

*Genpolymorphismen und 24 Stunden-Blutdruckprofile
im Zeitverlauf bei Kindern und Jugendlichen
mit Diabetes mellitus Typ 1*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Vera A. Dickgießer aus Kaiserslautern
Gießen 2009

Aus dem Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin

Abt. Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Klaus-Peter Zimmer

Gutachter: Prof. Dr. med. Joachim Kreuder

Gutachter: Prof. Dr. med. Clemens Jaeger

Tag der Disputation: 14.07.2009

Gedanken-Augenblicke

Sie werden uns immer an Dich erinnern

Und uns glücklich und traurig machen

Und uns Dich nie vergessen lassen

Meinem geliebten Opa

Dr. Ferdinand Schneckenburger

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	4
2. Abkürzungsverzeichnis	7
3. Einleitung	8
3.1. Einführung	8
3.2. Der Hyperglykämische Stoffwechsel	8
3.3. Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus	12
3.3.1. Diabetische Nephropathie	12
3.3.2. Diabetische Neuropathie	21
3.3.3. Diabetische Retinopathie	22
3.3.4. Kardiovaskuläre Erkrankungen	23
3.4. Hypertonie und Diabetes	25
3.5. Fragestellung	31
4. Patienten und Methoden	32
4.1. Patienten	32
4.1.1. Patientenkollektiv	32
4.1.2. Kontrollkollektiv	32
4.2. Blutdruckmessung	32
4.3. Klinisch-chemische Analyse	35
4.4. Extraktion der DNA	36
4.4.1. Isolierung der DNA	36
4.4.2. Photometrische Quantifizierung der DNA	37
4.4.3. Lagerung der DNA	38
4.5. Polymerasekettenreaktion	38
4.5.1. Primer	40
4.5.2. Reagenzien	40
4.5.3. Durchführung der PCR	41
4.5.4. Kontrollen	42
4.6. Gelelektrophorese	42
4.6.1. Bestandteile des Gels	43
4.6.2. Herstellung des Gels	44
4.6.3. Beschickung des Gels	45
4.6.4. Färbung und Fotografie des Gels	46

4.6.5. Auswertung	46
4.7. Restriktionsenzymverdau	48
4.7.1. Reagenzien	50
4.7.2. Reinigung des PCR-Produkts	50
4.7.3. Restriktionsenzymverdau	51
4.7.4. Gelelektrophorese	52
4.7.5. Auswertung	52
4.8. Statistische Auswertung	54
5. Ergebnisse	55
5.1. Patienten-Charakteristika	55
5.2. Globale Blutdruckanalyse	55
5.2.1. Qualitative Analyse	55
5.2.2. Quantitative Analyse	57
5.3. Verteilung der Genotypen- und Allelfrequenzen	58
5.4. Einfluss der Gen-Polymorphismen auf die Entwicklung des Blutdrucks	59
5.4.1. Qualitative Analyse	59
5.4.2. Quantitative Analyse	59
5.4.2.1. ACE	59
5.4.2.2. AGT	61
5.4.2.3. ATR1	62
5.4.2.4. Aldo-S	63
5.4.2.5. End1	64
5.5. Logistische Regressionsanalyse	65
5.5.1. AGT	66
5.5.2. Aldo-S	66
5.5.3. End1	66
6. Diskussion	67
6.1. Verteilung der Genotypen- und Allelfrequenzen	67
6.2. Globale Entwicklung des Blutdrucks	67
6.3. Entwicklung des Blutdrucks unter Beeinflussung der Polymorphismen	70
6.3.1. ACE	70
6.3.2. AGT	73
6.3.3. ATR1	76
6.3.4. Aldo-S	79
6.3.5. End1	84

Inhaltsverzeichnis	6
6.4. Limitationen	86
6.5. Ausblick	87
7. Zusammenfassung	88
8. Summary	90
9. Literaturverzeichnis	92
10. Abbildungsverzeichnis	101
11. Tabellenverzeichnis	102
12. Tabellen	103
13. Danksagung	120
14. Erklärung	121

