polymorphismus war nicht mit dem Auftretsalter, der Nierenfunktion, der Proteinurie oder der arteriellen Hypertonie zum Zeitpunkt der Biopsie assoziiert (Tab. 16).

	ACE-Gen I/D Polymorphismus			Signifikanz
	II	ID	DD	
Alter (Jahre)	48.9 ± 17	39.4 ± 17	45.9 ± 16	ns
Kreatinin (mg/dl)	1.4 ± 0.6	1.4 ± 0.7	1.3 ± 0.6	ns
ECC (ml/min/1.73m ²)	97.5 ± 33	92.2 ± 35	90.0 ± 33	ns
Proteinurie (g/24h)	11.7 ± 9.9	13.0 ± 11.5	7.5 ± 5.3	ns
MAP (mmHg)	112.9 ± 10	107.2 ± 10	106.7 ± 14	ns
Antihypertensiva (n)	1.9 ± 1.0	1.7 ± 1.1	2.1 ± 1.2	ns

Tabelle 16: Klinische und laborchemische Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie (Mittelwert ± SD) in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D Polymorphismus bei Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis.

Progression

Die Progression der FSGN wurde vom ACE-Gen I/D Polymorphismus beeinflusst, wie aus der Genotypverteilung und den Allelfrequenzen in der Gruppe A (slow progressors) und der Gruppe B (fast progressors) hervorgeht (Tab. 17).

ACE-Gen I/D Polymorphismus							
	II	ID	DD	$\chi^2=5.0$ $p=0.08$	I-Allel	D-Allel	$\chi^2=4.2$ $p<0.05$
Gruppe A (slow)	34.1 %	56.1 %	9.8 %		0.62	0.38	
Gruppe B (fast)	14.3 %	57.1 %	28.6 %		0.43	0.57	

Tabelle 17: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des ACE-Gen I/D Polymorphismus in der Gruppe A (slow progressors, n= 41) und der Gruppe B (fast progressors n= 21) bei Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis.

Eine signifikante Korrelation zur Progression anhand der absoluten Werten der 1/Cr Steigung bestand jedoch nicht (II-Genotyp: 0.112 ± 0.17 , ID: 0.127 ± 0.30 , DD: 0.270 ± 0.49 dl * mg⁻¹* Jahr⁻¹, ns). In der Kaplan Meier Analyse des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie war kein Unterschied zwischen Patienten mit und ohne ein D-Allel nachweisbar (ns, Abb. 41).

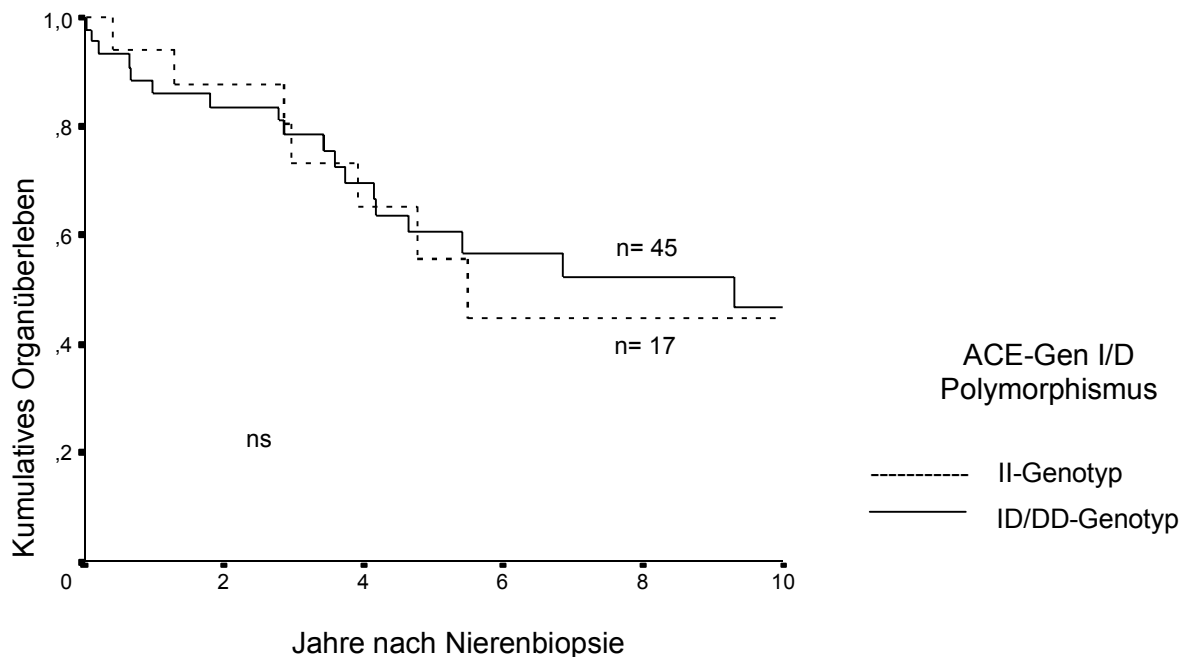


Abbildung 41: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D Polymorphismus bei n= 62 Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis.

Ansprechen auf die Therapie mit ACE-Hemmern

Eine renoprotektive Wirkung der ACE-Hemmung (Progressionsverlangsamung oder besseres Organüberleben) wurde bei keinem der ACE-I/D Genotypen festgestellt (ns).

3.3.4 Einfluss des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus auf die fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis

Prävalenz

Der Vergleich der Genotypverteilung und der Allelfrequenzen des AGT-M235T Polymorphismus in der Patienten- und der Kontrollgruppe zeigte keine Signifikanz (Tab. 18). Die Genotyphäufigkeiten entsprachen dem Hardy Weinberg Gleichgewicht.

Angiotensinogen-Gen M234T Polymorphismus							
	MM	MT	TT	ns	M-Allel	T-Allel	ns
Patienten	29.0 %	51.6 %	19.4 %		0.55	0.45	
Probanden	30.8 %	50.8 %	18.4 %		0.56	0.44	

Tabelle 18: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei n= 62 Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis und n= 120 Kontrollpersonen.

Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie

Alter, Nierenfunktion und Proteinurie zum Zeitpunkt der Biopsie waren vergleichbar unter Patienten mit verschiedenen AGT-M235T Genotypen (Tab. 19).

	Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus			Signifikanz
	MM	MT	TT	
Alter (Jahre)	42.5 ± 17	43.9 ± 18	40.6 ± 15	ns
Kreatinin (mg/dl)	1.4 ± 0.6	1.3 ± 0.5	1.7 ± 0.9	ns
ECC (ml/min/1.73m ²)	90.4 ± 33	93.8 ± 36	90.4 ± 36	ns
Proteinurie (g/24h)	11.0 ± 8.7	12.4 ± 10.9	10.5 ± 11.8	ns

Tabelle 19: Klinische und laborchemische Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie (Mittelwert ± SD) in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis.

Arterielle Hypertonie

Der AGT-M235T Polymorphismus war sowohl mit den absoluten arteriellen Blutdruckwerten (MM: 104.2 ± 11 , MT/TT: 110.5 ± 10 mmHg, $p < 0.05$, Abb. 42) als auch mit der Anzahl der verordneten Antihypertensiva assoziiert (MM: 1.39 ± 1.0 , MT/TT: 2.02 ± 1.1 , $p < 0.05$, Abb. 43).

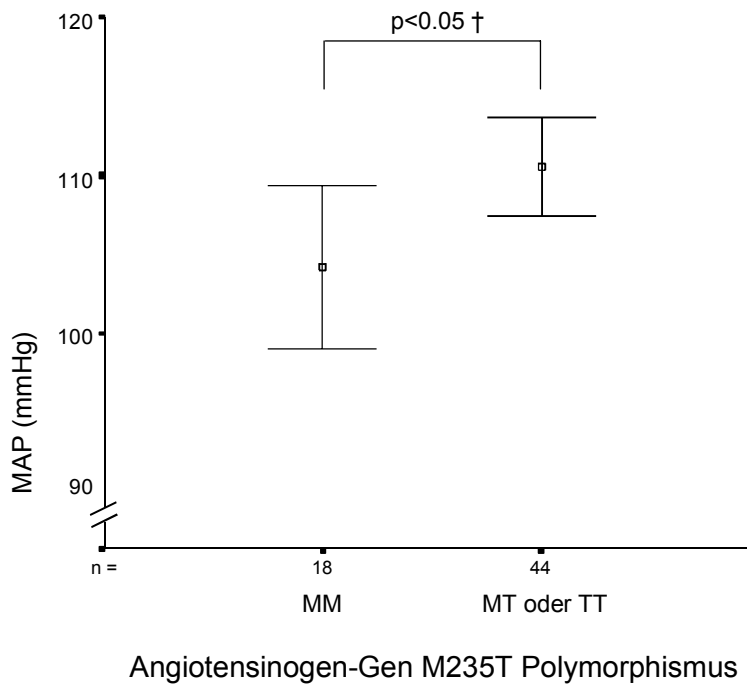


Abbildung 42: Mittlerer arterieller Blutdruck (Mittelwert \pm SE) in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei $n = 62$ Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis. (†) Student's t-Test

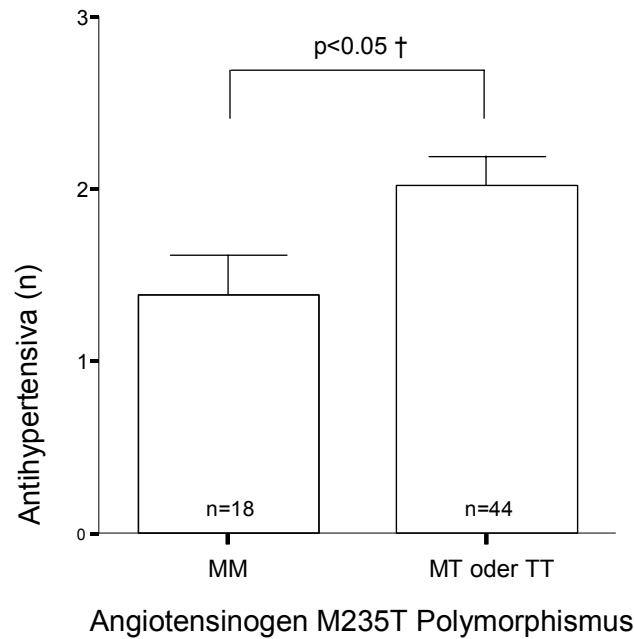


Abbildung 43: Anzahl der eingenommenen Antihypertensiva (Mittelwert \pm SE) in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei $n = 62$ Patienten mit fokaler und segmentaler sklerosierender Glomerulonephritis. (†) Mann-Whitney U-Test

Progression

Der AGT-M235T Polymorphismus war nicht mit der Progression der FSGN assoziiert. Die Genotypverteilung und die Allelfrequenzen unterschieden sich nicht signifikant zwischen Gruppe A und Gruppe B (ns, Tab. 20). Auf die Progressionsrate anhand der $1/Cr$ Steigung war kein signifikanter Einfluss nachweisbar (MM: -0.140 ± 0.19 , MT: -0.132 ± 0.31 , TT: -0.192 ± 0.46 $dl \cdot mg^{-1} \cdot Jahr^{-1}$, ns). Ebenfalls nicht signifikant war die Analyse nach Kaplan-Meier des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie (ns, Abb. 44).

Angiotensinogen-Gen M234T Polymorphismus							
	MM	MT	TT		M-Allel	T-Allel	
Gruppe A (slow)	24.4 %	56.1 %	19.5 %	ns	0.52	0.48	ns
Gruppe B (fast)	38.1 %	42.9 %	19.0 %		0.60	0.40	

Tabelle 20: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus in der Gruppe A (slow progressors, $n = 41$) und der Gruppe B (fast progressors $n = 21$) bei Patienten mit fokaler und segmentaler sklerosierender Glomerulonephritis.

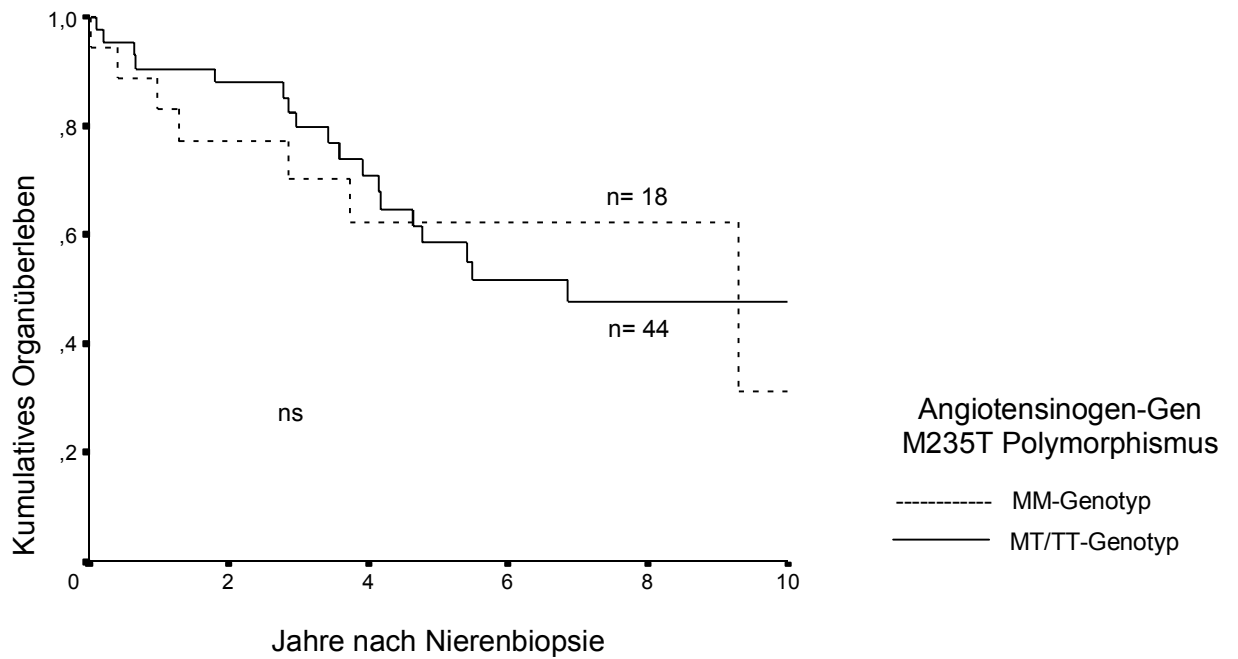


Abbildung 44: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei n= 62 Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis

Ansprechen auf die Therapie mit ACE-Hemmern

Ein Vorteil von der Therapie mit ACE-Hemmern konnte anhand der Progressionsrate (1/Cr Steigung) und der Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier bei keinem der AGT-M235T Genotypen nachgewiesen werden (ns).

3.3.5 Einfluss des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus auf die fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis

Prävalenz

Die Genotypverteilung und die Allelfrequenzen des AT₁R-A1166C Polymorphismus waren ähnlich in der Patienten- und Kontrollgruppe (Tab. 21). Die Genotyphäufigkeiten erfüllten das Hardy Weinberg Gleichgewicht. Wegen der kleinen Fallzahl der Patienten mit CC-Genotyp (n= 4) wurden die AC- und CC-Genotypen zusammen ausgewertet.

Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus							
	AA	AC	CC	ns	A-Allel	C-Allel	ns
Patienten	58.1 %	35.5 %	6.5 %		0.76	0.24	
Probanden	57.1 %	37.5 %	10.8 %		0.70	0.30	

Tabelle 21: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus bei n= 62 Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis und n= 120 Kontrollpersonen.

Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie

Die Patienten mit dem AA-Genotyp waren tendenziell jünger bei Diagnosestellung im Vergleich zu den Patienten mit den AC/CC-Genotypen ($p=0.055$). Ein Einfluss des AT₁R-A1166C Polymorphismus auf die übrigen klinischen und laborchemischen Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie war nicht nachweisbar (Tab. 22).

	Angiotensin II-Typ1 Rezeptor-Gen Polymorphismus		Signifikanz
	AA	AC/CC	
Alter (Jahre)	39.3 ± 15	47.7 ± 18	$p=0.055$ (†)
Kreatinin (mg/dl)	1.4 ± 0.7	1.4 ± 0.6	ns
ECC (ml/min/1.73m ²)	89.1 ± 32	96.5 ± 36	ns
Proteinurie (g/24h)	13.2 ± 11.9	9.3 ± 6.9	ns
MAP (mmHg)	108.9 ± 11	108.3 ± 11	ns
Antihypertensiva (n)	1.8 ± 1.0	1.9 ± 1.2	ns

Tabelle 22: Klinische und laborchemische Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie (Mittelwert ± SD) in Abhängigkeit vom Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus bei Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis. (†) Student's t-Test

Progression

Der AT₁R-A1166C Polymorphismus beeinflusste die Progression der FSGN nicht. Die Genotypverteilung und die Allelfrequenzen waren vergleichbar in der Gruppe A und der Gruppe B (ns, Tab. 23). Die Progression abgelesen an der 1/Cr Steigung war nicht mit dem AT₁R-A1166C Genotyp assoziiert (AA: -0.140 ± 0.30 , AC/CC: $-0.154 \pm 0.33 \text{ dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$, ns). Die Kaplan Meier Analyse des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie zeigte kein signifikantes Ergebnis (ns, Abb. 45).

Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus						
	AA	AC/CC	ns	A-Allel	C-Allel	ns
Gruppe A (slow)	56.1 %	43.9 %		0.77	0.23	
Gruppe B (fast)	61.9 %	38.1 %		0.74	0.26	

Tabelle 23: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus in der Gruppe A (slow progressors, n= 41) und der Gruppe B (fast progressors n= 21) bei Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis.

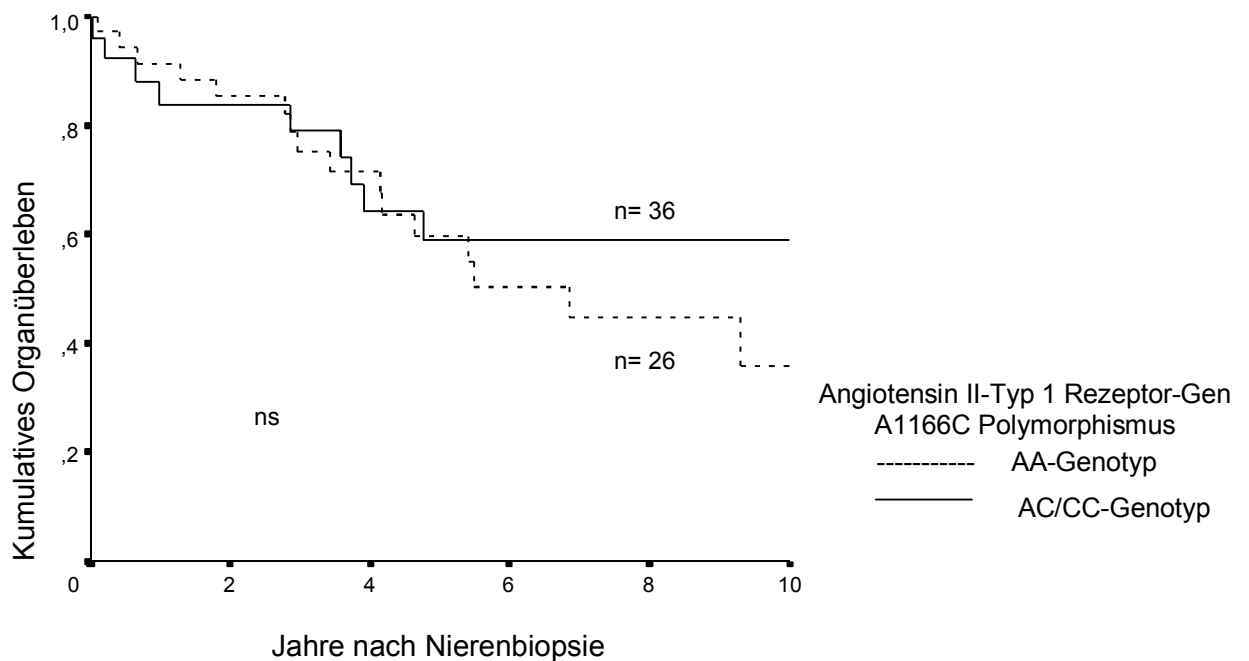


Abbildung 45: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit vom Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus bei n= 62 Patienten mit fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis.

Ansprechen auf die Therapie mit ACE-Hemmern

Bei keinem der AT₁R-A1166C Genotypen hatte eine Behandlung mit ACE-Hemmern eine signifikante Progressionsverlangsamung oder ein besseres Organüberleben zur Folge (ns).

3.3.6 Kombinierte Analyse des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAS auf die fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis

Progression

In der kombinierten Analyse der ACE-I/D und AGT-M235T Polymorphismen wiesen die Patienten mit drei oder vier ACE-D oder AGT-T Allelen eine relativ schnellere Progression auf, eine Signifikanz bestand jedoch nicht ($1/\text{Cr}$ Steigung bei den DD/TT, ID/TT und DD/MT Genotypen ($n=12$): $-0.225 \pm 0.45 \text{ dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$ vs. -0.127 ± 0.274 bei den restlichen Genotypen, ns). In der Kaplan Meier Analyse wiesen die Patienten mit den DD/TT, ID/TT und DD/MT Genotypen ein tendenziell schlechteres zehnjähriges Organüberleben auf, eine Signifikanz wurde wieder nicht erreicht ($p=0.106$, Abb. 46).

