

**Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Medizinische  
Klinik und Poliklinik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Direktor: Prof. Dr. med. B. Grabensee

**Untersuchung zum  
Einfluss des ACE-Gen-Polymorphismus auf  
die fokal segmental sklerosierende  
Glomerulonephritis**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Yvonne-Christin Luther

2002

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

Gez.: Prof. Dr. med. D. Häussinger

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. P. Heering

Korreferent: Prof. Dr. med. S. Bornstein

*In Dankbarkeit*

*meinen Eltern !*

<b><u>Inhaltsverzeichnis</u></b>	Seite
<b>1. Einleitung</b>	
1.1 Pathogenese, Klinik und Therapie der fokal segmental sklerosierenden Glomerulonephritis (FSGN)	1
1.2 Physiologie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems	5
1.3 Angiotensin-Converting-Enzym-Gen (ACE-Gen)	10
1.4 ACE-Gen-Polymorphismus und ACE-Hemmer-Therapie	14
<b>2. Hypothesen</b>	17
<b>3. Methodik</b>	
3.1 Patientengut und Kontrollgruppe	18
3.2 Bestimmung des ACE-Gen-Polymorphismus	24
3.3 Statistik	32
<b>4. Ergebnisse</b>	
4.1 ACE-Gen-Polymorphismus bei Gesunden und bei Patienten mit FSGN	33
4.2 Verteilung des DD-Genotyps bei Patienten mit FSGN	42
4.3 ACE-Gen-Polymorphismus und Verlaufparameter	52
<b>5. Diskussion</b>	
5.1 Einfluss des ACE-Gen-Polymorphismus auf die Entstehung der FSGN	71
5.2 Stellenwert des ACE-Gen-Polymorphismus bei der Progression der FSGN	73
5.3 ACE-Gen und Nierenfunktion	77
5.4 Kritisches Resumé	79
<b>6. Zusammenfassung</b>	82
<b>7. Literatur</b>	84
<b>8. Abstract</b>	94
<b>9. Anhang</b>	95

## Verzeichnis besonderer Abkürzungen

ACE	- Angiotensin-Converting-Enzym
ACTH	- adrenocorticotropes Hormon
ADH	- antidiuretisches Hormon, Adiuretin
AT1	- Angiotensin Typ 1 (Rezeptor)
AT2	- Angiotensin Typ 2 (Rezeptor)
ECC	- endogene Kreatinin-Clearance
EDRF	- „endothelium derived relaxing factor“
FSGN	- fokal segmental sklerosierende Glomerulonephritis
GFR	- glomeruläre Filtrationsrate
GN	- Glomerulonephritis
MCGN	- Minimal-Change-Glomerulonephritis
ns	- nicht signifikant
NYHA	- New York Heart Association
PCR	- Polymerase-Ketten-Reaktion
RAAS	- Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
DD	- homozygoter Deletionstyp
ID	- heterozygoter Insertions/Deletionstyp
II	- homozygoter Insertionstyp

# **1. Einleitung**

## **1.1 Pathogenese, Klinik und Therapie der fokal segmental sklerosierenden Glomerulonephritis**

Die Glomerulonephritis (GN) ist eine abakterielle beidseitige Entzündung der Nierenrinde mit primärem Befall der Glomeruli. Sie stellt die häufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz dar. Die Krankheitsgenese wird durch immunpathologische Prozesse erklärt. Die Ätiologie der GN ist in den meisten Fällen unbekannt und somit idiopathischer Natur. Nur zu einem kleinen Prozentsatz sind sekundäre Erkrankungen im Rahmen von entzündlichen Systemerkrankungen, Neoplasien, Infektionen oder Medikamentenreaktionen als Ursache zu finden. Man unterscheidet zwischen Immunkomplex- und Antibasalmembran-Glomerulonephritiden, wobei es zur Ablagerung von systemisch zirkulierenden Immunkomplexen bzw. gegen die Basalmembran gerichtete Autoantikörper im Glomerulum kommt. Dieser Vorgang führt zu Entzündungsreaktionen und zur Schädigung der Kapillarschlingen. Durch Biopsie und histologische Untersuchung können zusätzlich morphologische Einteilungskriterien für die Therapie und die prognostische Bewertung herangezogen werden.

Die fokal segmental sklerosierende Glomerulonephritis (FSGN), erstmals von Fahr 1925 beschrieben, ist eine chronische, über Jahre andauernde entzündliche Erkrankung, deren primäre Form idiopathischer Natur ist. Sekundär kann sie durch Erkrankungen wie HIV, Anämien, Refluxnephropathie, Malignome und Sarkoidose ausgelöst werden (Floege 1995). Die FSGN macht 7 bis 15 Prozent der glomerulären Erkrankungen aus (Korbet 1994, Cameron 1996) und ist im Erwachsenenalter mit 10 bis 15 Prozent die zweithäufigste Ursache für die Ausbildung eines nephrotischen Syndroms (Grabensee 1997).

Das nephrotische Syndrom, bestehend aus dem Symptomenkomplex der starken unselektiven Proteinurie, der Hypalbuminämie mit Ödemausbildung und der Hyperlipidämie, entwickelt sich bei Patienten mit FSGN mit einer Häufigkeit von 55 bis 90 Prozent (Korbet 1994, Floege 1995).

Durch Schädigung der glomerulären Basalmembran kommt es zur erhöhten Durchlässigkeit für Proteine mit folgender Hypoproteinämie und Hypalbuminämie. Die daraus resultierende geringere Osmolalität des Plasmas führt zur Diffusion von Flüssigkeit ins Gewebe mit möglicher Entstehung von Ödemen bis hin zu Anasarka, Aszites sowie Pleura- und Perikardergüssen. Für die Ödembildung kann gleichfalls eine aufgrund der renalen Funktionsstörung verminderte Durchblutung des Nierenparenchyms verantwortlich sein. Hierbei kommt es zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), welche eine vermehrte Natrium- und Wasser-Resorption bewirkt. Die dabei steigende Plasmaosmolalität verursacht eine erhöhte Aktivität des ADH mit folgender Antidiurese, wodurch die Entwicklung von Ödemen unterstützt wird.

Klinisch bestehen eine starke Proteinurie ( $> 3,5$  g/24h) und eine Hypalbuminämie ( $< 2,5$  g/dl). Die Retentionsparameter sind erhöht. Durch einen renalen Verlust von IgG kann es zu gesteigerter Infektanfälligkeit kommen. Ein Mangel an Antithrombin III geht mit einem größeren Thromboserisiko einher. Bei der FSGN wird das nephrotische Syndrom durch entzündlich bedingte Schäden der Basalmembran in circa 30 Prozent von einer Mikrohämaturie begleitet (Floege 1995). Zusätzlich leiden die Patienten häufig unter einer arteriellen Hypertonie, die sowohl als Folge der glomerulären Veränderungen als auch als Risikofaktor für die Progredienz der Organerkrankung betrachtet werden kann.

Die Diagnosestellung erfolgt durch eine Nierenbiopsie. Die FSGN gehört zum Formenkreis der Immunkomplex-Glomerulonephritiden. Sie ist dadurch gekennzeichnet, dass innerhalb der Niere nur einige der Glomeruli betroffen sind (fokal), in denen wiederum nur einzelne kapilläre Anteile geschädigt sind (segmental).

Lichtmikroskopisch sind eine Sklerosierung und eine Hyalinose der beteiligten Kapillaren im Glomerulum sichtbar. Immunhistologisch lassen sich IgG- und besonders IgM-Ablagerungen sowie Komplement C3 als Ausdruck der ablaufenden entzündlichen Reaktion nachweisen. Im Elektronenmikroskop ist außer der Verödung der Kapillaren ein Verlust der Deckzellfüßchen (Podozyten) erkennbar.

Die Therapie der FSGN besteht in einem Supprimierungsversuch des Entzündungsgeschehens. Verabreichte Kortikosteroide sind nur in circa 30 Prozent der Fälle wirksam (Korbet 1994). Bei Steroidresistenz oder Krankheitsrezidiv nach Reduzierung der Medikamentendosis wird eine additive Therapie mit Cyclosporin A (Sandimmun®) oder

Tacrolimus (Prograf®) angestrebt (Grabensee 1997). Ziele der Therapie sind eine Verlangsamung der Progression mit Erhalt der Nierenfunktion sowie eine Beeinflussung des nephrotischen Syndroms und der arteriellen Hypertonie auf Werte unter 130/85 mmHg. Wesentliche Pharmaka sind dabei ACE-Hemmer, Diuretika, Kalzium-Antagonisten, Beta-Blocker und Angiotensin-Typ-1-Rezeptorblocker (AT1-Blocker). Da die Medikation mit ACE-Hemmern und Kalzium-Antagonisten hinsichtlich der Nephroprotektion besonders wirksam ist, spielen deren Zielorte (Angiotensin-Converting-Enzym, Kalziumkanal) vermutlich eine entscheidende Rolle im Fortschreiten der FSGN (Grabensee 1997). Weitere Therapeutika sind aufgrund des Antithrombin III-Verlustes die Thrombozytenaggregationshemmer (ASS) zur arteriellen Thrombembolieprophylaxe. Hinzu kommt eine eiweißarme Diät und eine Therapie der Hyperlipidämie. Bei Infektionen muss eine antibiotische Abdeckung erfolgen.

Die Prognose der FSGN spiegelt den progredienten Verlauf wider. 50 Prozent der Patienten entwickeln innerhalb von 5 bis 10 Jahren eine terminale Niereninsuffizienz mit Folge der Dialysepflichtigkeit. Langzeitbeobachtungen vor gut 20 Jahren ergaben eine Überlebensrate der Patienten von 75 Prozent nach 5 Jahren, von 50 Prozent nach 10 Jahren und von 38 Prozent nach 15 Jahren (Cameron 1978). Heute sind genaue Letalitätsziffern aufgrund der modernen Dialysetherapien nur schwer zu erheben. Nach Nierentransplantationen bei Patienten mit FSGN bleibt die schlechte Prognose bezüglich der Krankheitsprogression bestehen. In circa 50 Prozent entwickelt sich hierbei eine rekurrente FSGN im Transplantat (Floege 1995), welche eine bedeutende renale Funktionseinschränkung nach sich zieht. Generell ist eine verkürzte Überlebenszeit der Nierentransplantate bei Patienten mit FSGN beschrieben (Cameron 1994).

In der Literatur gibt es unterschiedliche Ansichten über die Beziehung der FSGN zur Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCGN), die auch als „Lipoidnephrose des Kindes“ bezeichnet wird. Entgegen der meist vertretenen, klinisch und therapeutisch begründbaren Auffassung, dass es sich um zwei unterschiedliche Krankheiten handelt (Border 1988, Mallick 1991), besteht aufgrund des ähnlichen elektronenmikroskopischen Bildes mit Verlust der Deckzellfüßchen (Podozyten) und des gleichen pathogenetischen Automatismus auch die Vermutung, dass beide Erkrankungen unterschiedliche Stadien eines Krankheitsbildes sind (Niaudet 1994, Floege 1995, Matthias 1995, Came-

ron 1996). Weiterhin wird die Tatsache diskutiert, dass die initiale Histologie einer MCGN bei späteren Biopsien oft das Bild einer FSGN zeigt (Border 1988, Fogo 1990). Die FSGN stellt hierbei das fortgeschrittene und oft therapierefraktäre Stadium dar. Die MCGN kann im Gegensatz dazu spontan ausheilen, geht selten mit einer arteriellen Hypertonie einher und führt meist nicht zur terminalen Niereninsuffizienz (Floege 1995). Sie zeigt weder im Lichtmikroskop noch in der Immunhistologie auffällige Veränderungen. Die MCGN ist mit 75 Prozent die häufigste Ursache für ein nephrotisches Syndrom im Kindesalter, sie kann aber auch im Erwachsenenalter auftreten. Eine Therapie mit Kortikosteroiden ist hier in 90 Prozent Erfolg versprechend. Die Hälfte aller juvenilen Patienten entwickeln allerdings Rezidive. Meist verlieren sich diese aber in der Pubertät, so dass bei der MCGN insgesamt eine gute Prognose besteht.

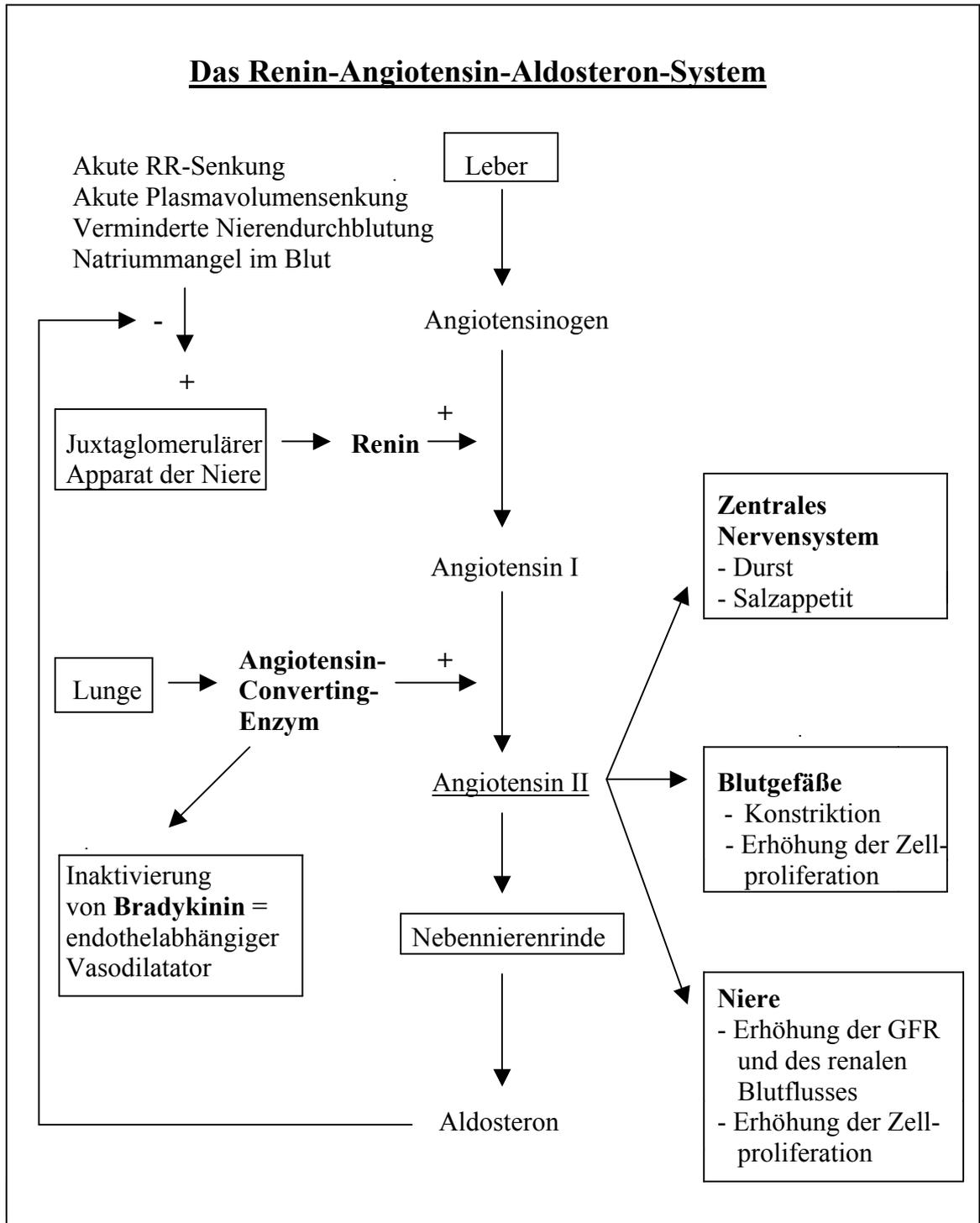
## 1.2 Physiologie des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems

Die Protagonisten des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) sind Renin, Angiotensinogen und das Angiotensin-Converting-Enzym. Ihre Bildung erfolgt in verschiedenen Organen. (Abb.1)

Renin stammt aus dem juxtamedullären Apparat der Niere, wo es in den Epitheloidzellen der Arteriolen gespeichert und auf spezifische Reize hin freigesetzt wird. Es katalysiert die Umwandlung von Angiotensinogen zu Angiotensin I. Die Sekretion von Renin ist durch folgende Mediatoren beeinflussbar:

- Barorezeptoren  
registrieren eine verminderte renale Durchblutung und fördern somit die Reninausschüttung. Ihre Empfindlichkeit ist bei Natrium-Mangel im Blutkreislauf erhöht.
- Macula-densa-Zellen  
bewirken bei einer erhöhten luminalen Natriumkonzentration und einem vermehrten luminalen Flüssigkeitsgehalt eine Freisetzung von Renin.
- Sympathische Innervation  
der Arteriolen führt zur Stimulierung der Reninsekretion.
- Prostaglandine  
können durch ihre verschiedenen Subtypen sowohl eine Steigerung als auch eine Verminderung der Reninfreisetzung bewirken.
- Angiotensin II (Rückkopplung)  
hemmt direkt die Ausschüttung von Renin durch die juxtaglomerulären Zellen.
- Atriopeptin  
hemmt die Reninfreisetzung.
- Kinine  
hemmen die Reninsekretion.
- Adiuretin (Rückkopplung)  
hemmt die Reninfreisetzung.

## Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System



**Abbildung 1:** Interaktionen des RAAS in ZNS, Gefäßsystem und Niere. Das Angiotensin-Converting-Enzym spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Blutdrucks. Das Angiotensin II ist hier stärkster Mediator für eine Blutdrucksteigerung (modifiziert nach Linnemann 1995).

Angiotensinogen wird als  $\alpha_2$ -Globulin in der Leber gebildet. Es spaltet nach Einwirken von Renin das Angiotensin I ab. Aus diesem entsteht nach Kontakt mit dem Angiotensin-Converting-Enzym das vasoaktive Angiotensin II.

Das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) wird hauptsächlich in der Lunge gebildet. Es bestimmt die Geschwindigkeit, mit der Angiotensin II zur Verfügung gestellt wird. Die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II läuft sowohl im Blut als auch in lokalen Geweben ab. Die gewebsspezifische Funktion ist kardial, glomerulär und tubulär sowie in bestimmten Arteriengebieten beschrieben worden (Mizuno 1988, Seikaly 1990, Yamada 1991) und dient einer unabhängigen Vasoregulation. Das ACE kann gebunden oder ungebunden vorliegen. Die gebundene Form befindet sich an der luminalen Oberfläche von Endothelzellen sowie an Plasmamembranen von intestinalen und renalen Epithelzellen und Zellen des Plexus choroideus. Ungebunden zirkuliert das ACE in Blut und Liquor (Erdös 1986). Das vaskuläre und das gewebsspezifische System scheinen sich in ihrer Wirkung zu potenzieren (Kojda 1997).

Angiotensin II ist einer der stärksten Vasokonstriktoren des menschlichen Organismus. Es hat Auswirkungen auf das Gefäßsystem, indem es direkt an den Arteriolen angreift und somit zu einer Lumenverengung führt. Weiterhin induziert Angiotensin II eine erhöhte Noradrenalin-synthese und -ausschüttung, eine Hemmung der Noradrenalin-Wiederaufnahme in die präsynaptischen Vesikel und eine Verstärkung der  $\alpha_1$ -adrenerg stimulierten Effekte, wodurch ebenfalls der Blutdruck gesteigert wird. In der Niere kommt es durch Angiotensin II bei Volumenmangel zur Erhöhung des efferenten Arteriolenwiderstandes und damit zu einer Steigerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des renalen Blutflusses. Bei Volumenüberschuss erfolgt ein Anstieg des afferenten Arteriolenwiderstandes, was eine Senkung der GFR nach sich zieht. Somit ist in der Niere die Autoregulation der Blutperfusion gewährleistet. Neben diesen hämodynamischen Faktoren hemmt das Angiotensin II die renale Natriumausscheidung durch direkte Stimulation der proximalen Natriumresorption. Zusätzlich kann es durch Angiotensin II in der Niere zu einer gesteigerten Proliferation und Hypertrophie von tubulären und mesangialen Zellen kommen. Eine derartige Fehlentwicklung und die Zerstörungen von extrazellulärer Matrix sind im Zusammenhang mit der Pathogenese von kardialen und renalen Erkrankungen beschrieben worden (Yoshida 1996<sub>a</sub>). Dieser Vorgang scheint

durch das Einwirken von spezifischen Wachstumsfaktoren (Naftilan 1989, Kagami 1994) und einer gesteigerten Synthese von Kollagenen (Wolf 1992) mitverursacht zu sein.

Im zentralen Nervensystem steigert Angiotensin II Durst und Salzappetit. Dadurch werden eine erhöhte Natriumkonzentration im Blut als auch eine Zunahme des Plasmavolumens gefördert. In der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde stimuliert Angiotensin II die Ausschüttung des Mineralkortikoides Aldosteron. Indirekt wird dieser Vorgang durch eine hypophysäre Freisetzung von ACTH verstärkt, welches gleichfalls an der Nebenniere ansetzt. Das Aldosteron greift in der Niere am distalen Tubulus und am Sammelrohr an. Hier bewirkt es eine erhöhte Natrium- und Wasser-Retention, im Austausch kommt es zu einer Zunahme der Kalium- und Protonen-Sekretion. Auch durch Einbeziehung von Darmtrakt sowie Speichel- und Schweißdrüsen wird ein verminderter Verlust von Natrium und Flüssigkeit erreicht. Darüber hinaus steigert Aldosteron die Erregbarkeit der glatten Muskulatur gegenüber konstriktorischen Reizen. Zusätzlich kommt es durch Angiotensin II zu einer erhöhten Freisetzung von Adiuretin, welches über eine verbesserte renale Gefäßpermeabilität zur vermehrten Rückresorption von Wasser führt. Auch mit Hilfe dieses Mechanismus wird die Blutdrucksteigerung verstärkt.

Angiotensin II wirkt über zwei verschiedene Rezeptoren. Der Angiotensin-Typ1-(AT1)-Rezeptor erzeugt bei Aktivierung eine vaskulär erhöhte Kontraktion der glatten Muskelzellen durch Kalzium-abhängige Stimulationswege (Peach 1990). Die oben aufgeführten Wirkungen des Angiotensin II laufen ebenfalls über den AT1-Rezeptor ab. Die Rolle des AT2-Rezeptors ist bisher nur im Zusammenhang mit der fetalen Entwicklung sowie mit Differenzierungs- und Hemmungsvorgängen des Zellwachstums beschrieben worden (Csikos 1998, Maric 1998).

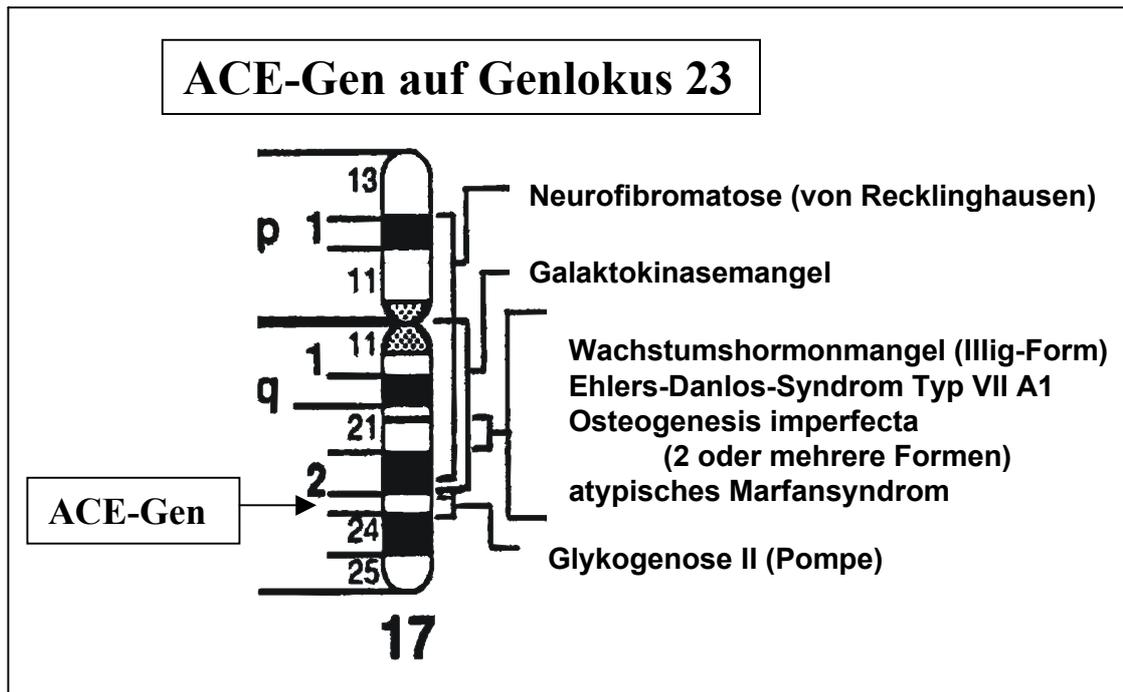
Das Angiotensin-Converting-Enzym ist identisch mit der Kininase II des Kallikrein-Kinin-Systems. Die Kinine zählen zu den vasodilatatorischen Gewebshormonen, welche für eine Senkung des Blutdrucks, aber auch für Schmerzauslösung, Bronchokonstriktion und erhöhte Gefäßpermeabilität mit Ödembildung verantwortlich sind. Das ACE spaltet Bradykinin, welches einer der stärksten endothelabhängigen Vasodilatoren ist. Bradykinin wirkt direkt an der glatten Gefäßmuskulatur und indirekt durch Frei-

setzung von Prostazyklin oder EDRF aus dem Endothel. Somit wird bei Anwesenheit des ACE gleichzeitig die Angiotensin-Kaskade aktiviert und die Kininkaskade inaktiviert, wodurch die Vasokonstriktion noch verstärkt ist.

Die Halbwertszeit von Angiotensin II im Plasma beträgt zwei Minuten. Seine Bildung ist von der Anwesenheit des Renins abhängig und wird somit limitiert. Das Angiotensin-Converting-Enzym, welches Angiotensin I in Angiotensin II umwandelt, wurde in der Vergangenheit nicht als limitierender Faktor für die Angiotensin-II-Produktion im Serum angesehen, neuere Ergebnisse weisen hier jedoch einen funktionellen Einfluss des ACE nach (Ueda 1995). Diese Tatsache ist aber für die gewebsspezifischen Vorgänge noch ungeklärt (Kennon 1999).

## 1.3 Angiotensin-Converting-Enzym-Gen (ACE-Gen)

Für das Angiotensin-Converting-Enzym gibt es auf Chromosom 17 ein Gen, dessen Polymorphismus 1990 entdeckt wurde (Rigat 1990). Dieses befindet sich dort am Genlokus 23 des langen Chromosomenarmes (Abb.2). Der kodierende DNA-Abschnitt enthält 21 Kilobasen, welche aus 26 Exons bestehen.



**Abbildung 2:** Position des ACE-Gens auf Chromosom 17 (Genlokus 23, Intron 16), zusätzlich sind weitere benachbart lokalisierte Erbkrankheiten aufgeführt (modifiziert nach Murken 1988).

Das Gen kann zwei unterschiedliche Allele aufweisen, was auf Anwesenheit (Insertion) bzw. Abwesenheit (Deletion) einer 287 Basenpaar-langen Sequenz beruht. Dieser Bereich gehört zu den repetitiven Alu-Sequenzen, welche humanspezifisch sind und sich während der Evolution über 500 000 mal im menschlichen Genom eingefügt haben. Sie besitzen bestimmte Zielorte für ihre Restriktionsendonuklease. Bei der Kodierung des ACE-Gens liegt der Bestimmungsort in Nähe des 3'-Endes im Intron 16, was zur Ausprägung von drei verschiedenen Genotypkonstellationen führt.

Die drei Genotypen des ACE-Gen-Polymorphismus sind somit:

- DD homozygoter Deletionstyp
- ID heterozygoter Insertions/Deletionstyp
- II homozygoter Insertionstyp

Das Deletions-Allel wird mit erhöhten Spiegeln von aktiv metabolisierendem ACE in Blut und Gewebe in Verbindung gebracht, wobei der homozygote DD-Typ die höchsten Werte aufweist (Harrap 1993, Ueda 1995). DI- und II-Typ haben dementsprechend eine geringere Menge an aktivem ACE (Abb.3).

Genotypen	ACE-Konzentration
DD	hoch
ID	↕
II	niedrig

D = Deletion }  
 I = Insertion } der 287 Basen-  
 paar-langen  
 Gen-Sequenz

**Abbildung 3:** Korrelation zwischen der ACE-Genotypkonstellation und der ACE-Konzentration im Serum und Gewebe (Harrap 1993, Ueda 1995).

Der ACE-Plasmaspiegel ist individuell normalerweise konstant. Zwischen einzelnen Individuen gibt es jedoch starke Abweichungen. Der ACE-Gen-Polymorphismus ist etwa zur Hälfte bestimmend für die Menge des aktiven ACE im Serum (Rigat 1990). Weitere Stimulatoren unterliegen noch unbekanntem genetischen oder umweltbedingten Einflüssen.

Durch den erhöhten ACE-Spiegel und die damit verbundene gesteigerte Bereitstellung von Angiotensin II, welche bei Auftreten des DD-Genotyps beschrieben wird (Nakai

1997, Teranishi 1999), ergibt sich ein nicht zu unterschätzender Einfluss auf das Entstehen von arteriellen und glomerulären Hypertonien sowie hyperplastischen fibrotischen Zellveränderungen. Diese Faktoren spielen eine gravierende Rolle im Fortschreiten von Nierenerkrankungen. Somit wurde der DD-Genotyp mit einem höheren Risiko für die schnelle Entwicklung von renalen und auch kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben (Kennon 1999).

Für ein Entstehen von Nierenerkrankungen scheint der ACE-Gen-Polymorphismus nicht verantwortlich zu sein (Harden 1995, Hunley 1996, Frishberg 1998, Stratta 1999). Nur einzelne Studien beschreiben ein erhöhtes Auftreten des DD-Typs bei Nierenkranken im Vergleich zu Gesunden (Chen 1997). Es gibt allerdings Arbeiten, in denen der DD-Genotyp signifikant mit einer schnelleren Progression bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz korreliert (Harden 1995, Hunley 1996, Martin 1999, Stratta 1999) bzw. der II-Genotyp mit einer besseren Prognose verbunden ist (Frishberg 1998). Gleichzeitig existieren Studien, die keine Signifikanzen zwischen ACE-Gen-Polymorphismus und Prognose im Verlauf von Nierenerkrankungen finden konnten (Schmidt 1995<sub>b</sub>, Chowdhury 1996). Weitere DD-Genotyp-Korrelate sind eine frühere Manifestation der renalen Erkrankung (Harden 1995, Lee 1997), ein vermehrtes Auftreten von Hypertonie (Yorioka 1995, Chen 1997), häufigere glomeruläre Sklerosen oder segmentale Läsionen (Yorioka 1995, Chen 1997, Tanaka 1998) und eine gesteigerte Proteinurie (Chen 1997, Tanaka 1998).

In Bezug auf die FSGN gibt es nur wenige Studien. Es wurde eine erhöhte Prävalenz des DD-Genotyps bei Nierenkranken mit FSGN im Vergleich zu Patienten mit einer Minimal-Change-Glomerulonephritis (MCGN) beschrieben (Lee 1997), wobei die MCGN als benigne Variante der FSGN betrachtet werden könnte und die Prognose dieser Erkrankung somit vom DD-Typ beeinflusst wird. Weiterhin wurde eine Korrelation des ACE-Gen-Polymorphismus bei Kindern mit FSGN gefunden (Frishberg 1998). Hierbei besteht bei Anwesenheit des D-Allels ein schlechterer Verlauf der Erkrankung, das Auftreten der FSGN zeigt allerdings keinen Zusammenhang mit dem DD-Genotyp.

Die Frage der Kodominanz der Insertions- und Deletionsallele scheint noch ungeklärt. Eine Anwesenheit des D-Allels (ID und DD) ist mit einer schnelleren Progression der

Glomerulonephritis verknüpft (Tanaka 1998, Frishberg 1998), womit sich eine Dominanz des D-Allels ergeben würde. Wie oben aufgeführt, wurde bisher aber meist nur der homozygote DD-Typ untersucht.

Die ACE-Genotyp-Verteilung ist in verschiedenen ethnischen Regionen unterschiedlich. Im europäischen und amerikanischen Raum tritt der DD-Genotyp mit einer Häufigkeit von circa 25 bis 30 Prozent auf (Harden 1995, Schmidt 1995<sub>a</sub>, Chiu 1997, Pei 1997), während er in der asiatischen Bevölkerung mit circa 14 Prozent einen deutlich niedrigeren Anteil ausmacht (Yorioka 1995, Doi 1997, Lee 1997, Tanaka 1998). In der gesunden deutschen Bevölkerung wurde folgende Genotypverteilung gefunden (Schunkert 1994):

<b>Genotyp</b>	<b>%</b>
DD	24,8
ID	58,6
II	16,6

**Tabelle 1:** Genotypverteilung des ACE-Gen-Polymorphismus in der gesunden deutschen Bevölkerung (Schunkert 1994).

## **1.4 ACE-Gen-Polymorphismus und ACE-Hemmer-Therapie**

Die ACE-Inhibitoren hemmen kompetitiv das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE). Dieses führt zu einer Unterdrückung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS). Das gilt sowohl für das RAAS im Gefäßsystem als auch für die gewebsspezifische Form, wo eine Reduktion der Angiotensin-II-Bildung ausgelöst wird. Weiterhin sind die ACE-Hemmer im Kallikrein-Kinin-System wirksam. Hier kommt es hauptsächlich zu einer Verminderung des Bradykinin-Abbaus im Gewebe. Es folgt eine Vasodilatation, welche sowohl arterielle als auch venöse Gefäße betrifft.

Das Ausmaß des Therapieerfolges ist vom aktuellen ACE-Serumspiegel abhängig. Durch die erhöhte ACE-Konzentration bei Vorliegen eines DD-Genotyps ergibt sich verglichen mit dem II-Gen wahrscheinlich eine verminderte Responsibilität der Gefäße bei gleicher Dosierung. In einigen Studien zeigte sich somit eine signifikante Korrelation zwischen dem Vorliegen eines I-Allels, welches mit einem geringeren ACE-Serumspiegel einhergeht, und einer gesteigerten Gefäßdilatation im Gegensatz zum DD-Genotyp (Haas 1998, Jacobsen 1998). Bei anderen Untersuchungen konnte dagegen kein unterschiedlicher ACE-Hemmer-Effekt bei den einzelnen Genotypen nachgewiesen werden (van der Kleij 1997).