2. Abkürzungsverzeichnis

ABPM	-	24 h-Blutdruckmessung (ambulant blood pressure monitoring)
ACE	-	Angiotensin-Converting-Enzyme
AGE	-	Advanced glycation end products oder advanced glycosylation end products
AGT	-	Angiotensinogen
Ang II	-	Angiotensin II
Aldo-S	-	Aldosteron-Synthetase (CYP11B2)
ATR1, ATR2	-	Angiotensin Rezeptor Typ 1, Typ 2
BP	-	Blood Pressure
DAG	-	Diacylglycerol
DBP	-	Diastolischer Blutdruck
Dip	-	Dipping
ECM	-	Extrazelluläre Matrix
ECTIM Studie	-	Etude Cas-Témoin sur l'infarctus du Myocarde Studie
End1	-	Endothelin 1
GBM	-	Glomeruläre Basalmembran
GHSS	-	Glasgow Heart Scan Studie
KHK	-	Koronare Herzerkrankung
NO	-	Stickoxid
SBP	-	Systolischer Blutdruck
TGF- β	-	Transforming-Growth-Factor- β
PAI-1	-	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
pAVK	-	Periphere Arterielle Verschlusskrankheit
PCR	-	Polymerase-Chain-Reaction
PKC	-	Proteinkinase C
RAAS	-	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RFLP	-	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
ROS	-	Sauerstoffradikale (reactive oxygen species)
TBM	-	Tubuläre Basalmembran
UDP-GlcNAc	-	UDP-N-Acetyl-Glukosamin
VCAM	-	vascular cell adhesion molecule
VEGF	-	vascular endothelial growth factor

3. Einleitung

3.1. Einführung

Der Diabetes mellitus Typ I ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die sich überwiegend bei Kindern und Jugendlichen manifestiert und durch eine Störung der Regulation des Blut-Glukosestoffwechsels charakterisiert ist. Der entscheidende ätiologische Faktor dieser diabetischen Erkrankung ist eine autoimmun bedingte Zerstörung der Inselzellen des Pankreas, die die körpereigene Insulinsynthese bei erhaltener Glukagonsekretion beeinträchtigt. Dadurch wird die Metabolisierung zum einen der Kohlenhydrate und zum anderen der Fette sowie der Eiweiße gestört. Dies führt neben einer Erhöhung des Blutzuckers, teilweise weit über den Normbereich hinaus, zu einer Ausscheidung von Glukose im Harn, sowie zu einer überwiegend katabolen Stoffwechseleinstellung (Hürter und Danne 2005).

Der Diabetes mellitus Typ 1 ist mit einer Reihe von Folgeerkrankungen verknüpft, die vordergründig aus den Veränderungen des Stoffwechsels resultieren.

3.2. Der Hyperglykämische Stoffwechsel

Eine sehr wichtige Ursache für die Folgeerkrankungen des Diabetes ist die chronische Hyperglykämie. Sie bedingt eine komplexe Kaskade an Störungsmechanismen, die zu einer Schädigung des Organismus und somit zu den typischen Komplikationen der diabetischen Erkrankung führen. Aufgrund ihrer zentralen Bedeutung sollen im Folgenden die biochemischen Veränderungen einer hyperglykämischen Stoffwechsellage genauer betrachtet werden.

3.2.1. Biochemische Störungen

Wie von Brownlee (Brownlee 2001) beschrieben, kommt es während einer Hyperglykämie zu mannigfaltigen biochemischer Störungen, die eine Reihe von Schädigungen induzieren. Zu den entscheidenden biochemischen Veränderungen zählen:

- Aktivierung des Polyol-Weges
- Bildung von AGE's (advanced glycation end products)
- Aktivierung der Proteinkinase C
- Vermehrte Synthese von Hexosaminen

Ursächlich für diese biochemischen Veränderungen ist die Bildung von Superoxiden im hyperglykämischen Milieu. Superoxide entstehen durch zusätzliche Aufnahme eines Elektrons durch ein Sauerstoffmolekül (O_2), woraus die Bildung einer sehr reaktiven Verbindung (O_2^-) resultiert. Während einer Hyperglykämie steigt durch eine übermäßige Produktion von Elektronendonatoren im Citratzyklus der Protonengradient über der inneren Mitochondrienmembran an. Dies hat eine Inhibition des Elektronentransports zur Folge. Aus den freien Elektronen werden in den Endothelzellen Superoxide gebildet. Diese Superoxide führen zu einer Hemmung der 3-Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase. Diese ist ein Enzym der Glykolyse, was unter physiologischen Bedingungen die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat in 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert. Ihre Hemmung führt zur Anreicherung von Glucose und Zwischenprodukten der Glykolyse. Von diesen wird unter hyperglykämischen Bedingungen ein mitunter sehr großer Anteil verschiedenen Stoffwechselprozessen zugeführt, die unter einer Hyperglykämie gesteigert ablaufen. Von großer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang die Anreicherung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Dieses wird zum einen der Bildung von AGE und zum anderen der Aktivierung der Proteinkinase C zugeführt. Ein weiteres Zwischenprodukt der Glykolyse, Fruktose-6-Phosphat, wird zur Synthese von Hexosaminen wie UDP-N-Acetyl-Glucosamin (UDP-GlcNAc), verwendet. Die angereicherte Glukose wird im Polyol-Weg verstoffwechselt. Abbildung 3-1 (Brownlee 2001) soll die Veränderungen des Stoffwechsels noch einmal veranschaulichen.