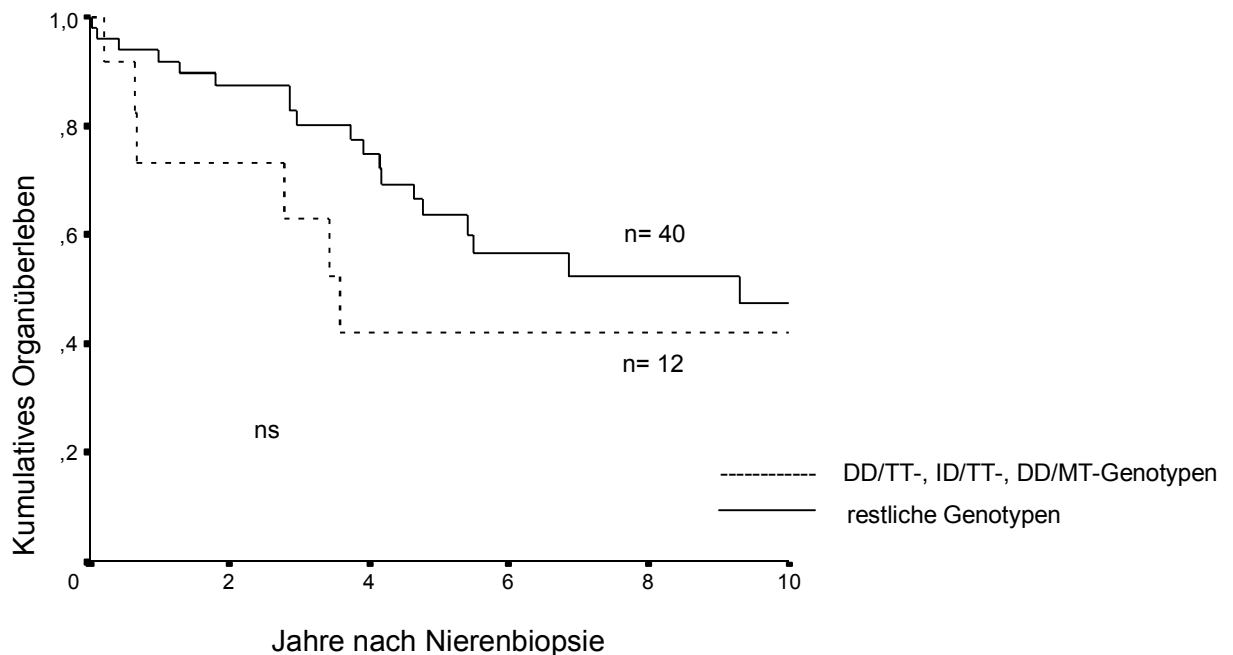


Abbildung 46: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D und dem Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei $n=62$ Patienten mit fokaler und segmentaler sklerosierender Glomerulonephritis.

3.3.7 Zusammenfassung des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAS auf die fokale und segmentale sklerosierende Glomerulonephritis

Das Auftretsalter und die Proteinurie (als Maß des Schweregrades des nephrotischen Syndroms) war mit keinem der Polymorphismen assoziiert (Tab. 24). Bei Patienten mit dem T-Allel des Angiotensinogen-Gen Polymorphismus war eine arterielle Hypertonie deutlicher ausgeprägt. Die Progression der FSGN wurde vom ACE-I/D Polymorphismus beeinflusst. Eine renoprotektive Wirkung der ACE-Hemmung war weder im gesamten Kollektiv noch in einer genetisch determinierten Subgruppe der Patienten mit FSGN nachweisbar.

	ACE-I/D	AGT-M235T	ACE I/D + AGT-M235T(†)	AT₁R-A1166C
Proteinurie	–	–	–	–
Hypertonie	–	+	–	–
Progression	+	–	–	–
Ansprechen auf die ACE-Hemmung	–	–	–	–

Tabelle 24: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAS auf die klinischen Parameter der fokalen und segmentalen sklerosierenden Glomerulonephritis. (†) kombinierte Analyse der ACE-Gen I/D und Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismen

3.4 Membranöse Glomerulonephritis

3.4.1 Patientenbeschreibung

In die Studie wurden n= 44 Patienten (26 Männer und 18 Frauen) mit einer bioptisch gesicherten membranösen Glomerulonephritis eingeschlossen, die im Zeitraum von 1974 bis 2001 in der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf nierenbiopsiert und/oder behandelt wurden. Im Durchschnitt wurden pro Patient 28.2 ± 24 Serumkreatininwerte über den Zeitraum von 5.9 ± 4.7 (1-22) Jahren bestimmt. Das mittlere Alter zum Zeitpunkt der ersten Nierenbiopsie lag bei 50.0 ± 16 Jahren und war nicht mit der Progression der Erkrankung assoziiert (Korrelation mit der 1/Cr Steigung: ns).

Nierenfunktion und Proteinurie zum Zeitpunkt der Biopsie

Bei Diagnosestellung betrug das mittlere Serumkreatinin 1.2 ± 0.7 mg/dl, die ECC 90.6 ± 38 ml/min/1.73m² und die Proteinurie 9.7 ± 4.9 g/24h. Ein erhöhtes Serumkreatinin zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie (>1.1 mg/dl) war mit einer tendenziell schlechteren Prognose verknüpft (1/Cr Steigung bei normalem Ausgangsserumkreatinin: -0.056 ± 0.05 vs. -0.151 ± 0.22 dl · mg⁻¹ · Jahr⁻¹ bei erhöhtem Ausgangsserumkreatinin, p=0.09).

Arterielle Hypertonie

Bei 27 (61.4%) der Patienten bestand zum Zeitpunkt der Biopsie eine arterielle Hypertonie. Der mittlere arterielle Blutdruck lag bei 105.5 ± 9 mmHg. Die Patienten wurden im Durchschnitt mit 2.1 ± 1.2 Antihypertensiva therapiert. Weder die absoluten Blutdruckwerte noch die Anzahl der eingenommenen Antihypertensiva beeinflussten die Progression der Erkrankung (Korrelation mit der 1/Cr Steigung: ns).

3.4.2 Progression der membranösen Glomerulonephritis

Zum Zeitpunkt der Genotypisierung hatten n= 33 der Patienten (75%) eine erhaltene primäre Nierenfunktion, während n= 11 (25%) eine terminale Niereninsuffizienz erreicht hatten. Fünf Patienten waren nierentransplantiert, drei wurden mit der Hämodialyse und einer mit der Peritonealdialyse behandelt. Die mittlere Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (als Maß der Progression, siehe 2.5) betrug -0.088 ± 0.14 dl · mg⁻¹ · Jahr⁻¹ (entspricht einer Erhöhung des Serumkreatinins von 1.0 auf 1.5 mg/dl innerhalb von vier Jahren). Drei Jahre nach der Nierenbiopsie hatten 29% der Patienten (9 der 31 so lange betrachteten) einen Organverlust erlitten (Abb. 47).

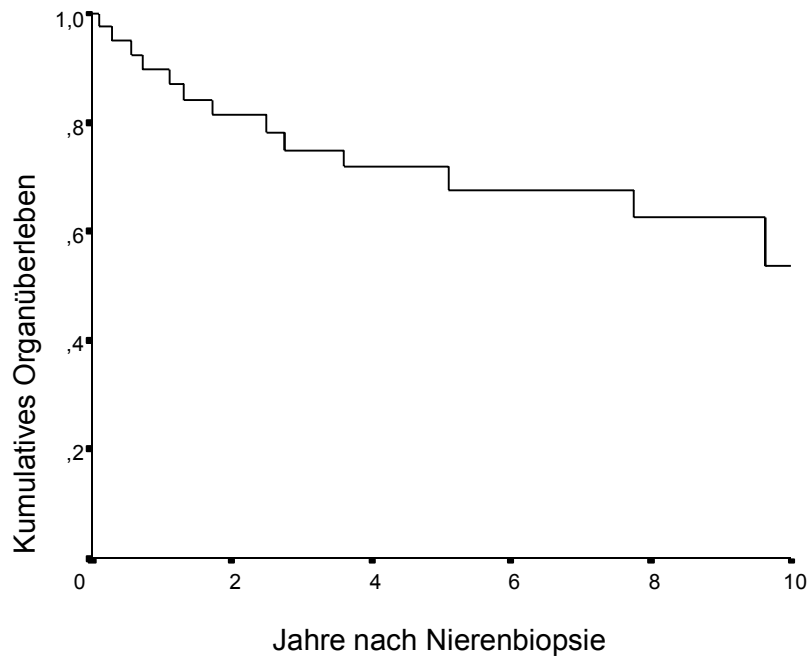


Abbildung 47: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier bei n= 44 Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.

Einfluss der Therapie mit ACE-Hemmern auf die Progression

Unter den Patienten mit membranöser Glomerulonephritis war eine nephroprotektive Wirkung der ACE-Hemmung nicht nachweisbar. Die Therapie mit ACE-Hemmern erbrachte kein signifikant besseres Organüberleben zehn Jahre nach Diagnosestellung (ns, Abb. 48). Eine Progressionsverlangsamung (anhand der $1/\text{Cr}$ Steigung) bei behandelten Patienten wurde ebenfalls nicht festgestellt (ns). Zwei Patienten, die mit AT_1R -Antagonisten therapiert wurden, wurden von dieser Auswertung ausgeschlossen.

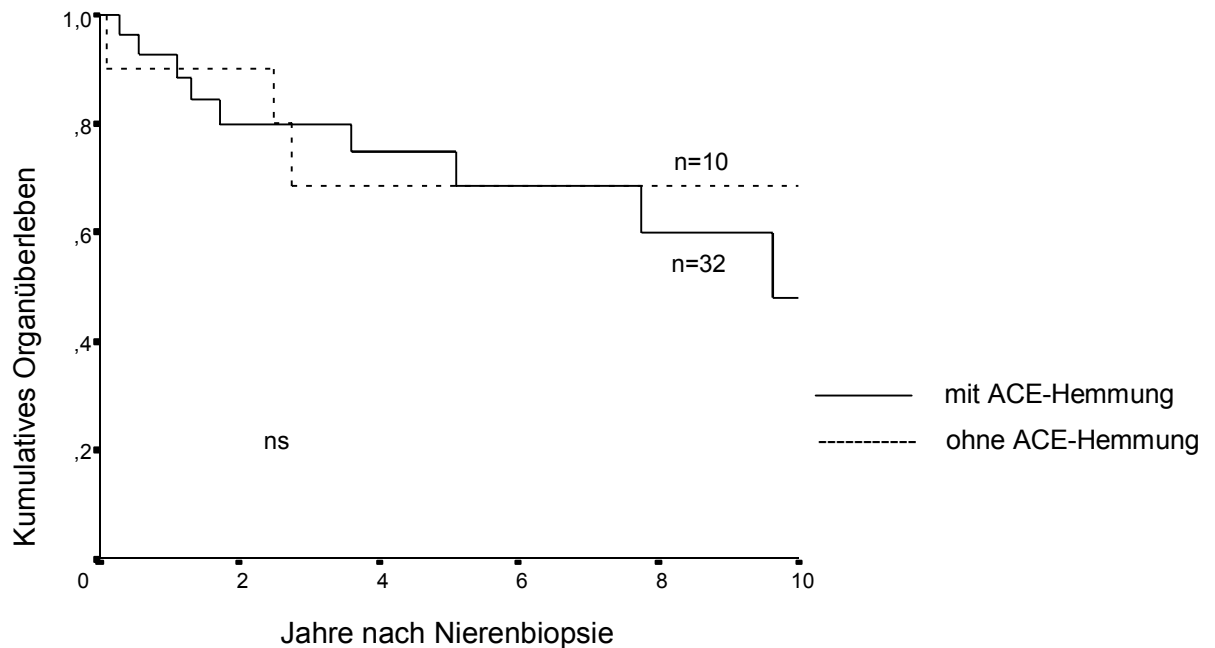


Abbildung 48: Kaplan Meier Analyse des Organüberlebens zehn Jahre nach Nierenbiopsie bei n= 42 Patienten mit membranöser Glomerulonephritis in Abhängigkeit von der Therapie mit ACE-Hemmern.

Gruppeneinteilung anhand der Progression der Erkrankung

Anhand der Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (\geq oder $<-0.1 \text{ dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$) wurden die Patienten in Gruppe A mit langsamer und in Gruppe B mit schneller Progression unterteilt. Die Gruppe A (slow progressors) bestand aus n= 31 und die Gruppe B (fast progressors) aus n= 13 Patienten (Abb. 49a und b). Die Patienten mit einer schnellen Progression (Gruppe B) wiesen bereits zum Zeitpunkt der Nierenbiopsie ein höheres Serumkreatinin im Vergleich zu den Patienten mit einer langsamen Progression (Gruppe A) auf ($p<0.05$, Tab. 25). Die übrigen untersuchten Parameter unterschieden sich nicht signifikant zwischen den zwei Gruppen. Im Laufe der Betrachtung wurden n= 9 Patienten (69.2%) aus der Gruppe B (fast progressors) und n= 7 (22.6%) aus der Gruppe A (slow progressors) terminal niereninsuffizient ($\chi^2=8.6$, $p<0.01$). In der Kaplan-Meier Analyse zeigte die Gruppe A ein hoch signifikant besseres Organüberleben zehn Jahre nach Nierenbiopsie im Vergleich zur Gruppe B (Log Rank: $p<0.0001$).

	Gruppe A slow progressors	Gruppe B fast progressors	Signifikanz
Anzahl (n)	31	13	
Alter (Jahre)	44.7 ± 17	45.6 ± 16	ns
Kreatinin (mg/dl)	1.1 ± 0.4	1.6 ± 1.0	p<0.05 †
ECC (ml/min/1.73m ²)	96.8 ± 33	76.7 ± 46	ns
Proteinurie (g/24h)	9.4 ± 5	10.5 ± 3	ns
Art. Hypertonie (%)	73.2%	71.4%	ns
MAP (mmHg)	104.5 ± 9	107.9 ± 10	ns
Antihypertensiva (n)	2.0 ± 1.2	2.2 ± 1.3	ns
ESRD (%)	22.6%	69.2%	p<0.01 ‡

Tabelle 25: Vergleich der untersuchten Parameter (Mittelwert ± SD) in der Gruppe A (slow progressors) und der Gruppe B (fast progressors) bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis. (†) Mann Whitney U-Test (‡) Chi Quadrat Test

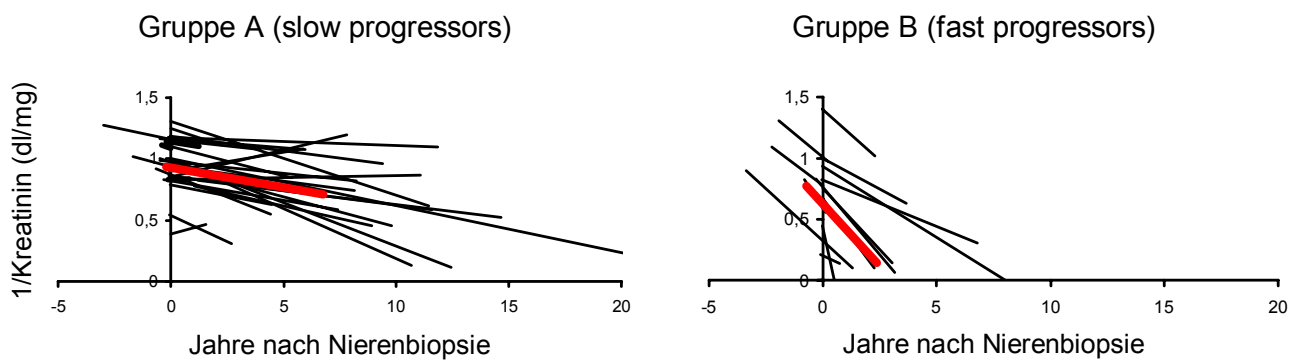


Abbildung: 49a und b: Kurven des reziproken Serumkreatinins pro Zeit jeweils in der Gruppe A (n= 31) und der Gruppe B (n= 13) bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.

3.4.3 Einfluss des Angiotensin I-Converting Enzym-Gen I/D Polymorphismus auf die membranöse Glomerulonephritis

Prävalenz

Der Vergleich der Genotypverteilung und der Allelfrequenzen des ACE-I/D Polymorphismus in der Patienten- und der Kontrollgruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied (Tab. 26). Die Genotyphäufigkeiten erfüllten das Hardy Weinberg Gesetz.

ACE-Gen I/D Polymorphismus							
	II	ID	DD		I-Allel	D-Allel	
Patienten	22.7 %	59.1 %	18.2 %	ns	0.52	0.48	ns
Probanden	18.3 %	51.7 %	30.0 %		0.44	0.56	

Tabelle 26: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des ACE-Gen I/D Polymorphismus bei n= 44 Patienten mit membranöser Glomerulonephritis und n= 120 Kontrollpersonen.

Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie

Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem ACE-Gen I/D Polymorphismus und den untersuchten Parametern zum Zeitpunkt der Biopsie nachgewiesen werden (Tab. 27).

	ACE-Gen I/D Polymorphismus			Signifikanz
	II	ID	DD	
Alter (Jahre)	42.3 ± 19	46.2 ± 15	44.4 ± 19	ns
Kreatinin (mg/dl)	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.4	1.7 ± 1.3	ns
ECC (ml/min/1.73m ²)	102.9 ± 37	91.4 ± 37	71.0 ± 44	ns
Proteinurie (g/24h)	8.2 ± 6.0	10.0 ± 4.0	10.6 ± 6.6	ns
MAP (mmHg)	106.2 ± 9	104.8 ± 10	107.1 ± 9	ns
Antihypertensiva (n)	2.6 ± 1.1	1.7 ± 1.2	2.6 ± 1.1	ns

Tabelle 27: Klinische und laborchemische Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie (Mittelwert ± SD) in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D Polymorphismus bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.

Progression

Der ACE-Gen I/D Polymorphismus beeinflusste die Progression der membranösen Glomerulonephritis, wie aus der Genotypverteilung und den Allelfrequenzen in der Gruppe A (slow progressors) und der Gruppe B (fast progressors) hervorgeht (exakter Test nach Fisher: II- gegen ID/DD-Genotyp: $p < 0.05$; Tab. 28, Abb. 50).

ACE-Gen I/D Polymorphismus							
	II	ID	DD		I-Allel	D-Allel	$\chi^2=2.8$ $p=0.09$
Gruppe A (slow)	32.3 %	51.6 %	16.1 %	$p < 0.05 \dagger$	0.58	0.42	
Gruppe B (fast)	-	76.9 %	23.1 %		0.38	0.62	

Tabelle 28: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des ACE-Gen I/D Polymorphismus in der Gruppe A (slow progressors, n= 31) und der Gruppe B (fast progressors n= 13) bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis. (†) exakter Test nach Fisher: II- vs. ID/DD-Genotyp

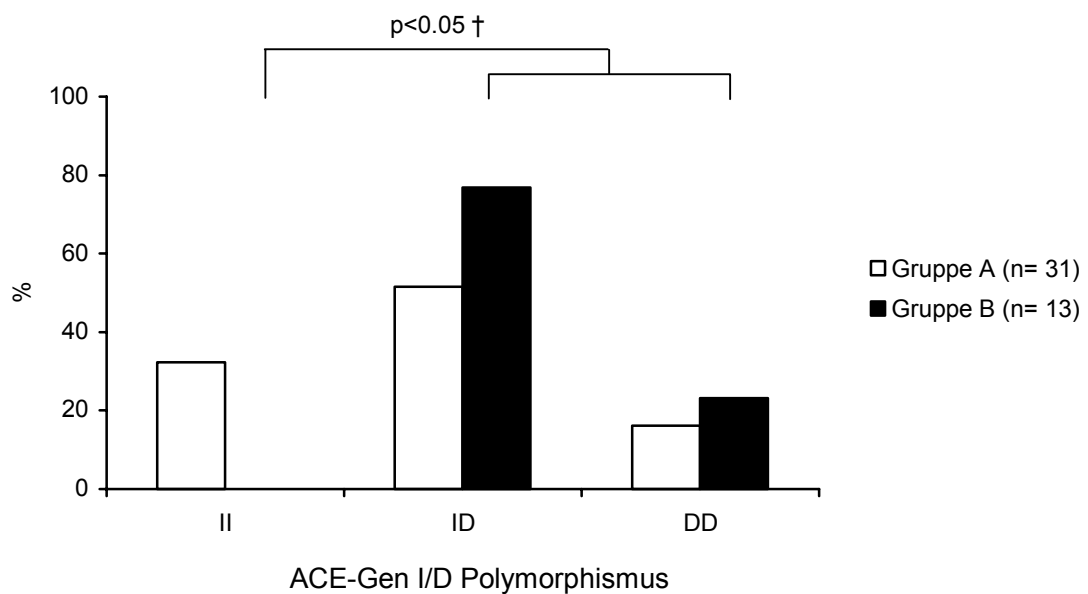


Abbildung 50: Genotypverteilung des ACE-Gen I/D Polymorphismus in der Gruppe A (slow progressors) und der Gruppe B (fast progressors) bei n= 44 Patienten mit membranöser Glomerulonephritis. (†) exakter Test nach Fisher

Auf Grund der kleinen Fallzahl wurde eine signifikante Korrelation des ACE-I/D Genotyp zur Progressionsrate anhand der 1/Cr Steigung nicht erreicht (II: 0.044 ± 0.04 ID: 0.080 ± 0.09 , DD: 0.173 ± 0.29 dl * mg⁻¹ * Jahr⁻¹, ns). Die Kaplan Meier Analyse zeigte ein signifikant

besseres Organüberleben zehn Jahre nach der Nierenbiopsie bei den Patienten ohne ein D-Allel ($p < 0.05$, Abb. 51).