An der Niere kommt es nach Einsatz von ACE-Inhibitoren zu einer deutlichen Dilatation der afferenten und efferenten Arteriolen mit Anstieg des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Der intraglomeruläre Druck wird gesenkt. Diese Effekte sind von der vorherigen Aktivität des RAAS und damit vom ACE-Genotyp abhängig. Das Vorhandensein des DD-Genotyps wird mit einem Absinken der GFR trotz ACE-Hemmer-Therapie in Verbindung gebracht (Parving 1996, van Essen 1996, Mizuiri 1997). Andere Arbeiten konnten diese Studienergebnisse nicht bestätigen (van der Kleij 1997) oder fanden sogar einen besseren Therapieerfolg bei Patienten mit DD-Genotyp (Perna 2000). Bezüglich der Eiweißausscheidung beschrieben verschiedene Autoren eine vermehrte ACE-Hemmer-Responsibilität bei Vorliegen eines ID- oder II-Gens (van Essen 1996, Haas 1998). Gegenteilige Arbeiten wiesen dagegen bei Patienten mit DD-Genotyp eine vermehrte Wirksamkeit der ACE-Hemmer auf die Proteinurie

nach (Moriyama 1995, Yoshida 1995, Perna 2000). Es gibt aber auch Untersuchungen, in denen hinsichtlich der Eiweißausscheidung keine signifikanten Differenzen zwischen den unterschiedlichen Genotypen gefunden werden konnten (Burg 1997, van der Kleij 1997, Han 2000). Weiterhin wurde eine höhere Effektivität der ACE-Hemmer-Therapie auf den Serumspiegel des Kreatinins bei Patienten mit DD-Genotyp beschrieben (Han 2000).

Darüber hinaus kann sich als Folge der Inhibition des ACE und der damit reduzierten Freisetzung von Aldosteron eine verstärkte Ausscheidung von Natrium und eine erhöhte Resorption von Kalium mit resultierender Hyperkaliämie einstellen. Außerdem sorgt die verminderte Stimulation von Adiuretin für eine bessere Diurese und senkt somit zusätzlich den Blutdruck.

Die vasodilatatorische Wirkung wird hauptsächlich der Hemmung des Angiotensin II zugeschrieben. Bei Beginn der Therapie scheinen hier besonders die plasmatischen Wirkungen wichtig zu sein, da der Abfall des ACE-Plasmaspiegels mit der Blutdrucksenkung korreliert. Längerfristige blutdrucksenkende Effekte beruhen auf einer Inhibition des gewebspezifischen Angiotensin II und einer vermehrten Aktivität des Bradykinin. Dies erklärt auch die weitere Wirksamkeit der ACE-Hemmer bei niedrigem ACE-Spiegel im Plasma. Inwiefern das ACE-Gen einen Einfluss auf diese Wirkungen im Gewebe hat, ist noch unklar.

Die wichtigste Indikation für die ACE-Hemmer-Therapie ist die arterielle Hypertonie. Hierbei kann eine Reduktion des systolischen und diastolischen Blutdrucks um 15-25 Prozent erreicht werden, welche durch Kombinationen mit anderen Antihypertensiva, insbesondere Diuretika deutlich steigerbar ist. Bei Gabe von ACE-Inhibitoren konnte hierbei ein häufigerer und stärkerer Blutdruckabfall bei Patienten mit ID- oder II-Genotyp nachgewiesen werden (Mizuri 1997, Haas 1998, Jacobsen 1998, Ueda 1998). Dies betrifft insbesondere eine bessere Kurzzeitwirkung der ACE-Hemmer auf die Hypertonie bei Vorliegen eines II- oder ID-Genotyps (Kutyryna 1999). Andere Untersuchungen fanden keinen Zusammenhang zwischen ACE-Gen-Polymorphismus und der antihypertensiven Wirkung der ACE-Hemmer (Moriyama 1995, van Essen 1996, van der Kleij 1997). So wurde bei Betrachtung der Langzeiteffekte ebenfalls eine relevante Blutdrucksenkung bei Patienten mit DD-Genotyp aufgezeigt (Kutyryna 1999). Damit scheint

diese Therapie für alle drei Genotypen gleichberechtigt zu sein. Die ACE-Inhibitoren sind zusätzlich Mittel der Wahl bei Begleiterkrankungen der Hypertonie im Bereich der Niere, da sie auch eine renoprotektive Wirkung aufweisen.

Weitere Indikation für eine Behandlung mit ACE-Hemmern ist die Herzinsuffizienz. Hier werden Nachlast (Blutdrucksenkung) sowie auch Vorlast (Minderung des linksventrikulären Füllungsdrucks im Herzen) gesenkt, woraus eine Abnahme des myokardialen Sauerstoffverbrauchs resultiert. Weitere Folgen sind eine erhöhte Auswurfleistung des Herzens, eine leichte Senkung der Herzfrequenz und eine Reduktion der Herzgröße. Damit kommt es zu einer Verbesserung der Symptomatik und der körperlichen Belastbarkeit, was zu einer Verminderung des Schweregrades der Herzinsuffizienz (NYHA-Stadium) führt.

Eine nicht zu unterschätzende Nebenwirkung der ACE-Hemmer ist der starke Blutdruckabfall bei Therapiebeginn. Um die Folgen einer mehr oder minder ausgeprägten Hypotonie zu verhindern, wird eine einschleichende Dosierung empfohlen. Durch die Suppression des Aldosterons sind weiterhin Elektrolytstörungen möglich. Diese bestehen hauptsächlich aus einer Hyperkaliämie oder Hyponatriämie. Eine häufige Begleiterscheinung der Therapie mit ACE-Hemmern ist der trockene Reizhusten (5-20 %), der unabhängig von der Dosis auftritt und nicht selten zum Abbruch der Behandlung führt. Weitere Nebenwirkungen sind selten und sollen hier vernachlässigt werden.

## **2. Hypothesen**

Die Zielstellung dieser Arbeit besteht in der Aufklärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Konstellation des ACE-Gens und der Entstehung sowie dem Fortschreiten der FSGN. Daraus würden sich Vorteile für klinische Therapieverfahren und eine bessere prognostische Beurteilung des individuellen Krankheitsverlaufs ergeben. Methodisch wurde ein Patientenkollektiv mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Interessant war die Frage, ob Patienten mit einem schnell progressiven Verlauf ihrer Grundkrankheit vermehrt einen DD-Genotyp aufweisen. Zusätzlich wurde die Beziehung zwischen DD-Genotyp und der Höhe des ACE-Spiegels im Serum beurteilt.

Zu Beginn der Studie wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- 1) Das Auftreten der FSGN ist unabhängig vom ACE-Genotyp.
- 2) Patienten mit einer FSGN und einem DD-Genotyp entwickeln schneller eine terminale Niereninsuffizienz als Patienten anderen Genotyps.

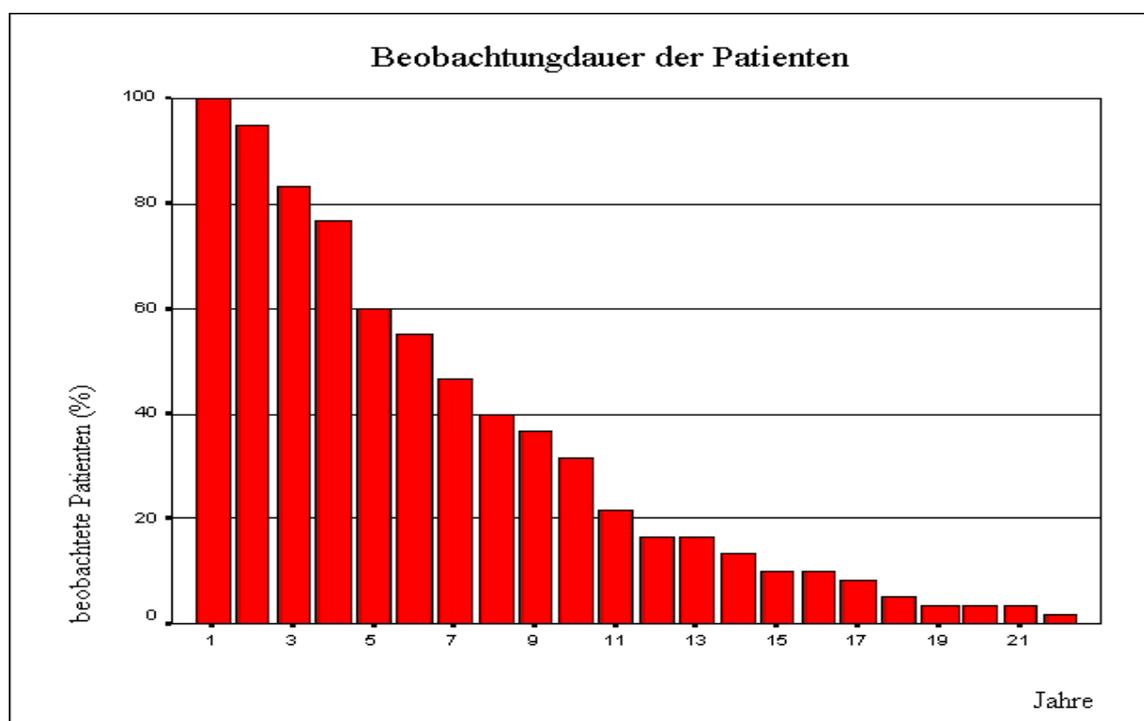
Bei Vorliegen einer Korrelation zwischen dem ACE-Gen-Polymorphismus und dem Fortschreiten der FSGN wäre eventuell in Zukunft ab Diagnosestellung eine spezifische Therapie für die einzelnen Genotypen mit Ansatz im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System möglich. Dabei könnten die unterschiedlichen Gen-Konstellationen Indikatoren für Therapiewahl und -dosierung mit ACE-Hemmern darstellen als auch für die Prognose der Patienten ausschlaggebend sein. Bisher vorliegende Untersuchungsergebnisse zur ACE-Hemmer-Therapie sind aber noch nicht eindeutig, so dass die Erfolge dieser und anderer Therapeutika auf die Progression der renalen Erkrankung noch genauer analysiert werden müssen.

## 3. Methodik

### 3.1 Patientengut und Kontrollgruppe

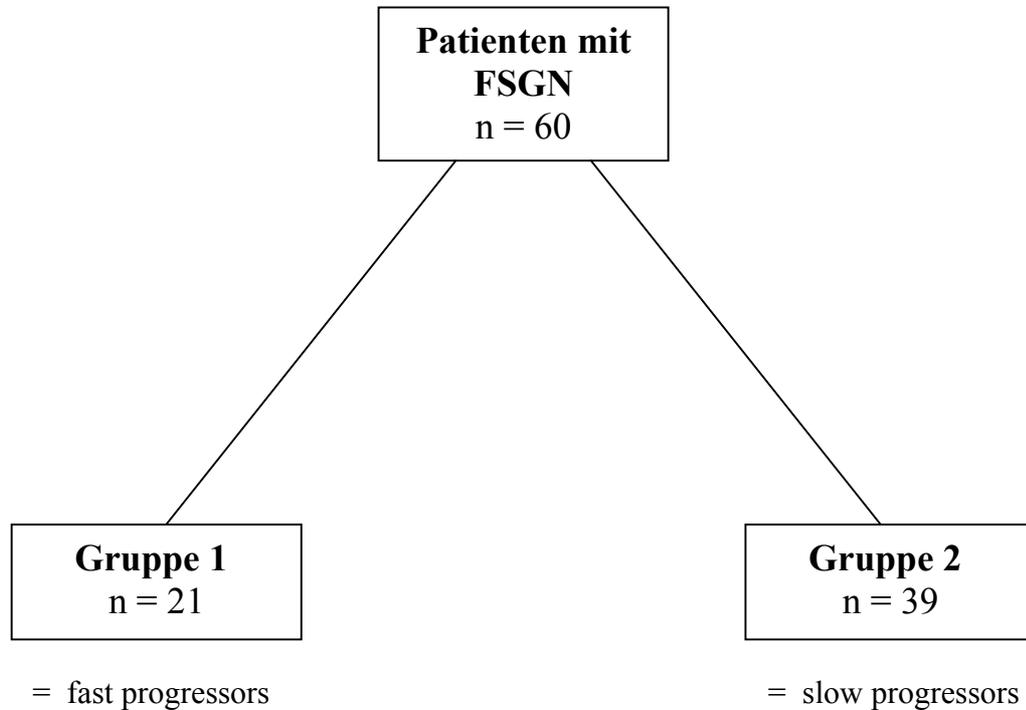
#### Patientengut

In die von 1997 bis 2000 durchgeführte Studie wurden 60 Patienten mit dem Krankheitsbild einer FSGN aufgenommen. Insgesamt konnten im Raum Düsseldorf und Umgebung 102 kaukasische Patienten mit einer FSGN ermittelt werden. Sie waren im Zeitraum von 1978 bis 1999 Patienten der Düsseldorfer Universitätsklinik für Nephrologie und Rheumatologie. Die Diagnose wurde durch Nierenbiopsie gesichert. Von den 102 Patienten waren bei Studienbeginn 8 verstorben, 10 lehnten die Teilnahme an der Untersuchung trotz eingehender Beratung ab. Bei 24 Patienten konnten die Krankenunterlagen auch nach intensiver Recherche nicht mehr vollständig aufgefunden werden, so dass eine Einbeziehung in die Studie nicht weiter erfolgen konnte. Die verbleibende Gruppe von 60 Patienten bestand aus 35 Frauen (58,3 %) und 25 Männern (41,7 %). Das Durchschnittsalter betrug 42,25 Jahre. Die mittlere Beobachtungsdauer lag bei 7,3 Jahren (Abb.4).



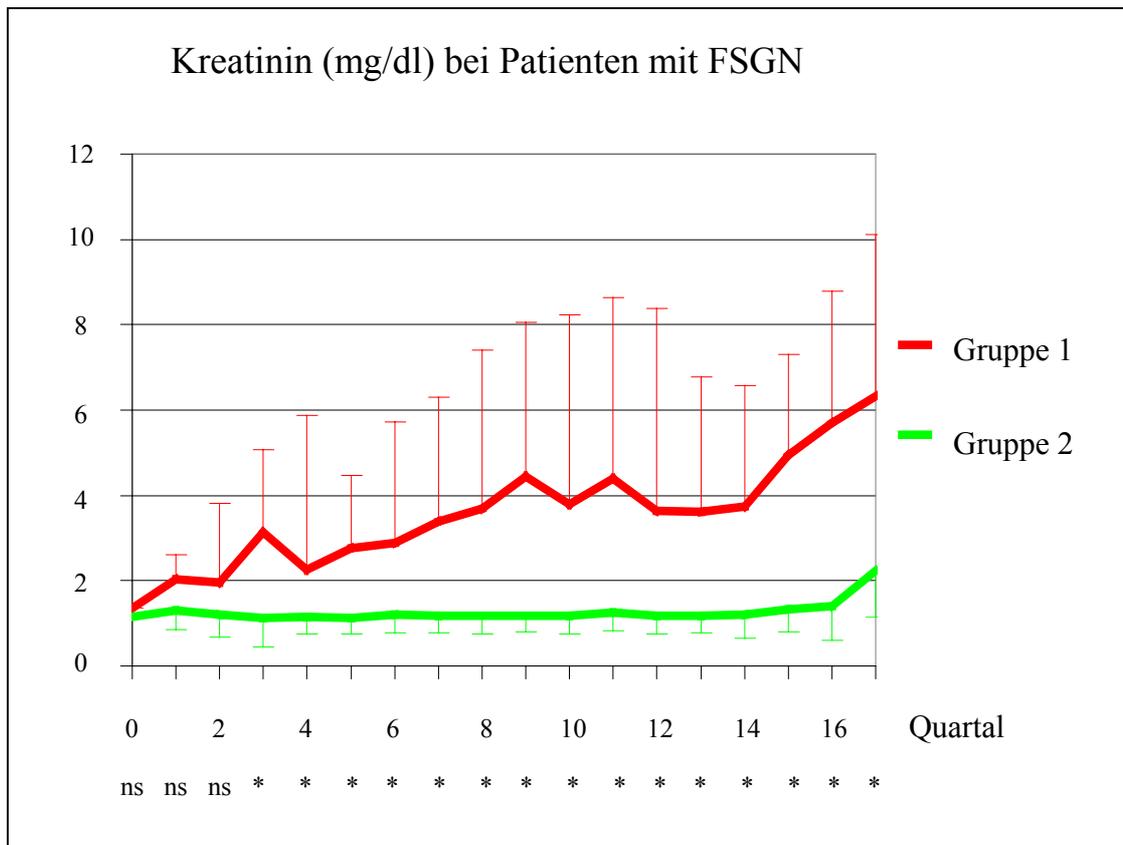
**Abbildung 4:** Beobachtungsdauer der Patienten in Jahren nach Diagnosestellung (mittlere Beobachtungszeit:  $7,3 \pm 5,0$  Jahre).

Um den Einfluss des ACE-Gen Polymorphismus auf die Progression der FSGN beurteilen zu können, wurden die Patienten in zwei Untergruppen eingeteilt:



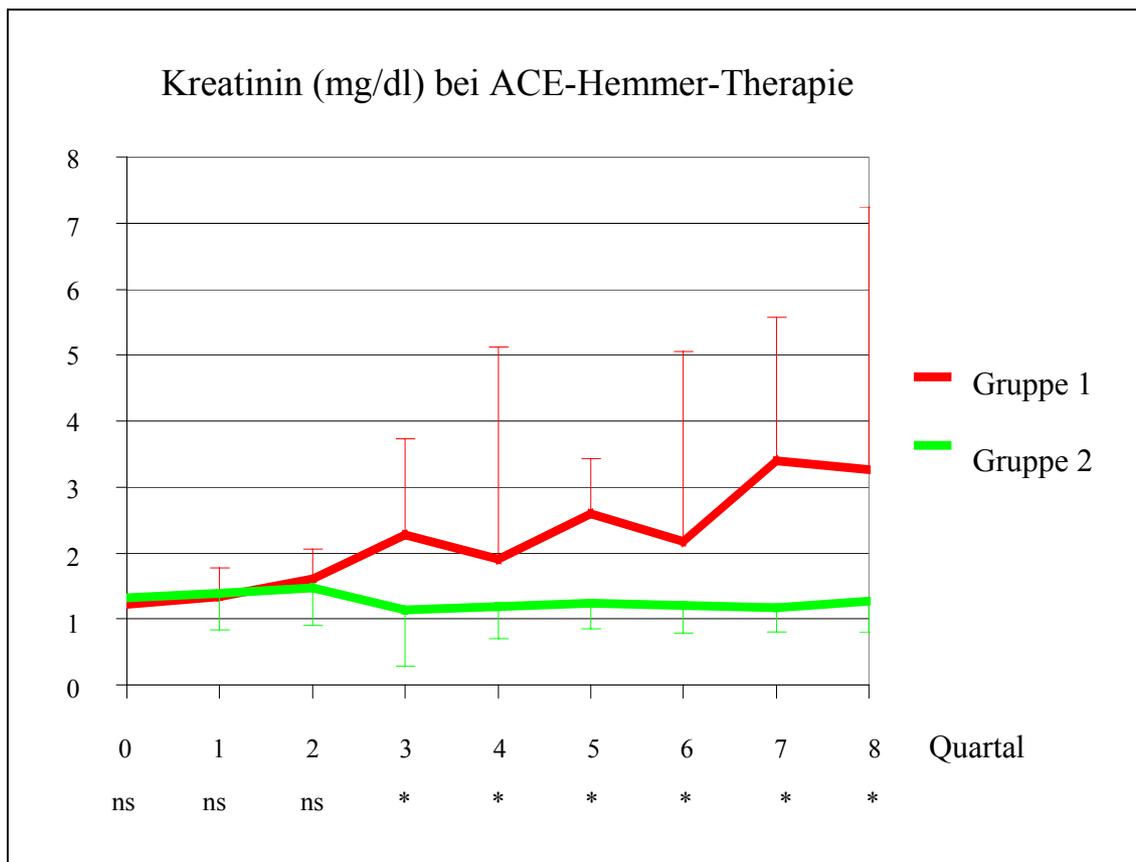
Dabei wurde als Kriterium für die **Gruppe 1** (fast progressors) mit schneller Entwicklung einer terminalen Niereninsuffizienz eine Verdoppelung des Kreatininwerts oder aber eine Dialysepflichtigkeit bzw. eine Nierentransplantation innerhalb von zwei Jahren nach Biopsie festgelegt.

Die **Gruppe 2** (slow progressors) zeigte im Gegensatz dazu einen geringeren Kreatininanstieg. Bereits ab dem 3. Quartal nach Biopsie ergab sich eine signifikante Differenzierung der beiden Patientengruppen (Abb.5).



**Abbildung 5:** Kreatininverlauf in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$  ab dem 3. Quartal; Vergleich von Gruppe 1 und 2 nach Mann-Whitney-U-Test).

Um einen Einfluss der Therapie mit ACE-Hemmern auf die Objektivität der Gruppeneinteilung auszuschließen, wurden die Patienten mit einer solchen Behandlung innerhalb der ersten 2 Jahre nach Biopsie in ihrem Kreatininverlauf gesondert überprüft. In der Gruppe 1 waren 14 Patienten (67 %) mit ACE-Hemmer-Therapie, in der Gruppe 2 13 Patienten (33 %). Auch hier zeigte sich ab dem 3. Quartal eine Signifikanz der Kreatininwerte zwischen den Gruppen, womit sich eine korrekte Aufteilung der Patienten belegen ließ (Abb.6)



**Abbildung 6:** Kreatininverlauf in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN und ACE-Hemmer-Therapie (ns = nicht signifikant, \* =  $p < 0,05$  ab dem 3. Quartal; Vergleich von Gruppe 1 und 2 nach Mann-Whitney-U-Test).

Von den 21 Patienten der **Gruppe 1** unterlagen nach Diagnosestellung 14 Patienten einer fulminanten Progression. Sie wurden durchschnittlich im 3. Jahr nach Biopsie dialysepflichtig. Neun von ihnen konnten im Mittel 5 Jahre nach Krankheitsbeginn nierentransplantiert werden. Sieben Patienten wurden später wieder dialysepflichtig. Einmal trat dabei eine rekurrente FSGN im Transplantat auf, bei den anderen handelte es sich um chronische Rejektionen. Vier Patienten erhielten ein zweites Nierentransplantat, einer sogar ein drittes.

Bei der **Gruppe 2** handelte es sich um benigne Verlaufsformen der FSGN. Obwohl von 39 dennoch fünf Personen dialysepflichtig geworden sind, trat dieses Ereignis im Durchschnitt erst im 8. Jahr nach Biopsie auf. Nach einem mittleren Krankheitsverlauf von 12 Jahren konnten drei Patienten erfolgreich nierentransplantiert werden.

## Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe für die Genanalyse bestand aus 30 weiblichen und 30 männlichen gesunden Probanden. Nieren-, Herz- und Lebererkrankungen in der Anamnese führten zum Ausschluss aus der Studie. Das Durchschnittsalter lag mit 33 Jahren rund 10 Jahre unter dem der Patienten.

## Aktenstudium

Anhand der vielfältigen Patientenunterlagen wurde retrospektiv der Krankheitsverlauf in Quartalsabständen erfasst und auf Zusammenhänge bezüglich der ACE-Genotypen untersucht. Folgende Quellen der Heinrich-Heine-Universität standen zur Verfügung:

- Archive der MNR-Klinik
- Archive der Chirurgischen Klinik
- Sektionsarchiv des Instituts für Pathologie
- Nephrologische Ambulanz
- Transplantationsbüro

Zusätzlich wurden zahlreiche hausärztliche und nephrologische Praxen in NRW konsultiert.

Besondere Aufmerksamkeit galt den Retentionswerten:

- Kreatinin (Norm: 0,7-1,5 mg/dl),
- Harnstoff (Norm: 11-55 mg/dl),
- Harnsäure (Norm: < 7,0 mg/dl),
- Proteinurie (Norm: < 150 g/24h)
- ECC (Norm: 100-160 ml/min/1,73m<sup>2</sup>KO).

Weitere Parameter waren:

- Gesamteiweiß (Norm: 6-8 g/dl) und Albumin im Serum (Norm: 3,6-5,5 g/dl)
- Hämoglobin im Serum (Norm: 12-17 g/dl)
- Lipidkonzentration im Serum: Cholesterin (Norm: < 200 mg/dl), Triglyceride (Norm: < 180 mg/dl), HDL (Norm: > 40 mg/dl), LDL (Norm: < 150 mg/dl); (Hyperlipidämie bei einem Gesamtcholesterin von > 250 mg/dl)
- Blutdruckwerte (Hypertonie bei Werten von systolisch > 140 mmHg und diastolisch > 90 mmHg).

Zusätzlich wurden die für die Erkrankung relevanten Medikamentengruppen aufgelistet:

- Antihypertensiva: - ACE-Hemmer
  - Diuretika
  - Kalzium-Antagonisten
  - Beta-Blocker
- Immunsuppressiva
- Kortikosteroide
- Lipidsenker

## 3.2 Bestimmung des ACE-Gen-Polymorphismus

### Blutentnahme und Konservierung:

Bei allen Patienten wurde eine Blutabnahme und eine klinische Untersuchung in der Nephrologischen Ambulanz der Universitätsklinik Düsseldorf durchgeführt. Sowohl bei Patienten als auch bei Kontrollpersonen wurde mit dem sterilen Vacutainer® - System venöses Blut entnommen, welches für die Bestimmung des ACE-Gens und des aktuellen ACE-Spiegels im Serum diente. Nach der Blutentnahme erfolgte die Hemmung der Blutgerinnung durch einen ACD-Zusatz im ACD-Röhrchen (ACD = Acidum citricum purum 2,5%, Dextrose 2,34% und Natrium citricum 2,16%). Aus dem verdünnten Vollblut wurden unter sterilen Bedingungen je 500 µl in sechs Eppendorf-Cups gegeben. Diese lagerten dann bei einer Temperatur von ca. -20°C bis zur Aufarbeitung der DNA.

### Extraktion der DNA aus dem Vollblut:

Es wurde der QIAamp Blood Kit von QIAGEN verwendet.

Die Extraktion der DNA aus den Leukozyten des Vollbluts besteht aus mehreren Schritten:

- Lysierung der DNA aus den Leukozyten
- Bindung der DNA an die QIAamp Silika-Membran
- Auswaschen der überflüssigen Proteine
- Herauslösen der DNA

### Lysierung:

Nach dem Auftauen des ACD-Blutes bei Raumtemperatur entnimmt man aus dem Eppendorf-Cup 200 µl Blut. Dieses wird zusammen mit 25 µl Protease und 200 µl Buffer (AL) sofort für 30 Sekunden auf dem Vortex-Gerät durchmischt. Die nun homogene

Flüssigkeit lässt man 10 Minuten im Wasserbad bei einer Temperatur von 70°C inkubieren, um störende Proteine zu spalten. Dann werden 210 µl absolutes Ethanol hinzugefügt. Eine nochmalige Homogenisierung erfolgt. Die DNA ist jetzt aus den Leukozyten freigesetzt.

#### Bindung der DNA:

Das Blutgemisch gibt man nun auf einen speziellen QIAamp-Filter und zentrifugiert es bei 6000 x g für eine Minute. Dabei wird die DNA an die QIAamp Silika-Membran adsorbiert. Salz und pH-Wert der Lösung verhindern eine Bindung von Proteinen oder anderen Kontaminationen an der Membran, welche die PCR stören würden. Das verbleibende Filtrat wird verworfen.

#### Waschung:

Man gibt nun 500 µl Buffer (AW) auf die Silika-Filtermembran. Danach folgt eine weitere Zentrifugation von einer Minute bei 6000 x g mit Verwerfen des Filtrats und eine erneute Buffer-(AW)-Zugabe von 500 µl auf die Filtermembran. Das Gemisch wird nun nochmals eine Minute bei 6000 x g und dann zwei Minuten bei maximaler Laufleistung zentrifugiert. Dieser Vorgang dient dazu, die verbliebenen Proteine und Kontaminationen zu entfernen. Die Zentrifugationen haben keinen Einfluss auf die Bindungsstabilität der DNA an der Silika-Membran.

#### Herauslösen der DNA:

Um die DNA aus der Filtermembran lösen zu können, wird diese mit 50 µl Tris-Puffer versetzt, der zuvor auf 70°C erhitzt worden ist. Dieses Gemisch muss nun fünf Minuten bei 70°C im Wasserbad inkubieren. Die dann herausgewaschene DNA sammelt sich während einer weiteren Zentrifugation von einer Minute bei 6000 x g am Boden des Eppendorf-Cups. Bis zur Konzentrationsmessung kann die DNA kurzzeitig bei +4 °C, für längere Zeiträume bei -20 °C gelagert werden.

## Konzentrationsbestimmung der DNA:

Die DNA-Konzentration lässt sich photometrisch bestimmen. Das Absorptionsmaximum der DNA liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die absorbierte Lichtmenge entspricht der vorliegenden Stoffmenge und kann durch die Extinktion ausgedrückt werden. Zum Beispiel entspricht eine Extinktion von 1 bei 260 nm ca. 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml. Die Extinktion steht dabei im logarithmisch umgekehrten Verhältnis zur Absorptionsmenge.

Pro 200 µl angesetzter ACD-Blutprobe können zwischen 4 – 12 µg reine DNA gewonnen werden.

Proteine haben im Gegensatz zur DNA ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Der Quotient der Extinktion von 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) dient zum Nachweis von restlichen Kontaminationen mit Proteinen. Für gut gereinigte Proben liegt dieser Quotient zwischen 1,7 und 1,9.

Um eine für den ACE-Gen-Polymorphismus möglichst günstige Konzentration des PCR-Ansatzes zu erhalten, muss die DNA nun auf 0,015 µg pro 5 µl verdünnt werden.

## Vervielfältigung der DNA mittels PCR:

Die Grundlagen der PCR für das Angiotensin-Converting-Enzym sind der Arbeit von Rigat aus dem Jahre 1992 entnommen.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion besteht aus:

- Versuchsansätzen
- Thermo-Cycler-Programm, in dem Denaturierung, Hybridisierung und Synthese der DNA in mehreren Zyklen durchlaufen werden



## Denaturierung

Der erste Zyklus beginnt mit einer 5-minütigen Phase bei 94 °C, um die Entwindung der DNA-Doppelstränge zu gewährleisten. Eine 30 Sekunden anhaltende Hitzebehandlung bei einer Temperatur von 94°C ist für die Trennung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge verantwortlich.

## Hybridisierung

Hierbei binden sich die Primer innerhalb von 25 Sekunden bei einer Temperatur von 64°C an den jeweils komplementären DNA-Abschnitt der Einzelstränge.

## Synthese der DNA

In einer 2-minütigen Phase bei einer Temperatur von 70°C verlängert die Taq-Polymerase die Primer und synthetisiert somit neue DNA. An den letzten Zyklus schließt sich eine 7-minütige Laufzeit bei 72°C an, die zur Vervollständigung der Transkription und zum Verschließen möglicher Lücken dient.

Insgesamt werden diese Vorgänge in 31 Zyklen wiederholt durchlaufen. Ergebnis ist eine millionenfach vervielfältigte Kopie der zuvor in den Cycler gegebenen DNA-Probe.

## Gelelektrophorese – Darstellung der ACE-Gen-Allele:

### Gießen des Agarosegels:

1,5 g Agarose (GIBCO BRL, Life Technologies®) gibt man mit 100 ml 1 x TAE Puffer (Tris-Puffer, Eisessig, EDTA und Aqua dest.) zusammen. Diese 1,5 prozentige Lösung wird für zwei Minuten aufgekocht und nach Zugabe von 5 µl Ethidiumbromid in die vorgegebene Gel-Form gegossen. Durch zuvor eingesetzte Kämme entstehen Taschen

in dem abkühlenden Gel. Nach Entnahme der Kämme wird das Gel in 1 x TAE Puffer einer Elektrophorese-Kammer (Biometra ®) gelegt.

### Elektrophorese – Kammer:

Vor dem Füllen der Geltaschen pipettiert man 10 µl der DNA unter der Ölschicht ab und versetzt es mit 2 µl eines Blaumarkers (Bromphenolblau, Ficoll, Glycerin, TAE-Puffer). Das Einfüllen der 12 µl in die Geltaschen ist somit sichtbar. Mit Hilfe des schweren Ficolls versinken die Proben schneller zum Boden der Taschen. Das Gel wird an eine elektrische Spannung von 110 bis 120 Volt angeschlossen. Die negativ geladenen Moleküle wandern nun zur Anode.

Die Allele für Deletion und Insertion unterscheiden sich in ihrer Molekülgröße. Das D-Allel besteht aus nur 319 Basenpaaren und ist somit im elektrischen Feld schneller als das aus 597 Basenpaaren bestehende I-Allel. Nach einer 30-minütigen Laufzeit wird das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen. Die entstandenen Allel-Banden können nun durch den Bestandteil Ethidiumbromid unter UV-Anregung sichtbar gemacht werden.

Für homozygote Genträger ist nur das jeweilige Allel sichtbar:

DD = D-Allel

II = I-Allel

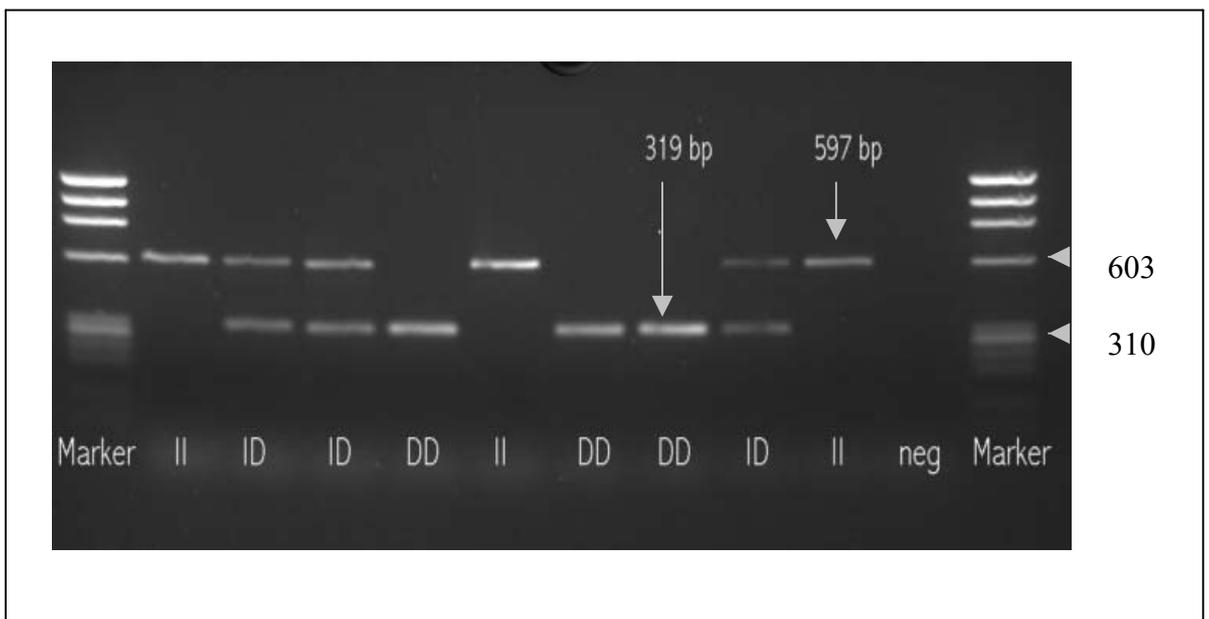
Bei heterozygoten Proben zeigen sich zwei Banden:

ID = I-Allel und D-Allel

Um die Banden identifizieren zu können, lässt man einen Längen-Marker im Gel mitlaufen, welcher gleichfalls mit einem Blaumarker versetzt ist. Der Marker erzeugt Banden von definierter Basenpaarlänge. Bei dieser Arbeit wurde ein Marker von Boehringer Mannheim (Nr.IX) verwendet, welcher zehn verschiedene DNA-Banden anzeigt. Da-

runter sind auch eine von 310 und eine von 603 Basenpaaren, welche den gesuchten D- und I-Allel-Banden sehr nahe liegen.