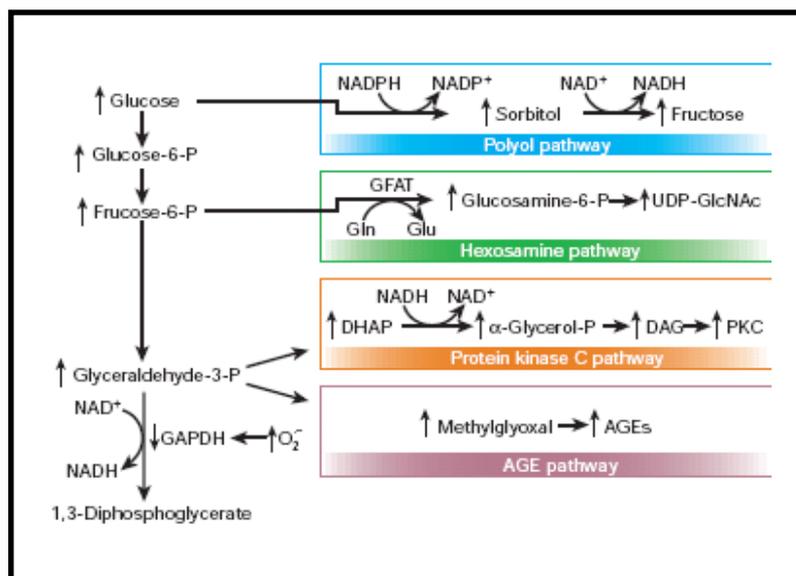


Abbildung 3-1: Pathophysiologie der hyperglykämie-induzierten Stoffwechseländerungen
(Brownlee 2001)

Aktivierung des Polyol-Weges

Unter einer hyperglykämischen Stoffwechsellage wird intrazelluläre Glukose vermehrt durch das Enzym Aldose-Reduktase zu Sorbitol reduziert. In einem zweiten Schritt wird das Sorbitol unter der Bildung von NADH zu Fruktose oxidiert (siehe Abbildung 3-1). Durch die Aldose-Reduktase-Reaktion wird NADPH verbraucht, welches dadurch der Glutathion-Reduktase nicht mehr zur Verfügung steht. Dies hat zur Folge, dass oxidiertes Glutathion nicht mehr reduziert werden kann und nicht zum Schutz der Zelle vor oxidativen Reaktionen zur Verfügung steht. Der unter diesen Bedingungen entstehende oxidativem Stress führt zu einer Schädigung der Zelle.

Bildung von advanced glycation end products (AGE)

Bezüglich der AGE-Entstehung werden oxidative und nicht-oxidative Umlagerungsprozesse unterschieden. Nicht-oxidativ entsteht aus einem hochreaktiven Dicarbonyl (3-deoxy-Glucoson) unter Bildung einer Hydroimidazol-Verbindung mit Arginin das AGE Pyrralin. Auch die Bildung von Methylglyoxal verläuft unter Fragmentierung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat nicht oxidativ.

Durch Autooxidation von Glukose und anschließende Reaktion mit einem Protein entsteht das AGE Glyoxal (Bretzel 2000).

Die pathophysiologischen Konsequenzen der AGE-Bildung umfassen im Wesentlichen drei Aspekte:

- Intrazelluläre AGE verändern direkt zelluläre Proteinfunktionen
- Extrazelluläre AGE-modifizierte Matrixkomponenten zeigen eine gestörte Interaktion mit anderen Matrixkomponenten und Matrix-Rezeptoren (Integrine).
- AGE-modifizierte Plasma-Proteine induzieren durch eine Anbindung an AGE-Rezeptoren an Endothelzellen, Makrophagen und Zellen des Mesangiums eine Bildung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, woraus eine verstärkte Genexpression proinflammatorischer Proteine resultiert.