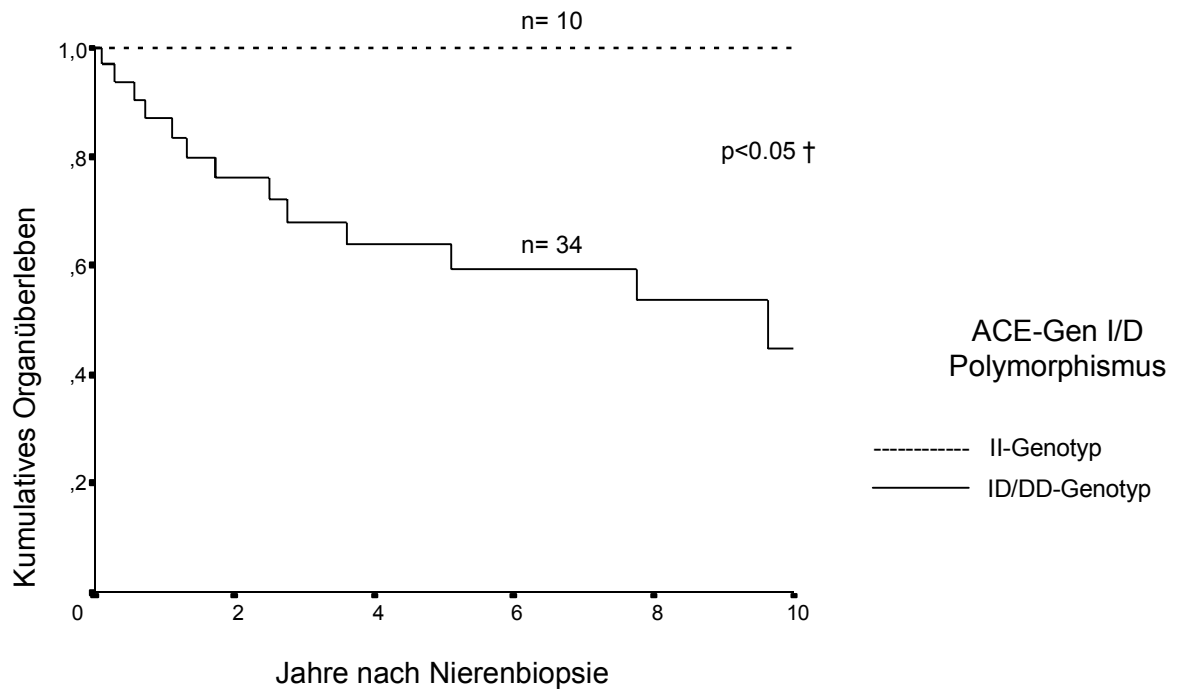


Abbildung 51: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit vom ACE-Gen I/D Polymorphismus bei $n = 44$ Patienten mit membranöser Glomerulonephritis. (†) Log Rank

Ansprechen auf die Therapie mit ACE-Hemmern

Eine durch die ACE-Hemmung erzielte Progressionsverlangsamung oder ein verbessertes Organüberleben wurde bei keinem der ACE-I/D Genotypen nachgewiesen (ns).

3.4.4 Einfluss des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus auf die membranöse Glomerulonephritis

Prävalenz

Die Patienten- und die Kontrollgruppe unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Genotypverteilung und der Allelfrequenzen des AGT-M235T Polymorphismus (Tab. 29). Die beobachteten Genotyphäufigkeiten waren vergleichbar mit den erwarteten im Rahmen des Hardy Weinberg Gleichgewichts.

Angiotensinogen-Gen M234T Polymorphismus							
	MM	MT	TT	ns	M-Allel	T-Allel	ns
Patienten	34.1 %	44.5 %	20.4 %		0.57	0.43	
Probanden	30.8 %	50.8 %	18.4 %		0.56	0.44	

Tabelle 29: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei n= 44 Patienten mit membranöser Glomerulonephritis und n= 120 Kontrollpersonen.

Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie

Es bestand kein signifikanter Unterschied in dem Auftretsalter, der Nierenfunktion und der Proteinurie zum Zeitpunkt der Biopsie zwischen Patienten mit verschiedenen AGT-M235T Genotypen (Tab. 30).

	Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus			Signifikanz
	MM	MT	TT	
Alter (Jahre)	47.8 ± 17	44.3 ± 15	41.7 ± 18	ns
Kreatinin (mg/dl)	1.2 ± 0.5	1.3 ± 0.9	1.0 ± 0.2	ns
ECC (ml/min/1.73m ²)	90.7 ± 42	88.4 ± 43	95.6 ± 38	ns
Proteinurie (g/24h)	9.4 ± 4.1	8.8 ± 5.0	12.5 ± 5.8	ns

Tabelle 30: Klinische und laborchemische Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie (Mittelwert ± SD) in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.

Arterielle Hypertonie

Der AGT-M235T Polymorphismus war zwar mit der Anzahl der verordneten Antihypertensiva ($p < 0.05$, Tab. 31, Abb. 52) aber nicht mit den absoluten Blutdruckwerten assoziiert (ns).

	MM	MT	TT	
MAP (mmHg)	105.9 ± 7	105.4 ± 11	105.1 ± 10	ns
Antihypertensiva (n)	1.5 ± 0.9	2.3 ± 1.3	2.6 ± 1.4	$p < 0.05$ †

Tabelle 31: Mittlerer arterieller Blutdruck und Anzahl der eingenommenen Antihypertensiva (Mittelwerte ± SD) in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei n= 44 Patienten mit membranöser Glomerulonephritis. (†) Mann Whitney U-Test: MM- vs. MT/TT-Genotyp

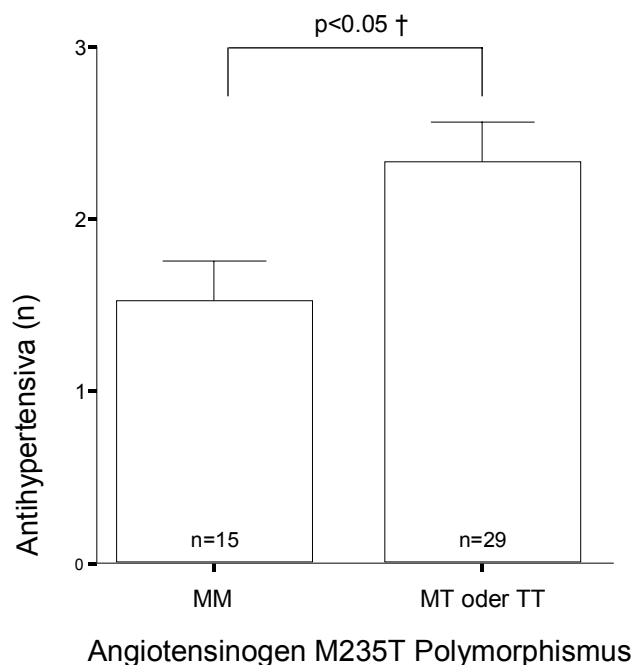


Abbildung 52: Anzahl der eingenommenen Antihypertensiva (Mittelwert ± SE) in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei n= 44 Patienten mit membranöser Glomerulonephritis. (†) Mann Whitney U-Test

Progression

Ein Einfluss des AGT-M235T Polymorphismus auf die Progression der membranösen Glomerulonephritis konnte nicht nachgewiesen werden. Die Genotypverteilung und die Allelfrequenzen unterschieden sich nicht signifikant zwischen Gruppe A und Gruppe B (ns, Tab. 32). Die Progressionsrate anhand der 1/Cr Steigung war nicht mit dem AGT-M235T

Genotyp assoziiert (ns). Die Kaplan Meier Analyse des Organüberlebens zehn Jahre nach der Nierenbiopsie zeigte ebenfalls kein signifikantes Ergebnis (ns, Abb. 53).

Angiotensinogen-Gen M234T Polymorphismus							
	MM	MT	TT		M-Allel	T-Allel	
Gruppe A (slow)	32.2 %	51.6 %	16.1 %	ns	0.58	0.42	ns
Gruppe B (fast)	38.5 %	30.8 %	30.8 %		0.54	0.46	

Tabelle 32: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus in der Gruppe A (slow progressors, n= 31) und der Gruppe B (fast progressors n= 13) bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.

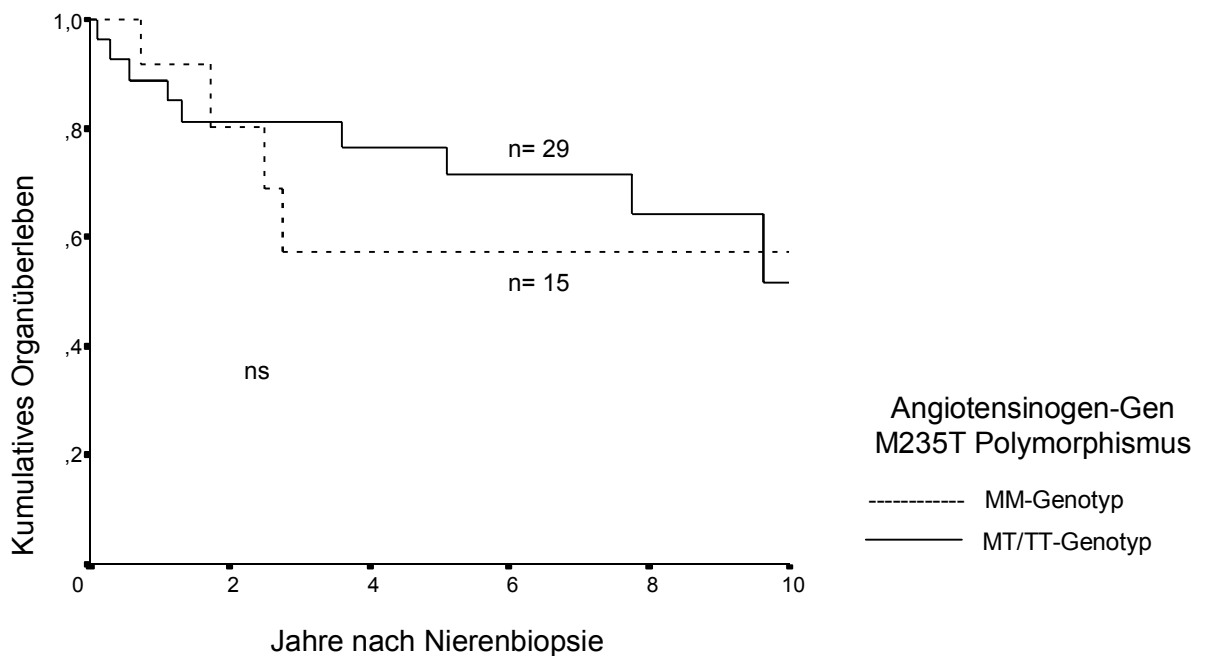


Abbildung 53: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit vom Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus bei n= 44 Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.

Ansprechen auf die Therapie mit ACE-Hemmern

Bei keinem der AGT-M235T Genotypen wurde eine nephroprotektive Wirkung der ACE-Hemmung (Progressionsverlangsamung oder besseres Organüberleben) festgestellt (ns).

3.4.5 Einfluss des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus auf die membranöse Glomerulonephritis

Prävalenz

Die Genotypverteilung und die Allelfrequenzen des AT₁R-A1166C Polymorphismus waren vergleichbar in der Patienten- und der Kontrollgruppe (Tab. 33). Die Genotyphäufigkeiten entsprachen dem Hardy Weinberg Gleichgewicht. Wegen der kleinen Fallzahl der Patienten mit membranöser Glomerulonephritis und dem CC-Genotyp (n= 4) wurden die AC und CC-Genotypen zusammen ausgewertet.

Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus							
	AA	AC	CC	ns	A-Allel	C-Allel	ns
Patienten	40.9 %	50.0 %	9.1 %		0.66	0.34	
Probanden	57.1 %	37.5 %	10.8 %		0.70	0.30	

Tabelle 33: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus bei n= 44 Patienten mit membranöser Glomerulonephritis und n= 120 Kontrollpersonen.

Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie

Der AT₁R-A1166C Polymorphismus war mit keinem der untersuchten klinischen und laborchemischen Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie assoziiert (Tab. 34).

	Angiotensin II-Typ1 Rezeptor-Gen Polymorphismus		Signifikanz
	AA	AC/CC	
Alter (Jahre)	41.9 ± 19	47.0 ± 14	ns
Kreatinin (mg/dl)	1.5 ± 0.9	1.1 ± 0.4	ns
ECC (ml/min/1.73m ²)	80.0 ± 43	97.7 ± 34	ns
Proteinurie (g/24h)	10.2 ± 5.0	9.5 ± 4.9	ns
MAP (mmHg)	105.9 ± 10	105.2 ± 9	ns
Antihypertensiva (n)	2.2 ± 1.4	2.0 ± 1.2	ns

Tabelle 34: Klinische und laborchemische Parameter zum Zeitpunkt der Biopsie (Mittelwert ± SD) in Abhängigkeit vom Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.

Progression

Die Progression der membranösen Glomerulonephritis wurde nicht vom AT₁R-A1166C Polymorphismus beeinflusst. Die Genotypverteilung und die Allelfrequenzen unterschieden sich nicht signifikant zwischen der Gruppe A und der Gruppe B (ns, Tab. 35). Die Progressionsrate anhand der 1/Cr Steigung war nicht mit dem AT₁R-A1166C Polymorphismus assoziiert (AA: -0.094 ± 0.20 , AC/CC: $-0.084 \pm 0.08 \text{ dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$, ns). Die Kaplan Meier Analyse des zehn Jahre Organüberlebens zeigte kein signifikantes Ergebnis (Abb. 54).

Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus						
	AA	AC/CC	ns	A-Allel	C-Allel	ns
Gruppe A (slow)	42.5 %	54.8 %		0.68	0.32	
Gruppe B (fast)	30.8 %	69.2 %		0.62	0.38	

Tabelle 35: Genotypverteilung und Allelfrequenzen des Angiotensin II – Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus in der Gruppe A (slow progressors, n= 31) und der Gruppe B (fast progressors n= 13) bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.

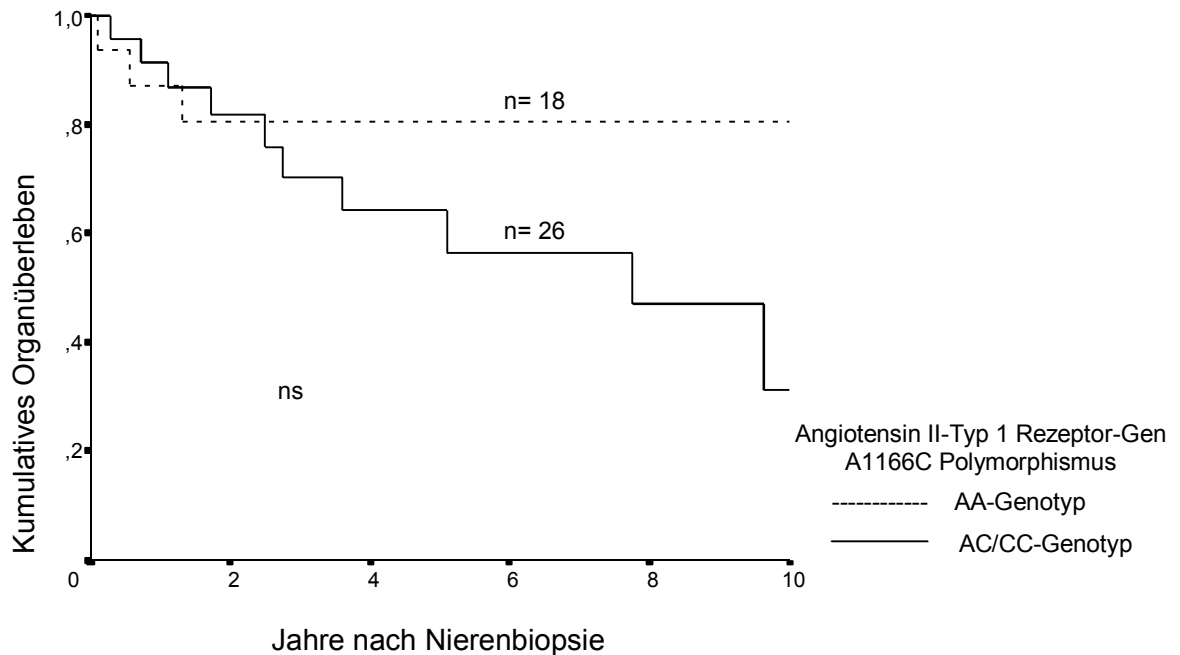


Abbildung 54: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit vom Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus bei n= 44 Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.

Ansprechen auf die Therapie mit ACE-Hemmern

Die ACE-Hemmung erbrachte keinen Effekt auf die Progressionsrate (1/Cr Steigung) oder auf das Organüberleben bei allen AT₁R-A1166C Genotypen (ns).

3.4.6 Kombinierte Analyse des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAS auf die membranöse Glomerulonephritis

Progression

In der kombinierten Analyse des ACE-I/D und des AGT-M235T Polymorphismus konnte ein synergistischer Einfluss auf die Progression der membranösen Glomerulonephritis nachgewiesen werden. Die Patienten mit drei oder vier ACE-D und AGT-T Allelen (DD/TT-, DD/MT- oder ID/TT-Genotypen) gehörten häufiger zur Gruppe B (fast progressors) im Vergleich zu den Patienten mit den restlichen Genotypen ($p < 0.01$, Abb. 55).

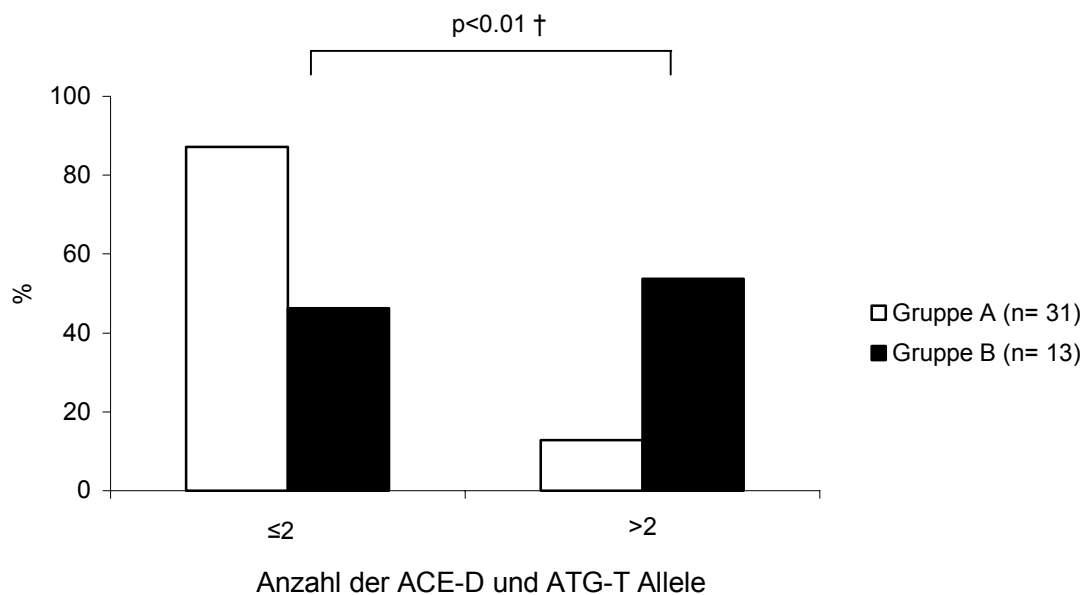


Abbildung 55: Kombinierte Darstellung der Anzahl der ACE-D und AGT-T Allele in der Gruppe A (slow progressors) und der Gruppe B (fast progressors) bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis. (†) exakter Test nach Fisher

Die Patienten mit drei oder vier ACE-D oder AGT-T Allelen wiesen weiterhin eine schnellere Progression anhand der 1/Cr Steigung auf ($p < 0.05$, Abb. 56). In der Kaplan Meier Analyse wurde ein relativ schlechteres Organüberleben zehn Jahre nach Nierenbiopsie bei Patienten mit diesen Genotypen festgestellt, eine Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht (ns, Abb. 57).

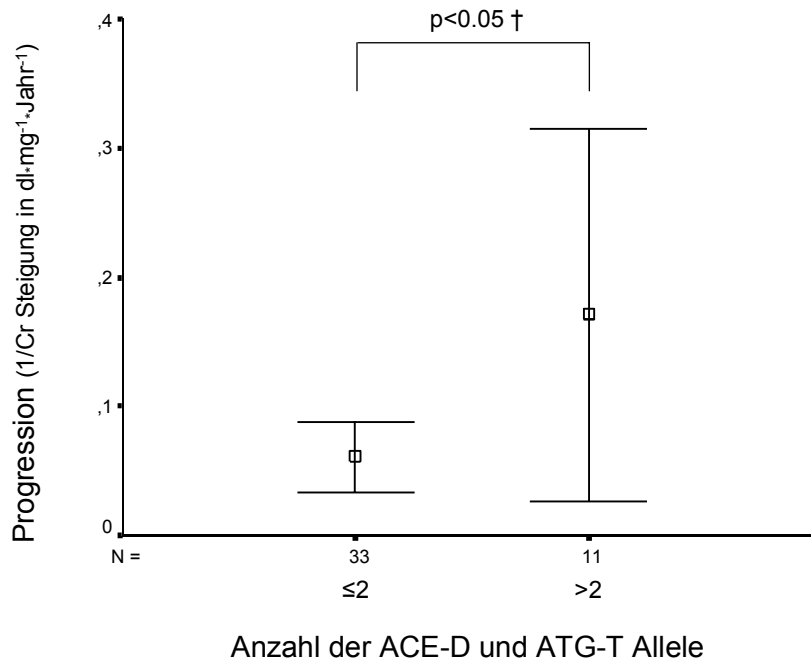


Abbildung 56: Steigung der Kurve des reziproken Serumkreatinins pro Zeit (Mittelwert \pm SE in $\text{dl} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{Jahr}^{-1}$) bei $n = 44$ Patienten mit membranöser Glomerulonephritis in Abhängigkeit von der Anzahl der ACE-Gen D- und Angiotensinogen-Gen T-Allele. (\dagger) Mann Whitney U-Test

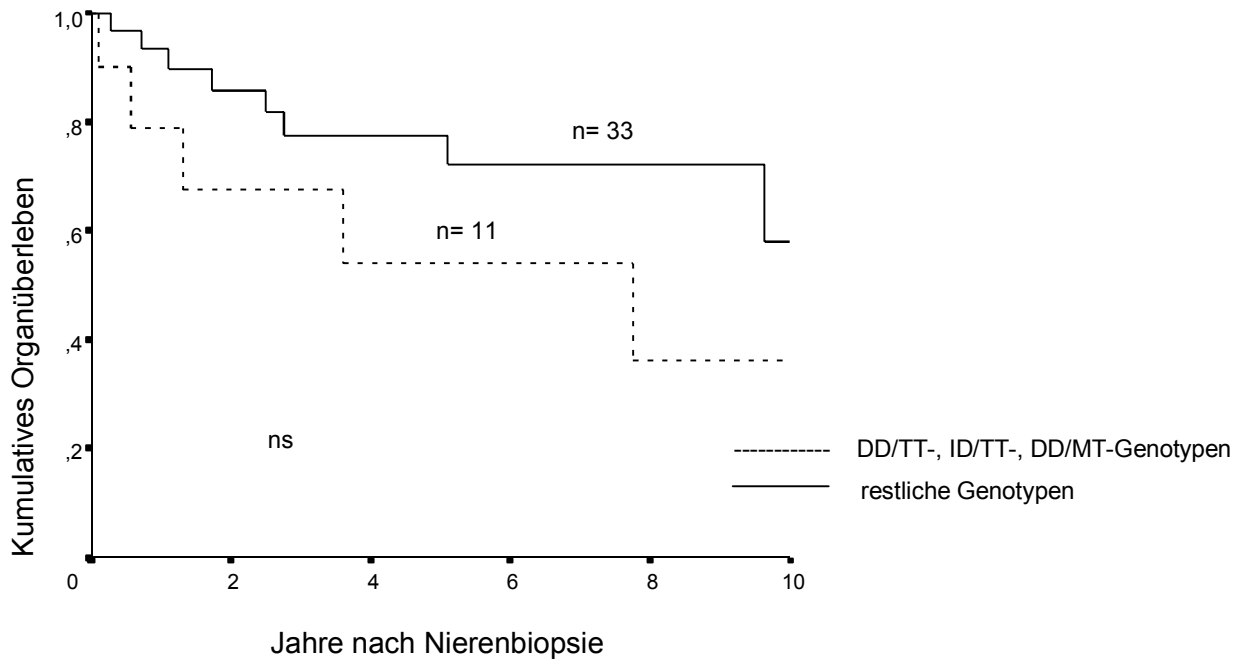


Abbildung 57: Zehn Jahre Organüberlebensanalyse nach Kaplan Meier in Abhängigkeit von dem ACE-I/D und dem AGT-M235T Polymorphismus bei $n = 44$ Patienten mit membranöser Glomerulonephritis.