Zur Sicherheit der Ergebnisse lässt man eine Kontrolle für jeden Genotyp (DD, ID, II) mitlaufen. Außerdem gibt man eine Negativkontrolle (Aqua dest.) hinzu, um Kontaminationen auszuschließen (Abb.7).



**Abbildung 7:** Darstellung der Genotypen des ACE-Gen Polymorphismus durch Gel-elektrophorese. Der Marker erzeugt Banden von 310 und 603 Basenpaaren, sodass das Deletions-Allel mit 319 und das Insertionsallel mit 597 Basenpaaren lokalisiert werden kann. Die zusätzliche Negativkontrolle schließt eventuelle Kontaminationen aus.

### Insertions-spezifische Primer:

Aus der Literatur stammt der Hinweis, dass einige heterozygote ID-Träger in der Elektrophorese fälschlicherweise als DD-Genotypen gewertet wurden (Ueda 1996), da das D-Allel stärker als das I-Allel exprimiert sein kann (Shanmugam 1993, Fogarty 1994). Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden alle homozygot erscheinenden DD-Träger mittels einer zweiten PCR überprüft. Hierbei verwendet man zwei Insertions-spezifische Primer. Dies ist das Verfahren der Wahl, um eine korrekte Genotypbestimmung sichern zu können. Der sense-Primer hat hierbei die Basenfolge: 5' TGG GAC

CAC AGC GCC CGC CAC TAC-3', der antisense-Primer besteht aus: 5'-TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA-3'.

Diese insertionsspezifische PCR ist vergleichbar mit der oben beschriebenen, wobei man nur die Hälfte (25 µl) des Versuchsansatzes nutzt. Nach Fertigstellung der Versuchsansätze werden im Cyclyer jedoch andere Zykluszeiten und Temperaturen durchlaufen. Der erste Zyklus beginnt mit einer 5-minütigen Phase bei 94 °C. Die Denaturierung besteht wie oben aus Erhitzung auf 94°C für 30 Sekunden. Die Hybridisierung dauert 25 Sekunden bei einer Temperatur von 67°C. Die Synthese der DNA benötigt eine 2-minütige Phase bei 70°C, wobei im letzten Zyklus eine 7-minütige Laufzeit bei 72°C angeschlossen wird. Die verschiedenen Zyklen durchlaufen 33 Wiederholungen.

Bei dieser PCR wird eine DNA-Sequenz vervielfältigt, welche spezifisch für das Insertions-Allel ist und nur bei dessen Anwesenheit sichtbar wird. Die Sequenz besteht aus 333 Basenpaaren. Wird hierbei nun keine Bande sichtbar, so sind die untersuchten Proben mit Sicherheit homozygote DD-Genotypen. Für die insertionsspezifische PCR verwendet man ebenfalls ein 1,5 prozentiges Agarosegel sowie den selben Blaumarker und DNA-Längen-Marker wie bei der oben beschriebenen PCR. Um die Ergebnisse zu sichern, lässt man hier ebenfalls Kontrollen für jeden Genotyp sowie eine Negativkontrolle mitlaufen.

### Bestimmung des ACE-Plasmaspiegels:

Der aktuelle ACE-Spiegel im Serum wurde im Nephrologischen Labor durch einen Radioassay ermittelt. Hierbei nutzt man die Funktion des ACE als Carboxypeptidase, welche von geeigneten Substanzen wie dem Angiotensin I das C-terminale Ende abspaltet. Bei der Messung der ACE-Aktivität übernimmt ein Tripeptid die Funktion des Substrates, wobei mittels Endpunktkinetik dessen Umsatzrate bestimmt wird. Ein Kontrollplasma mit bekanntem ACE-Spiegel dient als Referenz. Der Normwert des ACE im Serum liegt zwischen 50 und 120 U/l. Der Radioassay hat im Vergleich zu spektrometrischen Messverfahren eine bessere Sensitivität und zeigt keine wesentliche Beeinflussung durch Veränderungen der Blutproben (Hämolyse, lipämisches Serum).

### 3.3 Statistik

#### Fallzahl:

Diese Studie wurde vom Biomathematischen Institut (Prof. Dr. Mau) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unterstützt und lief aufgrund der geringen Fallzahl als Pilotstudie mit offener Fallzahl.

#### Auswertung der Ergebnisse:

Mit Hilfe des Statistik-Programmes SPSS in der Version 9.0 wurden sowohl die aktuellen Ergebnisse als auch die Retentionsparameter erfasst und daraus die Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde ein Wahrscheinlichkeitswert von  $p < 0,05$  als signifikant erachtet.

Die Allelverteilung für die ACE-Gen-Vergleiche zwischen den Gruppen 1 und 2 (fast und slow progressors) wurden mit dem Chi-Quadrat-Test und dem exakten Fisher-Test überprüft. Die ACE-Genotypen wurden hinsichtlich des Hardy-Weinberg-Gesetzes untersucht. Dies legt der Verteilung der Allele eine statistische Wahrscheinlichkeit zugrunde. Danach bleibt die Häufigkeit der Genotypen von Generation zu Generation unverändert. Die heterozygoten Genträger haben ein weit höheres Vorkommen als die homozygoten Konstellationen, welche zu circa gleichen prozentualen Anteilen vorhanden sind. Ausnahmen ergeben sich durch biologische (z.B. Mutationen) oder demographische (z.B. Inzucht) Einflussfaktoren.

Eine Überprüfung auf eine eventuelle Normalverteilung der erhobenen Verlaufsparemeter (z.B. Kreatinin, Proteinurie, RR) erfolgte mit dem W-Test von Shapiro und Wilk. Bei Gegenüberstellung von 3 Merkmalen, also bei Vergleich der Verlaufswerte von DD, ID und II, wurden die nicht normal verteilten Daten mittels des Kruskal-Wallis-H-Test verglichen. Normalverteilungen ergaben sich nicht. In der Gegenüberstellung von DD versus ID/II und DD/ID versus II fand zum Parametervergleich der Mann-Whitney-U-Test Anwendung.

## 4. Ergebnisse

### **4.1 ACE-Gen-Polymorphismus bei Gesunden und Patienten mit FSGN**

#### Kontrollgruppe

Bei den 60 gesunden Probanden ergab sich eine Verteilung des ACE-Gen-Polymorphismus entsprechend dem Hardy-Weinberg-Gesetz, welches der Verteilung der Genotypen eines genetischen Systems eine statistische Wahrscheinlichkeit zugrunde legt (Tab.2). Das ID-Gen war hierbei circa zur Hälfte vertreten. DD- und II-Genotyp machten jeweils ungefähr ein Viertel des Polymorphismus aus.

<b>Geschlecht</b>	<b>DD-Gen</b>	<b>ID-Gen</b>	<b>II-Gen</b>	<b>Gesamt</b>
Männlich	3 (10,0 %)	19 (63,3 %)	8 (26,7 %)	30 (100,0 %)
Weiblich	10 (33,3 %)	15 (50,0 %)	5 (16,7 %)	30 (100,0 %)
<b>Gesamt</b>	<b>13 (21,7 %)</b>	<b>34 (56,6 %)</b>	<b>13 (21,7 %)</b>	<b>60 (100,0 %)</b>

**Tabelle 2:** ACE-Gen-Verteilung bei den Kontrollpersonen mit Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Probanden ( $p = 0,085 = ns$ ).

Bei den weiblichen Personen war der DD-Typ relativ häufiger zu finden als bei den männlichen, bei denen eher das II-Gen vertreten war. Es gab jedoch keine Signifikanz ( $p = 0,085$ ). Die ID-Konstellation war sowohl bei Männern als auch bei Frauen circa zur Hälfte vorhanden.

Bei einer Differenzierung in Probanden mit und ohne D-Allel war diese Tendenz, wenn auch nicht in so starkem Maße, ebenfalls ersichtlich ( $p = 0,35$ ) (Tab.3).

<b>Gruppe</b>	<b>DD-/IDGen</b>	<b>II-Gen</b>	<b>Gesamt</b>
Männlich	22 (73,3 %)	8 (26,7 %)	30 (100,0 %)
Weiblich	25 (83,3 %)	5 (16,7 %)	30 (100,0 %)

**Tabelle 3:** D-Allel-Verteilung bei männlichen und weiblichen Kontrollpersonen ( $p = 0,35 = ns$ ).

Erst bei Vergleich von Personen mit und ohne I-Allel konnte man einen signifikanten Unterschied zwischen Männern und Frauen feststellen ( $p < 0,05$ ) (Tab.4).

<b>Gruppe</b>	<b>DD-Gen</b>	<b>ID/II-Gen</b>	<b>Gesamt</b>
Männlich	3 (10,0 %)	27 (90,0 %)	30 (100,0 %)
Weiblich	10 (33,3 %)	20 (66,7 %)	30 (100,0 %)

**Tabelle 4:** I-Allel-Verteilung bei männlichen und weiblichen Kontrollpersonen ( $p < 0,05$ ).

## Patientengruppe

Der ACE-Gen-Polymorphismus der Patienten ergab eine ähnliche Verteilung wie die der Kontrollgruppe (Tab.5). Auch hier war der ID-Typ circa bei der Hälfte aller Patienten vorhanden, während der II-Typ nur zu einem Drittel vertreten war, der DD-Typ sogar zu einem noch kleineren Prozentsatz.

<b>Geschlecht</b>	<b>DD-Gen</b>	<b>ID-Gen</b>	<b>II-Gen</b>	<b>Gesamt</b>
Männlich	2 (8,0 %)	14 (56,0 %)	9 (36,0 %)	25 (100,0 %)
Weiblich	9 (25,7 %)	17 (48,6 %)	9 (25,7 %)	35 (100,0 %)
<b>Gesamt</b>	<b>11 (18,3 %)</b>	<b>31 (51,7 %)</b>	<b>18 (30,0 %)</b>	<b>60 (100,0 %)</b>

**Tabelle 5:** ACE-Gen-Verteilung der Patienten mit FSGN mit Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Patienten ( $p = 0,21 = ns$ ).

Bei den weiblichen Patienten war der DD-Genotyp im Gegensatz zu den männlichen Patienten wieder vermehrt zu finden ( $p = 0,21$ ). ID- und II-Typ waren bei Frauen und Männern ungefähr zu gleichen Prozentsätzen vorhanden.

Stellt man dabei D- und I-Allel gegenüber, war dieser Tatbestand gleichfalls ohne Signifikanz vorzufinden (Tab.6 und 7).

<b>Gruppe</b>	<b>DD-Gen</b>	<b>ID/II-Gen</b>	<b>Gesamt</b>
Männlich	2 (8,0 %)	23 (92,0 %)	25 (100,0 %)
Weiblich	9 (25,7 %)	26 (74,3 %)	35 (100,0 %)

**Tabelle 6:** I-Allel-Verteilung bei männlichen und weiblichen Patienten mit FSGN ( $p = 0,83 = ns$ ).

<b>Gruppe</b>	<b>DD-/ID-Gen</b>	<b>II-Gen</b>	<b>Gesamt</b>
Männlich	16 (64,0 %)	9 (36,0 %)	25 (100,0 %)
Weiblich	26 (74,3 %)	9 (25,7 %)	35 (100,0 %)

**Tabelle 7:** D-Allel-Verteilung bei männlichen und weiblichen Patienten mit FSGN ( $p = 0,40 = ns$ ).

Bei Betrachtung der Genotypen in Bezug auf das Alter der Patienten bei Diagnosestellung ergaben sich folgende Werte (Tab.8):

	<b>DD-Gen</b>	<b>ID-Gen</b>	<b>II-Gen</b>
Alter (Jahre)	40,55	40,74	45,89
Patientenanzahl	11	31	18

**Tabelle 8:** ACE-Gen-Verteilung mit zugehörigem Patientendurchschnittsalter bei Diagnosestellung und entsprechender Patientenanzahl ( $p = 0,58 = ns$ ).

Hierbei zeigte sich ein zeitlich früheres Auftreten der Erkrankung bei Patienten mit DD-Genotyp. Diese Tendenz setzte sich in einem höheren Durchschnittsalter bei Patienten mit II-Typ fort, erreichte jedoch keine signifikanten Größen ( $p = 0,58$ ).

Bei Unterscheidung in Genotypen mit und ohne D-Allel ergab sich noch deutlicher ein jüngeres Erkrankungsalter bei Vorliegen des D-Allels, somit deutet das D-Allel auf ein früheres Auftreten der FSGN hin (Tab.9).

	<b>DD-/ID-Gen</b>	<b>II-Gen</b>
Alter (Jahre)	40,69	45,89
Patientenanzahl	42	18

**Tabelle 9:** D-Allel-Verteilung sowie Mittelwerte des Patientenalters bei Diagnosestellung und zugehörige Patientenanzahl ( $p = 0,23 = ns$ ).

Überprüfte man die Genotypverteilung auf Vorliegen eines I-Allels, so fand sich nur eine schwache Tendenz für ein späteres Auftreten der Erkrankung bei dem ID/II-Gen (Tab.10).

	<b>DD-Gen</b>	<b>ID/II-Gen</b>
Alter (Jahre)	40,55	42,63
Patientenanzahl	11	49

**Tabelle 10:** I-Allel-Verteilung sowie Mittelwerte des Patientenalters bei Diagnosestellung und zugehörigen Patientenanzahl ( $p = 0,72 = ns$ ).

Bei einer Differenzierung des Patientenalters in vor und nach dem 40. Lebensjahr zeigte sich gleichfalls eine stärkere Tendenz zum DD-Genotyp bei der jungen Patientengruppe und eine vermehrte Häufigkeit des II-Genotyps bei den älteren Patienten ( $p = 0,10$ ) (Tab.11).

<b>Alter bei Biopsie</b>	<b>DD-Gen</b>	<b>ID-Gen</b>	<b>II-Gen</b>	<b>Gesamt</b>
< 40 Jahre	7 (24,1 %)	17 (58,6 %)	5 (17,2 %)	29 (100,0 %)
> 40 Jahre	4 (12,9 %)	14 (45,2 %)	13 (41,9 %)	31 (100,0 %)
<b>Gesamt</b>	11 (18,3 %)	31 (51,7 %)	18 (30,0 %)	60 (100,0 %)

**Tabelle 11:** ACE-Gen-Polymorphismus bei Patienten mit FSGN mit Unterscheidung des Alters bei Biopsie ( $p = 0,10 = ns$ ).

Eine Signifikanz ergab sich, wenn man die Prävalenz des D-Allels mit der des II-Genotyps vergleicht ( $p < 0,05$ ). Hieraus lässt sich schließen, dass das D-Allel für ein früheres Auftreten der FSGN mitverantwortlich sein kann (Tab.12).

<b>Alter bei Biopsie</b>	<b>DD-/ID-Gen</b>	<b>II-Gen</b>	<b>Gesamt</b>
< 40 Jahre	24 (82,8 %)	5 (17,2 %)	29 (100,0 %)
> 40 Jahre	18 (58,1 %)	13 (41,9 %)	31 (100,0 %)
<b>Gesamt</b>	42 (70,0 %)	18 (30,0 %)	60 (100,0 %)

**Tabelle 12:** ACE-Gen-Polymorphismus bei Patienten mit FSGN mit Unterscheidung des Alters bei Biopsie ( $p < 0,05$ ).

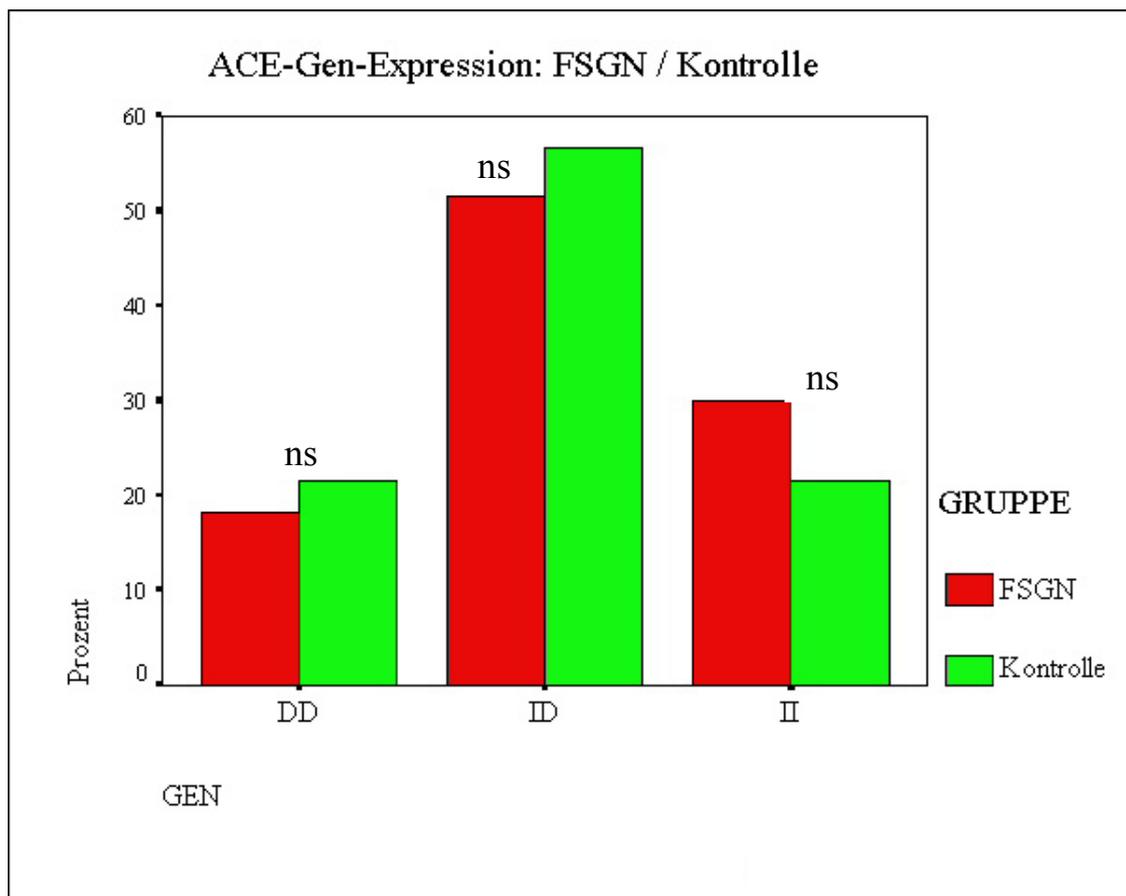
Bei Betrachtung des I-Allels ließen sich dagegen keine signifikanten Unterschiede finden ( $p = 0,27$ ), obwohl auch hier Tendenzen zu einem älteren Patientengut bei dem ID/II-Genotyp ersichtlich waren (Tab.13).

<b>Alter bei Biopsie</b>	<b>DD-Gen</b>	<b>ID/II-Gen</b>	<b>Gesamt</b>
< 40 Jahre	7 (24,1 %)	22 (75,9 %)	29 (100,0 %)
> 40 Jahre	4 (12,9 %)	27 (87,1 %)	31 (100,0 %)
<b>Gesamt</b>	11 (18,3 %)	49 (81,7 %)	60 (100,0 %)

**Tabelle 13:** ACE-Gen-Polymorphismus bei Patienten mit FSGN mit Unterscheidung des Alters bei Biopsie ( $p = 0,27 = ns$ ).

## Vergleich

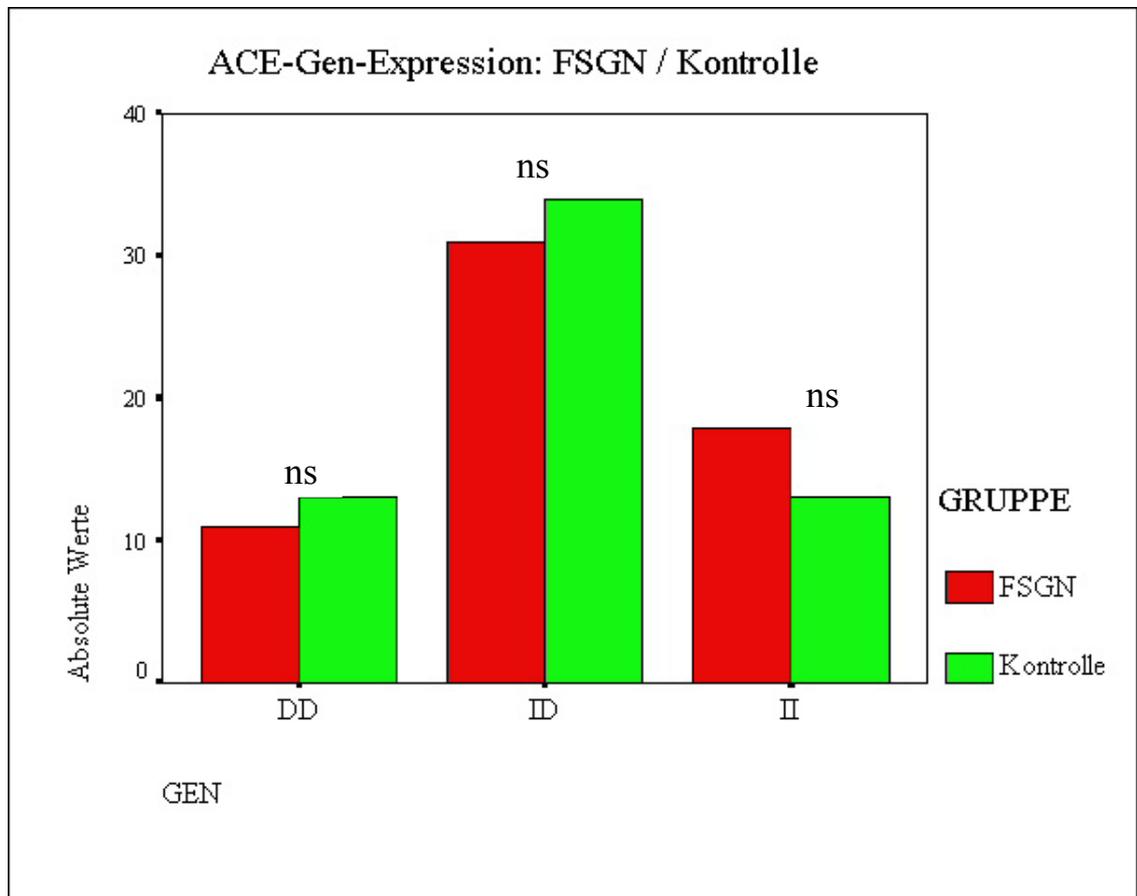
Zwischen der gesunden Kontrolle und den Patienten mit einer FSGN ergaben sich im Polymorphismus des ACE-Gens keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,57$ ) (Abb.8).



**Abbildung 8:** Prozentuale Verteilung des ACE-Gens bei Patienten mit FSGN und Kontrollgruppe ( $p = 0,57$ ) (ns = nicht signifikant).

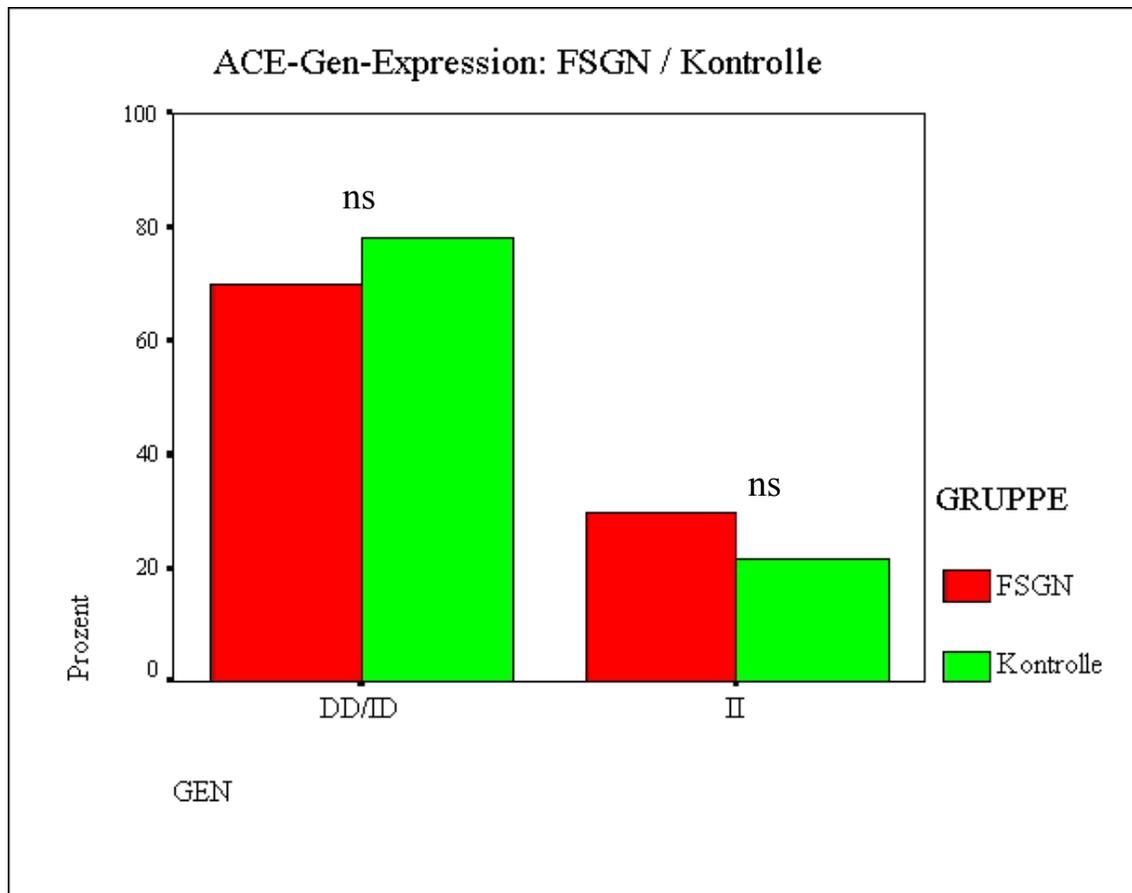
Somit besteht keine Korrelation zwischen dem ACE-Gen-Polymorphismus und dem Auftreten einer FSGN. Der als Risikofaktor beschriebene DD-Genotyp war bei unserer Kontrollgruppe sogar häufiger vertreten als unter den Patienten.

Die absoluten Zahlen der ACE-Gen-Verteilung bei Patienten mit FSGN und den Kontrollpersonen sind aus der folgenden Grafik ersichtlich (Abb.9).



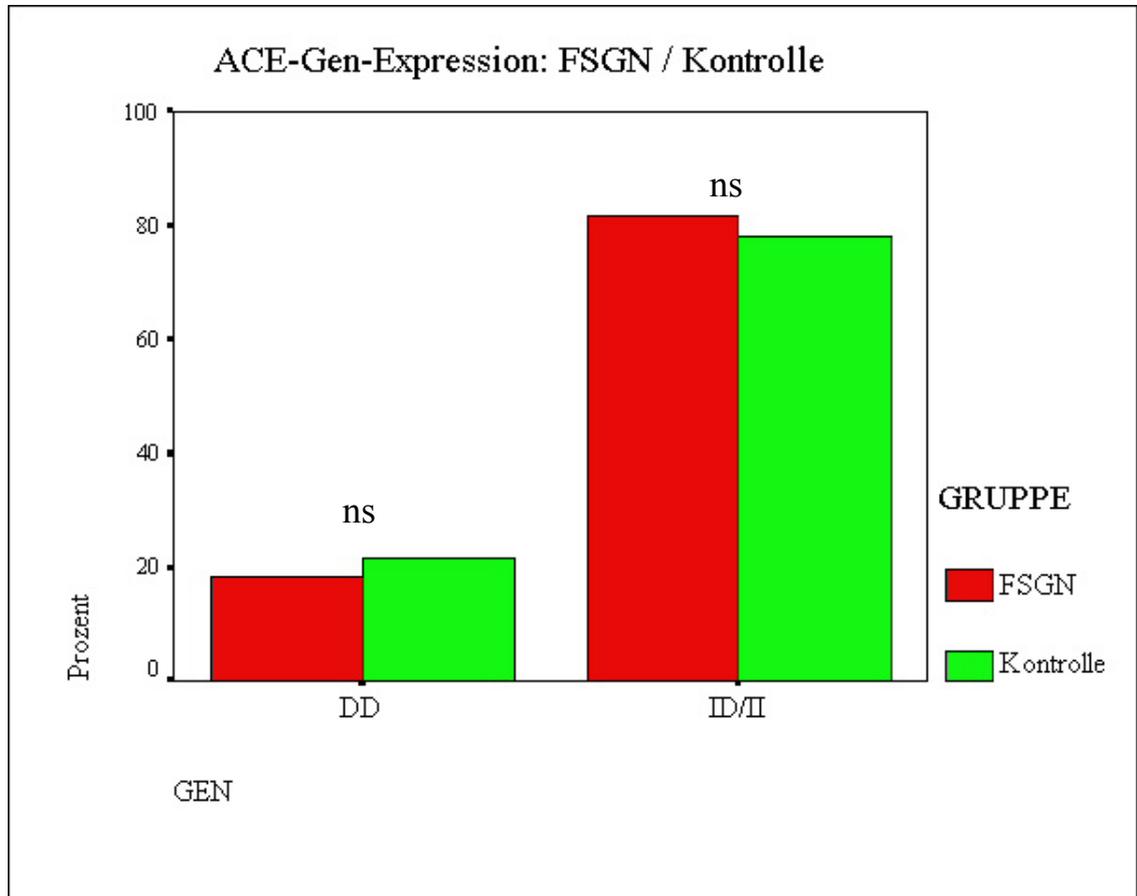
**Abbildung 9:** Absolute Zahlen des ACE-Gen-Polymorphismus bei Patienten mit FSGN und Kontrollgruppe (ns =nicht signifikant).

Auch bei Betrachtung des D-Allels fand sich keine signifikante Abweichung zwischen Patienten und Kontrollpersonen ( $p = 0,30$ ) (Abb.10).



**Abbildung 10:** Verteilung des D-Allels in Prozenten bei Patienten mit FSGN und Kontrollgruppe ( $p = 0,30$ ) (ns = nicht signifikant).

Bei Untersuchung auf Vorhandensein eines I-Allels gab es ebenfalls keine Signifikanzen zwischen Patienten und Kontrolle ( $p = 0,65$ ) (Abb.11).



**Abbildung 11:** Verteilung des I-Allels in Prozenten bei Patienten mit FSGN und Kontrollgruppe ( $p = 0,65$ ) (ns = nicht signifikant).

## 4.2 Verteilung des DD-Genotyps bei Patienten mit FSGN

Die Patienten hatten hinsichtlich ihrer Eingruppierung eine Verteilung von circa eins zu zwei, wobei die Gruppe 1 (fast progressors) ein Drittel und die Gruppe 2 (slow progressors) zwei Drittel ausmachte (Tab.14).

Gruppe	Anzahl	Prozent
1 (fast)	21	35 %
2 (slow)	39	65 %

**Tabelle 14:** Verteilung der Patienten mit FSGN in Gruppe 1 und 2.

Die Anzahl von männlichen und weiblichen Probanden in den Gruppen war unterschiedlich. In der Gruppe 1 waren deutlich weniger Männer als Frauen zu finden, in der Gruppe 2 war das Verhältnis eher ausgeglichen (Tab.15). Signifikanzen konnten hier nicht gefunden werden ( $p = 0,34$ ).

Gruppe	Männlich	Weiblich	Gesamt
1 (fast)	7 (33,3 %)	14 (66,7 %)	21 (100,0 %)
2 (slow)	18 (46,2 %)	21 (53,8 %)	39 (100,0 %)

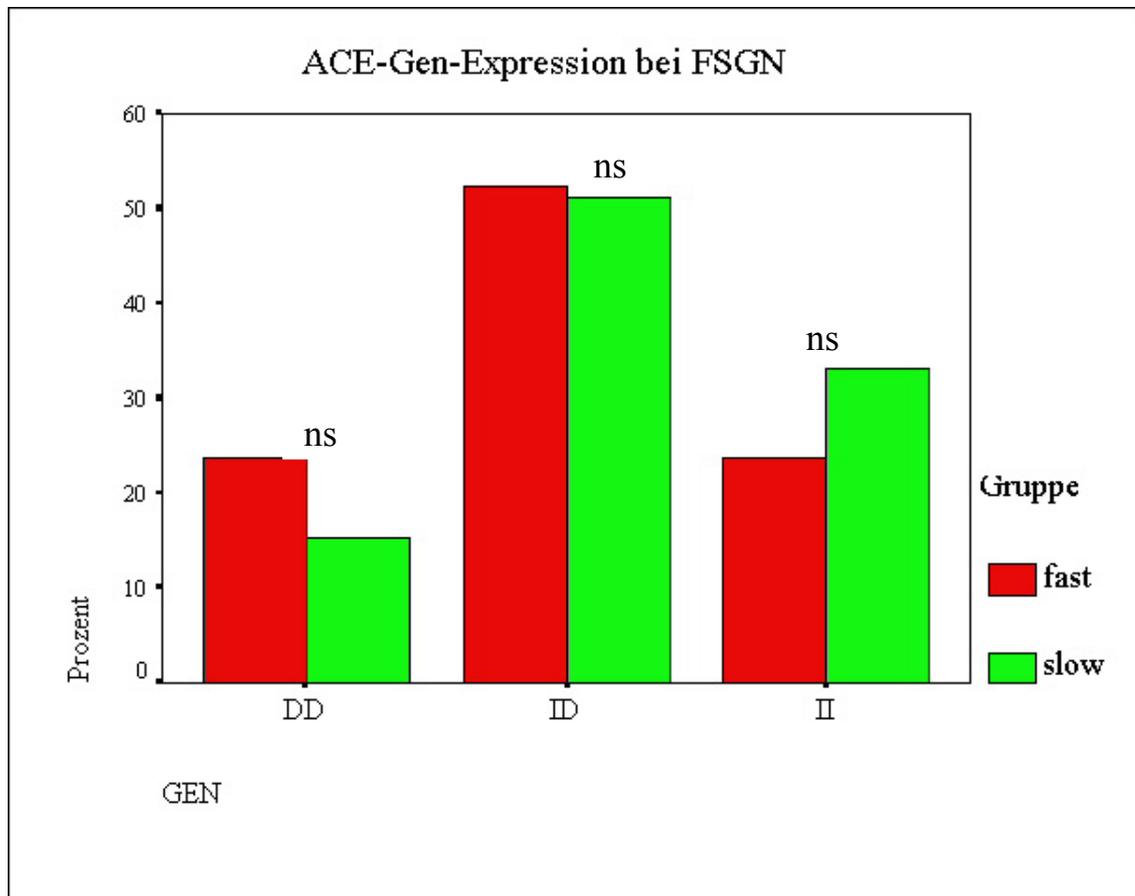
**Tabelle 15:** Gruppenverteilung der männlichen und weiblichen Patienten mit FSGN ( $p = 0,34 = ns$ ).