In Endothelzellen führt die AGE-Modifikation zu einer vermehrten Expression des Fibroblast-Growth-Faktors, welches eine gesteigerte Synthese von Bindegewebe zur Folge hat. Weiterhin hat die Bildung der AGE Auswirkungen auf einige Bestandteile der extrazellulären Matrix: Die Moleküle des Kollagen I werden durch den Einfluss der AGE pathologisch quervernetzt, woraus eine Elastizitätsabnahme der Gefäße resultiert.

Die AGE haben des Weiteren einen störenden Einfluss auf die Integrität der Basalmembran: Zum einen werden die Moleküle des Kollagens IV an ihrer physiologischen Quervernetzung gehindert, zum anderen wird die Polymerbildung des Laminins, als auch dessen Bindung an

Proteoglykane und am Kollagen IV, gehemmt. Auch die endotheliale Anheftung an der Basalmembran wird gestört.

Die Bindung der AGE an membranständige Rezeptoren auf den Makrophagen, Endothelzellen und Mesangiumzellen bewirkt eine gesteigerte Synthese von Wachstumsfaktoren, prokoagulatorischen und proinflammatorischen Molekülen und eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. VCAM) an den Endothelzellen, sowie eine Steigerung der Kapillarpermeabilität.

Aus diesen Zusammenhängen wird deutlich, dass die Bildung der AGE eine starke Schädigung des Gefäßsystems bedeutet.

Aktivierung der Proteinkinase C

Die Proteinkinase C existiert in 11 Isoformen, von denen 9 durch Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden. Im hyperglykämischen Milieu wird DAG vermehrt synthetisiert, woraus eine Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) resultiert. Die daraus für den Organismus resultierenden Folgen sind in Abbildung 3-2 veranschaulichend dargestellt.

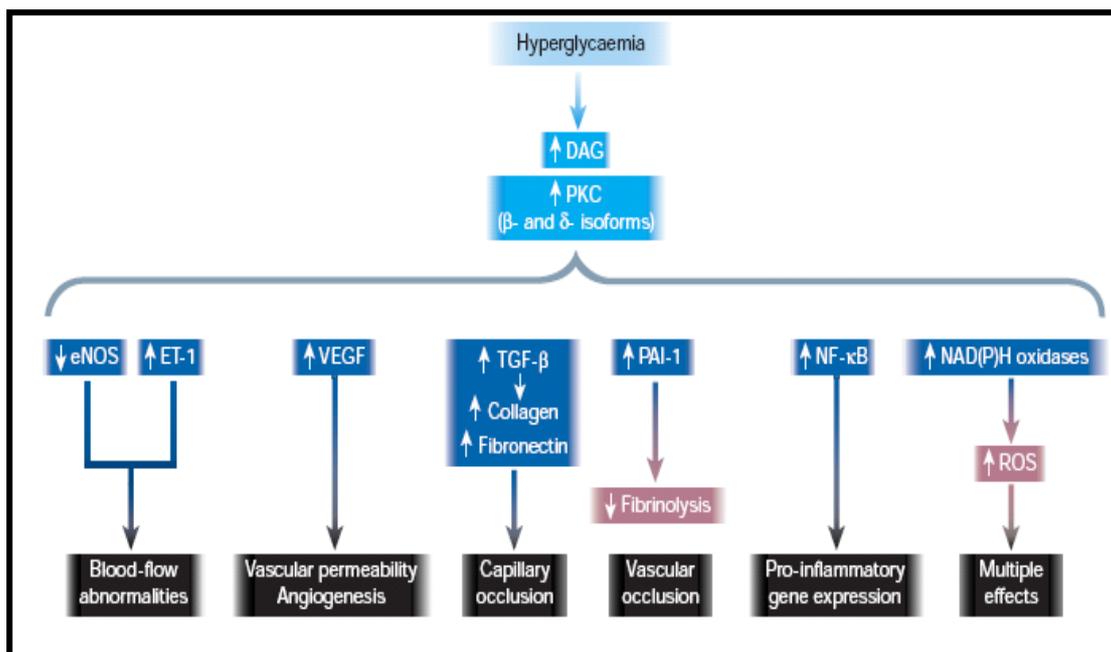


Abbildung 3-2: Pathophysiologische Folgen der Hyperglykämie-induzierten Aktivierung der PKC (Brownlee 2001)