3.4.7 Zusammenfassung des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAS auf die membranöse Glomerulonephritis

Das Auftretsalter und die Proteinurie (als Maß des nephrotischen Syndroms) wurde von keinem der Polymorphismen beeinflusst (Tab. 36). Patienten mit dem TT-Genotyp des Angiotensinogen-Gen Polymorphismus benötigten eine größere Anzahl von Antihypertensiva. Die Progression der membranösen Glomerulonephritis war mit dem ACE-I/D Polymorphismus assoziiert. Dieser Effekt kam noch deutlicher bei der kombinierten Analyse des ACE-I/D mit dem AGT-M235T Polymorphismus zum Vorschein. Ein Einfluss des AT₁R-A1166C Polymorphismus auf die untersuchten Parametern war nicht nachweisbar.

	ACE-I/D	AGT-M235T	ACE I/D + AGT-M235T(†)	AT ₁ R-A1166C
Proteinurie	–	–	–	–
Hypertonie	–	+	–	–
Progression	+	–	+	–
Ansprechen auf die ACE-Hemmung	–	–	–	–

Tabelle 36: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAS auf die klinischen Parameter der membranösen Glomerulonephritis. (†) kombinierte Analyse der ACE-Gen I/D und Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismen

4. Diskussion

4.1 Das Renin-Angiotensin-System und die Progression der chronischen Nierenerkrankungen

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) gilt sowohl aufgrund seiner Rolle in der Regulation des systemischen Blutdrucks und der renalen Hämodynamik als auch wegen der trophischen Effekte seiner Endprodukte als einer der entscheidenden Faktoren, die zur Progression der chronischen Nierenerkrankungen beitragen. Angiotensin II (Ang-II) führt zu einer Widerstandserhöhung des „vas efferents“ und damit zu einer intraglomerulären Hypertonie¹⁰³, die im Wesentlichen für das Fortschreiten der glomerulären Erkrankungen verantwortlich gemacht wird¹⁰⁴. Abgesehen von den funktionellen, hämodynamischen Einflüssen, wurden nach Applikation von Ang-II auch morphologische Veränderungen beobachtet¹⁰⁵. Angiotensin-II stimulierte die Proliferation^{106, 107, 108} und/oder die Hypertrophie^{109, 110, 111, 108} der Mesangiumzellen und die Produktion von Matrixproteinen^{109, 106, 107, 111} sowohl in der Zellkultur als auch im Tiermodell. Diese Wirkungen werden mindestens zum Teil durch die Steigerung der Expression des Gens des Wachstumsfaktors TGF- β (transforming growth factor beta) vermittelt¹¹¹. Auch in Tubuluszellen ruft Ang-II eine Zellhypertrophie und eine erhöhte Kollagensynthese durch Hochregulierung des Gens des TGF- β hervor^{112, 113}. Neben TGF- β wurden auch andere Mediatoren von Ang-II identifiziert, wie z.B. PDGF (platelet-derived growth factor)^{114, 105}, bFGF (basic fibroblast growth factor)¹¹⁵, PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)^{116, 117} oder das Chemokin RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted)¹¹⁸. Angiotensin II induziert außerdem die Expression von wachstumsfördernden Genen, wie *c-fos*¹¹⁹, *c-jun*¹²⁰, *c-myc*¹¹⁴ oder *Erg-1*^{121, 108}.

Abgesehen von den pathophysiologischen Hintergründen, gibt es auch klinische Hinweise dafür, dass ein hochreguliertes lokales RAS an der Progredienz der chronischen glomerulären Erkrankungen beteiligt ist, z.B. bei Patienten mit IgA Nephropathie¹²². Die Nephroprotektion, die durch die ACE-Hemmung erzielt wird, ist ein weiteres Zeichen dafür. Diese ist gut dokumentiert sowohl bei der diabetischen Nephropathie (Proteinurieverminderung¹²³, Progressionsverlangsamung¹²⁴) als auch bei nicht diabetischen chronischen Nierenerkrankungen¹²⁵ oder auch speziell bei der IgA Nephropathie (Reduktion der Proteinurie^{126, 127}, Progressionsverlangsamung^{128, 129, 162}). Die langfristige Wirkung der Therapie mit ACE-Hemmern wird nicht ausschließlich durch den Einfluss auf die

systemische oder die renale Hämodynamik hervorgerufen¹³⁰. Bei Patienten mit IgA Nephropathie erniedrigt die ACE-Hemmung die Permeabilität der Basalmembran. Dieser Effekt ist unabhängig von den Änderungen in der glomerulären Hämodynamik¹³¹. Die ACE-Hemmung verhindert weiterhin morphologische Veränderungen in der Niere durch Mechanismen, die unabhängig von der systemischen Blutdrucksenkung sind¹³². Möglicherweise ist die fehlende Aktivierung der oben beschriebenen Mediatoren des Ang-II dafür verantwortlich¹³³.

4.2 Einfluss der genetischen Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems auf die chronischen Glomerulonephritiden

Vor dem oben genannten Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der drei wichtigsten genetischen Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems auf die primäre chronische Glomerulonephritis am Beispiel der IgA Nephropathie, der fokale und segmental sklerosierende Glomerulonephritis und der membranösen Glomerulonephritis untersucht. Ziel der Studie war es, genetisch determinierte Patientensubgruppen zu identifizieren, die zu einer schnelleren Progression prädisponiert waren.

4.2.1 IgA Nephropathie

Das männliche Geschlecht, das hohe Auftretsalter, eine bereits bei Erstvorstellung eingeschränkte Nierenfunktion, eine große Proteinurie bzw. das Vorliegen eines nephrotischen Syndroms und die arterielle Hypertonie gelten als Progressionsfaktoren, die mit einer schlechteren Prognose bei Patienten mit IgA Nephropathie assoziiert sind^{134, 135}. In unserem Patientenkollektiv (n= 107) ließ sich diese Aussage nur für das Ausmaß der Proteinurie bzw. das Vorliegen eines nephrotischen Syndroms und die arterielle Hypertonie bestätigen (siehe 3.2.1). Wir konnten außerdem eine höhere ACE-Serumaktivität bei Patienten mit einer schnelleren Progression nachweisen (Abb. 17).

In unserem Patientenkollektiv wiesen 72% der Patienten eine schnelle Progression (Gruppe B) und nur 28% der Patienten eine relativ stabile Nierenfunktion (Gruppe A) auf. Obwohl in der Literatur eine Dialysepflichtigkeit zehn Jahre nach der ersten Manifestation in weniger als 20% der Patienten beschrieben ist¹³⁴, betrug der entsprechende Prozentsatz in unserem Kollektiv 71%. Die große Anzahl von Patienten mit einer schnellen Funktionsverschlechterung in der vorliegenden Studie hat möglicherweise folgenden

Hintergrund: Fälle mit einem gravierenden Verlauf werden in der Regel in die Universitätsklinik überwiesen, während Patienten mit einer langjährig stabilen Nierenfunktion häufig nur von ihren Hausärzten weiterbetreut werden. Deswegen hatten zwei Drittel der Studienteilnehmer mit IgA Nephropathie zum Zeitpunkt der Genotypisierung bereits eine terminale Niereninsuffizienz erreicht. Aus der gleichen Perspektive liesse sich auch die große Prävalenz der arteriellen Hypertonie (80% vs. 25%) und des nephrotischen Syndroms (27% vs. 7%) in unserem Kollektiv im Vergleich zu Literaturberichten aus dem europäischen Raum verstehen¹³⁶.

4.2.1.1 Einfluss des ACE-Gen I/D Polymorphismus auf die IgA Nephropathie

Die Genotypverteilung und die Allelfrequenzen des ACE-I/D Polymorphismus waren vergleichbar in der Patienten- und der Kontrollgruppe, d.h. der Polymorphismus trug nicht zur Entwicklung der IgA Nephropathie bei. Weiterhin beeinflusste er nicht das Auftretsalter, die Nierenfunktion, die Proteinurie oder den Schweregrad der begleitenden arteriellen Hypertonie bei Diagnosestellung. Der ACE-I/D Polymorphismus war nicht mit der Progression der Erkrankung im gesamten Patientenkollektiv assoziiert (n= 107, Tab. 7). Ein Zusammenhang zur Progression konnte nur in der nicht mit ACE-Hemmern therapierten Subgruppe (n= 38) nachgewiesen werden (Abb. 18). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass der Effekt des ACE-I/D Polymorphismus durch die ACE-Hemmung maskiert bzw. aufgehoben werden kann. Die Behandlung mit ACE-Hemmern erbrachte keinen signifikanten Vorteil beim II-Genotyp; bei den ID- und DD-Genotypen dagegen bewirkte sie eine deutliche Progressionsverlangsamung, so dass sich die Progressionsrate bei diesen Genotypen der des II-Genotyps angleich (Abb. 22).

Seit der Beschreibung des ACE-I/D Polymorphismus sind etliche Berichte über seinen Einfluss auf die IgA Nephropathie in verschiedenen ethnischen Gruppen erschienen (Tab. 37). In keiner dieser Studien konnte eine Prädisposition zum Auftreten der IgA Nephropathie durch den Polymorphismus nachgewiesen werden. In Übereinstimmung zu unseren Ergebnissen wurde das Erscheinungsbild der Erkrankung (Alter, Nierenfunktion bei Diagnosestellung, Proteinurie und arterielle Hypertonie) bis auf Ausnahmefällen (Proteinurie¹⁴⁴, Hypertonie¹³⁸) vom ACE-Gen I/D Polymorphismus nicht beeinflusst. Die meisten der Autoren stellten eine Assoziation mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung^{137, 138, 139, 141, 145} und dem Schweregrad des pathologischen Befalls^{138, 144, 146} fest. In einigen

ACE-Gen I/D Polymorphismus und IgA Nephropathie

Autor	Jahr	Land	Patienten (n)	Auftretsalter	Nierenfunktion bei Diagnosestellung	Proteinurie	Hypertonie	Progression	Pathologie
Yoshida et al ¹³⁷	1995	Japan	53					+	
Yorika et al ¹³⁸	1995	Japan	48	-	-	-	+	+	+
Harden et al ¹³⁹	1995	England	100	-	-	-	-	+	
Schmidt et al ¹⁴⁰	1995	BRD, Italien, Australien	204			-	-	-	
Hunley et al ¹⁴¹	1996	USA	64					+	
Burg et al ¹⁴²	1997	BRD	70		-		-	-	
Pei et al ¹⁴³	1997	Kanada	168			-	-	-	
Tanaka et al ¹⁴⁴	1998	Japan	97 (Kinder)	-		+	-		+
Stratta et al ¹⁴⁵	1999	Italien	81	-	-	-	-	+	-
Asano et al ¹⁴⁶	1999	Japan	82 (Kinder)	-	-	-	-		+
eigene Ergebnisse	2001	BRD	107	-	-	-	-	+	†

Tabelle 37: Übersicht des Einflusses des ACE-Gen I/D Polymorphismus auf die IgA Nephropathie anhand der Literatur und der eigenen Ergebnisse. (†) signifikant nur in der nicht mit ACE-Hemmern oder AT₁R-Antagonisten therapierten Subgruppe

Studien, unter anderen auch in den zwei größten^{140, 143}, war ein Einfluss des ACE-I/D Polymorphismus auf die Progression der IgA Nephropathie nicht reproduzierbar^{140, 143, 142}. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnten die unterschiedlichen ethnischen Hintergründen darstellen (vgl. Frequenz des D-Allels bei Kaukasiern: 0.56, bei Afrikanern: 0.60 und bei Asiaten: 0.39, $p < 0.001$ ¹⁴; Assoziation mit der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie bei nicht insulinpflichtigen Diabetikern bei Asiaten, aber nicht bei Kaukasiern^{147, 29, 30}). Die unterschiedlichen Therapieansätze (ACE-Hemmung, angestrebte Blutdruckwerte, Immunsuppression usw.) wären auch zu beachten.

Interessanterweise wurde der DD-Genotyp mit einem schwereren Verlauf der Schönleihenoch Purpura assoziiert, einer systemischen Vaskulitis, deren nierenbiptischer Befund sich kaum von der IgA Nephropathie unterscheiden lässt¹⁴⁸. Dieser Befund wurde von anderen Autoren jedoch nicht bestätigt^{149, 150}.

Pharmakogenetik

Bei Patienten mit chronischer Glomerulonephritis existiert eine große Variabilität, welches das Ansprechen auf die ACE-Hemmung betrifft¹⁵¹. Mit der Annahme, dass diese Variabilität einen genetischen Hintergrund haben könnte, hat sich die Analyse der pharmakogenetischen Interaktion zwischen ACE-Hemmern und dem ACE-I/D Polymorphismus zu einem faszinierenden Forschungsgebiet entwickelt. Ziel der Untersuchungen ist, Patientensubgruppen, die genetisch zu einer Resistenz gegenüber ACE-Hemmern veranlagt sind, zu identifizieren, um sie zukünftig intensiver bzw. anhand von alternativen Therapiestrategien zu behandeln. Zum Vergleich der Effektivität der ACE-Hemmung in den genetischen Subgruppen, wurde abgesehen vom „goldenen Standard“ der Progressionsrate (Steigung des reziproken Serumkreatinins oder Änderung der ECC bzw. der GFR) auch die Proteinurienenkung verwendet, die in den ersten Monaten nach Therapiebeginn erreicht wurde. Diese gibt Auskunft über das langfristige nephroprotektive Ergebnis der ACE-Hemmung^{152, 153}.

In der Literatur werden zwei Thesen bezüglich des Effektes des ACE-I/D Polymorphismus auf die Effektivität der ACE-Hemmung vertreten (Tab. 38):

These A: Der DD-Genotyp profitiert mehr von einer ACE-Hemmung

Sind Patienten mit dem DD-Genotyp bessere Kandidaten für eine ACE-Hemmertherapie, bzw. profitieren sie mehr von ihr, weil sie erhöhte ACE-Spiegel und ein höheres Progressionspotential aufweisen? Studien sowohl bei Patienten mit IgA Nephropathie¹³⁷ als auch mit diabetischer Nephropathie¹⁶³ oder bei gemischten Kollektiven^{156, 157, 160} beobachteten eine größere Reduktion der Proteinurie nach ACE-Hemmergabe beim DD-Genotyp (bzw. D-Allel). Auch in der vorliegenden Studie war eine Verminderung der Proteinurie durch die ACE-Hemmung bei Patienten mit IgA Nephropathie nur bei Vorhandensein mindestens eines D-Alleles (ID/DD-Genotypen) nachweisbar (Abb. 20-21). Weiterhin haben wir eine durch die ACE-Hemmung erzielte Progressionsverlangsamung nur bei den ID/DD-Genotypen festgestellt (Abb. 22). Dieses entspricht den Befunden anderer Autoren bei Patienten mit IgA Nephropathie¹⁵⁴ oder weniger homogenen Kollektiven¹⁶⁰.

These B: Beim DD-Genotyp ist die übliche ACE-Hemmung nicht ausreichend

Reicht bei Patienten mit dem DD-Genotyp wegen der erhöhten ACE-Aktivität die übliche ACE-Hemmerdosierung nicht aus? Ist bei diesen Patienten eine Dosissteigerung oder sogar zusätzliche Therapieansätze (z.B. kombinierte Gabe von ACE-Hemmern und AT₁Rezeptor Antagonisten) erforderlich? Beim II-Genotyp bewirkte die ACE-Hemmergabe eine stärkere und länger anhaltende ACE-Blockade als beim DD-Genotyp¹⁶⁴, ein Zeichen dafür, dass beim DD-Genotyp eine ACE-Restaktivität vorhanden blieb. Die durch ACE-Hemmung hervorgerufenen Änderungen in der renalen Hämodynamik waren weniger ausgeprägt bei Probanden mit dem DD-Genotyp¹⁶⁵. In vielen Studien bei verschiedenen Nierenerkrankungen bewirkte die ACE-Hemmung beim DD-Genotyp keine signifikante Verminderung der Proteinurie^{155, 158, 162} und Patienten mit dem DD-Genotyp wiesen trotz ACE-Hemmung weiterhin eine schnellere Progression auf^{158,161}. Diese Ergebnisse sprechen für eine Ineffektivität der ACE-Hemmertherapie beim DD-Genotyp zumindest in der üblichen Dosierung.

Diese zwei Thesen schließen sich nicht zwangsläufig gegenseitig aus. Nach ACE-Hemmergabe wurde ein größerer Abfall der ACE-Serumaktivität bei Probanden mit dem D-Allel gemessen (entspricht der These A), trotzdem war der ACE-Spiegel immer noch höher beim DD-Genotyp im Vergleich zum II-Genotyp (entspricht der These B)¹⁶⁶. Die Probanden mit dem DD-Genotyp profitierten also mehr von der Medikamentengabe, wiesen aber trotzdem immer noch höhere Werte als die Probanden mit dem II-Genotyp auf. Der Einfluss

ACE-Gen I/D Polymorphismus und Effektivität der ACE-Hemmung

Autor	Jahr	Land	Diagnose	Patienten (n)	Studiendesign	Beobachtungsdauer	antiproteinurischer Effekt	Progressionsverlangsamung
Yoshida et al ¹³⁷	1995	Japan	IgA	21	retrospektiv	1 y	nur bei DD	–
Han et al ¹⁵⁴	2000	Korea	IgA	61	retrospektiv	3.7 ± 2.2 y	–	größer bei DD
eigene Ergebnisse	2001	BRD	IgA	107	retrospektiv	6.6 ± 5.8 y	nur bei ID/DD	nur bei ID/DD
Burg et al ¹⁴²	1997	BRD	GN	29	retrospektiv	9-12 m	–	–
Haas et al ¹⁵⁵	1998	Österreich	GN	26	prospektiv	6 m	Proteinurie persistierend in DD trotz ACE-Hemmung	
Moriyama et al ¹⁵⁶	1995	Japan	CRD	36	retrospektiv	3 m	größer bei ID/DD	
Vleming et al ¹⁵⁷	1998	Niederlande	CRD	96	retrospektiv	>1.5 m	größer beim D-Allel	
Van Essen et al ¹⁵⁸	1996	Niederlande	ND	81	randomisiert	3-4 y	Proteinurie persistierend in DD trotz ACE-Hemmung	schnellere Progression in DD trotz ACE-Hemmung
Van der Kleij et al ¹⁵⁹	1997	Niederlande Österreich	ND	61	retrospektiv	1-3 m	–	
Ruggenenti et al ¹⁶⁰	2000	Italien	ND	352	randomisiert	16-47 m	nur bei DD (Männer)	nur bei DD (Männer)
Parving et al ¹⁶¹	1996	Dänemark	DM	35	retrospektiv	3-9 y		schnellere Progression in DD trotz ACE-Hemmung
Penno et al ¹⁶²	1998	Europa (multizentrisch)	DM	530	randomisiert	2 y	Proteinurie persistierend in ID/DD trotz ACE-Hemmung	
Ha et al ¹⁶³	2000	Korea	DM	83	prospektiv	3 m	größer bei DD	

Tabelle 38: Übersicht des Einflusses des ACE-Gen I/D Polymorphismus auf die Effektivität der ACE-Hemmung anhand der Literatur und der eigenen Ergebnisse (GN= Glomerulonephritis, CRD= chronische Nierenerkrankung, ND= nicht diabetische chronische Nierenerkrankung, DM= diabetische Nephropathie, m= Monat, y= Jahr).

des ACE-I/D Polymorphismus auf die Effektivität der ACE-Hemmung könnte je nach Grunderkrankung, Dosierung, Präparat, Blutdruckeinstellung, Natrium-Haushalt und Beobachtungsdauer variieren. Aus dieser Sicht ist auch die Diskrepanz der o.g. Ergebnissen von Studien mit unterschiedlichem Studienaufbau und Untersuchungsmaterial zu betrachten.

4.2.1.2 Einfluss des Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus auf die IgA Nephropathie

Beim Vergleich der Allelfrequenzen des AGT-M235T Polymorphismus zwischen den Patienten und den nierengesunden Probanden wurde ein grenzwertiger Unterschied ($p=0.054$) beobachtet, der für einen kausalen Zusammenhang des T-Allels mit dem Auftreten der IgA Nephropathie sprechen könnte. Dieser Zusammenhang ist aus pathophysiologischer Sicht schwierig nachvollziehbar und wurde bei anderen Studien mit ähnlicher Fragestellung widerlegt^{167, 141, 143, 168}. Diese eher falsch positive Assoziation ist wahrscheinlich auf ein methodologisches Problem der vorliegenden Studie zurückzuführen. Aus den in 4.2.1 erwähnten Gründen bestand unser Kollektiv zu mehr als zwei Drittel aus Patienten mit einer schnellen Progression, bei denen das T-Allel häufiger war (siehe 3.2.4). Würde sich unser Kollektiv gleichmäßig aus slow und fast progressors oder gar vorwiegend aus slow progressors zusammensetzen, so würde der o.g. Zusammenhang nicht mehr bestehen. Der Vergleich unserer Befunde mit den beschriebenen Allelfrequenzen in der Literatur unterstützt diese Annahme. Die Frequenz des T-Allels in unserer Kontrollgruppe (0.44) war ähnlich mit der berechneten Allelfrequenz für Kaukasier (0.42) in einer großen Metaanalyse¹⁹. Im Gegensatz dazu war sie bei unseren Patienten mit 0.53 deutlich höher als in den zwei anderen Patientengruppen aus dem kaukasischen Raum [0.41 (n= 168)¹⁴³ und 0.39 (n= 64)¹⁴¹].