Die Altersverteilung in den Gruppen zeigte ein niedrigeres Durchschnittsalter in der Gruppe 1. Die Abweichung zur Gruppe 2 war jedoch nicht signifikant ( $p = 0,59$ ) (Tab.16). Trotzdem wurde ersichtlich, dass die schnell terminal werdende Gruppe auch ein zeitlich früheres Auftreten der Erkrankung aufwies.

Gruppe	Alter (Jahre)
1 (fast)	40,57
2 (slow)	43,15

**Tabelle 16:** Durchschnittsalter der Patienten mit FSGN in den Untergruppen ( $p = 0,59 = ns$ ).

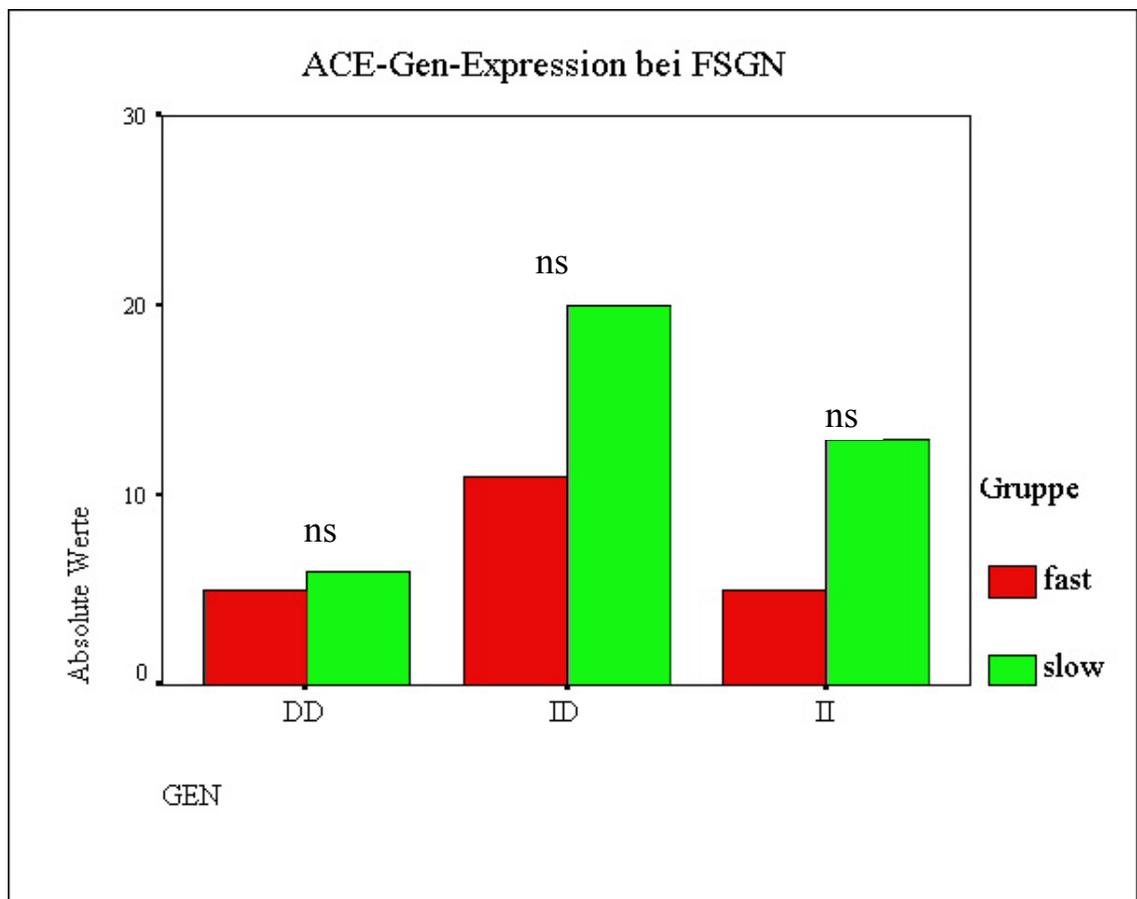
Zwischen den Patientengruppen 1 und 2 ergaben sich keine Signifikanzen in der Verteilung des ACE-Gen-Polymorphismus ( $p = 0,62$ ) (Abb.12).



**Abbildung 12:** Prozentuale Verteilung des ACE-Gen-Polymorphismus in Patientengruppe 1 und 2 ( $p = 0,62$ ) (ns = nicht signifikant).

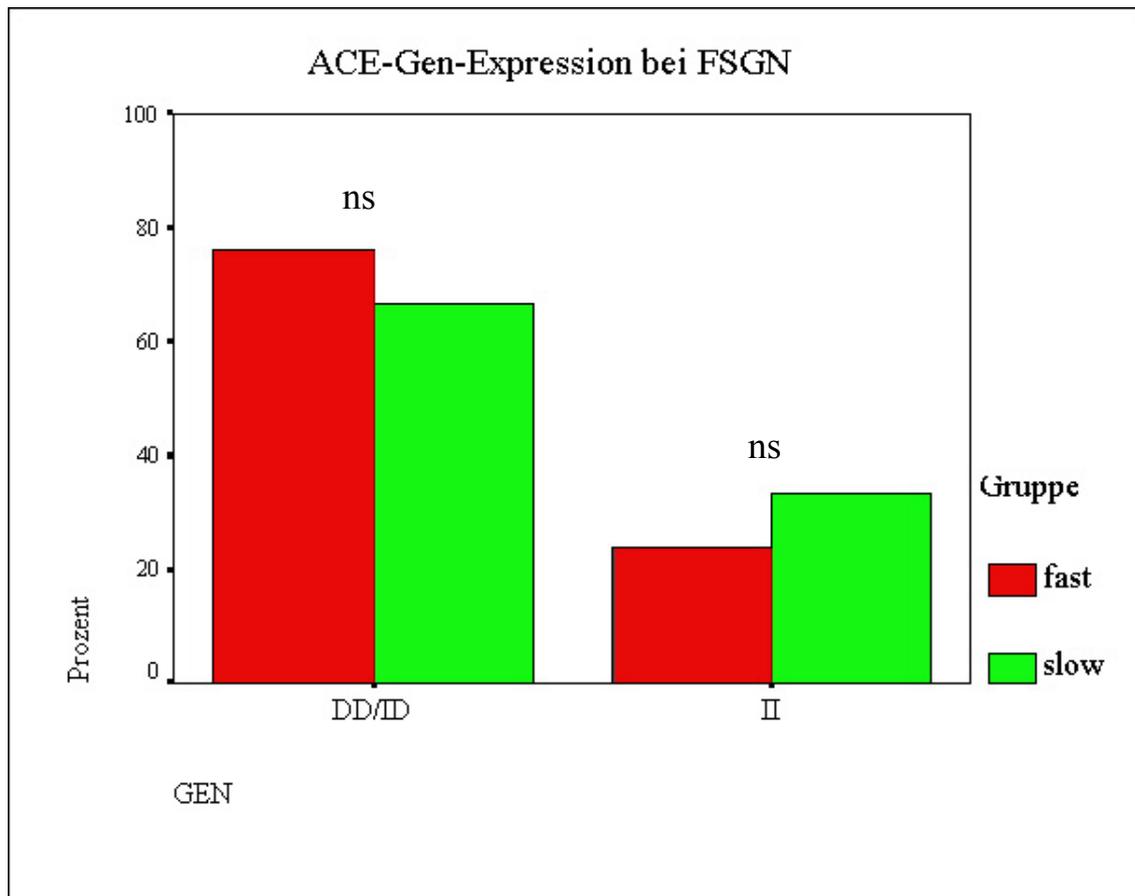
Beim DD-Genotyp bestand jedoch eine Tendenz für ein vermehrtes Auftreten in der Gruppe 1. Das II-Gen zeigte sich häufiger in der Gruppe 2. Das ID-Gen war wieder mit circa 50 prozentiger Häufigkeit zu finden. Diese Differenzen ergaben aber keine Signifikanzen, womit eine eindeutige Korrelation zwischen dem ACE-Gen und der Progression der FSGN nicht festgestellt werden konnte.

Die absoluten Zahlen waren dementsprechend (Abb.13).



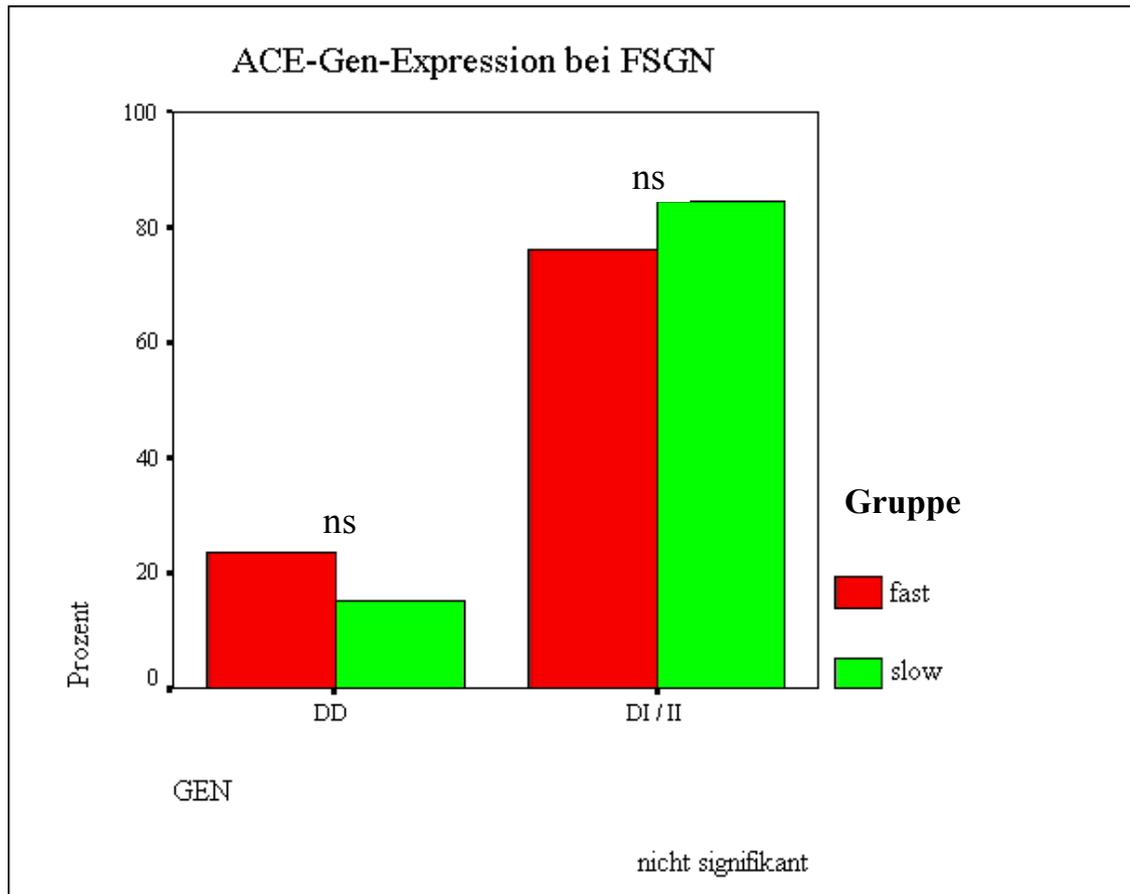
**Abbildung 13:** Absolute Zahlen des ACE-Gen-Polymorphismus in Patientengruppe 1 und 2 (ns = nicht signifikant).

Auch bei der Gegenüberstellung der Genotypen mit und ohne D-Allel konnte keine Signifikanz gefunden werden ( $p = 0,44$ ), die Tendenz zeigte jedoch ein häufigeres Vorkommen des D-Allels bei Patienten in Gruppe 1 und eine erhöhte Prävalenz des II-Gens in Gruppe 2 (Abb.14).



**Abbildung 14:** Prozentuale Verteilung des D-Allels in Patientengruppe 1 und 2 ( $p = 0,44$ ) (ns = nicht signifikant).

Bei Vergleich von Patienten mit und ohne I-Allel traten ähnliche Abweichungen auf. Es zeigte sich eine tendenzielle Erhöhung des DD-Genotyps bei Gruppe 1 und ein vermehrtes Vorhandensein des I-Allels bei Gruppe 2. Diese Unterschiede waren aber gleichfalls nicht signifikant ( $p = 0,42$ ) (Abb.15).



**Abbildung 15:** Prozentuale Verteilung des I-Allels in Patientengruppe 1 und 2 ( $p = 0,42$ ) (ns = nicht signifikant).

In den Gruppen 1 und 2 war die Anzahl der Männer und Frauen verschieden gewichtet (Tab.17 und 18). Die Frauen zeigten eine vermehrte Häufigkeit in der schnell terminal werdenden Gruppe und ein erhöhtes Vorkommen des DD-Genotyps im Vergleich zu den Männern. Es gab aber keine Signifikanz.

Gruppe	Geschlecht	DD-Gen	ID-Gen	II-Gen	Gesamt
1 (fast)	Männlich	0 (0,0 %)	6 (28,6 %)	1 (4,8 %)	7 (33,4 %)
	Weiblich	5 (23,8 %)	5 (23,8 %)	4 (19,0 %)	14 (66,6 %)

**Tabelle 17:** ACE-Gen-Polymorphismus der männlichen und weiblichen Patienten in Gruppe 1 ( $p = 0,08 = ns$ ).

Gruppe	Geschlecht	DD-Gen	ID-Gen	II-Gen	Gesamt
2 (slow)	Männlich	2 (5,1 %)	8 (20,5 %)	8 (20,5 %)	18 (46,1 %)
	Weiblich	4 (10,3 %)	12 (30,8 %)	5 (12,8 %)	21 (53,9 %)

**Tabelle 18:** ACE-Gen-Polymorphismus der männlichen und weiblichen Patienten in Gruppe 2 ( $p = 0,38 = ns$ ).

Auch bei der Untersuchung von Präsenz bzw. Abwesenheit des D-Allels konnten keine signifikanten Differenzen erreicht werden. Die Tendenz zeigte sich jedoch auch hier zugunsten einer vermehrten Häufigkeit des D-Allels bei den Frauen (Gruppe 1:  $p = 0,47$ , Gruppe 2:  $p = 0,17$ ). Bei Überprüfung auf das Vorhandensein eines I-Allels ergab sich ebenfalls nur eine Tendenz für den DD-Genotyp bei Frauen, besonders in der Gruppe 1 (Gruppe 1:  $p = 0,07$ , Gruppe 2:  $p = 0,49$ ).

Die Altersverteilung in den Gruppen 1 und 2 ergab insgesamt ein späteres Auftreten der FSGN bei Vorhandensein des I-Allels, es lagen aber keine Signifikanzen vor ( $p = 0,58$ ) (Tab.19).

Gruppe	DD-Gen	ID-Gen	II-Gen
1 (fast)	44,20 (n = 5)	34,91 (n = 11)	49,40 (n = 5)
2 (slow)	37,50 (n = 6)	43,95 (n = 20)	44,54 (n = 13)

**Tabelle 19:** Durchschnittsalter der Patienten (Jahre) in Gruppe 1 und 2 und die Beziehung zum ACE-Gen ( $p = 0,58 = ns$ ).

Bei Gegenüberstellung von An- und Abwesenheit des D-Allels waren bezüglich des Auftretensalters der FSGN gleichfalls keine Signifikanzen ersichtlich ( $p = 0,30$ ). Auch bei der Untersuchung des I-Allels fanden sich keine signifikanten Abweichungen ( $p = 0,72$ ).

Bei einer Unterscheidung zwischen Patientenalter über und unter 40 Jahren zeigte sich ein häufigeres Vorkommen des DD-Genotyps bei Patienten unter 40 Jahren und eine

Vermehrung des II-Genotyps bei Probanden über 40 Jahren. Diese Konstellation traf besonders in Gruppe 1 zu und in abgeschwächter Form auch in Gruppe 2 (Tab.20 und 21), Signifikanzen wurden jedoch nicht erreicht (Gruppe 1:  $p = 0,14$ , Gruppe 2:  $p = 0,34$ ).

<b>Gruppe</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>DD-Gen</b>	<b>ID-Gen</b>	<b>II-Gen</b>	<b>Gesamt</b>
1 (fast)	< 40	3 (14,3 %)	8 (38,1 %)	1 (4,8 %)	12 (57,2 %)
	> 40	2 (9,5 %)	3 (14,3 %)	4 (19,0 %)	9 (42,8 %)

**Tabelle 20:** ACE-Gen-Verteilung bei Patienten in Gruppe 1 mit Unterscheidung des Alters bei Diagnosestellung ( $p = 0,14 = ns$ ).

<b>Gruppe</b>	<b>Alter (Jahre)</b>	<b>DD-Gen</b>	<b>ID-Gen</b>	<b>II-Gen</b>	<b>Gesamt</b>
2 (slow)	< 40	4 (10,3 %)	9 (23,1 %)	4 (10,3 %)	17 (43,6 %)
	> 40	2 (5,1 %)	11 (28,2 %)	9 (23,1 %)	22 (56,4 %)

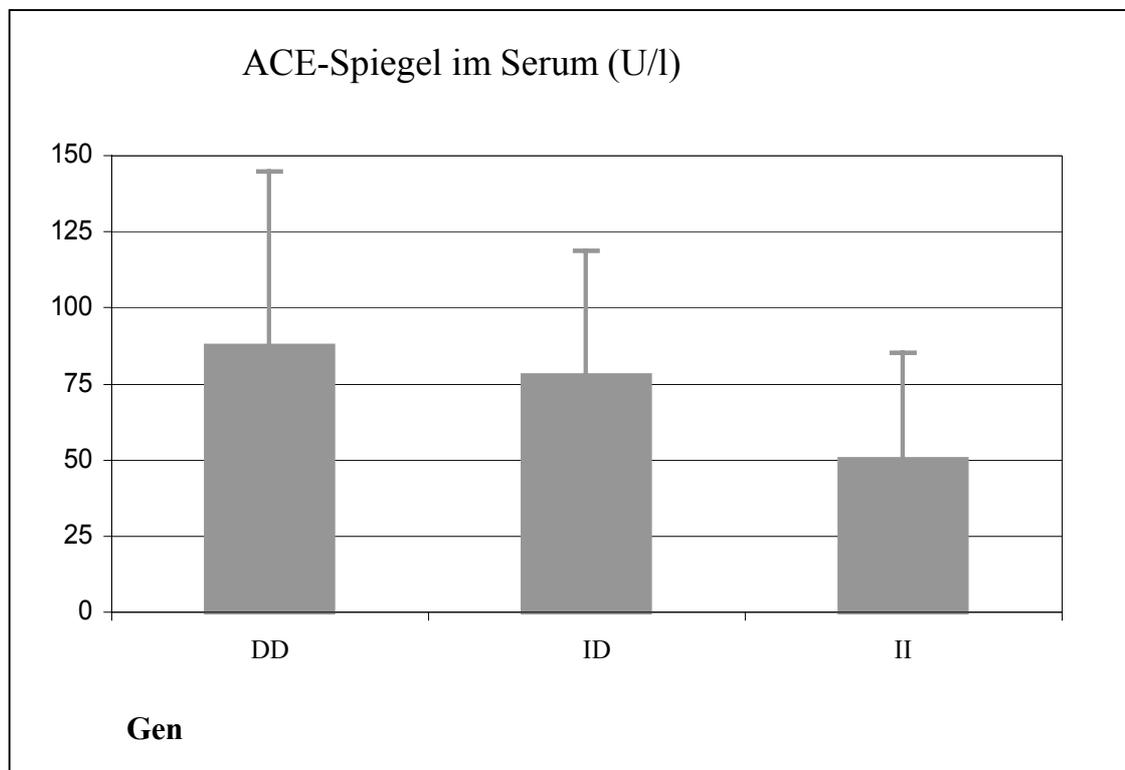
**Tabelle 21:** ACE-Gen-Verteilung bei Patienten in Gruppe 2 mit Unterscheidung des Alters bei Diagnosestellung ( $p = 0,34 = ns$ ).

Bei Gegenüberstellung von An- bzw. Abwesenheit des D-Allels ergibt sich ebenfalls eine vermehrte Häufigkeit des D-Allels bei den unter 40-jährigen Patienten, besonders in der Gruppe 1. Signifikant ist diese Abweichung jedoch auch hier nicht (Gruppe 1:  $p = 0,06$ , Gruppe 2:  $p = 0,25$ ).

Bei Betrachtung des I-Allels können diese Tendenzen nicht gefunden werden (Gruppe 1:  $p = 0,88$ , Gruppe 2:  $p = 0,22$ ).

## ACE-Spiegel im Serum

Bei der Überprüfung der Angiotensin-Converting-Enzym-Spiegel der Patienten ergaben sich signifikante Differenzen zwischen den verschiedenen Genotypen ( $p < 0,05$ ). Insgesamt lag der ACE-Spiegel mit durchschnittlich 71,2 U/l im Normbereich. Der DD-Genotyp zeigte die höchsten Werte im Serum. Der ID-Genotyp hatte geringere, der II-Genotyp die niedrigsten ACE-Spiegel (Abb.16).

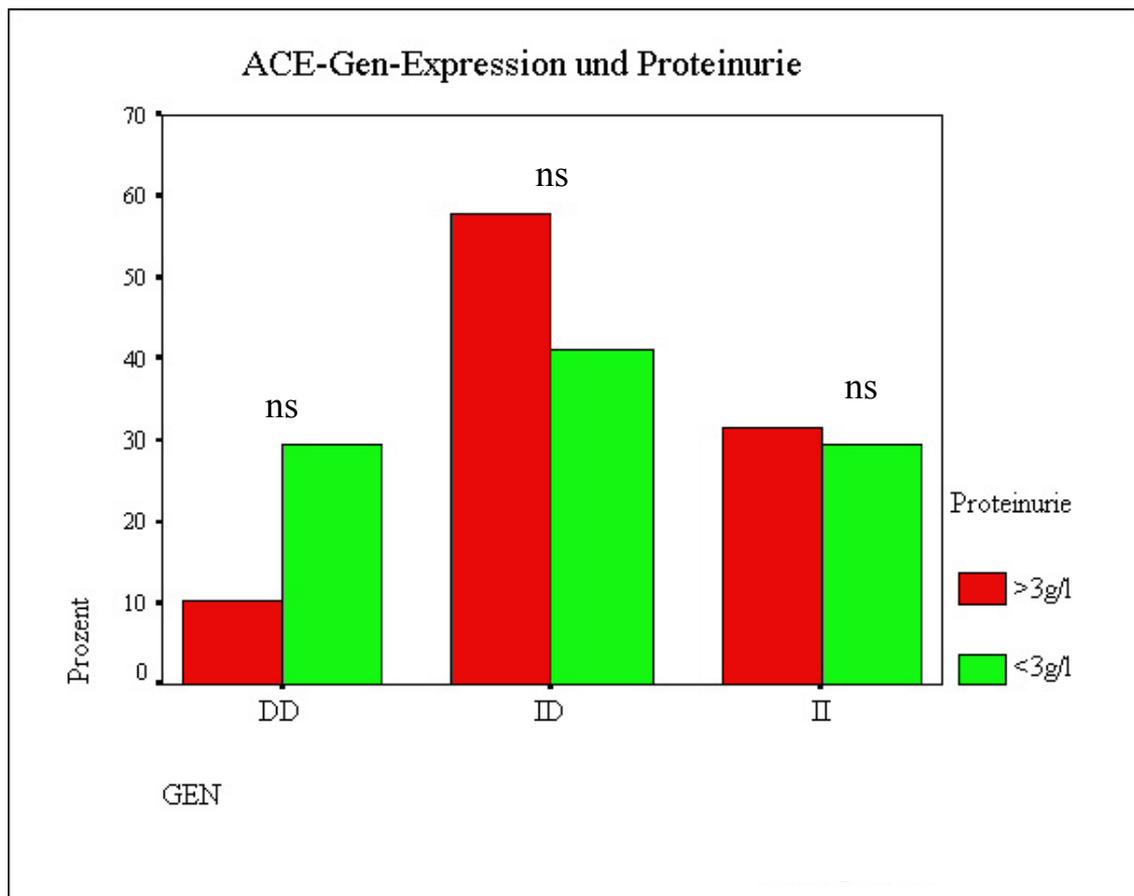


**Abbildung 16:** Serumspiegel des ACE bei unterschiedlichen Genotypen bei Patienten mit FSGN ( $p < 0,05$  bei Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

## ACE-Gen-Polymorphismus bei anderer Aufteilung der Patienten

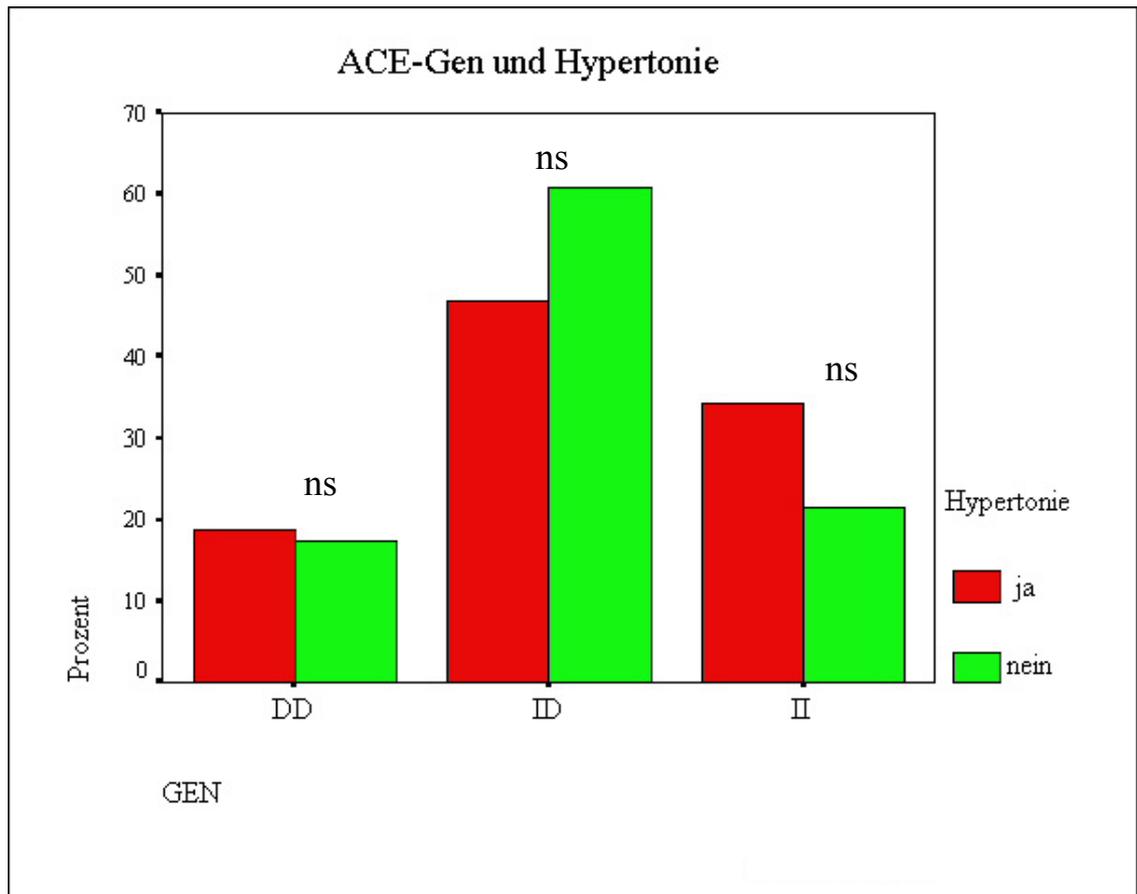
Zusätzlich zur Gruppeneinteilung der Patienten nach dem Kreatininanstieg erfolgte eine Einteilung nach Proteinurie und Hypertonie bei Krankheitsbeginn.

Bei Betrachtung der Proteinurie wurde zwischen Patienten mit einer Eiweißausscheidung über bzw. unter 3 g/l bei Diagnosestellung unterschieden. Es ergaben sich keine signifikanten Differenzen im ACE-Gen-Polymorphismus ( $p = 0,20$ ). Die Patienten mit der geringeren Proteinurie wiesen im Vergleich sogar prozentual vermehrt den DD-Genotyp auf. Der ID-Genotyp wurde von den Patienten mit hohen Eiweißverlusten dominiert, der II-Genotyp lag in beiden Gruppen mit circa 30 Prozent gleich häufig vor (Abb.17). Damit konnte auch die Proteinurie als Referenzparameter für die Nierenfunktion keine Korrelation zum ACE-Gen-Polymorphismus aufzeigen.



**Abbildung 17:** Prozentuale Verteilung des ACE-Gen-Polymorphismus nach Proteinurie bei Krankheitsbeginn bei Patienten mit FSGN ( $p = 0,20$ ) (ns = nicht signifikant).

Bei Differenzierung in normotone und hypertensive Patienten wurde eine Hypertonie bei Erreichen von systolischen Werten über 140 mmHg und diastolischen Werten über 90 mmHg festgelegt. Hierbei trat der DD-Genotyp in den Gruppen mit circa 20 % zu gleichen Teilen auf. Der ID-Genotyp war vermehrt durch die normotonen Patienten präsentiert, während der II-Genotyp eine höhere Anzahl von Hypertonikern aufwies. Die Differenzen besaßen jedoch keine Signifikanz ( $p = 0,54$ ) (Abb.18).

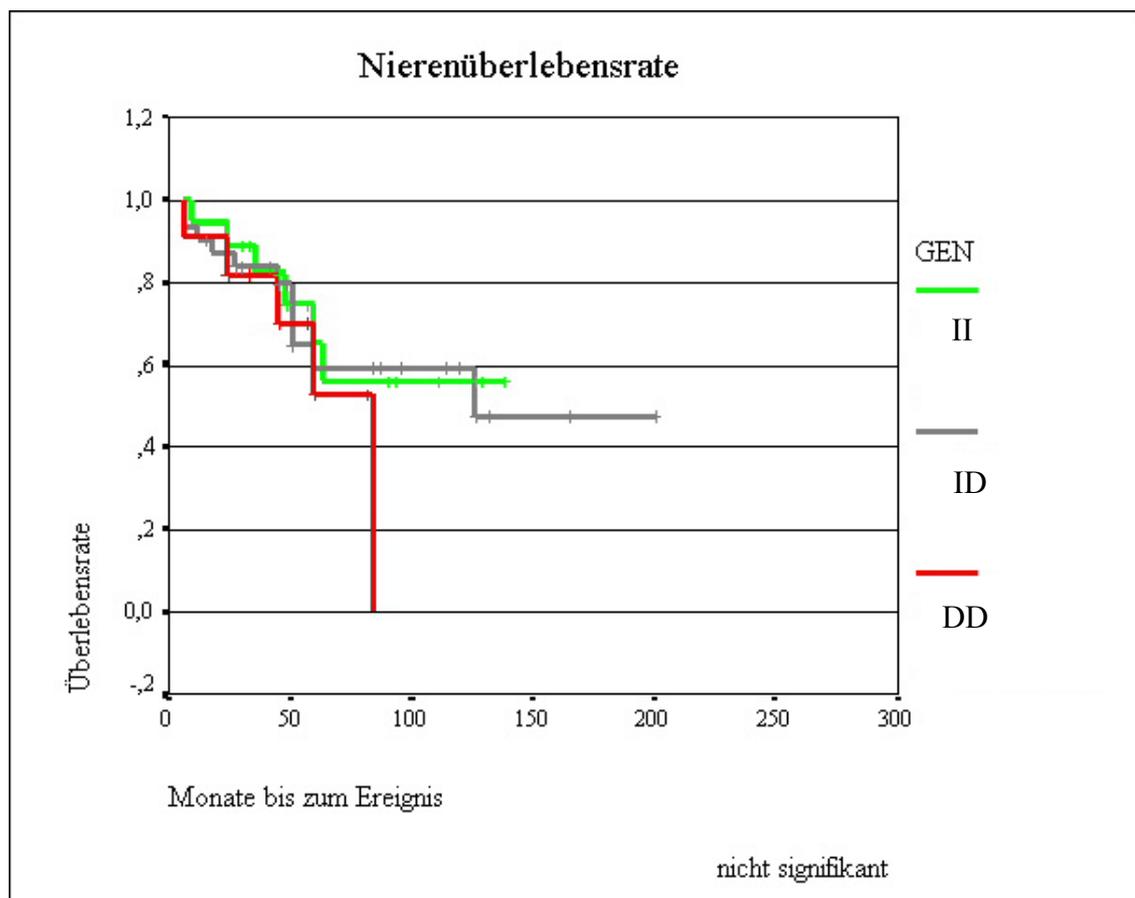


**Abbildung 18:** Prozentuale Verteilung des ACE-Gen-Polymorphismus nach Vorhandensein einer Hypertonie bei Krankheitsbeginn bei Patienten mit FSGN ( $p = 0,54$ ) (ns = nicht signifikant).