Wir konnten einen signifikanten Einfluss des AGT-M235T Polymorphismus auf das Vorliegen eines nephrotischen Syndroms, den Schweregrad der arteriellen Hypertonie und auf die Progression der IgA Nephropathie nachweisen (Abb. 24-28). Diese Befunde entsprechen generell den bisherigen Berichten in der Literatur (Tab. 39a). Ein Zusammenhang zu dem Ausmaß der Proteinurie¹⁴³ und der Progression^{143, 168} wurde auch von anderen Autoren beobachtet. Ein beschriebener Einfluss auf das Auftretsalter¹⁶⁸ wurde in unserem Kollektiv nur als Tendenz festgestellt. Auch im Fall des AGT-M235T Polymorphismus sind negative

Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus und IgA Nephropathie

Autor	Jahr	Land	Patienten (n)	Auftrittsalter	Nierenfunktion bei Diagnosestellung	Proteinurie-nephrotisches Syndrom	Hypertonie	Progression	Pathologie
Hamaguchi et al ¹⁶⁷	1995	Japan	53					-	
Hunley et al ¹⁴¹	1996	USA	64					-	
Pei et al ¹⁴³	1997	Kanada	168			+	-	+	
Schmidt et al ¹⁶⁸	1996	BRD, Italien, Australien	71	+				+	
eigene Ergebnisse	2001	BRD	107	-	-	+	+	+	

AT₁ Rezeptor-Gen- A1166C Polymorphismus und IgA Nephropathie

Autor	Jahr	Land	Patienten (n)	Auftrittsalter	Nierenfunktion bei Diagnosestellung	Proteinurie	Hypertonie	Progression	Pathologie
Yoshida et al ¹⁷⁷	1995	Japan	53					-	
Hunley et al ¹⁴¹	1996	USA	64					-	
Pei et al ¹⁴³	1997	Kanada	168			-	-	-	
eigene Ergebnisse	2001	BRD	107	-	-	-	-	-	

Tabellen 39 a und b: Übersicht des Einflusses der Angiotensinogen-Gen M235T und Angiotensin II- Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismen auf die IgA Nephropathie anhand der Literatur und der eigenen Ergebnisse.

Ergebnisse veröffentlicht worden, welches seinen Effekt auf die Progression der Erkrankung betrifft^{167, 141}. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Pei et al kein Zusammenhang zum arteriellen Blutdruck nachweisen¹⁴³. Dieses dürfte daran liegen, dass –ähnlich wie in der vorliegenden Studie- die meisten Patienten bereits unter antihypertensiver Therapie standen. Schließlich wurde der AGT-M235T Polymorphismus mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie in zahlreichen Studien bei nierengesunden assoziiert^{41, 44, 169, 170, 171, 172, 173}, welches für eine entsprechende Rolle auch bei Patienten mit IgA Nephropathie spricht.

Wir stellten eine höhere Effektivität der Therapie mit ACE-Hemmern bei Patienten mit dem AGT-TT Genotyp fest (Abb. 29-31). In der Literatur wurde nur von einem stärkeren antihypertensiven Effekt der ACE-Hemmung beim T-Allel¹⁷⁴ berichtet, welches allerdings in anderen Studien nicht bestätigt wurde^{175, 176}.

4.2.1.3 Einfluss des AT₁ Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus auf die IgA Nephropathie

Ähnlich wie bei anderen Studien^{177, 141, 143} war das AT₁R-C Allel in unserem Kollektiv nicht mit einem größeren Progressionspotential verbunden (Tab. 39b). Im Gegensatz dazu schien er in Teilen der Analyse eine protektive Wirkung zu haben (Tab. 11). Eine erhöhte Frequenz des C-Allels in Subgruppen mit langsamer Progression wurde auch von anderen Autoren¹⁴¹ berichtet. Auffällig war die fehlende Assoziation zum arteriellen Blutdruck.

4.2.1.4 Kombinierte Analyse des Einflusses der Polymorphismen des RAS auf die IgA Nephropathie

Die kombinierte Analyse der ACE-I/D und AGT-M235T Polymorphismen zeigte einen synergistischen Effekt in Bezug auf die Progression (Abb. 33-34) und das Ansprechen auf die ACE-Hemmung (Abb. 35-37). Ein ähnlicher additiver Effekt ist für das Risiko für Myokardinfarkt⁴⁵ und die Entwicklung diabetischer Nephropathie⁶⁹ beschrieben worden.

4.2.2 Fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis

In der vorliegenden Arbeit wurden n= 62 Patienten mit einer bioptisch gesicherten FSGN untersucht. Fünf Jahre nach Nierenbiopsie hatten 69% der Patienten noch eine erhaltene primäre Nierenfunktion. Der entsprechende Prozentsatz in der Literatur liegt bei 75%¹⁷⁸. Für diesen Unterschied könnten die in 4.2.1 erwähnten Gründen verantwortlich gemacht werden. Ein junges Auftretsalter und hohe arterielle Blutdruckwerte waren in unserem Patientenkollektiv mit einer schlechteren Prognose assoziiert (siehe 3.3.1).

4.2.2.1 Einfluss der genetischen Polymorphismen des RAS auf die FSGN

Die Genotypverteilung der untersuchten Polymorphismen war vergleichbar in der Patienten- und in der Kontrollgruppe, d.h. die Polymorphismen prädisponierten nicht zum Auftreten der fokal segmental sklerosierenden Glomerulonephritis. Bei Patienten mit einem T-Allel des AGT-M235T Polymorphismus wurden höhere mittlere Blutdruckwerte und eine größere Anzahl von eingenommenen Antihypertensiva nachgewiesen (Abb. 42, 43). Der DD-Genotyp des ACE-Gen Polymorphismus war mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Tab. 17). Die Untersuchung des AT₁R-A1166C und die kombinierte Analyse der ACE-I/D und AGT-M235T Polymorphismen zeigte keinen signifikanten Befund.

In der Literatur existieren zwei Berichte über den Effekt der Polymorphismen des RAS auf die FSGN, in beiden Fällen handelt es sich um Studien bei Kindern (Tab. 40 a,b,c). Analog zu unseren Ergebnissen war der ACE-I/D Polymorphismus nicht mit dem Auftretsalter und der arteriellen Hypertonie assoziiert¹⁷⁹. Die Progression der Erkrankung wurde vom ACE-I/D aber nicht vom AGT-M235T oder dem AT₁R-A1166C Polymorphismus beeinflusst¹⁸⁰.

ACE-Gen I/D Polymorphismus und FSGN

Autor	Jahr	Land	Patienten (n)	Auftrettsalter	Nierenfunktion bei Diagnosestellung	Proteinurie	Hypertonie	Progression	Pathologie
Lee et al ¹⁷⁹	1997	Korea	30 (Kinder)	–	–	–	–	–	–
Fishberg et al ¹⁸⁰	1998	Israel	47 (Kinder)	–	–	–	–	+	–
eigene Ergebnisse	2001	BRD	62	–	–	–	–	+	–

Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus und FSGN

Autor	Jahr	Land	Patienten (n)	Auftrettsalter	Nierenfunktion bei Diagnosestellung	Proteinurie	Hypertonie	Progression	Pathologie
Fishberg et al ¹⁸⁰	1998	Israel	47 (Kinder)	–	–	–	–	–	–
eigene Ergebnisse	2001	BRD	62	–	–	–	+	–	–

AT₁ Rezeptor-Gen- A1166C Polymorphismus und FSGN

Autor	Jahr	Land	Patienten (n)	Auftrettsalter	Nierenfunktion bei Diagnosestellung	Proteinurie	Hypertonie	Progression	Pathologie
Fishberg et al ¹⁸⁰	1998	Israel	47 (Kinder)	–	–	–	–	–	–
eigene Ergebnisse	2001	BRD	62	–	–	–	–	–	–

Tabellen 40 a, b und c: Übersicht des Einflusses der genetischen Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems auf die fokale und segmental sklerosierende Glomerulonephritis anhand der Literatur und der eigenen Ergebnisse.

4.2.3 Membranöse Glomerulonephritis

Unser Kollektiv umfasste n= 44 Patienten mit bioptisch gesicherter membranöser Glomerulonephritis. Auch dieses Patientenkollektiv zeigte einen gravierenderen Verlauf im Vergleich zu anderen Berichten (eingetretene dialysepflichtige Niereninsuffizienz innerhalb der ersten 10 Jahren bei 47% unserer Patienten vs. 33% in der Literatur¹⁸¹). Von den erhobenen klinischen und laborchemischen Parametern zum Zeitpunkt der Biopsie war nur ein erhöhtes Ausgangsserumkreatinin mit einer schlechteren Prognose assoziiert (siehe 3.4.1, Tab. 25). Eine eingeschränkte Nierenfunktion bereits bei Diagnosestellung und das Vorliegen eines nephrotischen Syndroms wurden auch in der Literatur als die wichtigsten Progressionsfaktoren betrachtet¹³⁴.

4.2.3.1 Einfluss der genetischen Polymorphismen des RAS auf die membranöse Glomerulonephritis

In der vorliegenden Untersuchung war kein Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf die Inzidenz der membranösen Glomerulonephritis nachweisbar. Der AGT-M235T Polymorphismus beeinflusste den Schweregrad des Bluthochdrucks in Bezug auf die Anzahl der verordneten Antihypertensiva (Abb. 52). Der ACE-I/D Polymorphismus war mit der Progression der membranösen Glomerulonephritis assoziiert (Abb. 50). Die kombinierte Analyse der ACE-I/D und AGT-M235T Polymorphismen erlaubte eine noch präzisere Identifizierung der Genotypkonstellationen, die mit einer schlechteren Prognose verknüpft waren (Abb. 55, 59). Ein Zusammenhang des AT₁R-A1166C mit den untersuchten Parametern wurde nicht festgestellt. Unsere Resultate stehen in Unstimmigkeit mit einer anderen Studie, die keine Assoziation der ACE-I/D und AGT-M235T Polymorphismen mit der Progression der membranösen Glomerulonephritis beobachtete¹⁸² (Tab. 41 a,b,c).

ACE-Gen I/D Polymorphismus und membranöse GN

Autor	Jahr	Land	Patienten (n)	Auftrittssalter	Nierenfunktion bei Diagnosestellung	Proteinurie	Hypertonie	Progression	Pathologie
Perrichot et al ¹⁸²	1996	Frankreich	78			-	-	-	
eigene Ergebnisse	2001	BRD	44	-	-	-	-	+	

Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus und membranöse GN

Autor	Jahr	Land	Patienten (n)	Auftrittssalter	Nierenfunktion bei Diagnosestellung	Proteinurie	Hypertonie	Progression	Pathologie
Perrichot et al ¹⁸²	1996	Frankreich	78			-	-	-	
eigene Ergebnisse	2001	BRD	44	-	-	-	+	-	

AT₁ Rezeptor-Gen- A1166C Polymorphismus und membranöse GN

Autor	Jahr	Land	Patienten (n)	Auftrittssalter	Nierenfunktion bei Diagnosestellung	Proteinurie	Hypertonie	Progression	Pathologie
eigene Ergebnisse	2001	BRD	44	-	-	-	-	-	

Tabellen 41 a, b und c: Übersicht des Einflusses der genetischen Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems auf die membranöse Glomerulonephritis anhand der Literatur und der eigenen Ergebnisse.

4.3 Vom Genotyp zum Phänotyp

4.3.1 Angiotensin I-Converting Enzym-Gen I/D Polymorphismus

Vom ACE-I/D Polymorphismus zum ACE-Spiegel

Der genaue Mechanismus, mit dem der ACE-I/D Polymorphismus den ACE-Spiegel beeinflusst, ist noch nicht völlig geklärt. Die ACE-Serumkonzentration könnte von drei Faktoren abhängen: a) Synthese in den Zellen, b) Freisetzung ins Plasma und c) Entfernung aus der Zirkulation. Da ein Einfluss des ACE-I/D Polymorphismus auch auf Gewebeebene nachweisbar ist^{6, 7} muss man von einer Modulation während der Synthese in den Zellen ausgehen. Der Nachweis von erhöhten zytoplasmatischen ACE-mRNA-Konzentrationen beim D-Allel unterstützt diese Schlussfolgerung¹⁸³.

ACE-I/D: Marker oder funktioneller Genlocus?

Die Frage, ob der ACE-I/D Locus funktionell ist oder nicht, bleibt immer noch Gegenstand der Diskussion. Für eine Funktionalität spricht die Tatsache, dass ein Teil der im D-Allel nicht vorhandenen Sequenz sehr ähnlich mit einer bekannten Unterdrückungssequenz ist¹⁸⁴. Es bestehen Hinweise dafür, dass diese Unterdrückungssequenz beim I-Allel durch Suppression der Transkription die Menge des produzierten Enzyms reguliert¹⁸⁵. Ihre Abwesenheit könnte die beschriebene Überexpression des ACE-Gens¹⁸³ und demzufolge die höheren ACE-Spiegel beim D-Allel erklären. Es handelt sich um eine sehr verlockende Hypothese, es gibt aber auch Argumente, die dagegen sprechen. In einer kombinierten Segregation- und Kopplungsstudie ergaben sich starke Hinweise dafür, dass der ACE-I/D Polymorphismus nicht direkt an der genetischen Regulation des ACE-Spiegels beteiligt ist, sondern nur ein neutraler Marker eines anderen wirklich funktionellen Genlocus ist. Dieser funktionelle Genlocus soll sehr nah am I/D Locus liegen und deswegen fast immer zusammen mit ihm vererbt werden¹⁸⁶. Gegen eine Funktionalität des ACE-I/D Polymorphismus spricht auch der Befund, dass er keinen Einfluss auf den Spiegel des testikulären ACE hat, obwohl sich der Promoter für das testikuläre ACE-mRNA im Intron 12 befindet (siehe 2.4.2.3) und das testikuläre ACE-mRNA die nachfolgenden Introne und Exone, Intron 16 inklusive (in dem der I/D Polymorphismus liegt), enthält¹⁸⁷.

Regulierung der Expression des ACE-Gens: einer oder mehrere Genloci?

Die nicht hundertprozentige Abhängigkeit des ACE-Spiegels vom ACE-I/D Polymorphismus ist durch die Mitwirkung von weiteren modulatorischen Genloci zu verstehen (abgesehen von

sekundären z.B. hormonellen Einflüssen). Der ACE-I/D Polymorphismus von alleine kann nicht die gesamte intrafamiliäre Ähnlichkeit der ACE-Serumaktivität erklären⁸⁶. Hinweise für die Existenz eines zweiten theoretischen Genlocus, ebenfalls mit Einfluss auf den ACE-Spiegel, weit entfernt¹⁸⁸ (möglicherweise auf einem anderen Chromosom) oder im ACE-Gen¹⁸⁷ (z.B. in der 5' „flanking“ Region) haben sich bereits ergeben.

Vom ACE-Spiegel zur Klinik

Die ACE-Serumkonzentration gilt generell nicht als geschwindigkeitsbestimmend bei der Konvertierung von Ang-I in Ang-II. Trotzdem führte eine erhöhte ACE-Expression in der Arterienwand zu einer gesteigerten lokalen Umwandlung von Ang-I in Ang-II¹⁸⁹ und zu morphologischen Veränderungen in Form einer Hypertrophie¹⁹⁰. Auch der Serumspiegel des Angiotensin I-Converting Enzyms korrelierte mit der Wandbreite der großen Arterien¹⁹¹. Erhöhte ACE-Konzentrationen dürften also von klinischer Bedeutung sein.

Der DD-Genotyp des ACE-I/D Polymorphismus wurde mit einer gesteigerten Umwandlung von Ang-I in Ang-II^{192, 193} und einer erhöhten Reaktion auf Ang-I Infusion^{192, 194} assoziiert. Diese Beobachtungen konnten in anderen Studien nicht bestätigt werden^{195, 196, 197}. Ein erhöhter Ang-II-Serumspiegel beim DD-Genotyp war außerdem in keiner der Arbeiten nachweisbar^{192, 194, 195, 196, 197}. Die durch den ACE-I/D Polymorphismus bedingte Erhöhung des ACE-Spiegels scheint also keine Auswirkung auf das Hauptendprodukt des RAS (Ang-II) zu haben, zumindest welches die Serumkonzentration betrifft. Über die Ang-II Konzentration auf Gewebeebene existieren zur Zeit noch keine Berichte. Ebenfalls mehr Aufmerksamkeit bedarf der Einfluss des ACE-I/D Polymorphismus auf den Metabolismus anderer Substrate des „Angiotensin Converting Enzyms“ (z.B. Effekt auf die Bradykinindegredierung^{198, 194, 199} und demzufolge auf die NO-Synthese²⁰⁰).

ACE-Serumkonzentration, ACE-I/D Polymorphismus und arterielle Hypertonie

Eine Assoziation des ACE-I/D Polymorphismus mit der arteriellen Hypertonie war nicht nachweisbar⁹. Es handelte sich um keinen überraschenden Befund: Die ACE-Serumaktivität selber (durch die der ACE-I/D Polymorphismus seine Wirkung ausüben soll) korreliert nicht zum arteriellen Blutdruck^{83, 201}. In transgenen Mäusen mit einer, zwei oder drei Kopien des ACE-Gens, war die ACE-Serumaktivität zwar direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Genkopien, ein Einfluss auf den arteriellen Blutdruck bestand jedoch nicht²⁰².

4.3.2 Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus

Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus: Marker oder funktioneller Genlocus?

Eine rationale Erklärung, wie diese Punktmutation und die daraus resultierende Änderung der Primärstruktur (Umwandlung von Methionin in Threonin in Aminosäure 235) die Menge des produzierten Angiotensinogens steigern könnte, ist nicht eruierbar. Deswegen muss angenommen werden, dass es sich um einen inaktiven aber immerhin guten Marker eines funktionellen Genlocus handelt. Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei der funktionellen Variante um den G(-6)A Polymorphismus des AGT-Gens²⁰³. Dieser Polymorphismus wurde bereits von Jeunemaitre et al zusammen mit dem M235T Polymorphismus beschrieben⁴¹. Er wurde jedoch für einige Jahre nicht weiter untersucht, da er in einem fast totalen Kopplungsungleichgewicht mit ihm vererbt wird. Erst auf der Suche nach dem funktionellen Genlocus hat er wieder Aufmerksamkeit erregt. Der G(-6)A Polymorphismus (Umwandlung von Guanin in Adenin am Nukleotid in der Position -6) liegt im Promoter des AGT-Gens. Das AGT-Gen-Promoterelement 1 (Nukleotide -25 bis -1) nimmt durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren eine bedeutende Rolle in der Genexpression ein^{93, 204, 205}. Eine genetische Variation in dieser Region könnte in kausalem Zusammenhang mit der Menge der Angiotensinogen-Produktion stehen. Die G/A Substitution am Nukleotid -6 führt tatsächlich zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität des Promoters *in vitro*²⁰⁶. Durch die Überexpression des AGT-Gens lässt sich der beschriebene Zusammenhang des G(-6)A Polymorphismus zur arteriellen Hypertonie^{203, 207} -im Gegensatz zum M235T Polymorphismus- kausalistisch erklären. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass der G(-6)A Polymorphismus für die individuelle Unterschiede im AGT-Spiegel verantwortlich ist und der M235T Polymorphismus nur als Marker aufgrund ihrer engen Kopplung von Bedeutung ist.

Vom Angiotensinogenspiegel zur Klinik

Lange Zeit wurde die von Renin katalysierte Degradation von AGT in Ang-I als eine Reaktion nullter Ordnung betrachtet, d.h. die produzierte Ang-I Menge sei ausschließlich von der Plasmareninaktivität und nicht vom AGT-Spiegel abhängig. Später wurde jedoch bewiesen, dass die AGT-Konzentration im Serum sehr nah an der Michaelis Konstante liegt²⁰⁸. Daraus resultiert, dass der AGT-Spiegel neben der Reninkonzentration eine wichtige Rolle bei der Regulation der Ang-I Produktion spielt. Demzufolge sollte theoretisch der höhere AGT-Spiegel beim T-Allel zu erhöhten Konzentrationen von Ang-II und Aldosteron führen. Ein

Zusammenhang des AGT-M235T Polymorphismus zu den Endprodukten des RAS konnte jedoch nicht bestätigt werden⁵⁰. Als Erklärung dafür wurde vorgeschlagen, dass die vermutete Erhöhung des Ang-II Spiegels durch eine Runterregulierung des Renins kompensiert wird. Beim T-Allel liegt tatsächlich ein subprimiertes Renin vor²⁰⁹. Selbst nach Stimulation mit Estrogenen stieg zwar der AGT-Spiegel (beim TT- stärker als beim MM- Genotyp), die Ang-I und Ang-II Konzentrationen blieben aber unverändert, kompensiert durch eine verminderte Reninfreisetzung²¹⁰.

Obwohl es nicht eindeutig bewiesen werden konnte, dass ein erhöhter AGT-Spiegel zu einer Hochregulierung des RAS führt, besteht kein Zweifel daran, dass die AGT-Serumkonzentration mit den arteriellen Blutdruckwerten in Verbindung steht^{211, 212, 213}. In transgenen Mäusen mit 0,1,2,3 oder 4 Kopien des AGT-Gens korrelierte die Anzahl der vorhandenen Genkopien fast linear zur AGT-Konzentration und zum arteriellen Blutdruck²¹⁴. Schließlich ist der Zusammenhang des AGT-M235T-Polymorphismus mit dem AGT-Serumspiegel^{169, 170, 44} und der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie^{169, 170, 171, 172, 173, 44} in zahlreichen Studien belegt worden.

Es ist davon auszugehen, dass der AGT-M235T Polymorphismus, seinen Einfluss auf die kardiovaskulären und renalen Erkrankungen nicht ausschließlich durch die Erhöhung des systemischen Blutdrucks bewirkt, sondern auch -oder eventuell sogar vorwiegend- durch die erhöhte lokale Aktivität des RAS in den Geweben. Der AGT-M235T Polymorphismus wurde z.B. mit einer Verdoppelung des Risikos für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit unabhängig vom arteriellen Blutdruck (Multivariantenanalyse) assoziiert⁴².

4.3.3 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C Polymorphismus

Wer ist der intermediäre Phänotyp?

Im Gegensatz zu dem ACE-I/D und dem AGT-M235T Polymorphismus, bei den der intermediäre Phänotyp von Anfang an eindeutig war (ACE- bzw. AGT-Spiegel), bleibt im Fall des AT₁R-A1166C Polymorphismus der Hintergrund für den Zusammenhang zur arteriellen Hypertonie immer noch unerforscht. Eine gesteigerte Antwort der Arterien auf Phenylepinephrin²¹⁵ und Methylegonovin²¹⁶ (Ang-II übt seine vasokonstriktive Wirkung teilweise durch die Steigerung der α -adrenigenischen Signale²¹⁷) und auf Ang-II⁵² ist beim C-Allel beschrieben worden. Diese Hyperreaktivität der Arterien auf Ang-II wäre auf eine erhöhte Rezeptorenanzahl auf der Zelloberfläche oder auf eine erhöhte Affinität des

Rezeptors zurückzuführen. Der AT₁R-A1166C Polymorphismus beeinflusst jedoch weder die Anzahl und die Affinität der AT₁Rezeptoren auf Thrombozyten⁵⁰ noch die Komponenten des RAS^{50,51}. Um die gesteigerte Antwort auf Ang-II bei unveränderter Basiskonzentration und Affinität der AT₁Rezeptoren zu erklären, wurde folgendes Model vorgeschlagen: Der Polymorphismus soll die „übliche“ (normale) Runterregulierung des AT₁R-Gens als Antwort auf hohe Ang-II Konzentrationen unterdrücken⁵⁵. Bei erhöhten Ang-II Spiegeln wären dann die Patienten mit dem C-Allel der vollen Ang-II Wirkung ausgesetzt, da der protektive Mechanismus der Rezeptorenrunterregulierung unterdrückt sein soll. Auch dieses Model ist jedoch auf molekularbiologischer Ebene noch nicht bestätigt worden. Die Frage nach dem intermediären Phänotyp des AT₁R-A1166C Polymorphismus lässt sich also bis lang nicht beantworten.

AT₁R-A1166C: Marker oder funktioneller Genlocus?

Der AT₁R-A1166C Polymorphismus liegt nicht in der kodierenden Region sondern am 5' Ende der 3' „untranslated“ Region, hat also keine Auswirkung auf die Struktur (und demzufolge auch auf die Affinität) des AT₁Rezeptors. Wenn überhaupt könnte er nur die Menge des produzierten Proteins beeinflussen. Selbst das gilt als unwahrscheinlich, da er kein potentielles mRNA Polyadenylierungs- oder Destabilisierungssignal ändert⁴⁹. Obwohl es nicht völlig ausgeschlossen werden kann, dass dieser Polymorphismus eine funktionelle Bedeutung hat, ist es dementsprechend viel wahrscheinlicher, dass es sich um einen inaktiven Marker einer funktionellen Variation handelt.

Dieser funktionelle Genlocus könnte theoretisch die Genexpression durch Regulation der Transkriptionsaktivität (5' „flanking“- , Promoterregion und vier erste nicht kodierende Exone) oder der mRNA-Stabilität (3' „untranslated“ Region) modifizieren. Ein Polymorphismus in der kodierenden Region könnte außerdem durch Änderung der Primärstruktur die Affinität oder die Internalisationsrate des AT₁Rezeptors beeinflussen. Auf der Suche nach diesem funktionellen Genlocus wurden der Promoter und die ersten vier nicht kodierenden Exone untersucht. Die dabei entdeckten Punktmutationen standen jedoch weder im Kopplungsungleichgewicht mit dem A1166C Polymorphismus noch waren sie mit der arteriellen Hypertonie assoziiert^{218, 219}. Fünf weitere Polymorphismen der kodierenden Region wurden beschrieben (zwei davon rufen eine Änderung der Primärstruktur hervor)²²⁰; ihre klinische Relevanz ist noch unerforscht. Theoretisch besteht außerdem die Möglichkeit, dass der funktionelle Genlocus sich in den Intronen oder weiter entfernt in der 3' Region befindet.

Vom AT₁R-A1166C Polymorphismus zur Klinik

In der Literatur häufen sich Berichte über den fehlenden Zusammenhang des AT₁R-A1166C Polymorphismus zum arteriellen Blutdruck^{63, 221, 66, 58, 222}, während nur wenige eine positive Assoziation bestätigen^{223, 224, 174}. Selbst Bonnardeaux et al in ihrer Erstbeschreibung bezeichneten diese Assoziation als eher schwach⁴⁹. Ein Einfluss des AT₁R-A1166C Genotyps auf die renale Hämodynamik im Ausgangsstatus oder nach Ang-II Infusion war nicht nachweisbar²²⁵. Der AT₁R-A1166C Polymorphismus scheint also -wenn überhaupt- nur eine geringe klinische Bedeutung zu haben. Charakteristisch dafür ist, dass seine Wirkung sich oft nicht als selbstständiger Risikofaktor sondern nur durch die Interaktion mit dem ACE-I/D Polymorphismus nachweisen lässt^{55, 56}.

5. Zusammenfassung und Schlussbetrachtung

Die chronische primäre Glomerulonephritis stellt eine der häufigsten Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz dar. Das Renin-Angiotensin-System gilt sowohl aufgrund seiner Rolle in der Regulation des systemischen Blutdrucks und der renalen Hämodynamik als auch wegen der proliferativen Wirkung seiner Endprodukte als einer der entscheidenden Faktoren, die zur Progression der chronischen Nierenerkrankungen beitragen. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss genetischer Polymorphismen des RAS auf die chronische Glomerulonephritis am Beispiel der IgA Nephropathie, der fokal und segmental sklerosierenden Glomerulonephritis und der membranösen Glomerulonephritis untersucht

Unser Kollektiv bestand aus n= 213 Patienten mit einer bioptisch gesicherten primären Glomerulonephritis (IgA Nephropathie: 107; fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis: 62; membranöse Glomerulonephritis: 44). Bestimmt wurden die drei wichtigsten Polymorphismen des RAS: der ACE-Gen I/D, der Angiotensinogen-Gen (AGT) M235T und der Angiotensin II-Typ1 Rezeptor-Gen (AT₁R) A1166C Polymorphismus. Beschrieben ist beim ACE-I/D Polymorphismus eine Korrelation zur ACE-Konzentration und beim AGT-M235T Polymorphismus eine Assoziation mit dem Angiotensinogenspiegel und der arteriellen Hypertonie. Der AT₁R-A1166C Polymorphismus ist in der in der Literatur ebenfalls mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie in Verbindung gebracht worden.

Bei Patienten mit IgA Nephropathie beeinflussten der ACE-I/D und der AGT-M235T Polymorphismus die Progression der Erkrankung und die Effektivität der ACE-Hemmung (Tab. 42). In der kombinierten Analyse zeigte sich eine Interaktion der ACE-I/D und AGT-M235T Polymorphismen. Der AGT-M235T Polymorphismus war zusätzlich mit dem Vorliegen eines nephrotischen Syndroms assoziiert.

Die Progression der FSGN war nur mit dem ACE-I/D Polymorphismus verknüpft. Möglicherweise aufgrund der kleinen Fallzahl wurde eine Signifikanz in der kombinierten Betrachtung der ACE-I/D und AGT-M235T Polymorphismen nicht erreicht.

Das D-Allel des ACE-I/D Polymorphismus ging mit einer schlechteren Prognose bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis einher. Die kombinierte Auswertung der ACE-I/D und AGT-M235T Genotypen erlaubte eine noch genauere Identifizierung der Patienten mit einem höheren Progressionspotenzial.

Der AGT-M235T Polymorphismus war bei allen Glomerulonephritisformen mit dem Schweregrad der arteriellen Hypertonie assoziiert. Wir konnten keinen Einfluss des AT₁R-

A1166C Polymorphismus auf die untersuchten Parameter bei allen Glomerulonephritisformen nachweisen.

	ACE-I/D	AGT-M235T	ACE I/D + AGT-235T(†)	AT ₁ R-A1166C
IgA Nephropathie	Progression (‡) Ansprechen auf ACE-Hemmung	Nephrotisches Syndrom Hypertonie Progression Ansprechen auf ACE-Hemmung	Progression Ansprechen auf ACE-Hemmung	–
FSGN	Progression	Hypertonie	–	–
Membranöse Glomerulonephritis	Progression	Hypertonie	Progression	–

Tabelle 42: Zusammenfassende Darstellung des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAS auf die klinischen Parameter der untersuchten Glomerulonephritisformen. (†) kombinierte Analyse der ACE-Gen I/D und Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismen (‡) signifikant nur in der nicht mit ACE-Hemmern therapierten Subgruppe

Zusammenfassend sprechen unsere Ergebnisse für einen wichtigen Stellenwert der ACE-I/D und AGT-M235T Polymorphismen als prognostische Progressionsmarker in der chronischen Glomerulonephritis. Die gemeinsame Analyse dieser genetischen Polymorphismen steigerte ihre Aussagekraft. Bestimmte genetisch determinierte Patientensubgruppen der IgA Nephropathie profitierten besonders von der Therapie mit ACE-Hemmern, während andere refraktär gegenüber der ACE-Hemmung waren. In Zukunft könnte die Therapieentscheidung abhängig von der Genotypkonstellation sein.

Da die vorliegende Studie zum größten Teil retrospektiv angelegt war, bestehen bestimmte Einschränkungen, die bei der Interpretation der Befunde möglicherweise mitberücksichtigt werden sollten. Die Patienten wurden nicht einheitlich behandelt. Die Therapiestrategien änderten sich über die Betrachtungsdauer der Studie und verschiedene blutdrucksenkende und immunsuppressive Medikamente wurden in unterschiedlicher Dosierung eingesetzt. Die angestrebte Blutdruckeinstellung variierte ebenfalls. In vielen Fällen wurden die dokumentierten Blutdruckwerte unter antihypertensiven Therapie gemessen, weil die Patienten antihypertensiv anbehandelt worden waren und die Werte vor Therapiebeginn nicht zur Verfügung standen.

Um die Fragestellungen dieser Pilotstudie und vor allem die Frage nach einer genetisch bedingten Suszeptibilität gegenüber der ACE-Hemmung eindeutig zu beantworten, sollten unsere Ergebnisse in größeren, randomisierten und prospektiv angelegten Langzeitstudien überprüft werden. Auch bei den Literaturberichten handelt es sich entweder um retrospektive Studien oder um inhomogene Patientenkollektive mit relativ kurzer Beobachtungsdauer (Tab. 39). Bis diese Befunde vorliegen, sollten alle Patienten mit einer chronischen Glomerulonephritis unabhängig vom Ihren Genotyp als Kandidaten für eine Therapie mit ACE-Hemmern betrachtet werden. Die Genotypisierung sollte zunächst nur als hinweisender Befund dienen und die Therapieentscheidung sollte nach wie vor anhand von klinischen Kriterien getroffen werden.

Um die Aussagekraft zukünftiger Untersuchungen zu steigern, wäre die Mitbestimmung des intermediären Phänotyps der Polymorphismen empfehlenswert. In der vorliegenden Studie wurde aus technischen Gründen zwar die ACE-Serumaktivität aber nicht der Angiotensinogenspiegel bestimmt.

In Zukunft wären außerdem weitere genetische Polymorphismen des RAS miteinzubeziehen. Zahlreiche Variationen der Gene, die für die Komponenten des RAS kodieren, wurden beschrieben, unter anderem auch 78 polymorphe Loci innerhalb des ACE-Gens²²⁶. Für einige dieser Polymorphismen ist eine Auswirkung auf molekularbiologischer Ebene bekannt (Tab. 43), die auf eine potentielle klinische Relevanz hindeutet. Diese sollte in klinischen Studien überprüft werden. Unter Umständen lässt sich in Zukunft durch Analyse mehrerer genetischer Polymorphismen das genetisch bedingte Risikoprofil jedes einzelnen Patienten bestimmen, um eine genauere Vorhersage über das individuelle Progressionspotential und die individuelle Suszeptibilität gegenüber der ACE-Hemmung treffen zu können.

Gen	Polymorphismus	Lokalisation	Änderung der DNA Sequenz	Änderung des Proteins	Autor
ACE	4656 (CT) _{2/3}	3' „untranslated“ Region	CTCT→CTCTCT	Konzentration	Villard et al ¹⁸⁷
AGT	A(-20)C	Promoter	A→C	Konzentration	Ishigami et al ²²⁷
	C(-18)T	Promoter	C→T	Konzentration	Sato et al ²²⁸
	G(-6)A	Promoter	G→A	Konzentration	Inoue et al ²⁰⁶
AT ₁ R	T(-810)A	5 „flanking“ Region	T→A	†	Poirier et al ²¹⁸
Aldosteron Synthase (CYP11B2)	C(-344)T	Promoter	C→T	‡	Brand et al ²²⁹

Tabelle 43: Genetische Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems mit einer potentiellen klinischen Relevanz (abgesehen von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten) und ihre Auswirkung auf die Komponenten des RAS. (†) A-Allel mit verringertem Risiko für Myokardinfarkt assoziiert, intermediärer Phänotyp unbekannt (‡) T-Allel mit höheren Aldosteronplasmaspiegeln⁵⁰ und mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie²²⁹ verknüpft.

5. Literatur

1. Corvol P, Jeunemaitre X, Plouin PF, Cambien F, Soubrier F. The application of molecular genetics to the study of familial arterial hypertension. *Clin Exp Hypert*, 1989; 11: 1053-1073
2. Naftilan AJ, Williams R, Burt D, Paul M, Pratt RE, Hobart P, Chirgwin J, Dzau V. Lack of genetic linkage of renin gene restriction fragment length polymorphisms with human hypertension. *Hypertension* 1989; 14: 219-224
3. Soubrier F, Jeunemaitre X, Rigat B, Houot AM, Cambien F, Corvol P. Similar frequencies of renin gene restriction fragment length polymorphisms in hypertensive and normotensive subjects. *Hypertension*. 1989; 14 712-717
4. Jeunemaitre X, Charru A, Rigat B, Hout AM, Soubrier F, Corvol P. Sib-pair linkage analysis of renin gene haplotypes in human essential hypertension. *Hum Genet* 1992; 88: 301-306
5. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86:1343-1346
6. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F. Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes. *Biochem J* 1993; 290: 33-40
7. Danser A, Schalekamp M, Bax W, van den Brink A, Saxena P, Riegger G, Schunkert H. Angiotensin-converting enzyme in the human heart: effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995; 92: 1387-1388
8. Mizuiri S, Yoshikawa H, Tanegashima M, Miyagi M, Kobayashi M, Sakai K, Hayaashi I, Ikawa A, Ohara T, Hasegawa A. Renal ACE immunohistochemical localization in NIDDM patients with nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 301-307
9. Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nature Genet* 1992; 1:72-75
10. Harrap SB, Davidson HR, Connor JM, Soubrier F, Corvol P, Fraser R, Foy CJW, Watt GCM. The angiotensin I-converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 1993; 21: 455-460
11. Higashimori K, Zhao Y, Higaki J, Kamitani A, Katsuya T, Nakura J, Miki T, Mikami H, Ogihara T. Association analysis of a polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene with essential hypertension in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 2: 399-404
12. Nakai K, Itoh C, Muira Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, Miyakawa T, Iwasaki R, Hiramori K. Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in Japanese. *Circulation* 1994; 90: 2199-2202
13. Beohar J, Damaraju S, Prather A, Yu BT, Raizner A, Kleinman N, Marian R. Angiotensin converting enzyme genotype DD is a risk for coronary heart disease. *J Invest Med* 1995; 43: 275-280

14. Staessen J, Wang J, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra A, Soubrier F, Vlietinck R, Fagard R. The deletion/insertion polymorphism of the converting-enzyme and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 1997; 15: 1579-1592
15. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou J-P, Arveiler D, Luc G, Bard J-M, Bara L, Richard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F. Deletion polymorphism in the gene of angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-644
16. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL. A meta-analysis of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme with myocardial infarction. *Circulation* 1996; 94: 708-712
17. Markus HS, Barley J, Lunt R, Bland JM, Jeffrey S, Carter ND, Brown MM. Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism: A new risk factor for lacunar stroke but not carotid atheroma. *Stroke* 1995; 26: 1329-1333
18. Kario K, Kanai N, Saito K, Nago N, Takefumi M, Shimada K. Ischemic stroke and the gene for angiotensin-converting enzyme in Japanese hypertensives. *Circulation* 1996; 93: 1630-1633
19. Strassen J, Kuznetsova T, Wang J, Emelianov D, Vlietinck R, Fagard R. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 1999; 17: 9-17
20. Schunkert H, Hense H-W, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GAJ. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1994; 330: 1634-1638
21. Iwai N, Ohmichi N, Nakamura Y, Kinoshita M. DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. *Circulation* 1994; 90: 2622-2628
22. Gharavi A, Lipkowitz M, Diamond J, Jhang J, Phillips R. Deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme is independently associated with left ventricular mass and geometric remodeling in systemic hypertension. *Am J Cardiol* 1996; 77: 1315-1319
23. Montgomery HE, Clarkson P, Dollery CM, Prasad K, Losi MA, hemingway H, Statters D, Unbb M, Girvain M, Varnava A, World M, Deanfield J, Talmud P, McEwan FR, Mc Kenna WJ, Humphries S. Association of angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism with change in left ventricular mass in response to physical training. *Circulation* 1997; 96: 741-747
24. Reynolds MV, Bristow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, Taft CS, Perryman MB. Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilative cardiomyopathy. *Lancet* 1993; 342: 1073-75
25. Castellano M, Muiesan M-L, Rizzoni D, Beschi M, Pasini G, Cinelli A, Salvetti M, Porteri E, Bettoni G, Kreutz R, Linpaintner K, Rosei EA. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population. The Vobarno study. *Circulation* 1995; 91: 2721-2724
26. Teranishi M, Ono H, Ishimitsu T, Matsuoka H. Insertion/deletion angiotensin converting enzyme polymorphism affects the microvascular structure of the kidney in patients with nondiabetic renal disease. *J Hypertens* 1999; 17: 351-356

27. Marre M, Bernadet P, Gallois Y, Savanger F, Guyene TT, Hallas M, Cambien F, Passa P, Alhenc-Geals F. Relationships between angiotensin converting enzyme polymorphism, plasma levels and diabetic retina and renal complications. *Diabetes* 1994; 43: 384-388
28. Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Hamada Y, Ueda H, Shintani M, Fukuda M, Ogihara. Meta-analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I-converting enzyme gene with diabetic nephropathy and retinopathy. *Diabetologia* 1998; 41: 47-53
29. Kunz R, Bork JP, Fritsche L, Ringel F, Sharma AM. Association between the angiotensin-converting enzyme-insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy: a methodological appraisal and systematic review. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 1653-1663
30. Tarnow L, Gluud C, Parving HH. Diabetic nephropathy and the insertion/deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1125-1130
31. Baboolal K, Ravine D, Daniels J, Williams N, Holmans P, Coles GA, Williams JD. Association of the angiotensin I converting enzyme gene deletion polymorphism with early onset of ESRF in PKD1 adult polycystic kidney disease. *Kidney Int* 1997; 52: 607-613
32. van Dijk M, Peters D, Breuning M, Chang P. The angiotensin-converting enzyme genotype and microalbuminuria in autosomal dominant polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 1999;10: 1916-1920
33. Perez-Oller L, Torra R, Badenas C, Mila M, Darnell A. Association of the angiotensin I converting enzyme gene deletion polymorphism with early onset of ESRF in PKD1 adult polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 1999; 34: 273-278
34. Broekroelofs J, Stegeman CA, Navis G, Tegzess AM, De Zeeuw D, De Jong PE. Risk factors for long-term renal survival after renal transplantation: a role for angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) polymorphism? *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 2075-2081
35. Adbi R, Tran HT, Zee R, Brenner, BM, Mitford EL. Angiotensin system gene polymorphisms identify patients at risk for chronic renal transplant dysfunction (abstract). *Transplantation* 2000; 69 (Suppl): S 381
36. Beige J, Scherer S, Weber A, Engeli S, Offermann G, Opelz G, Distler A, Sharma AM. Angiotensin-converting enzyme genotype and renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 1997; 8: 1319-1323
37. Beige J, Offermann G, Distler A, Sharma AM. Angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion genotype and long term renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 735-738
38. Gayagay G, Yu B, Hambly B, Boston T, Hahn A, Celermajer DS, Trent RJ. Elite endurance athletes and the ACE I allele – the role of genes in athletic performance. *Hum Genet* 1998; 103: 48-50
39. Montgomery HE, Marshall R, Hemingway H, Myerson S, Clarkson P, Dollery C, Hayward M, Holliman DE, Jubb M, World M, Thomas EL, Brynes AE, Saeed N, Barnard M, Bell JD, Prasad K, Rayson M, Talmud PJ, Humphries SE. Human gene for physical performance. *Nature* 1998; 393: 221-222
40. Myerson S, Hemingway H, Budget R, Martin J, Humphries S, Montgomery H. Human angiotensin I-converting enzyme gene and endurance performance. *J Appl Physiol* 1999; 87: 1313-1316

41. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev Y, Lifton R, Williams C, Charru A, Hunt S, Hopkins S, Williams R, Lalouel J, Corvol P. Molecular basis of human hypertension: the role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 169-180
42. Katsuya T, Koike G, Yee T, Sharpe N, Jackson R, Norton R, Horiuchi M, Pratt R, Dzau V, Mac Mahon S. Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease. *Lancet* 1995; 345: 1600-1603
43. Ishigami T, Umemura S, Iwamoto T, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nyui N, Kimura K, Miyazaki N, Ishii M. Molecular variant of angiotensinogen gene is associated with coronary atherosclerosis. *Circulation* 1995; 91: 951-954
44. Winkelmann BR, Russ AP, Nauck M, Klein B, Bohm BO, Maier V, Zoth R, Matheis G, Wolf A, Wieland H, Groß W, Galton D. Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease. *Am Heart J* 1999; 137: 698-705
45. Kamitani A, Rakugi H, Higaki J, Ohishi M, Shi SJ, Takami S, Nakata Y, Higashino Y, Fujii K, Mikami H, Miki T, Ogihara T. Enhanced predictability of myocardial infarction in Japanese by combined genotype analysis. *Hypertension* 1995; 25: 950-953
46. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington PF, Ogasawara M, Suzumori K, Tomoda S, Berrebi S, Sasaki M, Corvol P, Lifton RP, Lalouel JM. A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. *Nature Genet* 1993; 4 : 59-61
47. Schmidt S, Giessel R, Bergis KH, Strojek K, Gzesczak W, Ganten D, Ritz E. Angiotensinogen gene M235T polymorphism is not associated with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 1755-1761
48. Ringel J, Beige J, Kunz R, Distler A, Sharma AM. Genetic variants of the renin-angiotensin system, diabetic nephropathy and hypertension. *Diabetologia* 1997; 40: 193-199
49. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 1994; 24: 63-69
50. Pailard F, Chansel D, Brand E, Benetos A, Thomas F, Czekalski S, Ardaillou R, Soubrier F. Genotype phenotype relationships of the RAS in a normal population. *Hypertension* 1999; 34: 423-429
51. Miller JA, Thai K, Scholey JW. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism predicts response to losartan and angiotensin II. *Kidney Int* 1999; 56: 2173-2180
52. van Geel P, Pinto Y, Voors A, Buikema H, Oosterga M, Crijns H, van Gilst W. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries. *Hypertension* 2000; 35: 717-721
53. Fatini C, Abbate R, Pepe G, Battaglini B, Gensini F, Ruggiano G, Gensini GF, Guazzelli R. Searching for a better assessment of the individual coronary risk profile. The role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type 1 receptor and angiotensinogen polymorphisms. *Eur Heart*. 2000; 21: 633-638

54. Nakauchi Y, Suehiro T, Yamamoto M, Yasuoka N, Ari K, Kumon Y, Hamashige N, Hashimoto K. Significance of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism as a risk factor for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 1996; 125: 161-169
55. Tiret L, Bonnardeaux A, Poirier O, Marques-Vidal P, Evans A, Arveilier D, Luc G, Kee F, Ducimetiere P, Soubrier F, Cambien F. Synergistic effects of angiotensin-converting enzyme gene and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in risk of myocardial infarction. *Lancet* 1995; 344: 910-913
56. Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarey V, Coto E. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease. *Cardiovasc Res* 1998; 40: 375-379
57. Gardemann A, Nguyen QD, Humme J, Stricker J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W. Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism: absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial infarction and of a synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these diseases. *Eur Heart J* 1998; 19: 1657-1665
58. Takami S, Katsuya T, Rakugi H, Sato N, Nakata Y, Kamitani A, Miki T, Higaki J, Ogihara T. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with increase of left ventricular mass but not with hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11 : 316-321
59. Castellano M, Muiesan M, Beschi M, Rizzoni D, Cinelli A, Salvetti M, Pasini G, Porteri E, Bettoni G, Zulli R, Agabiti-Rosei E. Angiotensin II type 1 receptro A/C¹¹⁶⁶ polymorphism. Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. *Hypertension* 1996; 28: 1076-1080
60. Hamon M, Amant C, Bauters C, Richard J, Helbecque N, McFadden E, Lablanche J, Bertrand B, Amouyel P. Association of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor genotypes with left ventricular function and mass in patients with angiographically normal coronary arteries. *Heart* 1997; 77: 502-505
61. Osterop A, Kofflard M, Sandkuijl L, Cate F, Krams R, Schalekamp M, Danser A. AT1 receptor A/C1166 polymorphism contributes to cardiac hypertrophy in subjects with hypertrophic cardiomyopathy. *Hypertension* 1998; 32: 825-830
62. Tiret L, Mallet C, Poirier O, Nicaud V, Millaire A, Bouhour J, Roizes G, Desnos M, Dorent R, Schwarz K, Cambien F, Komajda M. Lack of association between polymorphisms of eight candidate genes and idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 29-35
63. Benetos A, Topouchian J, Ricard S, Gutier S, Bonnardeaux A, Asmar R, Poirier O, Soubrier F, Safar M, Cambien F. Influence of angiotensin II type 1 receptor polymorphism in aortic stiffness in never-treated hypertensive patients. *Hypertension* 1995; 26: 44-47
64. Benetos A, Cambien F, Gautier S, Ricard S, Safar M, Laurent S, Lacolley P, Poirier O, Topouchian J, Asmar R. Influence of the angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism on the effects of perindopril and nitredipine on arterial stiffness in hypertensive individuals. *Hypertension* 1996; 28: 1081-1084
65. Benetos A, Gautier S, Ricard S, Topouchian J, Asmar R, Poirier O, Lorosa E, Guize L, Safar M, Soubrier F, Cambien F. Influence of angiotensin-converting enzyme and angiotensin-II type 1

- receptor gene polymorphisms on aortic stiffness in normotensive and hypertensive patients. *Circulation* 1996; 94: 698-703
66. Cirerd X, Hanon O, Mourad J, Boutouyrie P, Laurent S, Jeunemaitre X. Lack of association between renin-angiotensin system gene polymorphisms and wall thickness of the radial and carotid arteries. *Hypertension* 1998; 32: 579-583
67. Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen F, Hansen B, Richard S, Poirier O, Parving HH. Angiotensin-II type 1 receptor gene polymorphism and diabetic microangiopathy. *Nephrol Dial Transplant* 1996; 11: 1019-1023
68. Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, Dusselier L, Kahal Z, Chaillous L, Halami S, Muller A, Sackmann H, Bauduceau B, Bled F, Passa P, Alhenc-Gelas F. Contribution of genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99: 1585-1595
69. Yudkin JS, Andres C, Mohamed A, Gould M, Pnahloo A, Haines A, Humphries S, Talmud P. The angiotensin-converting enzyme gene and the angiotensin II type 1 receptor gene as candidate genes for microalbuminuria. A study in non-diabetic and non-insulin dependent diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2188-2191
70. Morgan L, Crawshaw S, Baker P, Edwards R, Broughton Pipkin F, Kalsheker N. Functional and genetic studies of the angiotensin II type 1 receptor in pre-eclamptic and normotensive pregnant women. *J Hypertens* 1997; 15: 1389-1396
71. Wei L, Alhenc-Gelas F, Soubrier F, Michaud A, Corvol P, Clauser E. Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a c-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzyme. *J Biol Chem* 1991; 266: 5540-5546
72. Erdös E, Skidgel RA. The angiotensin I- Converting Enzyme. *Lab Invest* 1987; 56: 346-348
73. Schulz WW, Hagler HK, Buja LM, Erdös EG. Ultrastructural localization of angiotensin I converting enzyme (EC 3.4.15.1) and neutral metalloendopeptidase (EC 3.4.24.11) in the proximal tubulus of the human kidney. *Lab Invest* 1988; 59: 789-797
74. Mattei MG, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Roeckel N, Corvol P, Soubrier F. Angiotensin I converting enzyme gene is on chromosome 17. *Cytogenet Cell Genet* 1989; 51: 1041
75. Soubrier F, Alhenc-Gelas, Hubert C, Allegrini J, John M, Tregear G, Corvol P. Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 9386-9390
76. Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I- converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991; 266: 15377-15383
77. Wei L, Alhenc-Gelas F, Corvol P, Clauser E. The two homologous domains of the human angiotensin I-converting enzyme are both catalytically active. *J Biol Chem* 1991; 266: 9002-9008
78. Lation AI, Soubrier F, Allegrini J, Hubert C, Corvol P, Alhenc Gelas F. The testicular transcript of the angiotensin I-converting enzyme encodes for the ancestral, non-duplicated form of the enzyme. *FEBS* 1989; 252: 99-104

79. Ehlers MRW, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: The testis isoenzyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 7741-7745
80. Cornell MH, Williams TA, Lamango LS, Coates D, Corvol P, Soubrier F, Hoheisel J, Lehrach H, Isaac RE. Cloning and expression of an evolutionary conserved single-domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem* 1995; 270: 13613-13619
81. Alhenc-Gelas F, Weare J, Johnson R, Erdös E. Measurement of human converting enzyme level by direct radioimmunoassay. *J Lab Clin Med* 1983; 101: 83-96
82. Alhenc-Gelas F, Richard J, Courbon D, Warnet JM, Corvol P. Distribution of plasma angiotensin I-converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters. *J Lab Clin Med* 1991; 117: 33-39
83. Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakotovo R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 774-780
84. Mullis KB, Fallona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350
85. Shanmugam V, Sell K, Saha B. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Methods and Applications* 1993; 3:120-121
86. Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry* 1984; 23: 3603-3609
87. Sealey JE, Gerten-Banes J, Laragh JH. The renin system: variations in man measured by radioimmuno- or bioassay. *Kidney Int* 1972; 1: 240-253
88. Clauser E, Gailard I, Wel L, Corvol P. Regulation of angiotensinogen gene. *Am J Hypertens* 1989; 2: 403-410
89. Brasier AR, Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension* 1996; 27: 465-475
90. Isa MN, Boyd E, Morrison N, Harrap S, Clauser E, Connor JM. Assignment of the human angiotensinogen gene to chromosome 1q42-43 by non-isotopic in situ hybridization. *Genomics* 1990; 8: 598-600
91. Gailard I, Mattei MG, Clauser E, Corvol P. Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Hum Genet* 1990; 84: 341-343
92. Gailard I, Clauser E, Corvol P. Structure of Human Angiotensinogen Gene. *DNA* 1989; 8: 87-99
93. Fukamizu A, Takahashi S, Seo MS, Tada M, Tanimoto K, Uehara S, Murakami K. Structure and expression of the human angiotensinogen gene: identification of a unique and highly active promoter. *J Biol Chem* 1990; 265:7576-7582
94. Chiu T, Herblin W, Mc Call D, Ardecky R, Carini D, Duncia J, Pease L, Wong P, Wexler R, Jonson A, Timmermans P. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Bioch Biophys Res Commun* 1989; 165: 196-203

95. Kakinuma Y, Fogo A, Inagami T, Ichikawa I. Intrarenal localization of angiotensin II type 1 receptor mRNA in the rat. *Kidney Int* 1993; 43: 1229-1235
96. Curnow KM, Pascoe L, White PC. Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 1992; 6: 113-118
97. Szpirer C, Riviere M, Szpirer J, Levan G, Guo DF, Iwai N, Inagami T. Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type 1 angiotensin II receptor genes and A5 gene. *J Hypertens* 1993; 11: 919-925
98. Futura H, Guo DF, Inagami T. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin type 1 receptor. *Bioch Biophys Res Commun* 1992; 183: 8-13
99. Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Nakao R, Yanase T, Haji M, Inagami T, Furuta H, Gou DF, Nakamuta M, Nawata H. Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. *Bioch Biophys Res Commun* 1992; 183: 910-916
100. Guo DF, Furuta H, Mizukoshi M, Inagami T. The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor. *Bioch Biophys Res Commun* 1994; 200: 313-319
101. Hardy GH. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 1908; 28:49-50
102. Mitch WE. A simple method of estimating progression of chronic renal failure. *Lancet* 1976; 18: 1326-1327
103. Navar LG, Rasiball L. Contribution of the renin angiotensin system on the control of intrarenal hemodynamics. *Kidney Int* 1984; 25: 857-868
104. Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies. *Am J Med* 1982; 72: 375-380
105. Johnson RJ, Alpers CE, Yoshimura A, Lombardi D, Pritzl P, Floege U, Schwartz SM. Renal injury from angiotensin II-mediated hypertension. *Hypertension* 1992; 19: 464-474
106. Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am J Pathol* 1992; 140: 95-107
107. Ray PC, Bruggemann LA, Horikoshi S, Aguilera G, Klotman PE. Angiotensin II stimulates human fetal mesangial cell proliferation and fibronectin biosynthesis by binding to AT₁ receptors. *Kidney Int* 1994; 45: 177-184
108. Orth S, Weinreich T, Bonisch S, Weih M, Ritz E. Angiotensin II induces hypertrophy and hyperplasia in adult human mesangial cells. *Exp Nephrol* 1995; 3: 23-33
109. Homma T, Hoover RL, Ichikawa I, Harris RC. Angiotensin II (All) induces hypertrophy and stimulates collagen production in cultured rat glomerular mesangial cell (MC) (abstract). *Clin Res* 1990; 38: 358A
110. Anderson PW, Do YS, Hsueh WA. Angiotensin II causes mesangial cell hypertrophy. *Hypertension* 1993; 21: 29-35
111. Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor- β expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1994; 93: 2431-2437

112. Wolf G, Killen PD, Neilson EG. Intracellular signaling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells. *Cell Regul* 1991; 2: 219-227
113. Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor- β . *J Clin Invest* 1993; 92: 1366-1372
114. Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and *c-myc* gene by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1992; 83: 1419-1424
115. Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons G, Dzau VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1993; 91: 2268-2274
116. Vaughan DE, Lazos SA, Tong K. Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor-1. *J Clin Invest* 1995; 95: 995-1001
117. Feener EP, Noerthup JM, Aiello LP, King GL. Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and 2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 1353-1362
118. Wolf G, Ziyadeh FN, Thaïss F, Tomaszewski J, Caron RJ, Wenzel U, Zahner G, Helmchen U, Stahl RA. Angiotensin II stimulates expression of the chemokine Rantes in rat glomerular endothelial cells: Role of the angiotensin type 2 receptor. *J Clin Invest* 1997; 100: 1047-1058
119. Naftilan AJ, Pratt RE, Eldridge CS, Lin HL, Dzau VJ. Angiotensin II induces *c-fos* expression in smooth muscle via transcriptional control. *Hypertension* 1989; 13: 706-711
120. Itoh H, Pratt RE, Dzau VJ. Interaction of atral natriuretic polypeptide and angiotensin II on protooncogene expression and vascular cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176: 1601-1609
121. Rupprecht HD, Dann P, Sukhatme VP, Sterzel RB, Coleman DL. Effect of vasoactive agents on induction of *Egr-1* in rat mesangial cells: correlation with mitogenicity. *Am J Physiol* 1992; 263: F623-F636
122. Coppo R, Amore A, Gianoglio B, Cacace G, Picciotto G, Roccatello D, Peruzzi L, Piccoli G, Filippi P. Angiotensin II local hyperreactivity in the progression of IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1993; 21: 593-602
123. Hommel E, Parving HH, Matheisen E, Edsberg B, Damkhaer Niesen M, Giese J. Effect of captopril on kidney function in insulin-dependent diabetic patients with nephropathy. *Br Med J* 1986; 293: 467-470
124. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Eng J Med* 1993; 329: 1456-1462
125. The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia). Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. *Lancet* 1997; 349: 1857-1863

126. Cattran DC, Greenwood C, Ritchie S. Long-term benefit of angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in patients with severe immunoglobulin A nephropathy: A comparison in patients receiving treatment with other antihypertensive agents and to patients receiving no therapy. *Am J Kidney Dis* 1994; 23: 247-254
127. Maschio G, Cagnoli L, Claroni F, Fusaroli M, Rugiu C, Sanna G, Sasdelli M, Zuccala A, Zucchelli P. ACE inhibition reduces proteinuria in normotensive patients with IgA nephropathy: A multicentre, randomized, placebo-controlled study. *Nephrol Dial Transplant* 1994; 9: 265-269
128. Feriozzi S, Pierucci A, Roscia E, Cinotti GA, Pecci G. Angiotensin converting enzyme inhibition delays the progression of chronic renal failure in hypertensive patients with immunoglobulin A nephropathy. *J Hypertens* 1989; 7: S63-S64
129. Rekola S, Bergstrand A, Buckt H. Deterioration rate in IgA nephropathy: comparison of a converting enzyme-inhibitor and β -blocking agents. *Nephron* 1991; 59: 57-60
130. Ganesvoort RT, de Zeeuw D, de Jong PE. Dissociation between the course of the hemodynamic and antiproteinuric effects of angiotensin I converting enzyme inhibition. *Kidney Int* 1993; 44: 579-584
131. Remuzzi A, Peticucci E, Ruggenti P, Mosconi L, Limonta M, Remuzzi G. Angiotensin converting enzyme inhibition improves glomerular size-selectivity in IgA nephropathy. *Kidney Int* 1991; 39: 1267-1273
132. Kakimura Y, Khawamura T, Bills T, Yoshioka T, Ichikawa I, Fogo A. Blood pressure independent effect of angiotensin inhibition on the glomerular and non-glomerular vascular lesions of chronic renal failure. *Kidney Int* 1992; 42: 46-55
133. Peters H, Boerder WA, Noble NA. Targeting TGF- β overexpression in renal disease: Maximizing the antifibrotic action of angiotensin blockade. *Kidney Int* 1998; 54: 1570-1580
134. D'Amico G. Influence of clinical and histological features on actuarial renal survival in adult patients with idiopathic IgA nephropathy, membranous nephropathy and membranoproliferative glomerulonephritis: survey of the recent literature. *Am J Kidney Dis* 1992; 20: 315-323
135. Ibels LS, Gyory A. IgA nephropathy: analysis of the natural history, important factors in the progression of renal disease and a review of the literature. *Medicine* 1994; 73: 79-102
136. Schena FP. A retrospective analysis of the natural history of primary IgA nephropathy worldwide. *Am J Med* 1990; 89: 209-215
137. Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T, Kitajima T, Miyazaki Y, Nagasawa R, Kawaguchi Y, Kubo H, Ichikawa I, Sakai O. Role of the deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in the progression and therapeutic responsiveness of IgA nephropathy. *J Clin Invest* 1995; 96: 2162-2169
138. Yorioka T, Suehiro T, Yasuoka N, Hashimoto K, Kawada M. Polymorphism of the angiotensin converting enzyme and clinical aspects of IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1995; 44: 80-85
139. Harden P, Geddes C, Rowe PA, McIlroy JH, Boulton-Jones M, Rodger RSC, Junor BJR, Briggs JD, Connel JMC, Jardine AG. Polymorphisms in angiotensin-converting enzyme gene and progression of IgA nephropathy. *Lancet* 1995; 345: 1540-1542

140. Schmidt S, Stier E, Hartung R, Stein G, Bahnisch F, Woodroffe A, Clarkson A, Ponticelli C, Campise M, Mayer G, Ganten D, Ritz E. No association of converting enzyme insertion/deletion polymorphism with immunoglobulin A glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 1995; 26: 727-731
141. Hunley T, Julian B, Phillips J, Summar M, Yoshida H, Horn R, Brown N, Fogo A, Ichikawa I, Kon V. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: potential silencer motif and impact on progression in IgA nephropathy. *Kidney Int* 1995, 49: 571-577
142. Burg M, Menne J, Ostendorf T, Kliem V, Floege J. Gene-polymorphisms of angiotensin converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase in patients with primary glomerulonephritis: *Clin Nephrol* 1997; 48: 205-211
143. Pei Y, Scholey F, Thai K, Suzuki M, Cattran D. Association of angiotensinogen gene T235 variant with progression of immunoglobulin A nephropathy in caucasian patients. *J Clin Invest* 1997. 100: 814-820
144. Tanaka R, Iijima K, Murakami R, Koide M, Nakamura H, Yoshikawa N. ACE gene polymorphism in childhood IgA nephropathy: association with clinicopathologic findings. *Am J Kidney Dis* 1998; 31: 774-779
145. Stratta P, Canavese C, Ciccone G, Barolo S, Dall'Omo A, Fasano M, Mazzola G, Berutti S, Fop F, Curtioni E, Piccoli G. Angiotensin I-converting enzyme genotype significantly affects progression of IgA glomerulonephritis in an Italian Population. *Am J Kidney Dis* 1999; 33:1071-1079
146. Asano T, Tatsuma N, Yoshida J, Ohashi R, Ambo K, Tsuchiya M, Murakami M, Yamanaka N, Honda M, Yamamoto M. Association of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and renal pathology in Japanese children with IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 1999; 51: 335-340
147. Schmidt S, Rity E. Genetics of the renin-angiotensin system and renal disease: a progress report. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1997; 6: 146-151
148. Yoshioka T, Xu Y, Yoshida H, Shiraga H, Muraki T, Ito K. Deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene predicts persistent proteinuria in Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Arch Dis Child* 1998; 79: 394-399
149. Amoroso A, Danek G, Vatta S, Crovella S, Berrino M, Guarrera S, Fasano ME, Mazzola G, Amore A, Gianoglio B, Peruzzi L, Coppo R. Polymorphisms in angiotensin-converting enzyme gene and severity of renal disease in Henoch-Schoenlein patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 3184-3188
150. Dudley J, Afifi E, Gardner A, Tizard EJ, McGraw ME. Polymorphism of the ACE gene in Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Pediatr Nephrol* 2000; 14: 218-220
151. Bedogna V, Valvo E, Casagrande P, Braggio P, Fontanarosa C, Dal Santo F, Alberti D, Maschio G. Effects of ACE inhibition in normotensive patients with chronic glomerular disease and normal renal function. *Kidney Int* 1990; 38: 101-107
152. Gansevoort RT, de Zeeuw D, de Jong PE. Long-term benefits of the antiproteinuric effect of ACE-inhibition in non-diabetic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1993. 22: 202-206
153. Rossing P, Hommel E, Smidt UM, Parving HH. Reduction in albuminuria predicts diminished progression in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1994, 45 (Suppl 45): S145-149