## 4.3 ACE-Gen-Polymorphismus und Verlaufparameter

### Nierenüberlebensrate:

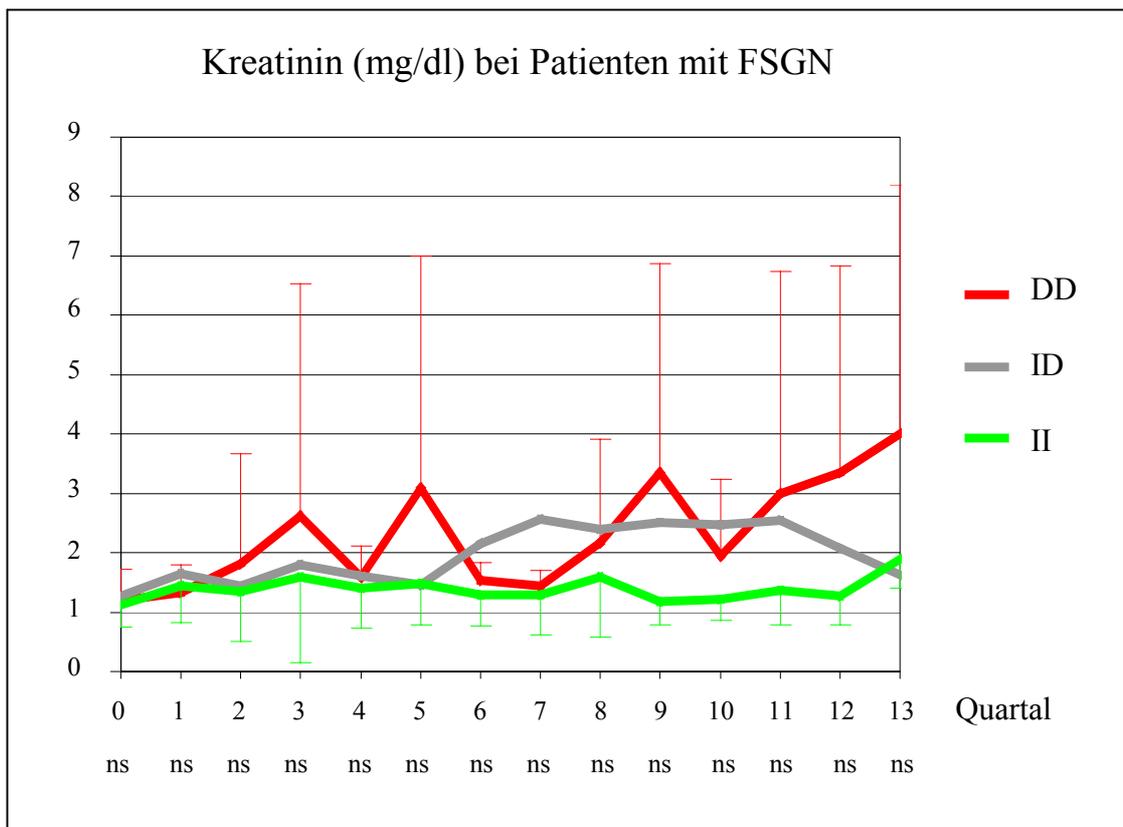
Die Patienten wurden in Bezug auf das Erreichen eines Kreatininwerts von 4,0 mg/dl untersucht. Dieser Wert wurde als prognostisches Kriterium für den langfristigen Erhalt der Nierenfunktion festgesetzt. Nach Kaplan-Meyer betrug die mittlere Nierenfunktionszeit der Patienten mit DD-Genotyp 62,7 Monate, d.h. 5,2 Jahre. Die Nierenfunktion bei Patienten mit ID-Genotyp blieb im Durchschnitt 124,8 Monate, d.h. 10,4 Jahre erhalten, bei Patienten mit II-Genotyp dagegen lag die Nierenfunktionsrate bei 96,55 Monaten, d.h. bei 8,0 Jahren (Abb.19). Diese Unterschiede erreichten jedoch keine Signifikanz ( $p = 0,79$ ). Auch bei Betrachtung von DD versus ID/II ( $p = 0,52$ ) und DD/ID versus II ( $p = 0,67$ ) ergaben sich keine signifikanten Abweichungen.



**Abbildung 19:** Nierenüberlebensrate nach Kaplan-Meyer bei Patienten mit FSGN mit Unterscheidung zwischen den verschiedenen Genotypen ( $p = 0,79 = ns$ ).

## Kreatinin:

Die mittleren Kreatininwerte der Patienten zeigten bezüglich der verschiedenen Genotypen keine relevanten Unterschiede (Abb.20). Die Kreatininwerte der Patienten mit DD-Genotyp lagen meist höher als bei Patienten mit ID- oder II-Genotyp. Bei Gegenüberstellung von DD versus ID/II ergab sich nur im 5. Quartal eine signifikante Differenz ( $p < 0,05$ ). Ein Vergleich von DD/ID mit II fand sich keine Signifikanz.

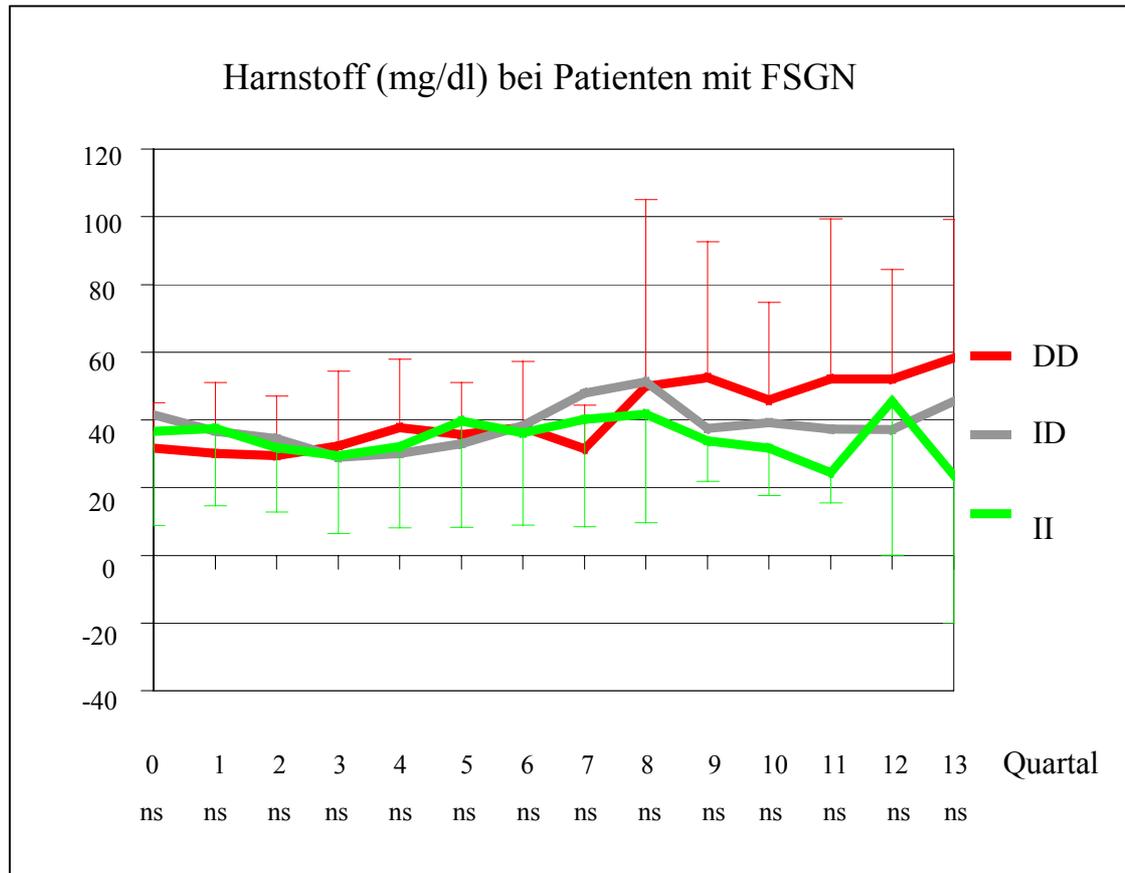


**Abbildung 20:** Kreatininverlauf in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

In der Abbildung sind nur die ersten 13 Quartale nach Diagnosestellung angegeben, der betrachtete Zeitraum betrug hier also 3,25 Jahre. Aufgrund der zu geringen Fallzahlen in den späteren Quartalen wurden die Auswertungen nur bis zu einer bestimmten Quartalsanzahl vorgenommen. Dies gilt auch für die folgenden Parameter.

## Harnstoff:

Die Verlaufsbeobachtung für die Harnstoffwerte ergaben ebenfalls keine bedeutenden Abweichungen (Abb.21). DD- und ID-Genotyp zeigten fast durchgehend höhere Werte als der II-Genotyp, aber auch bei Betrachtung von DD versus ID/II und DD/ID versus II ergab sich keine Signifikanz.

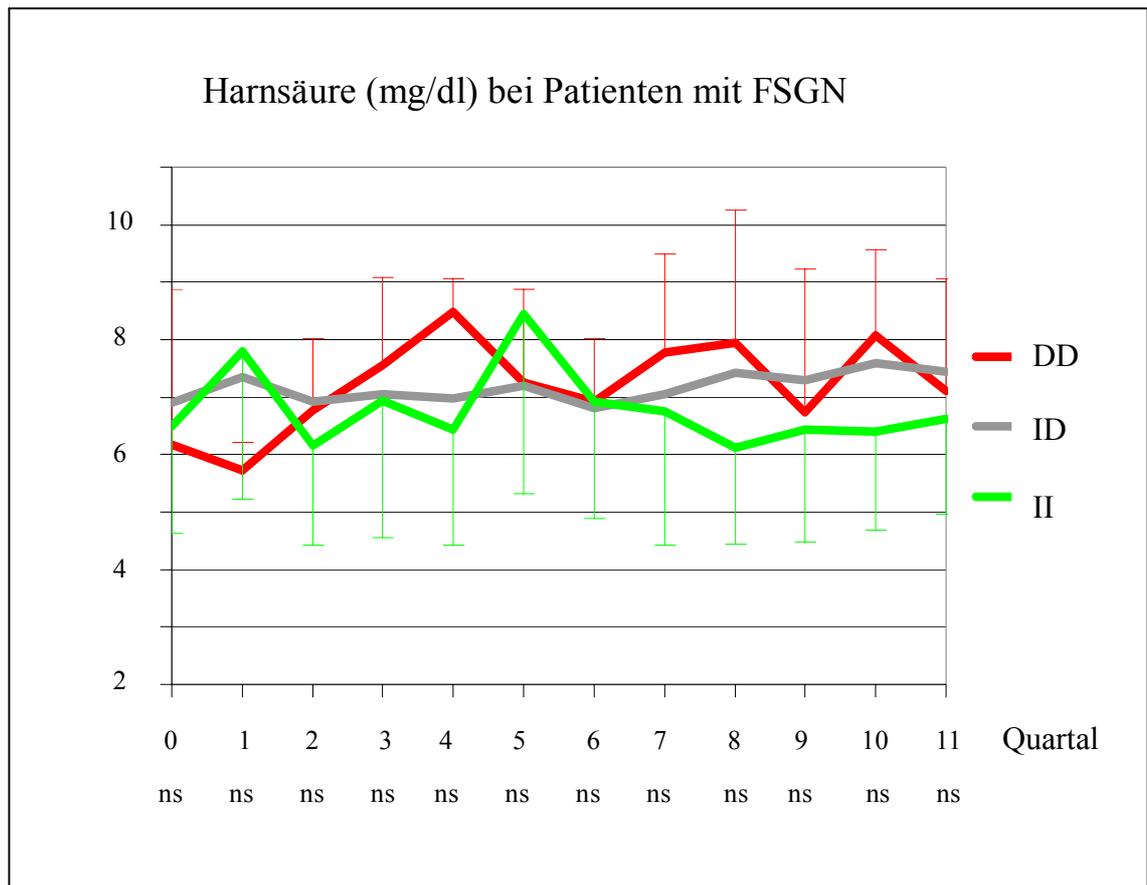


**Abbildung 21:** Harnstoffwerte in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

## Harnsäure:

Die Harnsäurewerte besaßen keine maßgeblichen Differenzen zwischen den unterschiedlichen Genotypen DD, ID und II (Abb.22). Bei Untersuchung des DD-Genotyps im Vergleich zum ID/II-Genotyp ergab sich eine signifikante Abweichung im 4. Quartal

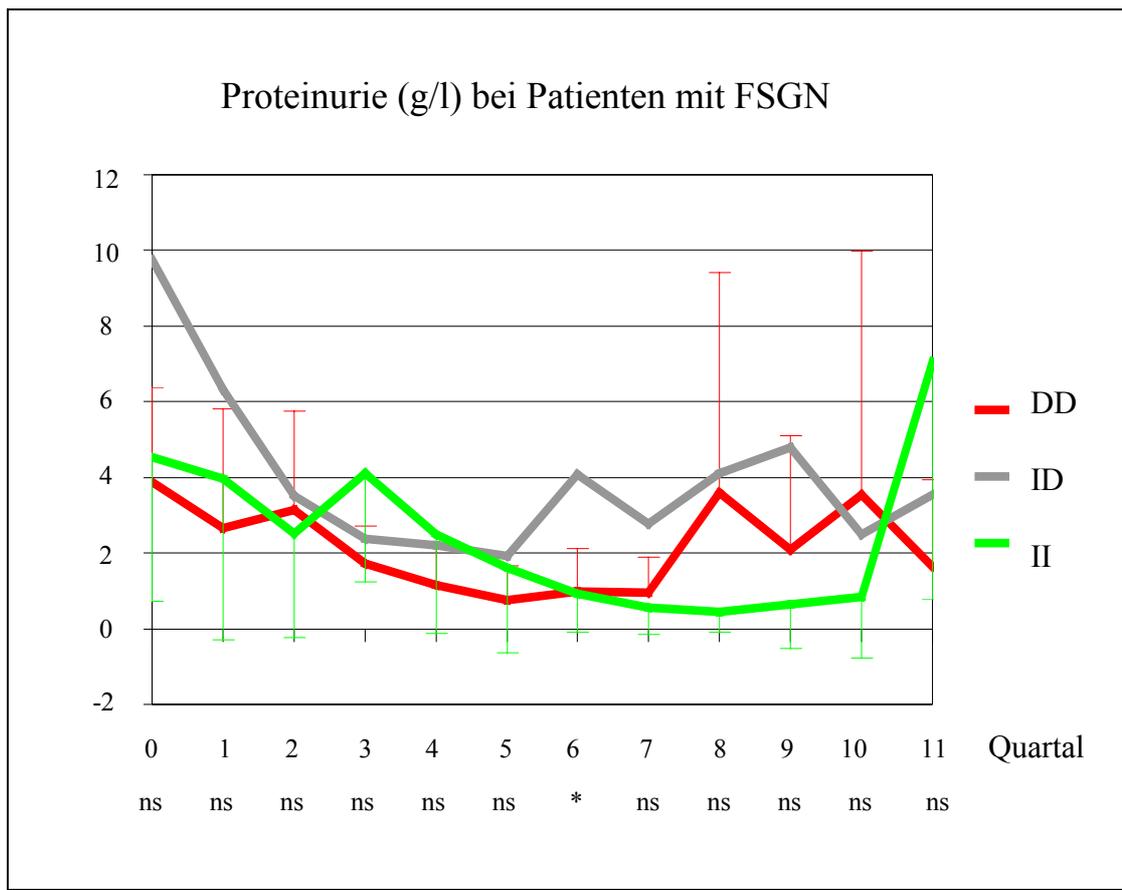
( $p < 0,05$ ), bei Differenzierung zwischen DD/ID und II dagegen im 8. Quartal ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 22:** Harnsäurewerte in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

### Proteinurie:

Auch der Verlauf der Proteinurie war zum großen Teil nicht signifikant. Nur im 6. Quartal war eine relevante Differenz zu verzeichnen ( $p < 0,05$ ), die auf einer hohen Eiweißausscheidung der Patienten mit ID-Genotyp beruht. Diese war auch fast in allen anderen Quartalen vorhanden, wogegen DD und II mit meist niedrigeren Werten verbunden waren (Abb.23). Bei der Gegenüberstellung von DD- versus ID/II-Genotyp zeigten sich keine bedeutenden Unterschiede, bei Betrachtung von DD/ID gegen II ergaben sich Signifikanzen im 6. bis 8., im 10. und 12. Quartal ( $p < 0,05$ ).

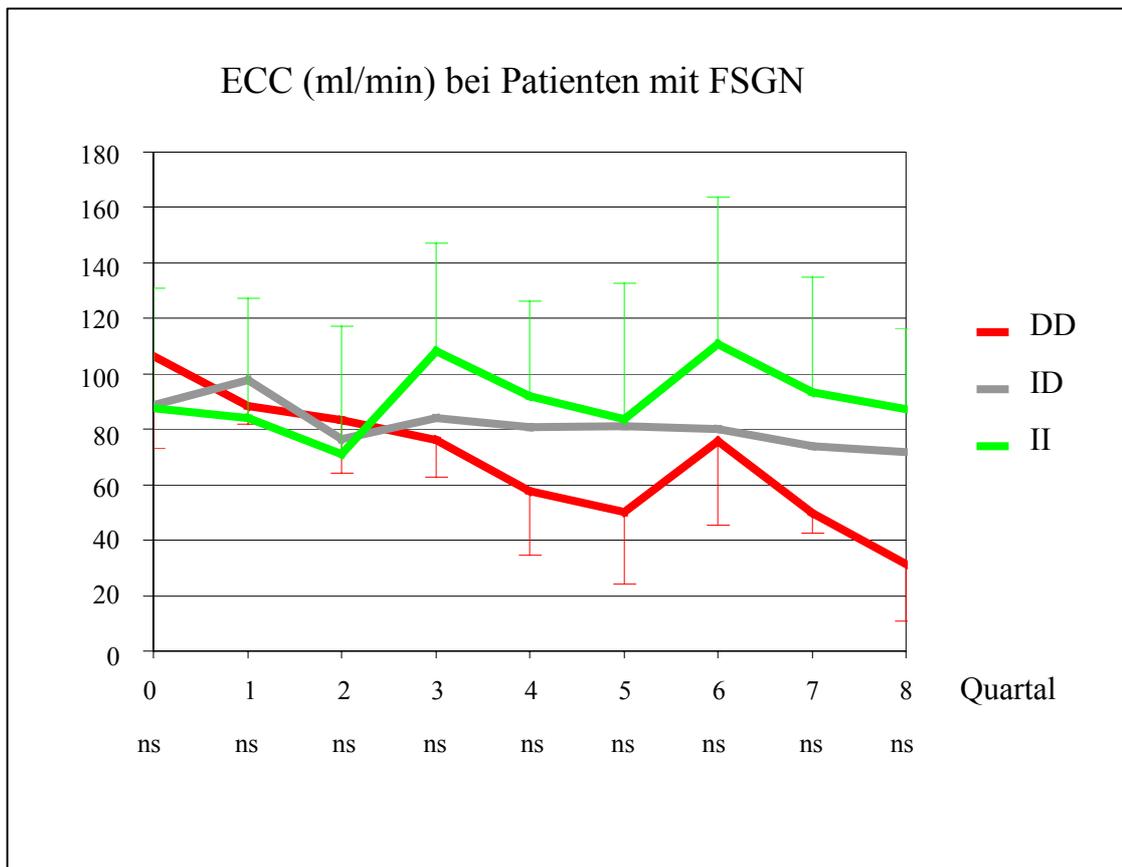


**Abbildung 23:** Verlauf der Proteinausscheidung in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (\* =  $p < 0,05$ , ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

### Endogene Kreatinin-Clearance:

Die endogene Kreatinin-Clearance (ECC) als Referenzparameter der Nierenfunktion unterschied sich zwischen den einzelnen ACE-Genotypen nicht signifikant. Zu Beginn besaß die Patientengruppe mit DD-Genotyp höhere Clearance-Werte, im späteren Verlauf entsprach jedoch der II-Genotyp der besseren Nierenfunktion. ID- und DD-Genotyp zeigten fast durchgehend eine bedeutende Einschränkung der Nierenfunktion (Abb.24). Bei Vergleich von DD/ID mit II ergaben sich gleichfalls keine Signifikanzen, bei Untersuchung von DD-Genotyp versus ID/II-Genotyp waren jedoch relevante Differenzen im 7. und 8. Quartal ( $p < 0,05$ ) vorhanden. Insgesamt wies das DD-Gen anhand

seiner Verlaufswerte auf die bevorstehende terminale Nierenfunktion hin, während der II-Typ eine fast stabile Organfunktion erhalten konnte.

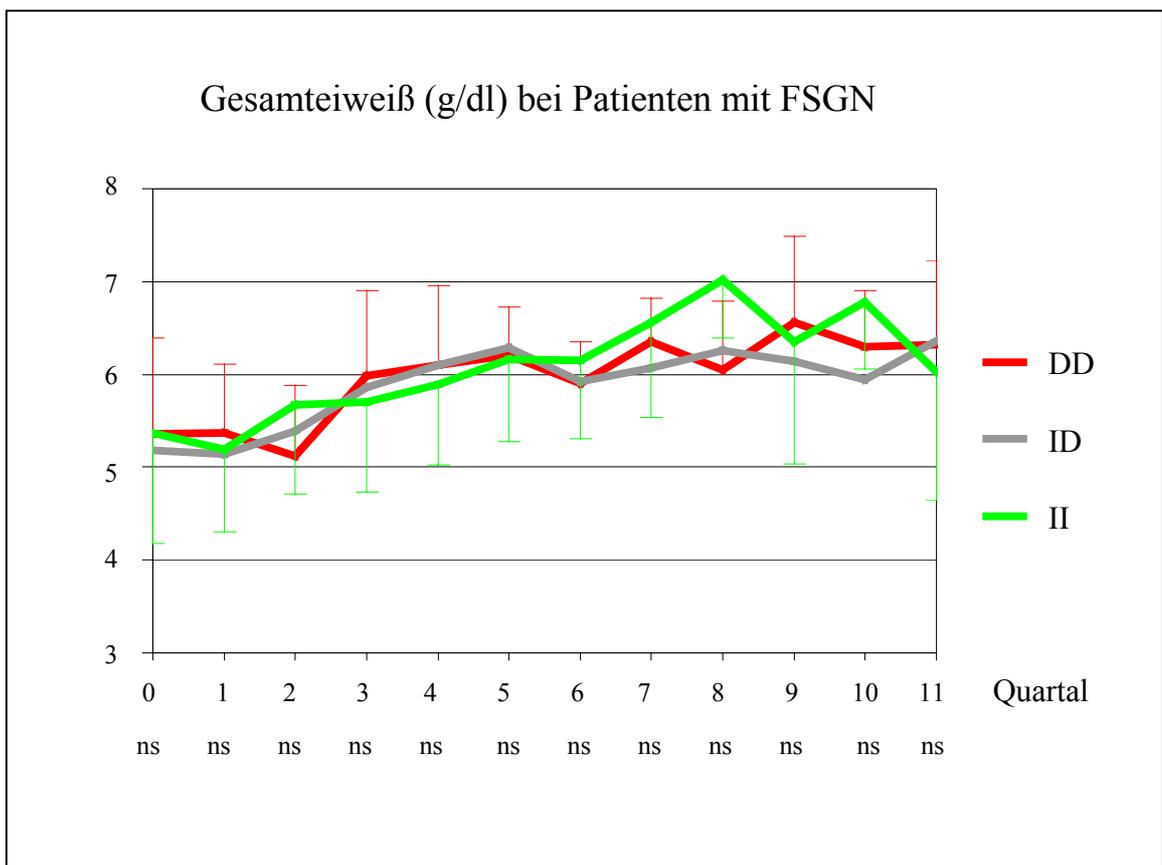


**Abbildung 24:** Entwicklung der endogenen Kreatinin-Clearance in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

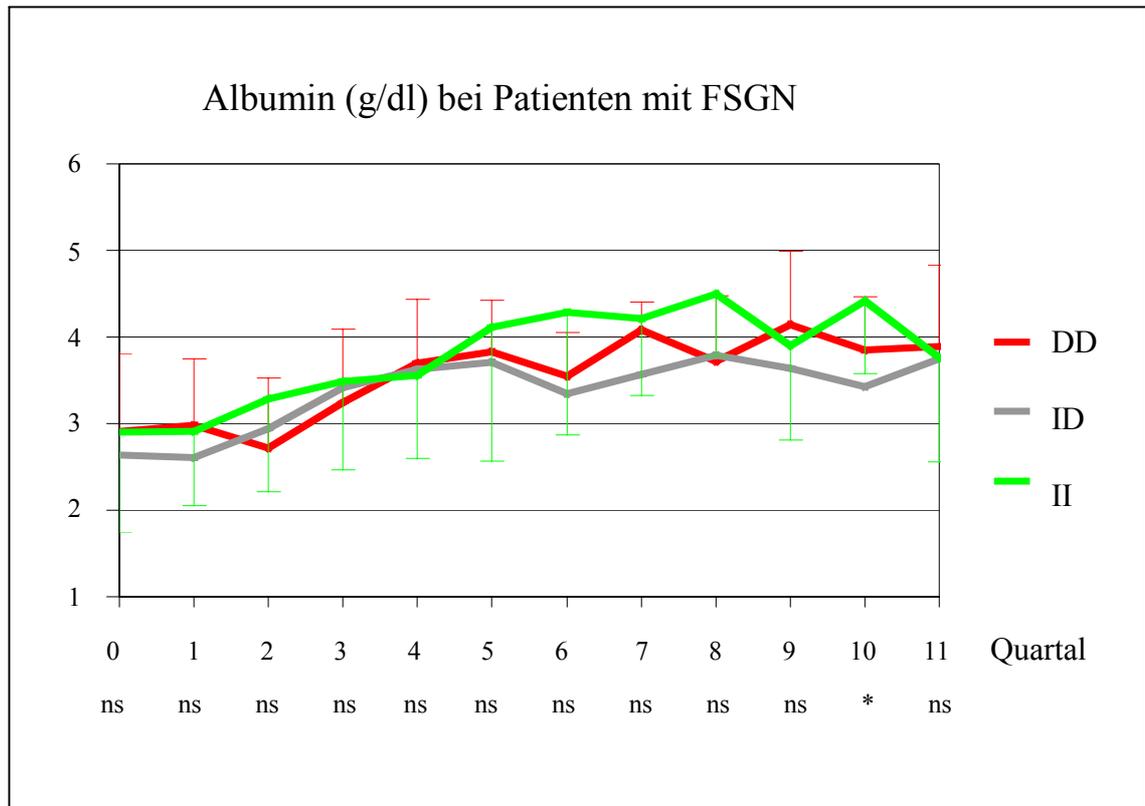
### Gesamteiweiß und Albumin:

Die Verlaufsdiagramme von Gesamteiweiß und Albumin wiesen bei allen drei Genotypen zu Krankheitsbeginn einen herabgesetzten Proteingehalt im Serum auf. Später stiegen beide Parameter wieder auf Normwerte an. Die Höhe des Gesamteiweißes erreichte zwischen den einzelnen Genotypen keine relevanten Differenzen (Abb.25). Bei der Betrachtung von DD- gegen ID/II-Genotyp gab es gleichfalls keine Signifikanz. Nur bei Gegenüberstellung von DD/ID versus II trat ein maßgeblicher Unterschied im 10. Quar-

tal nach Biopsie auf ( $p < 0,05$ ), wobei aber alle drei Genotypen Werte im Normbereich aufwiesen. Das Albumin erreichte im 10. Quartal nach Diagnosestellung eine signifikante Differenz zwischen den drei ACE-Genotypen ( $p < 0,05$ ) (Abb.26). Diese blieb auch bei Vergleich des DD/ID- mit dem II-Genotypen erhalten ( $p < 0,05$ ), aber auch hier lagen die Werte der einzelnen Genotypen dabei im Normbereich, so dass diese Abweichungen keine Bedeutung für den Krankheitsverlauf haben. Eine Untersuchung von DD gegen ID/II ergab keine bedeutenden Abweichungen.



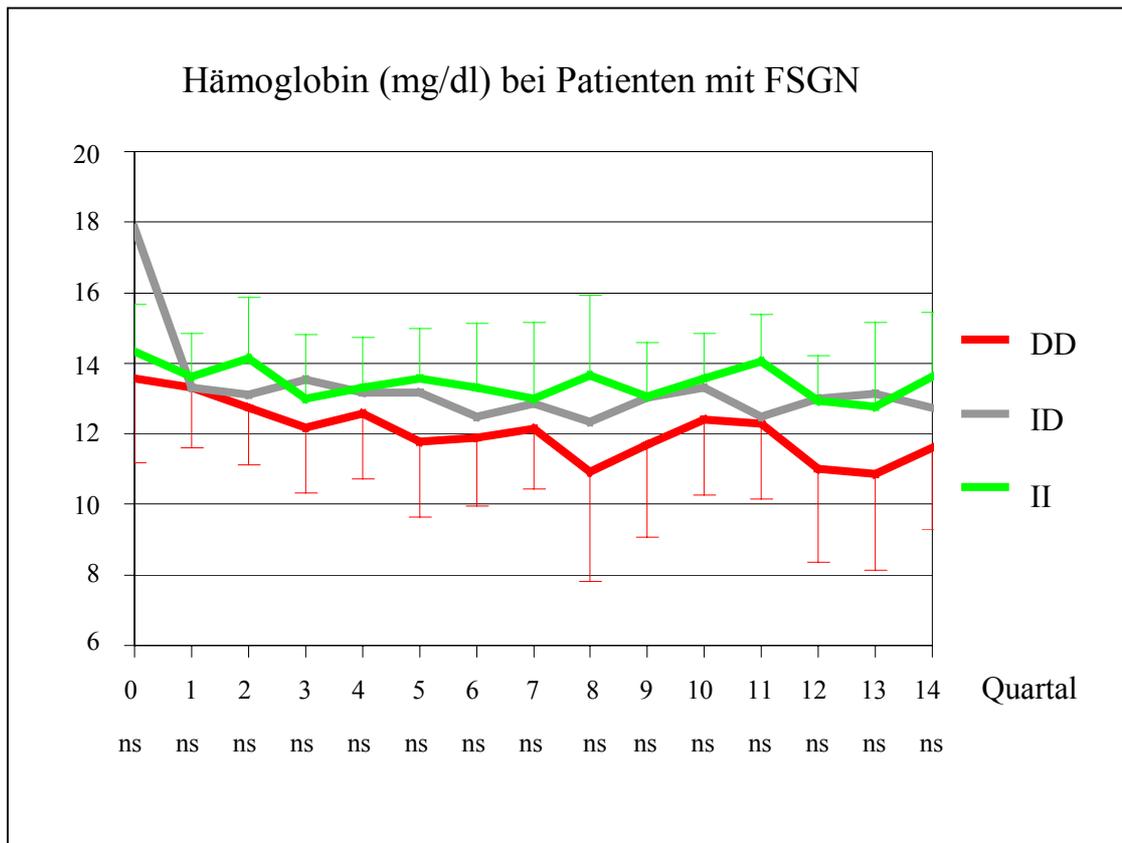
**Abbildung 25:** Gesamteiweiß im Serum in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).



**Abbildung 26:** Verlauf der Albuminwerte im Serum in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (\* =  $p < 0,05$ , ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

### Hämoglobin:

Die Hämoglobinwerte im Serum zeigten keine signifikanten Differenzen in Bezug auf die ACE-Genotypen. Bei Patienten mit ID- und II-Genotyp lagen sie mit einer Ausnahme im Quartal vor Biopsie im Normbereich. Das Hämoglobin bei DD-Genotyp erreichte anfangs ebenfalls Werte im Normbereich, später war es erniedrigt (Abb.27). Die Unterscheidung zwischen DD versus ID/II und DD/ID versus II ergab ebenfalls keine bedeutenden Abweichungen.