154. Han SY, Kwon YJ, Jo SK, Shin JH, Cha DR, Cho WY, Pyo HJ, Kim HK. ACE gene polymorphism and renal responsiveness to ACE inhibitors in IgA nephropathy patients. *Korean J Intern Med* 2000; 15: 13-18
155. Haas M, Yilmaz N, Schmidt A, Neyer U, Arneitz K, Stummvoll HK, Wallner M, Auinger M, Arias I, Schneider B, Mayer G. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism determines the antiproteinuric and systemic hemodynamic effect of enalapril in patients with proteinuric renal disease. *Kidney Blood Pressure Res* 1998; 21: 66-69
156. Moiryama T, Kitamura H, Ochi S, Izumi M, Yokoyama K, Yamauchi A, Ueda N, Kamada T, Imai E. Association of angiotensin converting enzyme gene polymorphism with susceptibility to antiproteinuric effect of angiotensin I converting enzyme inhibitors in patients with proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 1674-1678
157. Vleming LJ, Van Kooten C, Van Dijk M, Hollander DAMJ, Paape ME, Westeendorp RGJ, Van Es LA. The D-allele of the ACE gene polymorphism predicts a stronger antiproteinuric response to ACE inhibitors. *Nephrology* 1998; 4: 143-149
158. Van Essen GG, Rensma PL, de Zeeuw D, Sluiter WJ, Scheffer H, Apperloo AJ, de Jong PE. Association between angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and failure of renoprotective therapy. *Lancet* 1996; 347: 94-95
159. Van der Kleij FG, Navis GJ, Gansevoort RT, Heeg JE, Scheffer H, de Zeeuw D, Jong PE. ACE polymorphism does not determine short-term renal response to ACE-inhibition in proteinuric patients. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12 (Supp 2): 42-46
160. Ruggenti P, Perna A, Zoccali C, Gherardi G, Benini R, Testa A, Remuzzi G. Chronic proteinuric nephropathies. Outcomes and response to treatment in a prospective cohort of 352 patients: differences between women and men in relation to the ACE gene polymorphism. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 88-96
161. Parving H-H, Jacobson P, Tarnow L, Rossing P, Lecert L, Poirier O, Cambein F. Effect of deletion polymorphism of angiotensin converting enzyme gene on progression of diabetic nephropathy during inhibition of angiotensin converting enzyme: observational follow up study. *BMJ* 1996; 313: 591-594
162. Penno G, Ghaturvedi N, Talmud PJ, Cotroneo P, Manto A, Nannipieri M, Luong LA, Fuller JH. Effect of angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphism on progression of renal disease and the influence of ACE inhibition in IDDM patients. *Diabetes* 1998; 47: 1507-1511
163. Ha SK, Yong Lee S, Su Park H, Ho Shin J, Jung Kim S, Hum Kim D, Rae Kim K, Yung Lee H, Suk Han D. ACE DD genotype is more susceptible than ACE II and ID genotypes to the antiproteinuric effect of ACE inhibitors in patients with proteinuric non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 1617-1623
164. Ueda S, Meredith PA, Morton JJ, Connell JMC, Elliott HL. ACE (I/D) genotype as a predictor of the magnitude and duration of the response to an ACE inhibitor drug (enalaprilat) in humans. *Circulation* 1998; 98: 2148-2153

165. Mizuiri S, Hemmi H, Inoue A, Takano M, Kadomatsu S, Tanimoto H, Tanegashima M, Hayashi I, Fushimi T, Hasegawa A. Renal hemodynamic changes induced by captopril and angiotensin converting enzyme gene polymorphism. *Nephron* 1997; 75: 310-314
166. Todd G, Chadwick I, Higgins K, Yeo W, Jackson PR, Ramsay L. Relation between changes in blood pressure and serum ACE activity after a single dose of enalapril and ACE genotype in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 1995; 39: 131-134
167. Hamaguchi A, Yoshida H, Miyazaki Y, Kawamura T, Mitarai T, Sakai O. The deletion polymorphism in the ACE gene is a risk factor for the progression to renal failure independent of the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 389
168. Schmidt S, Bahnisch J, Campise M, Clarkson A, Ferrario F, Ponticelli C, Ritz E. The angiotensinogen gene M235T polymorphism and IgA nephropathy (abstract). *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1863
169. Jeunemaitre X, Charru A, Chatellier G, Dumont C, Sassano P, Soubrier F, Menard M, Corvol P. M235T variant of the human angiotensinogen gene in unselected hypertensive patients. *J Hypertens* 1993; 11: S80-81
170. Schunkert H, Hense HW, Gimenez-Roqueplo AP, Stieber J, Keil U, Riegger GA, Jeunemaitre X. The angiotensinogen T 235 variant and the use of antihypertensive drugs in a population-based cohort. *Hypertension* 1997; 29: 628-633
171. Nishiuma S, Kario K, Kayaba K, Nagio N, Shimada K, Matsuo T, Matsuo M. Effect of the angiotensinogen gene Met235-Thr variant on blood pressure and other cardiovascular risk factors in two Japanese population. *J Hypertens* 1995; 13 : 717-722
172. Hata C, Namikawa C, Sasaki M, Sato K, Nakamura T, Tamura K, Lalouel M. Angiotensinogen as risk factor for essential hypertension in Japan. *J Clin Invest* 1994; 93: 1285-1287
173. Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma A. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites. A systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 1997; 30: 1331-1337
174. Hingorani AD, Jia H, Stevens PA, Hopper R, Dickerson J, Brown MF. Renin-angiotensin system gene polymorphisms influence blood pressure and the response to angiotensin converting enzyme inhibition. *J Hypertens* 1995; 13: 1602-1609
175. Dudley C, Keavney B, Casadei B, Conway J, Bird R, Ratcliffe P. Prediction of patient response to antihypertensive drugs using gene polymorphisms: investigation of renin-angiotensin system genes. *J Hypertens* 1996; 14: 259-262
176. Mondorf UF, Russ A, Wiesemann A, Herrero M, Oremek G, Lenz T. Contribution of angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism and angiotensinogen polymorphism to blood pressure regulation in essential hypertension. *Am J Hypertens* 1998; 11: 174-183
177. Yoshida H, Hamaguchi A, Shimoda M, Eto T, Kawamura T, Hunley T, Kon V, Mitarai T, Sakai O. Does the A1166C polymorphism in the angiotensin type 1 receptor gene have an influence on the progression to renal failure. *J Am Soc Nephrol* 1995; 6: 409
178. Cameron JS, Turner DR, Ogg CS, Chantler C, Williams DG. The long-term prognosis for patients with focal segmental glomerulosclerosis *Clin Nephrol* 1978; 10: 213-218

179. Lee D, Kim W, Kang S, Koh G, Park S. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in patients with minimal-change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulonephritis. *Nephron* 1997; 77:471-473
180. Frischberg Y, Becker-Cohen R, Halle D, Fegin E, Eisenstein B, Halevy R, Lotan D, Juaber I, Ish-Shalom N, Magen D, Shvil Y, Sinai-Treiman L, Drukker A. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and the outcome of focal segmental glomerulosclerosis in children. *Kidney Int* 1998; 54:1843-1849
181. Wehrmann M, Bohle A, Bogenschuetz O, Eissele R, Freisleder A, Oehlschleger C, Schumm G, Batz C, Gaertner HV. Long-term prognosis of chronic idiopathic membranous glomerulonephritis. An analysis of 334 cases with particular regard to tubulo-interstitial changes. *Clin Nephrol* 1989; 31: 67-76
182. Perrichot R, Raguenes O, Mercier B, Whebe B, Lenormand J, Ferec C, Cledes J. Genetic variation in the renin-angiotensin system and membranous glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 1779
183. Mizuiri S, Hemmi H, Kumanomidou H, Sakai K, Aikawa A, Ohara T, Shimatake H, Hasegawa A. Decreased renal ACE mRNA levels in healthy subjects with ACE II genotype and diabetic nephropathy (abstract). *J Am Soc Nephrol* 1997 8: 115A
184. Yoshida H, Kon V, Ichikawa I. Polymorphisms of the renin-angiotensin system genes in progressive renal disease. *Kidney Int* 1996; 50: 732-744
185. Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T. Functional significance of ACE I/D locus for controlling the ace gene. *J A Soc Nephrol* 1997(abstract); 8: 633A
186. Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I- converting enzyme (ACE) controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 197-205
187. Villard E, Tiret L, Visvikis S, Rakotovao R, Cambien F, Soubrier F. Identification of new polymorphisms of the angiotensin I- converting enzyme (ACE) gene and study of their relationship to plasma ACE levels by two-QTL segregation-linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1996; 58: 1268-1278
188. McKenzie C.A., Julier C, Forrester T, McFarlane-Anderson N, Keavney, Lathrop GM, Ratcliffe PJ, Farrall M. Segregation and linkage analysis of serum angiotensin I-converting enzyme levels: evidence for two quantitative-trait loci. *Am J Hum Genet* 1995;57: 1426-1435
189. Müller DN, Bohlender J, Hilgers KF, Dragun D, Costerousse O, Menard J, Luft FC. Vascular angiotensin-converting enzyme expression regulates local angiotensin II. *Hypertension* 1997; 29: 98-104
190. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Lee W, Zhang L, Yu H, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Evidence for direct local effect of angiotensin in vascular hypertrophy. In vivo gene transfer of angiotensin converting enzyme. *J Clin Invest* 1994; 94: 978-984
191. Bonithon-Kopp C, Ducimetiere P, Touboul PJ, Feve JM, Billaud E, Courbon D, Heraud V. Angiotensin-converting-enzyme activity and carotid wall thickening. *Circulation* 1994; 89: 952-954

192. Ueda S, Elliott H, Morton J, Connell M. Enhanced Pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 1995; 25: 1266-1269
193. Buikema H, Pinto YM, Rooks G, Grandjean JG, Schunkert H, van Gilst WH. The deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is related to phenotypic differences in human arteries. *Eur Heart J* 1996; 17: 787-794
194. Van Dijk MA, Kroon I, Kamper AM, Doomsma F, Danser A, Chang PC. The angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and responses to angiotensins and bradykinin in the human forearm. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35: 484-490
195. Lachurie ML, Azizi M, Guyene TT, Alhenc-Gelas F, Menard J. Angiotensin converting enzyme I/D polymorphism has no influence on the circulating RAS or the blood pressure in normotensive subjects. *Circulation* 1995; 91: 1899-1900
196. Chadwick IG, O' Toole L, Morice AH, Yeo WW, Jackson PR, Ramsay LE. Pressor and hormonal responses to angiotensin I infusion in healthy subjects of different angiotensin-converting enzyme genotypes. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997; 29: 485-489
197. Danser A, Deinum J, Osterop A, Admiraal P, Schalekamp M. Angiotensin I-to-II conversion in the human forearm and leg. Effect of the ACE gene I/D polymorphism. *J Hypertens* 1999; 17: 1867-1872
198. Brown NJ, Blais CJ, Gandhi SK, Adam A. ACE insertion/deletion genotype affects bradykinin metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32: 373-377
199. Gainer JV, Stein CM, Neal T, Vaughan DE, Brown NJ. Interactive effect of ethnicity and ACE insertion/deletion polymorphism on vascular reactivity. *Hypertension* 2001; 37: 46-51
200. Butler R, Morris AD, Burchell B, Struthers A. DD angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction in normal humans. *Hypertension* 1999; 33: 1164-1168
201. Dux S, Aron N, Boner G, Carmel A, Taron A, Fosenfeld JB. Serum angiotensin converting enzyme activity in normal adults and patients with different types of hypertension. *Isr J Med Sci* 1984; 20: 1138-1141
202. Kregel JH, Kim HS, Moyer JS, Jennett JC, Peng L, Hiller SK, Smithies O. Angiotensin-converting enzyme gene mutations, blood pressure and cardiovascular homeostasis. *Hypertension* 1997; 29: 150-157
203. Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet Jean, Powers M, Sharma AM, Gimenez-Roqueplo AP, Hata A, Corvol P, Lalouel JM. Haplotypes of Angiotensinogen in essential hypertension. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1448-1460
204. Tamura K, Umemura S, Ishii M, Tanimoto K, Murakami K, Fukamizu A. Molecular mechanism of transcriptional activation of angiotensinogen gene by proximal promoter. *J Clin Invest* 1994; 93: 1370-1379
205. Yanai K, Nibu Y, Murakami K, Fukamizu A. A cis-acting DNA-element located between TATA box and transcription initiation site is critical in response to regulatory sequences in human angiotensinogen gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 15981-15986

206. Inoue I, Nakakijima T, Williams CD, Quackenbush J, Puryear R, Powers M, Cheng T, Ludwig EH, Sharma AM, Hata A, Jeunemaitre X, Lalouel JM. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest* 1997; 99: 1786-1797
207. Ishigami T, Tamura K, Fujita T, Kobayashi I, Hibi K, Kihara M, Toya Y, Ochiai H, Umemura S. Angiotensinogen gene polymorphism near transcription start site and blood pressure. Role of a T-to-C transition at intron I. *Hypertension* 1999; 34: 430-434
208. Gould Ab, Green D. Kinetics of the human renin and human substract reaction: *Cardiovasc Res* 1971; 5: 86-89
209. Danser A, Derkx F, Hense HW, Jeunemaitre X, Riegger G, Schunkert H. Angiotensinogen (M235T) and angiotensin-converting enzyme (I/D) polymorphisms in association with plasma renin and prorenin levels. *J Hypertens* 1998; 16: 1879-1883
210. Azizi M, Hallouin MC, Jeunemaitre X, Guyene TT, Menard J. Influence of the M235T polymorphism of human angiotensinogen (AGT) on plasma AGT and renin concentrations after ethinylestradiol administration. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4331-4337
211. Walker WG, Whelton PK, Saito H, Russel RP, Hermann J. Relationship between blood pressure and renin, renin substrate, angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension* 1979; 1: 287-291
212. Gardes J, Bouhnik J, Clauser E, Corvol P, Menard J. Role of angiotensinogen in blood pressure homeostasis. *Hypertension* 1982; 4: 185-189
213. Menard J, El-Amrani AIK, Savoie F, Bouhnik J. Angiotensinogen: an attractive and underrated participant in hypertension and inflammation. *Hypertension* 1991; 18: 705-706
214. Kim HS, Krege JH, Kluckmann KD, Hagaman JR, Hodgins JB, Best CF, Jennette JC, Coffmann TM, Maeda N, Smithies O. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2735-2739
215. Henrion D, Amant C, Benessiano J, Philip I, Plantefevre G, Chantel D, Hwas U, Desmont J, Durand G, Amouyel P, Levy B. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism is associated with an increased vascular reactivity in the human mammary artery in vitro. *J Vasc Res* 1998; 35: 356-362
216. Amant C, Hamon M, Bauters C, Richard F, Helbecque N, Mc Fadden E, Escudero X, Lablanche J, Amoyel P, Bertrand M. The angiotensin II type 1 rezeptor gene polymorphism is associated with coronary artery vasoconstriction. *J Am Coll Cardiol* 1997; 29: 486-490
217. Weber MA, Purdy RE, Stupecky SL, Prins BA. Augmentation of sympathomimetic arterial contraction by angiotensin II: A novel mechanism. *J Vasc Biol* 1989; 1: 7-15
218. Poirier O, Georges JL, Ricard S, Arveiler D, Ruidavets JB, Luc G, Evans A, Cambien F, Tiret L. New polymorphisms of the angiotensin II type 1 receptor gene and their associations with myocardial infarction an blood pressure: the ECTIM study. *J Hypertens* 1998; 16: 1443-1447
219. Zhang X, Erdmann J, Regitz-Zagrosek V, Hense HW, Schunkert H. Evaluation of three polymorphisms in the promoter region of the angiotensin II type 1 receptor gene. *J Hypertens* 2000; 18: 267-272

220. Rolfs A, Weber-Rolfs I, Regitz-Zagrosek V, Kallisch H, Riedel K, Fleck E. Genetic polymorphisms of the angiotensin II type 1 (AT₁) receptor gene. *Eur Heart J* 1994; 15: 108-112
221. Schmidt S, Beige J, Walla-Friedel M, Michel MC, Sharma AM, Ritz E. A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension. *J Hypertens* 1997; 15: 1385-1388
222. Liyou N, Davis D, James K, Simons L, Friedlander Y, Simons J, McCallum J, Johnson A. the A1166C mutation in the angiotensin II type 1 receptor and hypertension in the elderly. *Clin Exp Pharm Physiol* 1999; 26: 525-526
223. Wang WY, Zee RY, Morris BJ, Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension. *Clin Genet* 1997; 51: 31-34
224. Miyamoto Y, Yoshimasa T, Itoh H, Igaki T, Harada M, Yamashita J, Chun T, Doi K, Ishikawa M, Hori Y, Kuwahara K, Ogawa E, Inoue M, Masuda I, Saito Y, Nakao K. Association of angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism with essential hypertension in Japanese. *J Hypertens* 1996; 14 (Suppl. 1): S29
225. Hilgers K, Langenfeld M, Schlaich M, Veelken R, Schmieder R. 1166 A/C polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor gene and the response to short-term infusion of angiotensin II. *Circulation* 1999; 100: 1394-1399
226. Rieder M, Taylor S, Clark A, Nickerson D. Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme. *Nat Genet* 1999; 22: 59-62
227. Ishigami T, Umemura S, Tamura K, Hibi K, Nyui N, Kihara M, Yabana M, Watanabe Y, Sumida Y, Nagahara T, Ochiai H, Ishii M. Essential hypertension and 5' upstream core promoter region of human angiotensinogen gene. *Hypertension* 1997; 30: 1325-1330
228. Sato N, Katsuya T, Rakugi H, Takami S, Nakata Y, Miki T, Higaki J, Ogihara T. Association of variants in critical core promoter element of angiotensinogen gene with increased risk of essential hypertension in Japanese. *Hypertension* 1997; 30: 321-325
229. Brand E, Chatelain N, Mulatero P, Fery I, Curnow K, Jeunemaitre X, Corvol P, Pascoe L, Soubrier F. Structural analysis and evaluation of the aldosterone synthase gene in hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 198-204

7. Verwendete Abkürzungen

ACE	Angiotensin I - Converting Enzym
Ang-I	Angiotensin I
Ang-II	Angiotensin II
AT ₁ R	Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor
Cr	Serumkreatinin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
ECC	endogene Kreatinin Clearance
ESRD	terminale Niereninsuffizienz
FSGN	fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
I/D	insertion/deletion
kb	Kilobasenpaare
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MGN	membranöse Glomerulonephritis
min	Minute
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
RAS	Renin-Angiotensin-System
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
TGF- β	transforming growth factor-beta
UV	ultraviolett

8. Lebenslauf

Christos Bantis

14 Juni 1972	in Thessaloniki (Griechenland) geboren
1978-1984	Grundschule „Ekpaidefteria Koraes“ in Thessaloniki
1984-1990	Gymnasium der Deutschen Schule Thessaloniki
6/1990	Deutsches Abitur und griechisches Abschlusszeugnis
1990-1996	Studium der Humanmedizin an der Aristoteles Universität Thessaloniki
8/1996	Griechische Approbation
9/1996-3/1998	Militärdienst als Arzt
5/98-8/99	„Landarztendienst“ in der nephrologischen Klinik in Kavala, Griechenland (Leiter: Dr. med. K. Kalaitzidis)
9/1999	Deutsche Approbation
9/1999-8/2001	Klinik für Nephrologie und Rheumatologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf (Leiter: Prof. Dr. med. B. Grabensee) im Rahmen eines DAAD-Forschungsstipendiums
9/2001-	Medizinische Klinik II der Aristoteles Universität Thessaloniki (Leiter: Prof. Dr. med. M. Papadimitriou)

9. Kurzfassung

Einfluss von genetischen Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems auf die primäre chronische Glomerulonephritis

Christos Bantis

Einleitung: Die chronische Glomerulonephritis stellt eine der häufigsten Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz dar. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss genetischer Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) auf die Progression der chronischen Glomerulonephritis untersucht.

Patienten und Methoden: Betrachtet wurden die drei häufigsten chronischen primären Glomerulonephritisformen: IgA Nephropathie (n= 107), fokal und segmental sklerosierende Glomerulonephritis (n= 62) und membranöse Glomerulonephritis (n= 44). Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden der Angiotensin-I Converting Enzym (ACE)-Gen I/D, der Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T und der Angiotensin II-Typ1 Rezeptor (AT₁R)-Gen A1166C Polymorphismus bestimmt.

Ergebnisse: Bei Patienten mit IgA Nephropathie beeinflussten der ACE-I/D und der AGT-M235T Polymorphismus die Progression der Erkrankung; so erlitten 55% der Patienten mit einem AGT-T Allel und nur 23% der Patienten ohne ein AGT-T Allel einen Organverlust innerhalb der drei ersten Jahre nach Nierenbiopsie ($p<0.05$). Bei Patienten mit fokal und segmental sklerosierender Glomerulonephritis und einer Nierenfunktionsverschlechterung kam das ACE-D Allel mit einer Frequenz von 0.57 vermehrt im Vergleich zu 0.38 bei Patienten mit einer stabilen Nierenfunktion vor ($p<0.05$). Auch bei Patienten mit membranöser Glomerulonephritis war das ACE-D Allel mit einer schlechteren Prognose assoziiert; so trugen alle Patienten, die innerhalb der ersten 10 Jahre nach Nierenbiopsie einen Organverlust erlitten, mindestens ein ACE-D Allel ($p<0.05$). Die kombinierte Analyse zeigte eine Interaktion des ACE-I/D und des AGT-M235T Polymorphismus und erlaubte eine genauere Identifizierung der Patienten mit IgA Nephropathie oder membranöser Glomerulonephritis und einem höheren Progressionspotenzial. Eine nephroprotektive Wirkung der Therapie mit ACE-Hemmern war ausgeprägter in genetisch determinierten Patientensubgruppen mit IgA Nephropathie und bestimmten Genotypen des ACE-I/D und des AGT-M235T Polymorphismus; so wurde nur bei den DD/TT, DD/MT und ID/TT Genotypen eine signifikante Reduktion der Proteinurie durch die ACE-Hemmung im Vergleich zur konventionellen Therapie festgestellt ($p<0.01$). Der AGT-M235T Polymorphismus war mit dem Schweregrad der arteriellen Hypertonie bei allen Glomerulonephritisformen verknüpft. Ein Einfluss des AT₁R-A1166C Polymorphismus auf die untersuchten Parameter konnte nicht nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung: Unsere Ergebnisse sprechen für einen wichtigen Stellenwert des ACE-I/D und des AGT-M235T Polymorphismus als prognostischer Marker der chronischen Glomerulonephritis. In zukünftigen prospektiven Studien gilt es neben der Therapie auch die Genotypkonstellation der Polymorphismen des RAS zu berücksichtigen.