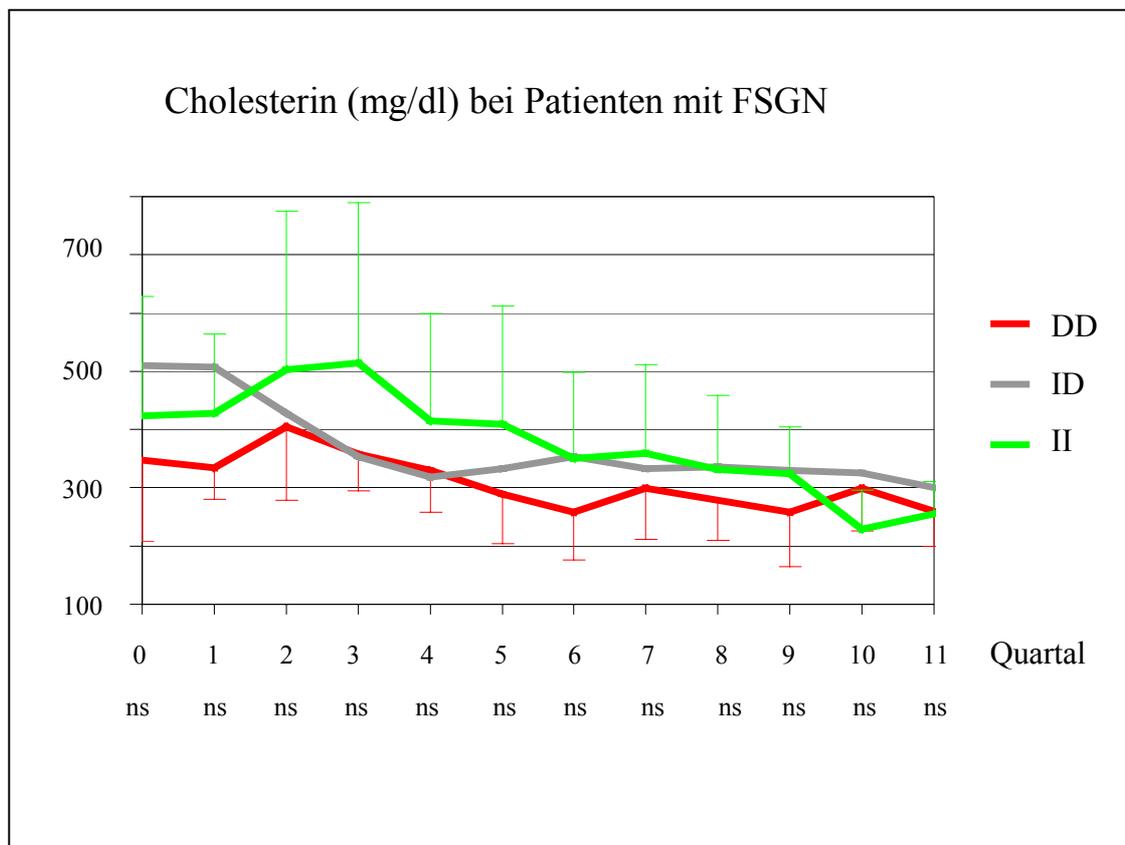


**Abbildung 27:** Verlauf der Hämoglobinwerte in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

### Lipide:

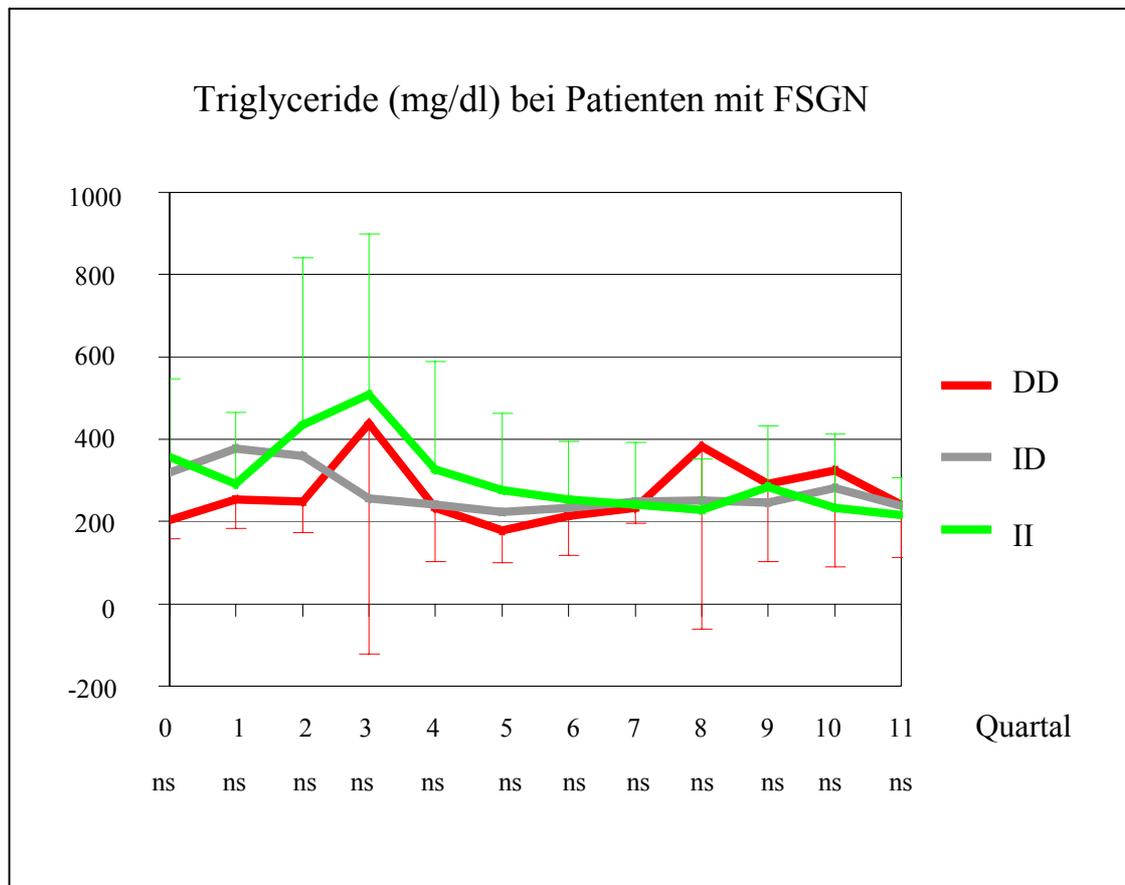
Der Verlauf der Lipidkonzentrationen wies keine Signifikanzen bezüglich der verschiedenen ACE-Genotypen auf. Das Gesamtcholesterin war zu Beginn der Erkrankung bei allen drei Patientengruppen erhöht. Erst ab dem 5. Quartal nach Diagnosestellung nahm die Hypercholesterinämie ab und die Werte näherten sich dem Normbereich an.

Patienten mit einem DD-Genotyp wiesen geringere Cholesterinspiegel auf, Patienten mit ID- oder II-Genotyp dagegen zeigten tendenziell höhere Werte (Abb.28). Bei Vergleich von DD mit ID/II ergaben sich ebenfalls keine relevanten Differenzen. Unterschied man dagegen DD/ID- von II-Genotyp, gab es eine Signifikanz im 10. Quartal ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 28:** Verlauf des Cholesteringehalts im Serum in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

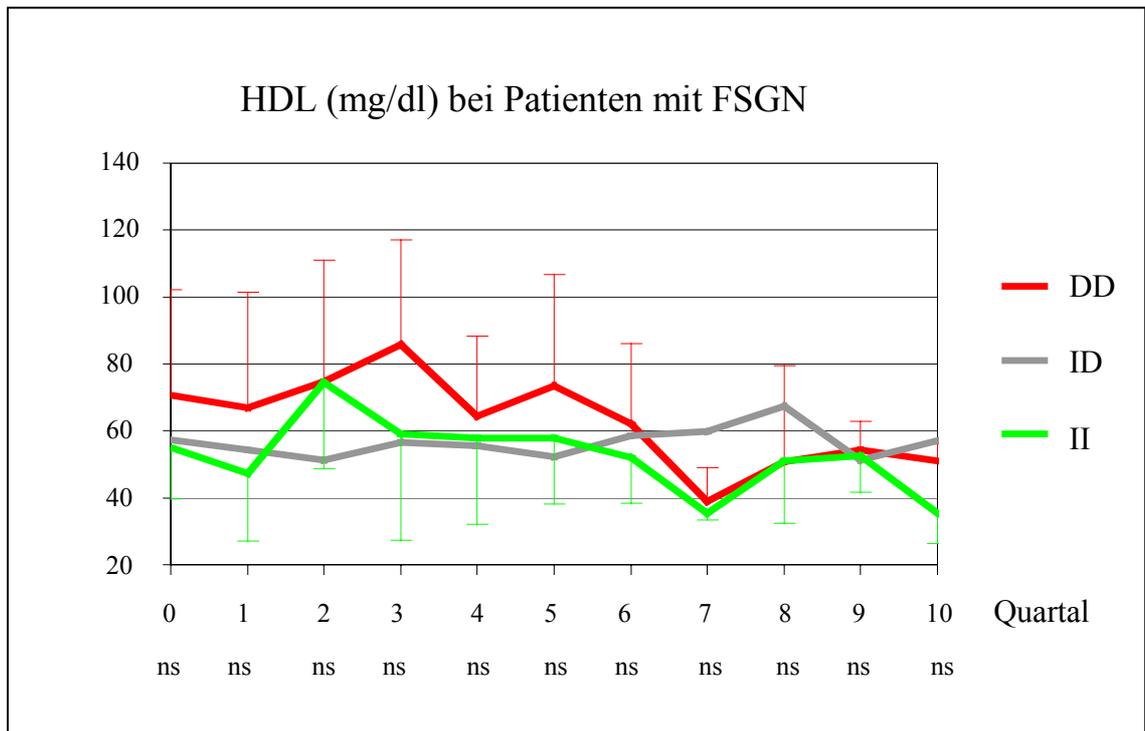
Auch bei den Triglyceriden waren insgesamt keine Signifikanzen vorhanden. Der Serumspiegel war anfangs eher bei ID und II erhöht, in den späteren Quartalen besaß der DD-Genotyp die höheren Werte (Abb.29). Bei Gegenüberstellung von DD gegen ID/II gab es zuungunsten des II-Genotyps relevante Unterschiede vor Biopsie ( $p < 0,05$ ). Bei der Überprüfung von DD/ID versus II zeigte sich im 3. Quartal eine Signifikanz ( $p < 0,05$ ), wobei der II-Genotyp hierbei mit den höheren Werten korrelierte. Somit ging das I-Allel zumindest bei Krankheitsbeginn mit erhöhten Triglyceridwerten einher und ist als möglicher Risikofaktor für das Auftreten der FSGN bei Abwesenheit anderer Prädispositionen nicht auszuschließen.



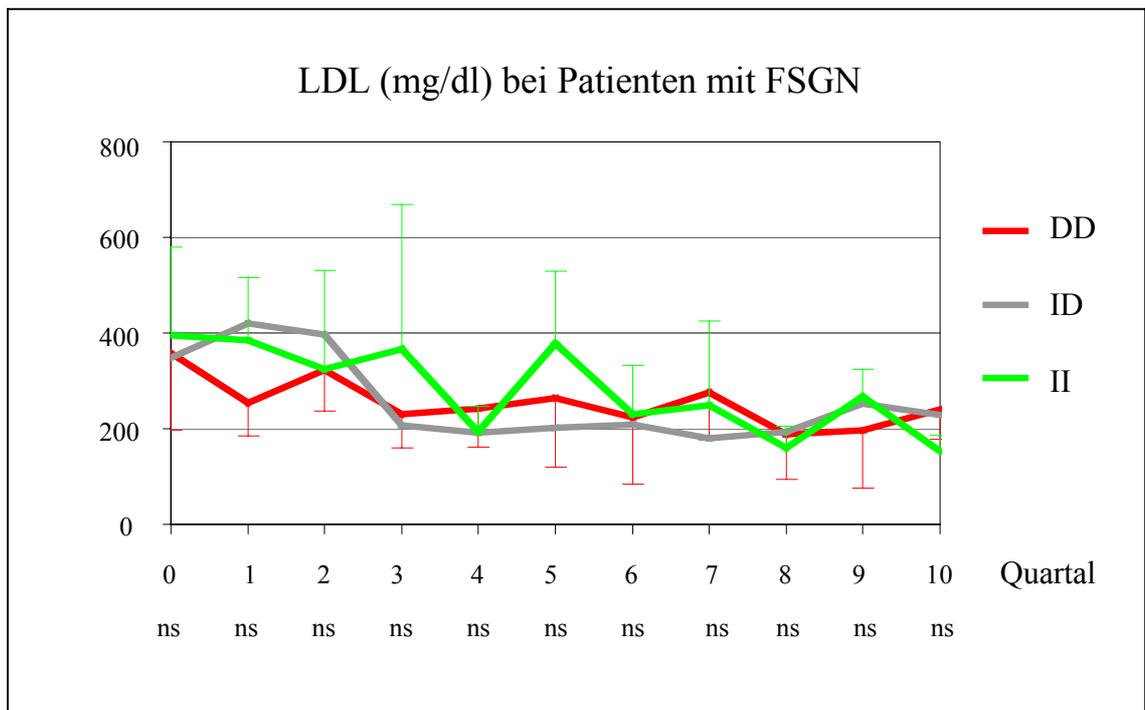
**Abbildung 29:** Verlauf der Triglyceridkonzentrationen im Serum in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

HDL- und LDL-Konzentrationen wiesen keine bedeutenden Differenzen zwischen den einzelnen Genotypen auf. Die Serumspiegel für HDL lagen mit meist > 40 mg/dl im Normbereich. DD- und ID-Genotyp besaßen im Durchschnitt bessere Werte als der II-Genotyp (Abb.30). Bei Betrachtung von DD/ID versus II waren ebenfalls keine Signifikanzen vorhanden, bei Einteilung in DD und ID/II trat im 3. Quartal eine relevante Abweichung auf ( $p < 0,05$ ).

Das LDL lag im gesamten Beobachtungszeitraum über dem Normbereich. Zu Krankheitsbeginn war es besonders beim ID- und der II-Genotyp erhöht, welche in den späteren Quartalen niedrigere Serumspiegel aufwiesen. Diese Abweichungen zeigten jedoch keine Signifikanzen. Der DD-Genotyp war eher mit gleichbleibenden Konzentrationen verbunden (Abb.31). Bei Überprüfung von DD versus ID/II und DD/ID versus II ergab sich gleichfalls keine Signifikanz. Insgesamt zeigte sich erneut die Tendenz des I-Allels zu schlechteren Werten des Lipidstoffwechsels im Serum.



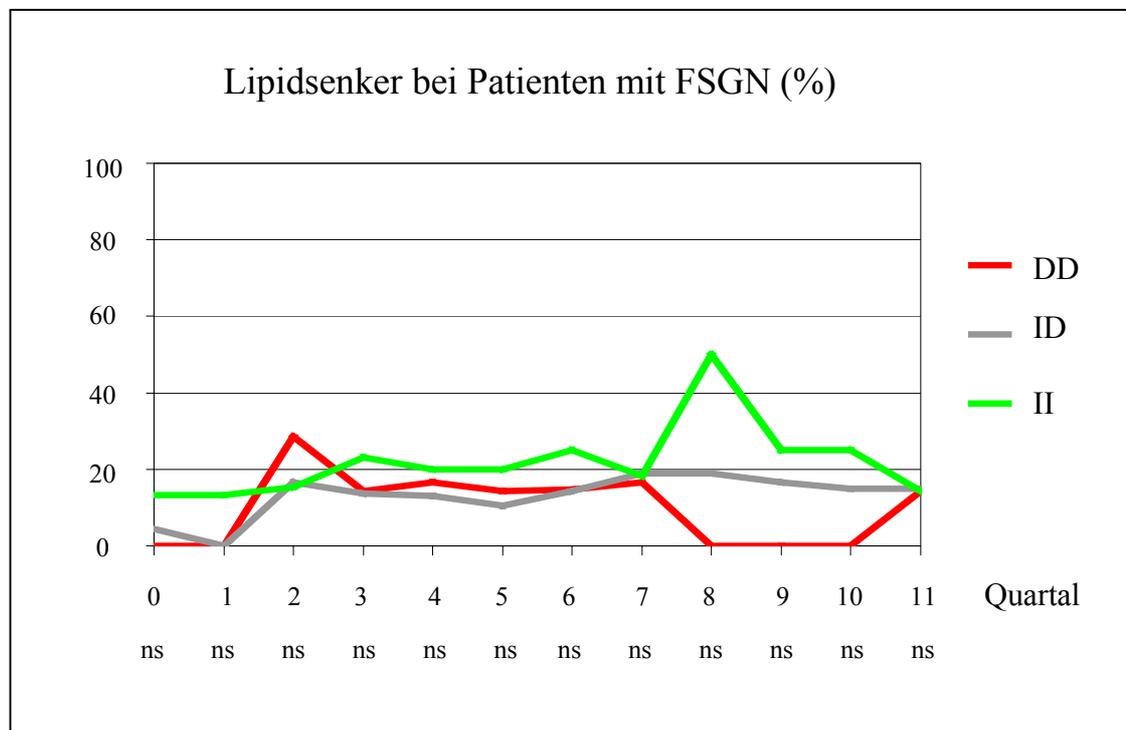
**Abbildung 30:** HDL-Verlauf in Quartalen nach Biopsie bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).



**Abbildung 31:** LDL-Verlauf in Quartalen nach Biopsie bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

## Therapie mit Lipidsenkern:

Eine Therapie mit Lipidsenkern wurde im Durchschnitt nur bei 15 Prozent der Patienten durchgeführt. Im Gegensatz zum DD- und ID-Genotyp sind vermehrt Patienten mit einem II-Genotyp wegen einer Hyperlipidämie behandelt worden. Zwischen den verschiedenen ACE-Genotypen gab es jedoch keine Signifikanzen (Abb.32). Bei Betrachtung von DD versus ID/II zeigten sich ebenfalls keine relevanten Abweichungen. Bei Differenzierung zwischen DD/ID- und II-Genotyp war dagegen ein signifikanter Unterschied im 1. Quartal vorhanden ( $p < 0,05$ ), wobei das II-Gen mit erhöhtem Bedarf an einer lipidreduzierenden Therapie einher ging. Somit ergab sich für das I-Allel nochmals eine Korrelation zu schlechteren Lipidwerten.

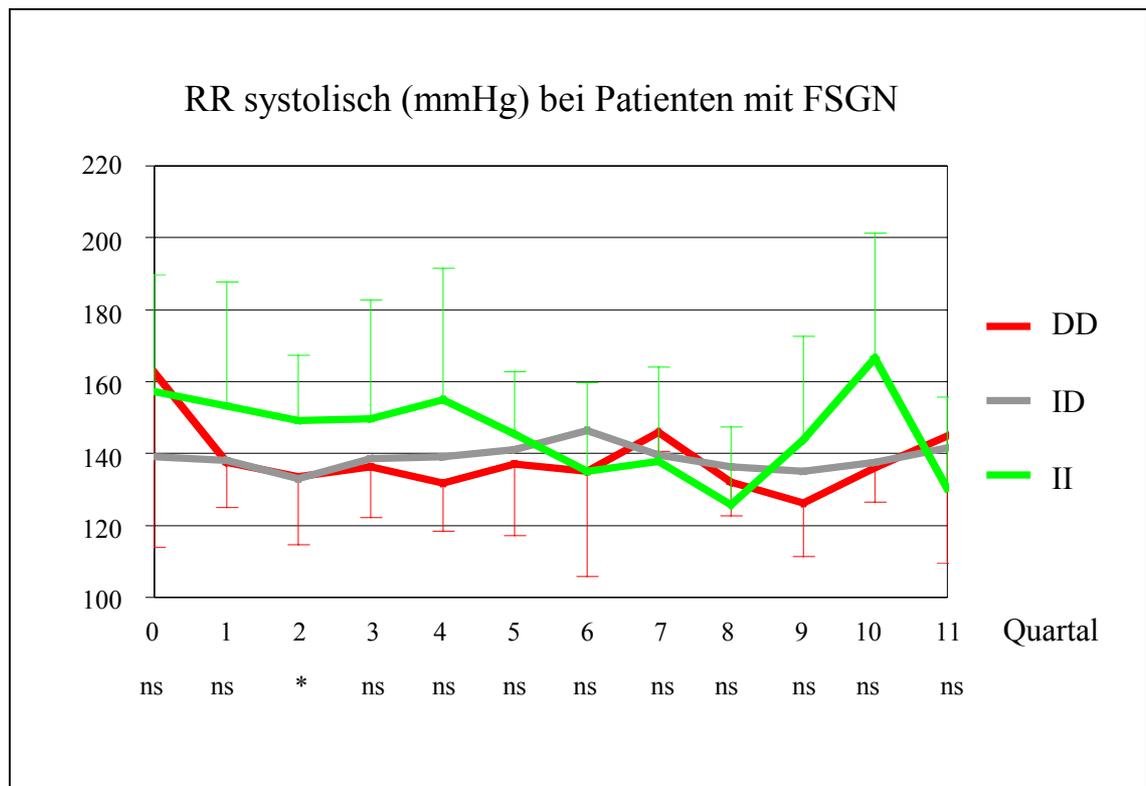


**Abbildung 32:** Prozentualer Anteil der Patienten mit FSGN und einer Lipidsenker-Therapie in Quartalen nach Diagnosestellung (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

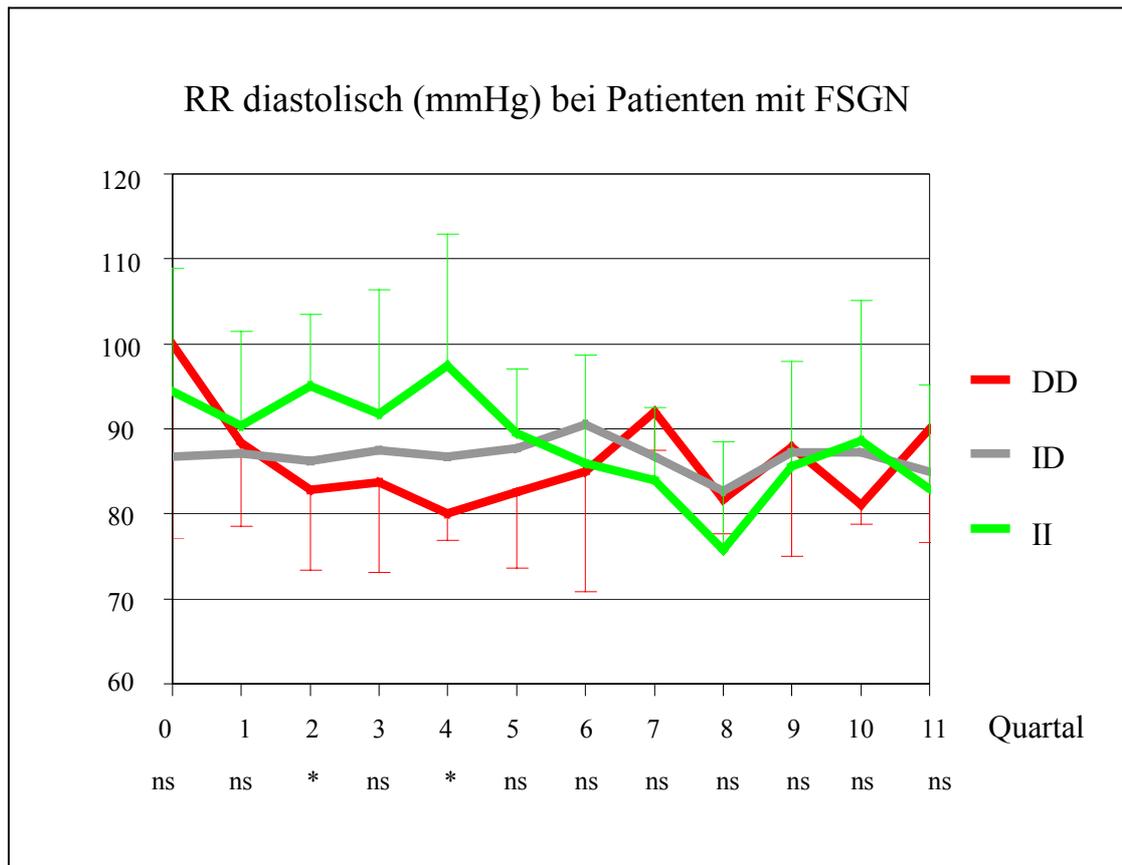
## Systolische und diastolische Blutdruckwerte:

Die Differenzen hinsichtlich der Blutdruckwerte waren größtenteils nicht signifikant. Die systolischen Werte lagen circa zwischen 126 und 166 mmHg und es gab zwischen

den verschiedenen ACE-Genotypen nur eine signifikante Differenz im 2. Quartal ( $p < 0,05$ ), was auf erhöhte Werte der Patienten mit II-Genotyp zurückzuführen ist. Der Blutdruck des II-Genotyps war im Vergleich zu DD oder ID auch in mehreren anderen Quartalen erhöht (Abb.33). Bei Gegenüberstellung von DD/ID und II zeigte sich außer der Signifikanz im 2. Quartal ( $p < 0,05$ ) eine weitere im 10. Quartal ( $p < 0,05$ ). Bei einer Einteilung in DD-Genotyp und ID/II-Genotyp ergab sich kein signifikanter Unterschied. Die diastolischen Blutdruckwerte befanden sich in einem Bereich von circa 76 bis 100 mmHg. Signifikante Abweichungen zwischen den ACE-Genotypen waren im 2. und 4. Quartal ( $p < 0,05$ ) vorhanden. Wieder war der II-Genotyp in einigen Quartalen mit höheren Werten verbunden als der DD- oder der ID-Genotyp (Abb.34). Auch bei Betrachtung von DD/ID versus II blieb die Signifikanz im 2. und 4. Quartal ( $p < 0,05$ ) bestehen. Überprüfte man dagegen DD versus ID/II, trat nur im 4. Quartal ( $p < 0,05$ ) eine signifikante Differenz auf. Insgesamt zeigte sich eine relativ gute Einstellung der systolischen und diastolischen Parameter.



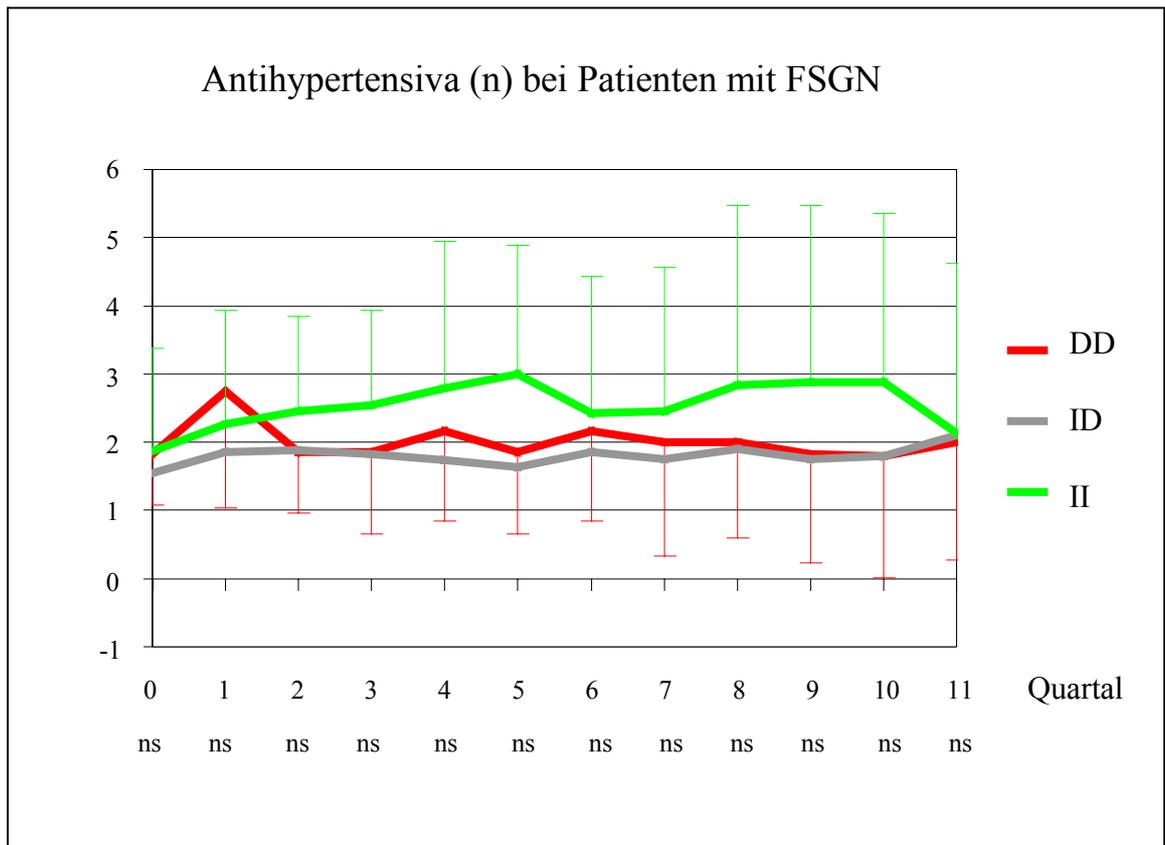
**Abbildung 33:** Verlauf der systolischen Blutdruckwerte in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (\* =  $p < 0,05$ , ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).



**Abbildung 34:** Verlauf der diastolischen Blutdruckwerte in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (\* =  $p < 0,05$ , ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

### Antihypertensiva:

Bei der antihypertensiven Therapie der FSGN gab es zwischen den ACE-Genotypen keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der verabreichten Präparate. Die Patienten mit einem II-Genotyp zeigten bei einer Behandlung mit 1,9 bis 3,0 Medikamenten fast durchgehend einen höheren Bedarf an Antihypertensiva, während die anderen Patientengruppen durchschnittlich nur 1,6 bis 2,7 Präparate benötigten (Abb.35). Diese Tendenz scheint gegen einen malignen Einfluss der DD-Konstellation auf die Hypertonie zu sprechen. Eine Gegenüberstellung von DD- und ID/II-Genotyp ergab gleichfalls keine Signifikanzen, nur die Untersuchung von DD/ID versus II zeigte eine signifikante Abweichung im 5. Quartal ( $p < 0,05$ ) mit häufigerer Einnahme von Antihypertensiva bei Patienten mit II-Konstellation.

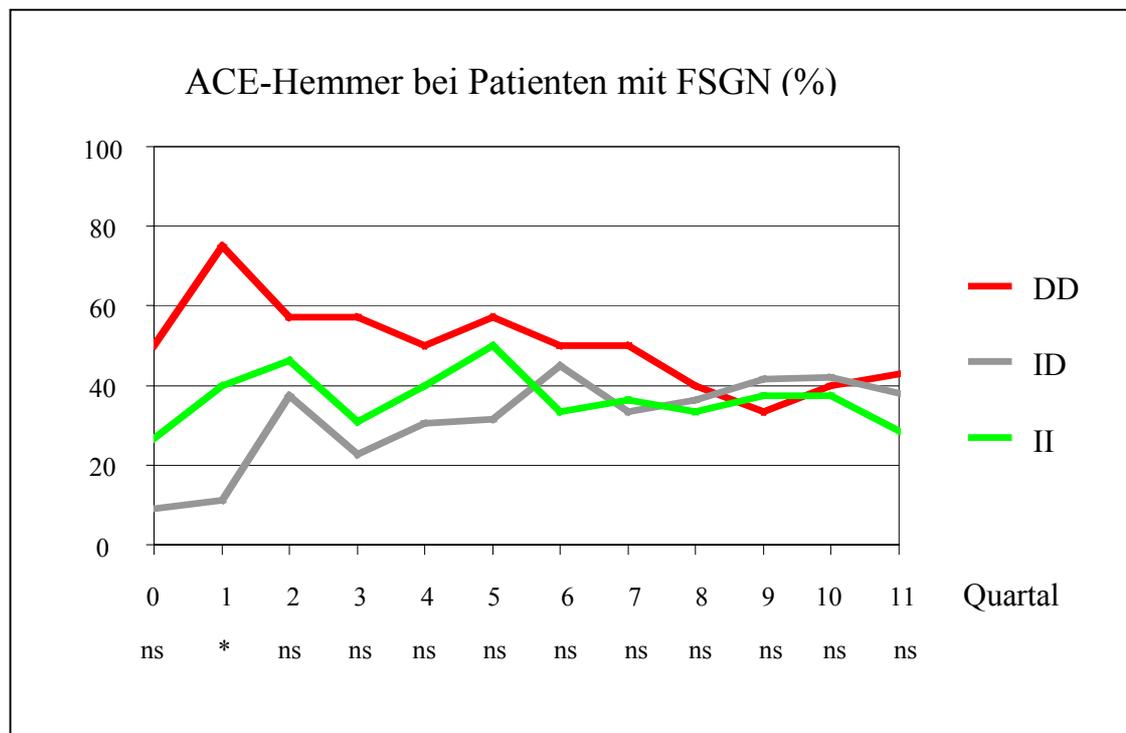


**Abbildung 35:** Antihypertensive Medikamentenanzahl in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

### ACE-Hemmer:

Zu den antihypertensiven Therapeutika zählen auch die ACE-Inhibitoren. Die Patienten mit DD-Genotyp wurden besonders in den ersten sieben Quartalen zu einem höheren Prozentsatz, von 50 bis 75 Prozent, einer solchen Behandlung unterzogen. Diese Abweichung kann auf eine vermehrte Effektivität der ACE-Hemmer und damit auf eine therapeutische Bevorzugung oder aber auf einen erhöhten ACE-inhibitorischen Bedarf dieser Patienten hinweisen. Patienten mit einem ID- oder II-Genotyp bekamen nur in 9 bis 50 Prozent eine ACE-Hemmer-Therapie. Diese Unterschiede erreichten aber nur im 1. Quartal eine Signifikanz ( $p < 0,05$ ). Nach dem 7. Quartal erhielten alle Patientengruppen zu gleichermaßen zu 29 bis 43 Prozent eine solche Medikation (Abb.36). Bei Differenzierung von DD- und ID/II-Genotyp ließ sich wieder eine signifikante Abwei-

chung im 1. Quartal nachweisen ( $p < 0,05$ ), bei Unterscheidung zwischen DD/ID und II gab es keine Signifikanzen.



**Abbildung 36:** ACE-Hemmer-Therapie in Prozent in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (\* =  $p < 0,05$ , ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

Insgesamt erhielten Patienten mit einem II-Genotyp eine höhere Anzahl von Antihypertensiva, die ACE-Hemmer wurden jedoch eher an Patienten mit einem DD-Genotyp verabreicht. Diese Tendenz könnte auf eine vermehrte Effektivität der ACE-inhibitorischen Therapie bei Patienten mit DD-Gen hinweisen.

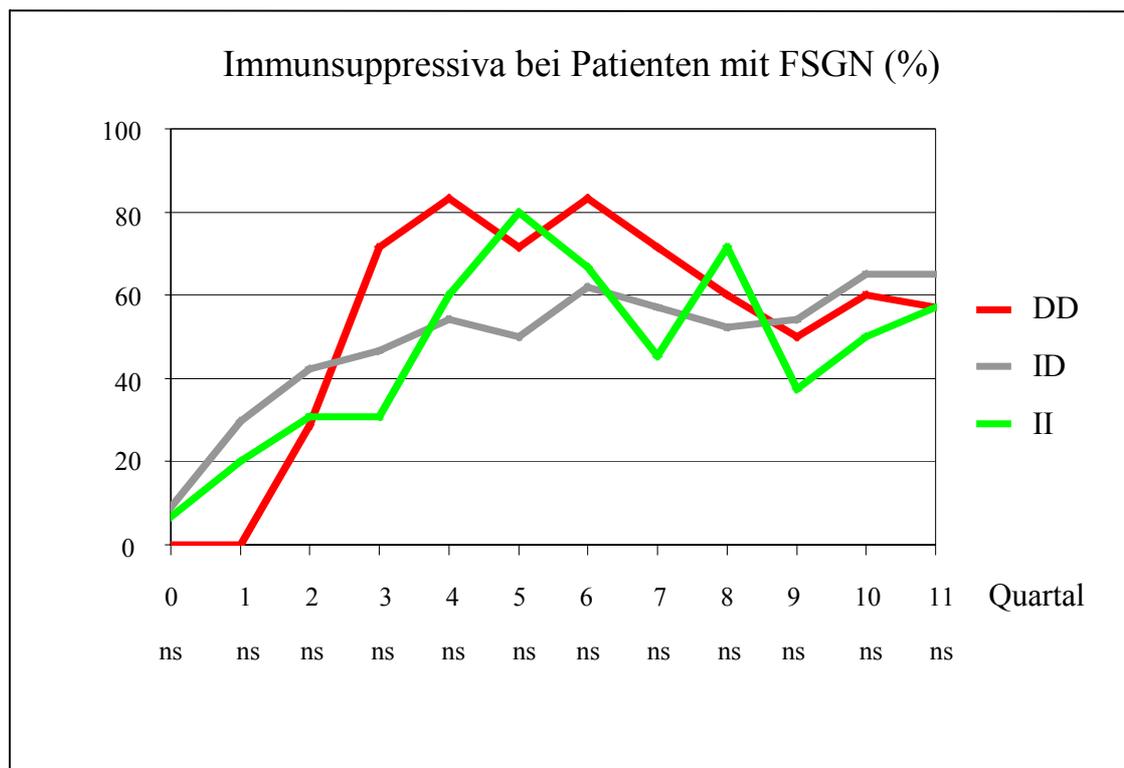
### Immunsuppressive Therapie:

Durchschnittlich 66 Prozent aller Patienten erhielten eine immunsuppressive Therapie zur Unterdrückung des Entzündungsgeschehens. In der Verlaufsbeobachtung wurde zwischen Immunsuppressiva wie CsA und Kortikosteroiden unterschieden. Hierbei traten zwischen den ACE-Genotypen keine signifikanten Unterschiede auf. Zu Beginn

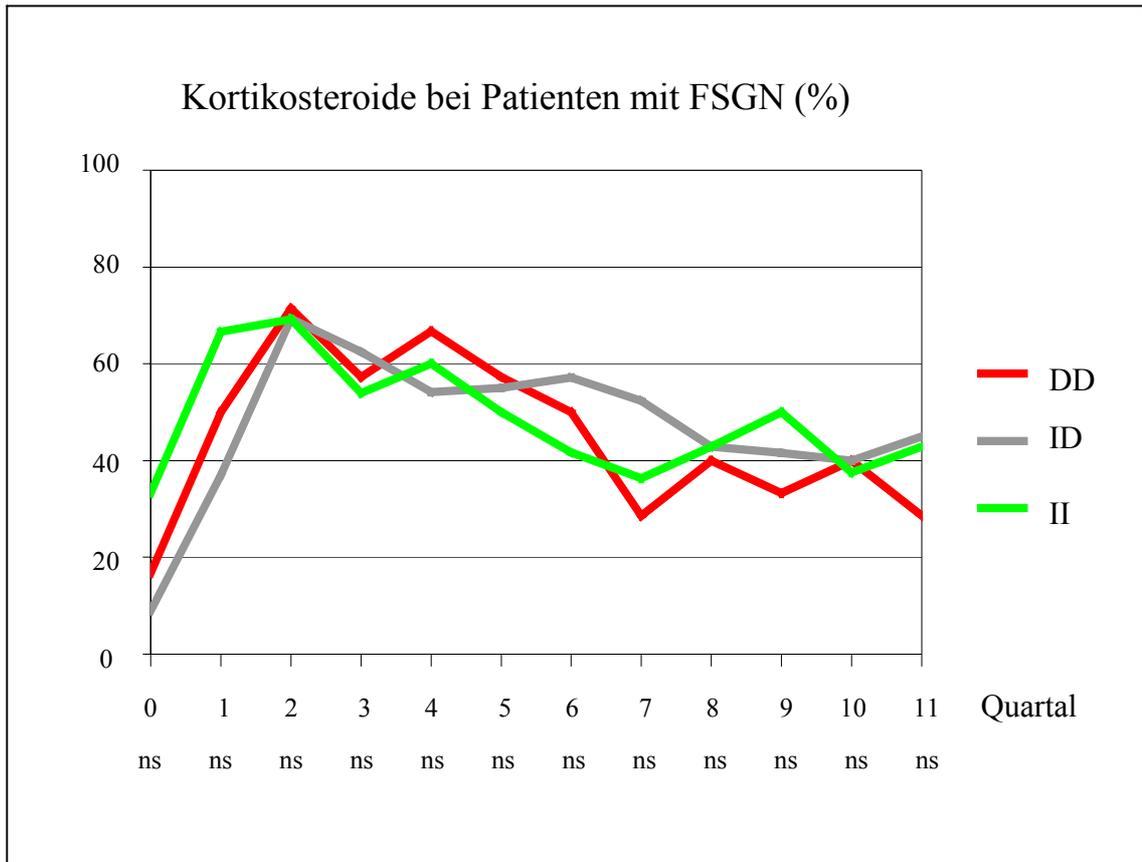
zeigten die Patienten mit ID-Genotyp einen höheren Bedarf an immunsuppressiver Therapie, später wurden häufiger Patienten mit einem DD-Genotyp einer solchen Behandlung unterzogen. Nach dem 7. Quartal sind alle Patientengruppen circa zu einem gleich großen Prozentsatz mit Immunsuppressiva behandelt worden (Abb.37). Die Therapie mit Kortikosteroiden wurde im gesamten Untersuchungszeitraum zu ungefähr gleichen Anteilen bei den verschiedenen Patientengruppen durchgeführt (Abb.38).

Patienten, welche eine Kombinationsbehandlung mit Immunsuppressiva und Kortikosteroiden erhielten, wurden zusätzlich gesondert erfasst. Auch hier traten keine Signifikanzen auf. Im Durchschnitt bekamen 30 Prozent aller Patienten eine solche Therapie. Zu Beginn erhielten besonders Patienten mit ID-Genotyp diese Kombinationsbehandlung, später wurden alle Patientengruppen ungefähr gleich häufig therapiert.

Auch bei Gegenüberstellung von DD versus ID/II und DD/ID versus II ergaben sich bei der Therapie mit Immunsuppressiva und Kortikosteroiden keine signifikanten Differenzen. Eine differenzierte immunsuppressive Therapie spezifisch nach den ACE-Genotypen war somit nicht erkennbar.



**Abbildung 37:** Therapie mit Immunsuppressiva in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).



**Abbildung 38:** Kortikosteroid-Therapie in Prozent in Quartalen nach Diagnosestellung bei Patienten mit FSGN (ns = nicht signifikant; Vergleich von DD, ID und II nach Kruskal-Wallis-H-Test).

## **5. Diskussion**

### **5.1 Einfluss des ACE-Gen-Polymorphismus auf die Entstehung der fokal segmental sklerosierenden Glomerulonephritis**

Nach der Erkenntnis der Dominanz des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems in der systemischen Blutdruckregulation wurde im Rahmen neuer technischer Möglichkeiten versucht, auch die entschlüsselten Genkonstellationen des RAAS zu evaluieren. Dazu gehören das Renin-Gen (West 1994, Frossard 1999), der M235T-Polymorphismus des Angiotensinogen-Gens, das ACE-Gen und die A1166C-Mutation im AT1-Rezeptor-Gen (Hunley 1996, Yoshida 1996<sub>b</sub>, Marre 1997, Frishberg 1998). In diesem Zusammenhang sei auf die bevorstehende Aufdeckung des gesamten menschlichen Gen-Codes hingewiesen, deren Erkenntnisgewinn auch für die medizinische Forschung bisher noch nicht abgeschätzt werden kann (Pennisi 2000).

Diese Studie befasst sich gezielt mit dem ACE-Gen, da dieser Polymorphismus durch seinen starken Einfluss auf die Serumkonzentration des ACE (Rigat 1990) auch die Bildung des vasokonstriktorisches Angiotensin II mitbestimmt. Der DD-Genotyp ist häufig als die Konstellation beschrieben worden, die die höchsten ACE-Plasmaspiegel hervorruft (Harrap 1993, Ueda 1995, Nakai 1997, Teranishi 1999) und damit für hypertensive sowie für renale Erkrankungen am gefährlichsten zu sein scheint (Kennon 1999). Weiterhin wird diese Gen-Konstellation in der Literatur mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt und Apoplex sowie mit der Progression von koronarer, renaler als auch systemischer Arteriosklerose in Verbindung gebracht (Nakauchi 1996, Rasmussen 1996, Doi 1997, Kogawa 1997, Staessen 1997). Andere Autoren konnten diesbezüglich keinen Zusammenhang aufzeigen (Lindpaintner 1995, Ringel 1997, Kunz 1998).

In unserer Arbeit sind 60 Patienten und 60 gesunde Kontrollpersonen auf ihren Genotyp hin untersucht worden. Dabei wurden ethnische Unterschiede ausgeschlossen, um eventuelle Einflüsse auf die Genotypverteilung zu verhindern. Die FSGN hat bei Schwarzen

eine erhöhte Prävalenz (Cameron 1996) und zeigt zudem eine schnellere Progression bis hin zum terminalen Nierenversagen (Ingulli 1991<sub>b</sub>). Weiterhin ist bei diesen Patienten ein vermehrtes Auftreten des D-Allels beschrieben worden (Barley 1994, Rutledge 1994).

Die Kontrollgruppe wies eine Genotypkonstellation auf, die mit den Ergebnissen anderer europäischer Studien übereinstimmt (Schunkert 1994, Harden 1995, Schmidt 1995<sub>a</sub>). In unserer ersten Hypothese wurde keine Differenz des Polymorphismus zwischen den Patienten und Kontrollpersonen erwartet, das heißt, das ACE-Gen sei nicht verantwortlich für ein Auftreten der FSGN. Diese Erwartung bestätigte sich, denn die Genotypen von Patienten und Kontrolle besaßen keine signifikanten Differenzen. Die DD-Konstellation war bei unserer Kontrollgruppe sogar häufiger vertreten als unter den Patienten. Der ACE-Gen-Polymorphismus ist somit kein prädisponierender Faktor für die Entstehung einer FSGN.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Studien zu renalen Erkrankungen (Schmidt 1995<sub>a</sub>, Nakai 1997) sowie auch speziell zu Glomerulonephritiden (Harden 1995, Schmidt 1995<sub>b</sub>, Yorioka 1995, Hunley 1996, Tanaka 1998, Stratta 1999). Die FSGN wurde diesbezüglich nur in der Studie von Frishberg (Frishberg 1998) untersucht, welcher den Polymorphismus des ACE-Gens als Risikofaktor für die Entwicklung einer FSGN bei Kindern ausschließen konnte. Nur wenige Studien beschreiben ein erhöhtes Auftreten von renalen Erkrankungen bei Vorliegen des DD-Genotyps (Chen 1997), dies konnte für die FSGN bislang nicht bestätigt werden.

In unserer Kontrollgruppe von 30 männlichen und 30 weiblichen Personen ergab sich ein signifikant erhöhtes Auftreten des I-Allels bei den Männern und des DD-Genotyps bei Frauen. Auch in der Patientengruppe zeigten die Frauen vermehrt den DD-Genotyp, die Männer eher das I-Allel. Hier waren die Unterschiede jedoch nicht signifikant. Basierend auf der Vermutung eines aggressiven Einflusses des DD-Gens bei renalen Erkrankung sprechen sie aber für ein eventuell erhöhtes Risiko für das weibliche Geschlecht. In unserer Patientengruppe betrug der Anteil an Frauen 58,3 %.

In der Patientengruppe korrelierte der DD-Genotyp mit einem zeitlich früheren Auftreten der Erkrankung. Da auch die ID-Konstellation ähnliche Werte wie das DD-Gen

zeigt, stellt sich die Frage nach der Dominanz des D-Allels. Patienten mit II-Genotyp waren bei Diagnosestellung dagegen durchschnittlich fünf Jahre älter. Bei einer Unterteilung der Patienten in unter und über 40-Jährige ergibt sich gleichfalls eine stärkere Tendenz zum DD-Genotyp bei der jungen Patientengruppe und eine erhöhte Häufigkeit der II-Konstellation bei den älteren Patienten. Das Vorliegen des DD- oder ID-Gens führte zu einem um 25 Prozent erhöhten Krankheitseintritt bei den unter 40-jährigen Patienten. Diese Differenz war signifikant und unterstreicht nochmals die starke Einflussnahme des D-Allels auf eine zeitlich frühere Manifestation der FSGN. Die Korrelation des Auftretensalters mit dem D-Allel kann möglicherweise auch durch einen progressiveren Verlauf der Erkrankung vor der bioptischen Diagnosestellung erklärt werden. In der Literatur ist dieser Zusammenhang in Bezug auf renale Erkrankungen ebenfalls beschrieben worden (Harden 1995, Lee 1997).

## **5.2 Stellenwert des ACE-Gen-Polymorphismus bei der Progression der FSGN**

Die fokal segmental sklerosierende Glomerulonephritis scheint ein Krankheitsbild mit zwei verschiedenen Entitäten zu sein, welche bioptisch nicht unterscheidbar sind. Hierbei gibt es die Gruppe der progressiven, schnell niereninsuffizient werdenden Patienten. Zwei Drittel von ihnen erreichen innerhalb von 5 bis 10 Jahren einen vollständigen Funktionsverlust der Niere (Brown 1978, Cameron 1996). Bei Erkrankungsbeginn leiden diese Patienten vermehrt unter dem nephrotischen Syndrom, welches neben den fibrotischen Veränderungen im Glomerulum (Floege 1995) und dem Kreatininanstieg im Plasma (Cameron 1996, Suzuki 2000) somit auch als prognostischer Marker gewertet werden kann (Grupp 1992, Korbet 1994, Suzuki 2000). Besonders das anfängliche Ausmaß der Proteinurie konnte hierbei als Risikofaktor für eine schnelle Entwicklung zum renalen Funktionsverlust gefunden werden (Mallick 1991, Matthias 1995, Suzuki 2000). Die Prognose ist schlecht, da unter der Dialyse vermehrt kardiovaskuläre Komplikationen, eine verstärkte Progression der renalen Erkrankung und eine erhöhte Mortalität beschrieben sind (Mallick 1991). Auch der langfristige therapeutische Erfolg der

Nierentransplantation ist bei diesen Patienten durch ein verkürztes Transplantatüberleben eingeschränkt (Cameron 1994).

Die anderen Patienten zeigen als „slow progressors“ ein benigneres Bild. Entweder sie gelangen schnell in eine komplette Remission, welche nur in 3 bis 5 Prozent mit einem Rezidiv mit Nierenversagen verbunden ist (Cameron 1996), oder sie haben eine langsamere Progression über viele Jahre hinweg, welche dann schließlich auch in einem Nierenfunktionsverlust münden kann.

Unsere Patientengruppe wurde auf dieser Grundlage in 2 Gruppen unterteilt, um den ACE-Gen-Polymorphismus als möglichen prognostischen Indikator zu identifizieren. Gruppe 1 waren die schnell terminal werdenden Patienten, die „fast progressors“, Gruppe 2 die Patienten mit einem günstigeren Verlauf, die „slow progressors“. Als Unterscheidungskriterium zogen wir den Kreatininverlauf als Referenzparameter der Nierenfunktion heran, wie dies auch in anderen Studien durchgeführt wurde (Hunley 1996, McLaughlin 1996, Yorioka 1996, Yoshida 1996, Frishberg 1998). Durch diese Aufteilung der Patienten sollte der Einfluss der ACE-Gen-Polymorphismus auf die Progression der FSGN untersucht werden.

Unsere zweite Hypothese bestand aus der Annahme, dass Patienten mit DD-Genotyp schneller eine terminale Niereninsuffizienz erreichen. Dies konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, da die DD-Konstellation zwar vermehrt in der Gruppe 1 vorzufinden war, die Differenz zur Gruppe 2 jedoch keine Signifikanz ergab. Dieses Ergebnis beruht möglicherweise auf einer zu kleinen Patientenzahl. Es gab nur 11 Patienten mit DD-Genotyp im Gesamtkollektiv von 60 Patienten. Damit war die Zahl dieser Patienten innerhalb der einzelnen Gruppen noch kleiner, so dass hier eventuell keine signifikanten Unterschiede erreichbar waren. Weiterhin war in der Gruppe 2 eine erhöhte Häufigkeit des II-Genotyps vorhanden, wobei aber ebenfalls keine relevante Differenz auftrat. Ein weiterer Faktor für das geringe Auftreten des DD-Genotyps könnte die in anderen Studien beschriebene hohe kardiovaskulär bedingte Mortalität sein, welche mit dieser Konstellation, insbesondere bei Dialysepflichtigkeit einhergeht (Yoshida 1996, Stratta 1999). Auch dieser Einflussfaktor sollte mit berücksichtigt werden. Insgesamt konnte

aber in dieser Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen ACE-Gen-Polymorphismus und der Progression der FSGN aufgezeigt werden.

Dieses Resultat geht mit ähnlichen Studienergebnissen in der Literatur konform, in denen eine bedeutsame Rolle des ACE-Gen-Polymorphismus im Verlauf von Nierenerkrankungen nicht gefunden werden konnte (Schmidt 1995<sub>b</sub>, Chowdhury 1996, Pei 1997, Schmidt 1997, Kunz 1998, Suzuki 2000). Im Gegensatz dazu gibt es aber auch signifikante Nachweise für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie (Yoshida 1996<sub>b</sub>, Jeffers 1997, Marre 1997, Martin 1999, Hsieh 2000) und der Progression der IgA- Glomerulonephritis (Harden 1995, Yorioka 1995, Hunley 1996, Chen 1997, Stratta 1999). Bezüglich der FSGN wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Progression und dem Vorliegen eines D-Allels bei Kindern aufgezeigt (Frishberg 1998). Möglicherweise könnte in Zukunft ein prospektives Studiendesign Aufklärung über die Zusammenhänge zwischen ACE-Gen und dem Fortschreiten von renalen Erkrankungen bringen.

Auffällig war, dass sich in unserer Gruppe 1 ein deutlich größerer Anteil an weiblichen Patienten befand, in der Gruppe 2 dagegen das Verhältnis zwischen der Anzahl der Männer und Frauen eher ausgeglichen war. In der Gruppe 1 besaßen die Frauen außerdem vermehrt den DD-Genotyp, die Männer mit einer DD-Konstellation waren in dieser Gruppe gar nicht vertreten. Die Gruppe 2 zeigte ein abgeschwächtes Bild, aber auch hier fand sich der DD-Genotyp eher bei den weiblichen Probanden. Somit ergibt sich unter der Annahme einer malignen Einwirkung des DD-Gens eher eine schlechtere Prognose für den Krankheitsverlauf des weiblichen Geschlechts.

Das Patientenalter bei Diagnosestellung lag in der Gruppe 1 circa drei Jahre niedriger als in Gruppe 2. Das frühere Auftreten der Erkrankung ist in beiden Gruppen mit dem Vorhandensein des D-Allels möglicherweise, aber nicht signifikant verknüpft. Dieses Ergebnis trifft besonders auf die Gruppe 1 zu, wo sich bei Vorliegen eines D-Allels eine um zwölf Jahre frühere Manifestation der FSGN im Vergleich zum II-Genotyp findet. In der Gruppe 2 beträgt die Differenz nur zwei Jahre. Unterscheidet man nun die Patienten nach Krankheitseintritt vor und nach dem 40. Lebensjahr, ergeben sich ähnliche Tendenzen. Der DD-Genotyp ist häufiger vorhanden bei den unter 40-jährigen Patienten, der II-Genotyp zeigt sich vermehrt in der Gruppe der über 40-Jährigen. Diese Kon-

stellation findet man besonders in der Gruppe 1. Somit scheint das D-Allel für einen frühzeitiges Auftreten der FSGN mitverantwortlich zu sein. Auch in der Literatur ist der DD-Genotyp in Verbindung mit einem frühen aggressiven Voranschreiten von Nierenerkrankungen bis hin zum chronischen Nierenversagen beschrieben worden (Perez-Oller 1999, Stratta 1999). Betrachtet man die Patienten mit einem D-Allel, so haben in der Gruppe 1 die bei Diagnosestellung unter 40-Jährigen in über 50 Prozent ein solches Allel. Die über 40-Jährigen in der Gruppe 1 weisen das D-Allel nur in circa 20 Prozent auf. In der Gruppe 2 dagegen ist das D-Allel bei den unter und über 40-Jährigen relativ gleichmäßig vertreten. Insgesamt konnten bei beiden Gruppen keine Signifikanzen gefunden werden. Der DD-Genotyp bzw. das D-Allel kann dennoch mit einem früheren und progressiveren Auftreten der FSGN in Verbindung gebracht werden.

Da bei der Einteilung der Patienten in zwei Gruppen nach dem Kriterium des Kreatininanstiegs keine signifikanten Ergebnisse auftraten, wurden die Gruppen zur nochmaligen Überprüfung nach dem Grad der Proteinurie und dem Vorliegen einer arteriellen Hypertonie bei Diagnosestellung eingestuft.

Eine vermehrte Prävalenz des DD-Genotyps bei Patienten mit einer Eiweißausscheidung über 3 g/l konnte nicht signifikant nachgewiesen werden. Das DD-Gen war eher mit Proteinurie-Werten unter 3g/l verbunden. Somit scheint das ACE-Gen bei Erkrankungsbeginn keinen Einfluss auf die Proteinurie zu haben. Andere Studien berichten über ähnliche Resultate bei Nierenerkrankungen (Pei 1997), es gibt jedoch auch signifikante Aussagen zur Korrelation des ACE-Gen-Polymorphismus und dem Ausmaß der Proteinurie bei einer renalen Funktionsstörung (Chen 1997, Frishberg 1998, Tanaka 1998).

Das Vorliegen einer arteriellen Hypertonie konnte nur Tendenzen für eine erhöhte Präsenz von Patienten mit DD-Konstellation aufzeigen. Es gab keine Signifikanzen und somit keine wahrscheinliche Beziehung zwischen ACE-Gen und Hypertonie bei Diagnosestellung. Andere Autoren fanden ebenfalls keine Korrelation zwischen ACE-Gen und Hypertonie bei Nierenerkrankung (Burg 1997, Miller 1997, Teranishi 1999). Einige Studien wiesen jedoch einen signifikanten Zusammenhang zwischen ACE-Gen-Polymorphismus und arterieller Hypertonie nach (Chen 1997).

Zusätzlich wurde der Einfluss des ACE-Gen-Polymorphismus auf den ACE-Serumspiegel der Patienten untersucht. Trotz Therapie traten signifikante Differenzen zwischen den Genotypen auf. Die DD-Konstellation war mit den höchsten Enzymwerten verbunden. Der ID-Genotyp zeigte dagegen geringere ACE-Spiegel, während die II-Konstellation die niedrigsten Werte aufwies. Dieses Resultat geht mit anderen Studienergebnissen zur Korrelation zwischen ACE-Gen und der Konzentration des ACE im Plasma einher (Rigat 1990, Harrap 1993, Ueda 1995, Mizuiri 1997, Nakai 1997, Teranishi 1999).

### **5.3 Nierenfunktion und ACE-Gen**

Die Erhaltung der Nierenfunktionsrate zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen, obwohl die Tendenzen deutlich sind. Die Nierenfunktion der Patienten mit einem DD-Genotyp kann mit circa 5 Jahren nur etwa halb so lange aufrecht erhalten werden wie bei Patienten mit einer ID- oder II-Konstellation. Dieses verkürzte Überleben der Nierenfunktion bei Vorhandensein eines DD-Genotyps konnte in anderen Studien signifikant nachgewiesen werden (Harden 1995, Chen 1997, Lee 1997, Schmidt 1997). Andere Autoren fanden dementsprechend den II-Genotyp bzw. das I-Allel als protektiven Faktor vor einem schnellen Nierenversagen (McLaughlin 1996, Yoshida 1996, Perez-Oller 1999, Stratta 1999). Es gibt jedoch auch Studien, welche keinen Zusammenhang zwischen ACE-Gen-Polymorphismus und einer kürzeren Nierenfunktionszeit zeigen konnten (Suzuki 2000).

Die Betrachtung der Retentionsparameter Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Proteinurie und ECC ergab insgesamt keine Signifikanzen im Gen-Polymorphismus. In vielen Quartalen herrschte eine Tendenz des DD-Genotyps zu schlechteren renalen Funktionswerten vor, die Gruppe der Patienten mit DD-Genotyp bleibt aber wahrscheinlich auch hier für relevante Differenzen zu klein. Weiterhin unterliegen diese Parameter einer Modifikation durch Therapeutika, so dass die Aussagekraft dieser Analyse eingeschränkt ist. In ähnlichen Arbeiten konnte gleichfalls keine Korrelation zwischen dem DD-Genotyp und einem Kreatininanstieg (Teranishi 1999) oder einer vermehrten Eiweißausscheidung (Pei 1997) gefunden werden. Andere Studien wiesen dagegen einen

Zusammenhang zwischen dem ACE-Gen-Polymorphismus und dem Kreatininverlauf (Yorioka 1995, Hunley 1996, McLaughlin 1996, Stratta 1999) sowie einem zunehmenden Grad der Proteinurie (Chen 1997) nach.

Die anderen Verlaufsparameter wie Gesamteiweiß, Albumin, Lipide und Hämoglobin im Serum ergaben nur in vereinzelt Quartalen Signifikanzen zwischen den Genotypen, welche aber keine schlüssige Aussage zulassen. Das Gesamtcholesterin ist bei Patienten mit einem I-Allel tendenziell erhöht. Die Triglyceride und das LDL im Serum zeigen zu Krankheitsbeginn bei diesen Patienten ebenfalls höhere Werte im Gegensatz zu Patienten mit einem DD-Genotyp. Das HDL ging anfangs bei Patienten mit DD-Gen gleichfalls mit besseren Werten einher. Diese Tendenzen weisen auf einen weiteren möglichen Risikofaktor für die Progression dieser Erkrankung hin, diesmal allerdings bei Patienten mit I-Allel. Die Wirkung des II-Gens als eventuellen Schutzfaktor kann damit nicht uneingeschränkt bekräftigt werden.

Die Unterschiede zwischen systolischen und diastolischen Blutdruckwerten waren, wahrscheinlich aufgrund der guten therapeutischen Einstellung, ebenfalls größtenteils nicht signifikant. In den ersten Krankheitsquartalen zeigten sich allerdings Tendenzen für höhere Drücke bei den Patienten mit einem I-Allel. In der Literatur ist eine bedeutende Rolle des ACE-Gens auf die arterielle Hypertonie ebenfalls häufig nicht nachweisbar (Kiema 1996, Pontremoli 1996, Beige 1997<sub>b</sub>, Pei 1997, Ringel 1997). Es gibt aber auch gegensätzliche Ergebnisse, die hierbei einen signifikanten Einfluss des DD-Genotyps bzw. des D-Allels auf die Hypertonie aufzeigen (Yorioka 1995, Chen 1997, Stefansson 2000).

Die Therapie der Patienten mit FSGN bestand zum großen Teil aus einer antihypertensiven Behandlung. Hierbei bekamen Patienten mit einem II-Genotyp eine generell höhere Anzahl an Antihypertensiva, die ACE-Hemmer wurden aber vermehrt an Patienten mit einem DD-Genotyp verabreicht. Dieses zeigt eventuell eine geringere Effektivität der ACE-Hemmer bei Patienten mit II-Gen. Weiterhin könnte man auch einen vermehrten ACE-inhibitorischen Bedarf der Patienten mit DD-Konstellation vermuten. Da in den ersten Krankheitsquartalen die Patienten mit einem DD-Genotyp unter der Therapie aber eher bessere Blutdruckwerte aufweisen als Patienten mit einem I-Allel, spricht dies für eine höhere Therapieeffektivität der ACE-Hemmer bei Vorliegen eines DD-Gens. Diese Tendenzen erreichten jedoch keine Signifikanz.

Die immunsuppressive Therapie mit CsA und Kortikosteroiden zeigte ebenfalls keine eindeutigen Differenzen. Zu Therapiebeginn wurden die Patienten mit DD- oder ID-Gen vermehrt mit Immunsuppressiva wie CsA behandelt, später war die Medikation bei allen Genotypen vergleichbar.

Bei der lipidsenkenden Therapie ergaben sich gleichfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gen-Konstellationen, der Bedarf an Lipidsenkern war allerdings bei Patienten mit einer II-Konstellation tendenziell erhöht. Dieses Ergebnis weist nochmals auf die Hyperlipidämie als möglichen zusätzlichen Risikofaktor für den Verlauf der FSGN hin, da sich bei ähnlichem Krankheitsverlauf die vermutete Schutzfunktion des II-Gens (Hunley 1996, Kennon 1999) eventuell durch andere Progressionsfaktoren wie zum Beispiel ein erhöhtes Serumcholesterin beeinträchtigen lässt. Weitere Faktoren, welche mit der Prognose der FSGN korrelieren und die Einflussnahme des ACE-Gen-Polymorphismus einschränken, müssen noch genauer untersucht werden.

## **5.4 Kritisches Resumé**

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen oft nur Tendenzen. Eine mögliche Ursache könnte in der Gruppengröße von 60 Personen liegen, die, obwohl sie die bisher zahlenmäßig größte Studie bezüglich der FSGN ist, für statistisch signifikante Zahlen nicht ausreicht. Hinzu kommt, dass es innerhalb dieser Gruppe nur 11 Patienten mit einem DD-Genotyp gibt. Dies entspricht prozentual sogar einer geringeren Anzahl als wir in der gesunden Kontrolle gefunden haben. Da das Patientengut mit FSGN aber sehr intensiv recherchiert wurde, ist es fast nicht möglich, eine größere Studiengruppe in Düsseldorf und Umgebung zu erfassen. Dazu müsste eine Studie auf nationaler Ebene durchgeführt werden, wodurch eventuell signifikante Resultate bezüglich eines Einflusses des ACE-Gens auf die Progression der FSGN erzielt werden könnten. Prospektive Studienansätze wären hier äußerst vielversprechend.

Auf der anderen Seite muss man die widersprüchlichen Ergebnisse der bisherigen Studien mitbeachten. Einige Arbeiten fanden eine Korrelation des ACE-Gen-Polymorphismus mit dem Fortschreiten von Nierenerkrankungen (Harden 1995 Frishberg 1998),

andere konnten solche Resultate nicht nachweisen (Pei 1997, Schmidt 1997). Vielleicht ist die Progression der renalen Erkrankungen doch in größerem Rahmen durch einerseits multiple genetische und andererseits äußere Einflüsse bedingt, die erst in ihrem Zusammenspiel aufgedeckt werden können. Deshalb wäre es sinnvoll, bei derselben Patientengruppe mehrere Gene des RAAS bzw. eventuell auch andere Gene und weitere Risikofaktoren gleichzeitig zu untersuchen. Das hauptsächliche Hindernis weiterführender Erkenntnisse ist die Tatsache, dass die meisten Glomerulonephritiden immer noch idiopathischer bzw. ungeklärter Natur sind. Hier liegt eine wesentliche Forschungsaufgabe der Zukunft. Dabei kann die baldige Entschlüsselung des gesamten Gen-Codes des Menschen ein neuer Ansatz bezüglich der Frage einer Beeinflussung und vielleicht medizinischen Therapie des „krankmachenden“ genetischen Erbgutes sein.

Weiterhin muss die FSGN für sich als renale Erkrankung kritisch betrachtet werden. Durch die Rekurrenz der FSGN im Nierentransplantat ergibt sich die Frage einer systemischen Pathogenese, die eventuell vaskulär lokalisiert ist. Wir hatten nur einen transplantierten Patienten mit einer rekurrenten FSGN nach Nierentransplantation, in der Literatur findet sich mit 15 bis 55 Prozent dagegen eine höhere Anzahl betroffener Patienten (Striegel 1986, Cameron 1989, Banfi 1990, Ingulli 1991<sub>a</sub>), von denen circa die Hälfte innerhalb von fünf Jahren ihr Transplantat durch ein Wiederauftreten der FSGN verlieren (Pinto 1981). Auch bei einem Zweittransplantat nach vorheriger Rekurrenz muss in circa 85 Prozent mit einer erneuten Entwicklung der FSGN gerechnet werden (Stephanian 1992, Cameron 1996). Gleichfalls ist die schnelle Rückkehr des nephrotischen Syndroms mit einer starken Proteinurie nach Transplantation ein Hinweis auf eine teilweise plasmatische Genese der Erkrankung. Hierbei wird ein zirkulierender Faktor im Gefäßsystem als aggressive Komponente zur Schädigung der frisch implantierten Niere vermutet (Zimmermann 1984, Cameron 1996), welcher erneut entzündlich-immunologische Prozesse in den Kapillaren und den Glomeruli hervorruft. Ob auch gewebsständige Faktoren in den bereits zerstörten Eigennieren für eine Transplantatschädigung verantwortlich sind, wurde bisher nicht untersucht. Dies ist aber notwendig, da sich eventuell als Konsequenz die präventive beidseitige Nephrektomie vor einer allogenen Nierentransplantation ergibt. Inwiefern der ACE-Gen-Polymorphismus hinsichtlich der rekurrenten FSGN eine Rolle spielt, ist noch unklar. Für das ACE-Gen wird ein unabhängiger Einfluss auf die intimale Gefäßproliferation beschrieben (Jeunemaitre 1998). Trotzdem konnte das Wiederauftreten der FSGN im Transplantat bisher

nicht mit diesem Polymorphismus in Zusammenhang gebracht werden (Beige 1997<sup>a</sup>, Beige 1998). Es ist allerdings eine Korrelation zwischen dem DD-Genotyp und einem kürzeren Transplantatüberleben bei Kindern nachgewiesen worden (Barocci 1999). Weiterhin entwickeln nierentransplantierte Patienten mit einem DD-Gen in größerem Ausmaß eine linksventrikuläre Hypertrophie (Hernandez 1997), welche mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko verbunden ist.

Trotz der wenig signifikanten Aussagen dieser Studie ergibt sich als Schlussfolgerung für die Patienten mit Nierenerkrankung und einem DD-Genotyp bzw. einem D-Allel ein früheres Manifestationsalter und wahrscheinlich auch eine schnellere Progression zum terminalen Nierenversagen. Gegensätzliche ACE-Hemmer-Erfolge werfen die Frage auf, ob Patienten mit einem DD-Genotyp im Gegensatz zu Patienten anderen Genotyps vermehrt mit ACE-Inhibitoren behandelt werden sollten, da die DD-Konstellation einen starken Pathogenesefaktor darzustellen scheint. Andererseits könnte man aufgrund der hohen ACE-Konzentrationen, die mit diesem Genotyp einhergehen, eher eine Therapieresistenz vorfinden und müsste dann Abstand von einer solchen Therapie nehmen. Die dritte Möglichkeit wäre, alle Patienten mit FSGN weiterhin mit ACE-Hemmern zu behandeln und nur hinsichtlich der Dosierung zwischen den Genotypen zu differenzieren und somit auf die unterschiedlich hohen ACE-Serumspiegel einzugehen. Dazu müssten langfristige prospektive Studien mit der Beobachtung der ACE-Konzentrationen im Serum durchgeführt werden. Auch der Schweregrad des DD-Genotyp-Einflusses muss weiter untersucht werden, da dieser durch andere klinische und äußere Parameter einschränkbar zu sein scheint oder sogar verdeckt werden kann. Deshalb gibt es häufig Studien, in denen Patienten mit weiteren Risikofaktoren wie einer schwerwiegenden Proteinurie oder Hypertonie von der Studie ausgeschlossen werden, um so das Einwirken des ACE-Gen-Polymorphismus stärker sichtbar zu machen (Yoshida 1995, Hunley 1996, Stratta 1999, Samuelsson 2000).

Insgesamt ist der ACE-Gen-Polymorphismus aber sicherlich nur ein Baustein der progressionsfördernden Mechanismen bei renalen Erkrankungen, insbesondere bei der FSGN. Deshalb müssen weitere genetische Systeme und plasmatische Faktoren in ihrem Zusammenspiel untersucht werden.

## **6. Zusammenfassung**

Die Frage einer Korrelation zwischen der renalen Erkrankung und dem ACE-Gen-Polymorphismus als einem wichtigen Einflussfaktor für die Serumkonzentration des Angiotensin-Converting-Enzyms ist immer noch umstritten. Die fokal segmental sklerosierende Glomerulonephritis (FSGN) als oft stark progressive Erkrankung ist in dieser Hinsicht bisher selten untersucht worden. Ziel dieser Studie war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Insertions/Deletions(I/D)-Polymorphismus des ACE-Gens und der Entstehung und Progression der FSGN nachzuweisen.

In dieser retrospektiv angelegten Studie wurden 60 Patienten mit einer FSGN erfasst, welche im Zeitraum von 1978 bis 1999 Patienten der Düsseldorfer Universitätsklinik für Nephrologie und Rheumatologie waren. Die Diagnose konnte durch eine Nierenbiopsie gesichert werden. Zusätzlich wurde retrospektiv der Krankheitsverlauf in Quartalsabständen dokumentiert. Die Patienten sind in Gruppe 1 (fast progressors, n = 21) und Gruppe 2 (slow progressors, n = 39) eingeteilt worden. Als Kriterium für das progressive Fortschreiten der FSGN in der Gruppe 1 diente dabei eine Verdoppelung des Serumkreatinins bzw. eine Dialysepflichtigkeit innerhalb der ersten zwei Krankheitsjahre nach Diagnosestellung. Die Gruppe 2 stellte die eher benigne Verlaufsform der Erkrankung dar. Als Kontrollgruppe dienten 60 gesunde Personen. Der ACE-Gen-Polymorphismus ist durch Polymerase-Ketten-Reaktion ermittelt worden. Außerdem wurde die Höhe des aktuellen Angiotensin-Converting-Enzyms im Serum bestimmt.

Es ergaben sich keine signifikanten Differenzen im ACE-Genotyp zwischen Patienten und gesunden Probanden. Sowohl die ACE-Genotypverteilung der Patienten mit DD = 18,3 %, ID = 51,7 %, II = 30,0 % als auch die der Kontrollpersonen mit DD = 21,7 %, ID = 56,6 %, II = 21,7 % stimmten mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz überein und gehen mit Ergebnissen anderer Studien zur Häufigkeit der verschiedenen ACE-Genotypen im europäischen Raum einher. Somit ist der I/D-Polymorphismus nicht für das Auftreten der FSGN verantwortlich. Zwischen Gruppe 1 und 2 konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des ACE-Gens gefunden werden, obwohl die Tendenz ein erhöhtes Vorhandensein des DD-Genotyps bei den schnell terminal werdenden Patienten

mit DD = 23,8 %, ID = 52,4 %, II = 23,8 % im Gegensatz zur Gruppe 2 mit DD = 15,4 %, ID = 51,3 %, II = 33,3 % zeigt. Insgesamt konnte eine signifikante Häufung des D-Allels bei den Patienten gefunden werden, bei denen die Diagnose vor dem 40. Lebensjahr gestellt wurde. Daraus ergibt sich für den ACE-Gen-Polymorphismus zwar kein Einfluss auf den Verlauf der FSGN, aber auf eine frühere Manifestation der Erkrankung bei Vorliegen eines D-Allels.

Die Höhe der ACE-Serumspiegel differierte signifikant zwischen den einzelnen ACE-Genotypen mit DD = 87,6 U/l, ID = 77,7 U/l, II = 50,4 U/l, welches die bedeutende Einwirkung dieses Polymorphismus auf die ACE-Konzentration zeigt. Die Differenz der Nierenüberlebensraten zeigte eine starke, aber nicht signifikante Tendenz zwischen den Gruppen. Patienten mit DD-Gen wurden durchschnittlich 62,7 Monate nach Diagnosestellung terminal niereninsuffizient, Patienten mit II-Gen dagegen erst nach 96,6 Monaten. Die Verlaufsp Parameter Kreatinin, Harnstoff und Proteinurie ergaben bezüglich des ACE-Gens keine relevanten Differenzen. Weitere Retentionsparameter und Blutwerte sowie die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte erreichten ebenfalls keine signifikanten Abweichungen. Auch bezüglich der klinischen Therapie mit Antihypertensiva, Immunsuppressiva und Lipidsenkern konnten keine relevanten Unterschiede gefunden werden.

Somit zeigt sich kein bedeutender Einfluss des I/D-Polymorphismus auf die Verlaufsp Parameter der FSGN, obwohl einzelne Tendenzen, wie zum Beispiel der ACE-Hemmerbedarf der Patienten mit DD-Gen auf eine differente Therapieeffektivität bei den verschiedenen Genotypen hindeutet. Schlussfolgernd konnte hier kein signifikanter Einfluss des ACE-Gen-Polymorphismus auf die Entstehung und die Progression der FSGN, wohl aber auf das Manifestationsalter der Erkrankung nachgewiesen werden. In Zukunft lässt sich eventuell eine spezifischere Therapie mit ACE-Hemmern verfolgen. Die bisher gegensätzlichen Studienergebnisse zu diesem Thema werfen die Frage auf, ob dabei Patienten mit FSGN und einem DD-Genotyp im Vergleich zu anderen Patienten vermehrt mit ACE-Hemmern behandelt werden sollten, oder sie aufgrund der höheren ACE-Spiegel eher therapieresistent sind bzw., ob die Dosierung der ACE-Hemmer höher sein sollte. Insgesamt wird der ACE-Gen-Polymorphismus und sein Einfluss auf die Progression der FSGN sicherlich durch weitere genetische und äußere Faktoren beeinflusst und überlagert, welche in ihrem Zusammenspiel mit dem ACE-Gen-Polymorphismus noch weiter untersucht werden müssen.

## 7. Literatur

- 1) **Banfi G**, Colturi C, Montagnino G, Ponticelli C (1990) The recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in kidney transplant patients treated with cyclosporine. *Transplantation* 50: 594-596
- 2) **Barley J**, Blackwood A, Carter ND, Crews DE, Cruickshank JK, Jeffery S, Ogunlesi AO, Sagnella GA (1994) Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism: association with ethnic origin. *J Hypertens* 12: 955-957
- 3) **Barocci S**, Ginevri F, Valente U, Torre F, Gusmano R, Nocera A (1999) Correlation between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and kidney graft long-term outcome in pediatric recipients: a single-center analysis. *Transplantation* 67: 534-538
- 4) **Beige J**, Offermann G, Distler A, Sharma AM (1998) Angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion genotype and long-term renal allograft survival. *Nephrol Dial Transplant* 13: 735-738
- 5) **Beige J<sub>a</sub>**, Scherer S, Weber A, Engeli S, Offermann G, Opelz G, Distler A, Sharma AM (1997) Angiotensin-converting enzyme genotype and renal allograft survival. *J Am Soc Nephrol* 8: 1319-1323
- 6) **Beige J<sub>b</sub>**, Zilch O, Hohenbleicher H, Ringel J, Kunz R, Distler A, Sharma AM (1997) Genetic variants of the renin-angiotensin system and ambulatory blood pressure in essential hypertension. *J Hypertens* 15: 503-508
- 7) **Border WA** (1988) Distinguishing minimal-change disease from mesangial disorders. *Kidney Int* 34: 419-434
- 8) **Brown CB**, Cameron JS, Turner DR, Chantler C, Ogg CS, Williams DG, Bewick M (1978) Focal segmental glomerulosclerosis with rapid decline in renal function („malignant FSGS“). *Clin Nephrol* 10: 51-61
- 9) **Burg M**, Menne J, Ostendorf T, Kliem V, Floege J (1997) Gene-polymorphisms of angiotensin converting enzyme and endothelial nitric oxide synthase in patients with primary glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 48: 205-211

- 10) **Cameron JS**, Turner DR, Ogg CS, Chantler C, Williams DG (1978) The long-term prognosis of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Nephrol* 10: 213-218
- 11) **Cameron JS**, Senguttuvan P, Hartley B, Rigden SPA, Chantler C, Koffmann G (1989) Focal segmental glomerulosclerosis in fifty-nine renal allografts from a single centre; analysis of risk factors for recurrence. *Transplant Proc* 21: 2117-2118
- 12) **Cameron JS** (1994) Recurrent renal disease after renal transplantation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 3: 602-607
- 13) **Cameron JS** (1996) The enigma of focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 50: 119-131
- 14) **Chen X**, Lin S, Ye Y, Xu Q (1997) Association of angiotensin-converting-enzyme gene insertion/deletion polymorphism with the clinicopathological manifestations in immunoglobulin-A-nephropathy patients. *Chin Med J Eng* 110: 526-529
- 15) **Chiu KC**, McCarthy JE (1997) The insertion allele at the angiotensin I-converting enzyme gene locus is associated with insulin resistance. *Metabolism* 46: 395-399
- 16) **Csikos T**, Chung O, Unger T (1998) Receptors and their classification: focus on angiotensin II and the AT2 receptor. *J Hum Hypertens* 12: 311-318
- 17) **Doi Y**, Yoshinari M, Yoshizumi H, Ibayashi S, Wakisaka M, Fujishima M (1997) Polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene in patients with thrombotic brain infarction. *Atherosclerosis* 132: 145-150
- 18) **Erdős EG**, Skidgel RA (1987) The angiotensin I-converting enzyme. *Laboratory Invest* 56: 345-348
- 19) **Fahr T** (1925) Pathologische Anatomie des Morbus Brightii. In: Lubarsch O, Hencke F (Hrsg.) *Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie*, Springer-Verlag, Berlin, S. 222-236
- 20) **Floege J**, Brunkhorst R, Gröne H-J (1995) Primäre Glomerulonephritiden. *Internist* 36: 193-206
- 21) **Fogarty DG**, Maxwell AP, Doherty CC, Hughes AE, Nevin NC (1994) ACE gene typing. *Lancet* 343: 851
- 22) **Fogo A**, Hawkins EP, Berry PL, Glick AD, Chiang ML, MacDonell RC Jr, Ichikawa I (1990) Glomerular hypertrophy in minimal change disease predicts subsequent progression to focal glomerular sclerosis. *Kidney Int* 38: 115-123

- 23) **Frishberg Y**, Becker-Cohen R, Halle D, Feigin E, Eisenstein B, Halevy R, Lotan D, Juabeh I, Ish-Shalom N, Magen D, Shvil Y, Sinai-Treiman L, Drukker A (1998) Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and the outcome of focal segmental glomerulosclerosis in children. *Kidney Int* 54: 1843-1849
- 24) **Frossard PM**, Lestringant GG, Malloy MJ, Kane JP (1999) Human renin gene BgII dimorphism associated with hypertension in two independent populations. *Clin Genet* 56: 428-433
- 25) **Grabensee B**, Bach D, Heering P (1997) Immunsuppression in der Therapie der Glomerulonephritis. *Internist* 38: 562-573
- 26) **Grupp CT**, Steffgen J, Franz HE (1992) Komplikationen der fokal segmental sklerosierenden Glomerulonephritis. *Nieren Hochdruckkrh* 21: 296-298
- 27) **Han SY**, Kwon YJ, Jo SK, Shin JH, Cha DR, Dho WY, Pyo HJ, Kim HK (2000) ACE gene polymorphism and renal responsiveness to ACE inhibitors in IgA nephropathy patients. *Korean J Intern Med* 15: 13-18
- 28) **Haas M**, Yilmaz N, Schmidt A, Neyer U, Arneitz K, Stummvoll HK, Wallner M, Auinger M, Arias I, Schneider B, Mayer G (1998) Angiotensin-converting-enzyme-gene-polymorphism determines the antiproteinuric and systemic hemodynamic effect of enalapril in patients with proteinuric renal disease. *Kidn Blood Press Res* 21: 66-69
- 29) **Harden PN**, Geddes C, Rowe PA, McHroy JH, Boulton-Jones M, Rodger RSC, Junor BJR, Briggs JD, Connell JMC, Jardine AG (1995) Polymorphisms in angiotensin-converting-enzyme gene and progression of IgA nephropathy. *Lancet* 345: 1540-1542
- 30) **Harrap SB**, Davidson HR, Connor JM, Soubrier F, Corvol P, Fraser R, Foy CJW, Watt GCM (1993) The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 21: 455-460
- 31) **Hernandez D**, Lacalzada J, Rufino M, Torres A, Martin N, Barragan A, Barrios Y, Macia M, de Bonis E, Lorenzo V, Rodriguez A, Gonzalez-Posada JM, Salido E (1997) Prediction of left ventricular mass changes after renal transplantation by polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene. *Kidney Int* 51: 1205-1211

- 32) **Hsieh MC**, Lin SR, Hsieh TJ, Hsu CH, Chen HC, Shin SJ, Tsai JH (2000) Increased frequency of angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with type 2 diabetes in taiwan. *Nephrol Dial Transplant* 5: 1008-1013
- 33) **Hunley TE**, Julian BA, Philipps JA, Summar L, Yoshida H, Horn RG, Brown NJ, Fogo A, Ichikawa I, Kon V (1996) Angiotensin converting enzyme gene polymorphism: Potential silencer motif and impact on progression in IgA nephropathy. *Kidney Int* 49: 571-577
- 34) **Ingulli E<sub>a</sub>**, Tejani A (1991) Incidence, treatment and outcome of recurrent focal segmental glomerulosclerosis posttransplantation in 42 allografts in children – a single center experience. *Transplantation* 51: 401-405
- 35) **Ingulli E<sub>b</sub>**, Tejani A (1991) Racial differences in the incidence and renal outcome of idiopathic focal segmental glomerulosclerosis in children. *Pediatr Nephrol* 5: 393-397
- 36) **Jacobsen P**, Rossing K, Rossing P, Tarnow L, Mallet C, Poirier O, Cambien F, Parving H-H (1998) Angiotensin in converting enzyme gene polymorphism and ACE inhibition in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 53: 1002-1006
- 37) **Jeffers BW**, Estacio RO, Raynolds MV, Schrier RW (1997) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus and its relationship with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 52: 473-477
- 38) **Jeunemaitre X** (1998) Genetic polymorphisms in the renin-angiotensin system. *Therapie* 53: 271-277
- 39) **Kagami S**, Border WA, Miller DE, Noble NA (1994) Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 93: 2431-2437
- 40) **Kennon B**, Petrie JR, Small M, Connell JMC (1999) Angiotensin-converting enzyme gene and diabetes mellitus. *Diab Med* 16: 448-458
- 41) **Kiema T-R**, Kauma H, Rantala AO, Liljy M, Reunanen A, Kesäniemi YA, Savolainen MJ (1996) Variation at the angiotensin-converting enzyme gene and angiotensinogen gene loci in relation to blood pressure. *Hypertension* 28: 1070-1075
- 42) **Kogawa K**, Nishizawa Y, Hosoi M, Kawagishi T, Maekawa K, Shoji T, Okuno Y, Morii H (1997) Effect of polymorphism of apolipoprotein E and angiotensin-converting enzyme genes on arterial wall thickness. *Diabetes* 46: 682-687

- 43) **Kojda G** (1997) *Pharmakologie/Toxikologie systematisch*. Uni-med, Bremen-Lorch/Württemberg, S. 588-596
- 44) **Korbet SM**, Schwartz MM, Lewis EJ (1994) Primary focal segmental glomerulosclerosis: Clinical course and response to therapy. *Am J Kidn Dis* 23: 773-783
- 45) **Kunz R**, Bork JP, Fritsche L, Ringel J, Sharma Am (1998) Association between the angiotensin-converting-enzyme-insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy: A methodologic appraisal and systematic review. *J Am Soc Nephrol* 9: 1653-1663
- 46) **Kutyryna IM**, Tareeva IE, Nosikov VV, Kamyshova ES, Gorashko NM, Chistiakov DA, Okonova EB, Troepolskaia OV (1999) Polymorphism studies of angiotensin converting enzyme gene in chronic glomerulonephritis. *Ter Arkh* 71: 30-34
- 47) **Lee DY**, Kim W, Kang SK, Koh GY, Park SK (1997) Angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism in patients with minimal-change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis. *Nephron* 77: 471-473
- 48) **Lindpaintner K**, Pfeffer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH (1995) A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 332: 706-711
- 49) **Linnemann M**, Kühl M (1995) *Biochemie für Mediziner*. 4. Aufl., Vieweg, Braunschweig-Wiesbaden, S. 519
- 50) **Mallick NP** (1991) Epidemiology and natural course of idiopathic nephrotic syndrome. *Clin Nephrol* 35: 3-7
- 51) **Maric C**, Aldred GP, Harris PJ, Alcorn D (1998) Angiotensin II inhibits growth of cultured embryonic renomedullary interstitial cells through AT2 receptor. *Kidney Int* 53: 92-99
- 52) **Marre M**, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, Dusselier L, Kahal Z, Chaillous L, Halimi X, Muller A, Sackmann H, Bauduceau B, Bled F, Passa P, Alhenc-Gelas F (1997) Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes: Genetique de la Nephropathie Diabetique (GENEDIAB) study group. *J Clin Invest* 99: 1585-1595

- 53) **Martin JK**, Hayney Ms (1999) Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism: Is there a link to nephropathy in patients with type 1 diabetes? *Ann Pharmacother* 33: 474-479
- 54) **Matthias S**, Ritz E, Waldherr R (1995) Therapie der Glomerulonephritis. *Internist* 36: 218-226
- 55) **McLaughlin KJ**, Harden PN, Uede S, Boulton-Jones JM, Connell JMC, Jardine AG (1996) The role of genetic polymorphisms of angiotensin-converting enzyme in the progression of renal diseases. *Hypertension* 28: 912-915
- 56) **Miller JA**, Scholey JW, Thai K, Pei YP (1997) Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and renal hemodynamic function in early diabetes. *Kidney Int* 51: 119-124
- 57) **Mizuri S**, Hemmi H, Inoue A, Takano M, Kadomatsu S, Tanimoto H, Tanegashima M, Hayashi I, Fushimi T, Hasegawa A (1997) Renal hemodynamic changes induced by captopril and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism. *Nephron* 75: 310-314
- 58) **Mizuno K**, Nakamaru M, Higashimori K, Inagami T (1988) Local generation and release of angiotensin II in peripheral vascular tissue. *Hypertension* 11: 223-229
- 59) **Moriyama T**, Kitamura H, Ochi S, Izumi M, Yokoyama K, Yamauchi A, Ueda N, Kamada T, Imai E (1995) Association of angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism with susceptibility to antiproteinuric effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in patients with proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 6: 1674-1678
- 60) **Murken J**, Cleve H (1988) *Humangenetik*. 4. Aufl., Enke, Stuttgart, S. 14
- 61) **Naftilan AJ**, Pratt RE, Dzau VJ (1989) Induction of platelet-derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1419-1424
- 62) **Nakai K**, Itoh C, Nakai K, Saito F, Ninomiya K, Sato M, Sudo M (1997) Angiotensin-I-converting-enzyme gene polymorphism and renal disease. *Rinsho Byori* 45: 1067-1071
- 63) **Nakauchi Y**, Suehiro T, Yamamoto M, Yasuoka N, Arii K, Kumon Y, Hamashige N, Hashimoto K (1996) Significance of angiotensin I-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 125: 161-169

- 64) **Niaudet P**, Habib R (1994) Cyclosporine in the treatment of idiopathic nephrosis. *J Am Soc Nephrol* 5: 1049-1056
- 65) **Parving HH**, Jacobsen P, Tarnow L, Rossing P, Lecerf L, Poirier O, Cambien F (1996) 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* 313: 591-594
- 66) **Pei Y**, Scholey J, Thai K, Suzuki M, Cattran D (1997) Association of angiotensin gene T235 variant with progression of immunoglobulin-A-nephropathy in caucasian patients. *J Clin Invest* 100: 814-820
- 67) **Pennisi E** (2000) Human genome. Finally, the book of life and instructions for navigating it. *Science* 288: 2304-2307
- 68) **Pérez-Oller L**, Torra R, Badenas C, Milà M, Darnell A (1999) Influence of the ACE gene polymorphism in the progression of renal failure in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Am J Kidn Dis* 34: 273-278
- 69) **Perna A**, Ruggenti P, Testa A, Spoto B, Benini R, Misefari V, Remuzzi G, Zoccali C (2000) ACE genotype and ACE inhibitors induced renoprotection in chronic proteinuric nephropathies 1. *Kidney Int* 57: 274-281
- 70) **Pinto J**, Lacerda G, Cameron JS, Turner DR, Bewick M, Ogg CS (1981) Recurrence of focal segmental glomerulosclerosis in renal allografts. *Transplantation* 32: 83-89
- 71) **Pontremoli R**, Sofia A, Tirotta A, Ravera M, Nicoletta C, Viazzi F, Bezante GP, Borgia L, Bobola N, Ravazzolo R, Sacchi G, Deferrari G (1996) The deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with target organ damage in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol* 7: 2550-2558
- 72) **Rasmussen LM**, Ledet T (1996) Aortic atherosclerosis in diabetes mellitus is associated with an insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene. No relation between the polymorphism and aortic collagen content. *Diabetologia* 39: 696-700
- 73) **Rigat B**, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F (1990) An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86: 1343-1346
- 74) **Rigat B**, Hubert C, Corvol P, Soubrier F (1992) PCR detection of the insertion

- deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucl Acids Res* 20: 1433
- 75) **Ringel J**, Beige J, Kunz R, Distler A, Sharma AM (1997) Genetic variants of the renin-angiotensin system, diabetic nephropathy and hypertension. *Diabetologia* 40: 193-199
- 76) **Rutledge DR**, Browe CS, Ross EA (1994) Frequencies of the angiotensinogen gene and angiotensin I converting enzyme (ACE) gene polymorphisms in African Americans. *Biochem Mol Biol Int* 34: 1271-1275
- 77) **Samuelsson O**, Attman PO, Larsson R, Mulec H, Rymo L, Weiss L, Ricksten A (2000) Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism in non-diabetic renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 15: 481-486
- 78) **Schmidt S<sub>a</sub>**, Schöne N, Ritz E, Diabetic Nephropathy Study Group (1995) Association of ACE gene polymorphism and diabetic nephropathy? *Kidney Int* 47: 1176-1181
- 79) **Schmidt S<sub>b</sub>**, Stier E, Hartung R, Stein G, Bahnisch J, Woodroffe AJ, Clarkson AR, Ponticelli C, Campise M, Mayer G, Ganten D, Ritz E (1995) No Association of Converting Enzyme Insertion/Deletion Polymorphism With Immunoglobulin A Glomerulonephritis. *Am J Kidn Dis* 26: 727-731
- 80) **Schmidt S**, Ritz E (1997) Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism and diabetic nephropathy in type II diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 12 Suppl 2: 37-41
- 81) **Schunkert H**, Hense H-W, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GAJ (1994) Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 330: 1634-1638
- 82) **Seikaly MG**, Arant BS, Seney FD (1990) Endogenous angiotensin concentrations in specific fluid compartments of the rat. *J Clin Invest* 86: 1352-1357
- 83) **Shanmugam V**, Sell KW, Saha BK (1993) Mistyping ACE heterozygotes. *Genome Res* 3: 120-121
- 84) **Staessen JA**, Wang JG, Ginocchio G, Petrow V, Saavedra AP, Soubrier F, Vlietinck R, Fagard R (1997) The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk. *J Hypertens* 15: 1579-1592

- 85) **Stefansson B**, Ricksten A, Rymo L, Aurell M, Herlitz H (2000) Angiotensin-converting enzyme gene I/D polymorphism in malignant hypertension. *Blood Press* 9: 104-109
- 86) **Stephanian E**, Matas AJ, Mauer SM, Chavers B, Nevins T, Kashtan C, Sutherland DE, Gores P, Najarian JS (1992) Recurrence of disease in patients retransplanted for focal segmental sclerosis. *Transplantation* 53: 755-757
- 87) **Stratta P**, Canavese C, Ciccone G, Barolo S, Dall'Omo AM, Fasano ME, Mazzola G, Berutti S, Fop F, Curtoni ES, Piccoli G (1999) Angiotensin I-converting enzyme genotype significantly affects progression of IgA glomerulonephritis in an Italian population. *Am J Kidn Dis* 33: 1071-1079
- 88) **Striegel JE**, Sibley RK, Fryd DS, Mauer SM (1986) Recurrence of focal segmental sclerosis in children following renal transplantation. *Kidney Int* 30: 44-50
- 89) **Suzuki S**, Suzuki Y, Kobayashi Y, Harada T, Kawamura T, Yoshida H, Tomino Y (2000) Insertion/deletion polymorphism in ACE gene is not associated with renal progression in Japanese patients with IgA nephropathy. *Am J Kidney Dis* 35: 896-903
- 90) **Tanaka R**, Iijima K, Murakami R, Koide M, Nakamura H, Yoshikawa N (1998) ACE gene polymorphism in childhood IgA nephropathy: Association with clinicopathologic findings. *Am J Kidney Dis* 31: 774-779
- 91) **Teranishi M**, Ono H, Ishimitsu T, Matsuoka H (1999) Insertion/deletion angiotensin converting enzyme gene polymorphism affects the microvascular structure of the kidney in patients with nondiabetic renal disease. *J Hypertens* 17: 351-356
- 92) **Ueda S**, Elliott HL, Morton JJ, Connell JMC (1995) Enhanced pressor response to angiotensin I in normotensive men with the deletion genotype (DD) for angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* 25: 1266-1269
- 93) **Ueda S**, Heeley RP, Lees KR, Elliott HL, Connell JM (1996) Mistyping of the human angiotensin-converting enzyme gene polymorphism: Frequency, causes and possible methods to avoid errors in typing. *J Mol Endocrinol* 17: 27-30
- 94) **Ueda S**, Meredith PA, Morton JJ, Connell JMC, Elliott HL (1998) ACE (I/D) genotype as a predictor of the magnitude and duration of the response to an ACE inhibitor drug (enalaprilat) in humans. *Circulation* 98: 2148-2153

- 95) **van der Kleij FG**, Navis GJ, Gansevoort RT, Heeg JE, Scheffer H, de Zeeuw D, de Jong PE (1997) ACE polymorphism does not determine short-term renal response to ACE-inhibition in proteinuric patients. *Nephrol Dial Transplant* 2: 42-46
- 96) **van Essen GG**, Rensma PL, de Zeeuw D, Sluiter WJ, Scheffer H, Apperloo AJ, de Jong PE (1996) Association between angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and failure of renoprotective therapy. *Lancet* 347: 94-95
- 97) **West MJ**, Summers KM, Burstow DJ, Wong KK, Huggard PR (1994) Renin and angiotensin-converting enzyme genotypes in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21: 207-210
- 98) **Wolf G**, Haberstroh U, Neilson EG (1992) Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. *Am J Pathol* 140: 95-107
- 99) **Yamada H**, Fabris B, Allen AM, Jackson B, Johnston CI, Mendelsohn AO (1991) Localization of angiotensin converting enzyme in rat heart. *Circ Res* 68: 141-149
- 100) **Yorioka T**, Suehiro T, Yasuoka N, Hashimoto K, Kawada M (1995) Polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and clinical aspects of IgA nephropathy. *Clin Nephrol* 44: 80-85
- 101) **Yoshida H**, Mitarai T, Kawamura T, Kitajima T, Miyazaki Y, Nagasawa R, Kawaguchi Y, Kubo H, Ichikawa I, Sakai O (1995) Role of the deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in the progression and therapeutic responsiveness of IgA nephropathy. *J Clin Invest* 96: 2162-2169
- 102) **Yoshida H<sub>a</sub>**, Kon V, Ichikawa I (1996) Polymorphisms of the renin-angiotensin system in progressive renal diseases. *Kidney Int* 50: 732-744
- 103) **Yoshida H<sub>b</sub>**, Kuriyama S, Atsumi Y, Tomonari H, Mitarai T, Hamaguchi A, Kubo H, Kawaguchi Y, Kon V, Matsuoka K, Ichikawa I, Sakai O (1996) Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 50: 657-664
- 104) **Zimmermann SW** (1984) Increased urinary protein excretion in the rat produced by serum from a patient with recurrent focal sclerosis after renal transplantation. *Clin Nephrol* 22: 32-38

# **Untersuchung zum Einfluss des ACE-Gen-Polymorphismus auf die fokal segmental sklerosierende Glomerulonephritis**

Yvonne-C. Luther

## **Abstract**

Eine mögliche Beziehung zwischen renaler Erkrankung und dem Insertions/Deletions-(I/D)-Polymorphismus des Angiotensin-Converting Enzyms (ACE) wird immer noch gegensätzlich beschrieben.

**Studienziel:** In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss des ACE-Gen-Polymorphismus bei Patienten mit dem Krankheitsbild einer fokal segmental sklerosierenden Glomerulonephritis (FSGN) analysiert.

**Methode:** Die Studie umfasste 60 Patienten mit bioptisch gesicherter FSGN und 60 gesunde Kontrollpersonen. Die Patienten wurden in Gruppe 1 (fast progressors, n=21) mit Verdoppelung des Kreatininwertes bzw. Dialysepflichtigkeit innerhalb der ersten zwei Krankheitsjahre und Gruppe 2 (slow progressors, n=39) mit benignen Verlaufsformen unterteilt. Der ACE-Gen-Polymorphismus wurde durch PCR ermittelt.

**Ergebnisse:** Es ergaben sich keine signifikanten Differenzen im ACE-Genotyp zwischen Patienten und gesunden Probanden (Pat: DD=18,3 %, ID=51,7 %, II=30,0 %; Kontrolle: DD=21,7 %, ID=56,6 %, II=21,7 %; ns). Auch zwischen Gruppe 1 und 2 konnten keine eindeutigen Einflüsse des ACE-Gens auf eine schnellere Progression der FSGN nachgewiesen werden, obwohl die Tendenz ein häufigeres Vorhandensein des DD-Gens bei den schnell terminal niereninsuffizient werdenden Patienten zeigte (Gruppe 1: DD=23,8 %, ID=52,4 %, II=23,8 %; Gruppe 2: DD=15,4 %, ID=51,3 %, II=33,3 %; ns). Es konnte eine signifikante Häufung des D-Alles bei denjenigen Patienten gefunden werden, bei denen die Diagnose vor dem 40. Lebensjahr gestellt wurde ( $p < 0,05$ ). Die Nierenüberlebensrate differierte deutlich, jedoch ohne Signifikanz: Patienten mit DD-Gen erreichten  $62,7 \pm 9,6$  Monate, Patienten mit II-Gen dagegen  $96,6 \pm 13,1$  Monate. Kreatinin, Harnstoff und Proteinurie ergaben bezüglich des ACE-Gens ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte zeigten innerhalb der Genotyp-Gruppen gleichfalls keine großen Abweichungen.

**Schlussfolgerungen:** Der ACE-Gen-Polymorphismus beeinflusst signifikant das Manifestationsalter, nicht aber die Entstehung und die Progression der FSGN.

Gez.: Prof. Dr. med. P. Heering

## **8. Anhang**

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, Yvonne-Christin Luther, an Eidesstatt, dass ich die vorliegende Arbeit allein und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Alle Angaben sind wahrheitsgetreu wiedergegeben, die Daten wurden korrekt erhoben.

Diese Arbeit ist bisher weder als Ganzes noch auszugsweise an dieser oder einer anderen Universität zur Promotion eingereicht worden. Sie wurde im November 1997 begonnen und im Januar 2001 abgeschlossen, konnte aber erst nach Abschluss meines vollständigen Studiums im Mai 2002 eingereicht werden.

## **Danksagung**

Für die Überlassung des Themas, seine große Unterstützung und den immer währenden Optimismus danke ich ganz besonders meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. P. Heering. Er widmete sich stets verständnisvoll meinen Problemen bei der Durchführung der Studie und der Anfertigung der Dissertation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. B. Grabensee für die Möglichkeit, diese Dissertation in seiner Klinik anfertigen zu können.

Für die Unterstützung beim Aufbau der ACE-Gen-Polymorphismus-Methode möchte ich Frau Dr. rer. nat. K. Fehsel und Frau Prof. Dr. rer. nat. V. Kolb-Bachhofen danken. Außerdem bin ich Frau Nicola Klein-Vehne, medizinisch-technische Laborassistentin, zu Dank verpflichtet, ohne deren Anleitung und Geduld diese Arbeit wahrscheinlich niemals fertig geworden wäre.

Ebenfalls möchte ich Herrn Oberarzt Dr. med. R. Hetzel und Herrn Dr. med. F. Özcan danken, die mir in der Ambulanz bei der Untersuchung der Patienten stets zur Seite standen.

Frau Priv.-Doz. Dr. med. K. Ivens verdanke ich die statistische Beratung und konstruktive Kritik an dieser Arbeit.

Desweiteren danke ich dem Transplantationszentrum Düsseldorf und den folgenden Nephrologischen Praxen in Düsseldorf und Umgebung für ihre kooperative Hilfe bei der Evaluierung der Patienten: Prof. Dr. Bach (Klinik f. Nephrologie, Klinikum Krefeld), Praxis Dr. Dreyling (Wuppertal), Praxis Dr. Gäckler (Bochum), Fr. Dr. Heinig (Kuratorium für Heimdialyse Düsseldorf), Praxis Dr. Jennessen (Mönchengladbach), Praxis Dr. Messner (Wuppertal), Praxis Dr. Saueressig (Wuppertal), Praxis Dr. Westhoff, Dr. van Endert (Düsseldorf).

# Curriculum vitae

Yvonne-Christin Luther,  
geboren am 15. Juli 1975 in Berlin

Mutter: Dr. med. Barbara Luther, geb. Otto (niedergelassene Zahnärztin in Berlin)

Vater: Prof. Dr. med. Dr. phil. Bernd Luther (Gefäßchirurg an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)

1982 - 1984	Grundschule Bertolt-Brecht (Berlin)
1984 - 1989	Johann-Gottfried-Herder-Oberschule (Berlin)
1989 - 1995	Hildegard-Wegscheider-Oberschule (Berlin)
1995	Abitur
1995	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
1997	Ärztliche Vorprüfung an der Freien Universität Berlin
1997	Fortsetzung des Studiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
1998	1. Staatsexamen
1999	„Erasmus“-Austauschsemester an der „Università di Verona“, Italien
1999	Famulatur im „Department of Surgery“ des Derriford Hospitals in Plymouth, Großbritannien
2001	2. Staatsexamen
2001	Fortsetzung des Studiums (Praktisches Jahr) an der Humboldt Universität zu Berlin
2002	3. Staatsexamen