Die PKC-Aktivierung hat mannigfaltige schädigende Einflüsse auf das Gefäßsystem: Aus der verminderten NO- und gleichzeitig erhöhten Endothelin-Synthese resultiert eine vermehrte Gefäß-Konstriktion. Die vermehrte Expression von VEGF (vascular endothelial growth factor) führt zu einer Hyperpermeabilität der Gefäße und Steigerung der Angiogenese. Durch die gesteigerte Bildung von TGF-β (transforming-growth-factor) und PAI-1 (Plasminogen-

Aktivator-Inhibitor) wird eine Okklusion der Kapillaren und der größeren Gefäße begünstigt, während der Transkriptionsfaktor NF- κ B die Expression proinflammatorischer Enzyme steigert.

Durch die Aktivierung der PKC werden ferner reaktive Superoxide, deren schädigender Einfluss bereits beschrieben wurde, gebildet.

Gesteigerte Synthese von Hexosaminen

Das in der Glykolyse nicht verstoffwechselte Fruktose-6-Phosphat wird, während hyperglykämischer Phasen, vermehrt für die Synthese des Hexosamins UDP-N-Acetyl-Glukosamin (UDP-GlcNAc) verwendet. UDP-GlcNAc glykosyliert den Transkriptionsfaktor Sp1, wodurch PAI-1 und TGF- β_1 vermehrt exprimiert werden. PAI-1 bedingt eine Hemmung des Fibrinolyse systems, während TGF- β_1 zu einer gesteigerten Synthese von Fibronectin und Kollagen führt.

3.3. Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus

Die Folgeerkrankungen des Diabetes mellitus lassen sich in die diabetischen Mikro- und Makroangiopathien untergliedern (Lichtenauer, Seissler et al. 2003):

- Die mikroangiopathischen Folgeschäden manifestieren sich in der diabetischen Retino-, Nephro- und Neuropathie.
- Die Makroangiopathie manifestiert sich überwiegend in Form kardiovaskulärer Erkrankungen als koronare Herzerkrankung, periphere arterielle Verschlusskrankheit und als zerebrale ischämische Durchblutungsstörung (Lichtenauer, Seissler et al. 2003).

Auf die einzelnen Komplikationen des Diabetes soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

3.3.1. Diabetische Nephropathie

Die Pathophysiologie der Nephropathie ist sehr vielfältig. Sie beruht schwerpunktmäßig auf folgenden Initiationsfaktoren :

- Hyperglykämie (Meguid El Nahas und Bello 2005)
- Aktivierung des Sympathikus (Neumann, Ligtenberg et al. 2004)
- Aktivierung des RAAS (Carey und Siragy 2003; Hollenberg 2004)
- Hypertension (Soergel und Schaefer 2002; Meguid El Nahas und Bello 2005)

Initial ist die diabetische Nephropathie charakterisiert durch eine Hypertrophie der glomerulären und tubulären Epithelzellen und eine zunehmende Verdickung der Basalmembran. Dies äußert sich in einer Hyperfiltration, welche zu einer Mikroalbuminurie führt. Die pathologischen Veränderungen führen zu einer Glomerulosklerose, die gekennzeichnet ist durch eine übermäßige Akkumulation der extrazellulären Matrix im glomerulären Mesangium. Mit zunehmender Schädigung der Niere entwickelt sich die tubulointerstitielle Fibrose, die bei Fortdauer der schädigenden Einflüsse, zum chronischen Nierenversagen führt (Carey und Siragy 2003).

Entstehung der Glomerulosklerose

Den Ausgangspunkt für die Pathogenese der Glomerulosklerose stellen inflammatorische Reize, die eine Schädigung und Dysfunktion der glomerulären Endothelzellen induzieren, dar. Dies führt zu einer Einwanderung von Leukozyten in die Glomeruli die dort mit den mesangialen Zellen interagieren (Meguid El Nahas und Bello 2005). Die daraus resultierende Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bewirkt eine Aktivierung, Proliferation und Dysfunktion der mesangialen Zellen. Die Folge davon ist, vorzugsweise unter der Wirkung von TGF β 1, eine Umwandlung der mesangialen Zelle in Mesangioblasten, die durch die massive Synthese von extrazellulärer Matrix, eine Glomerulosklerose induzieren (Meguid El Nahas und Bello 2005).

In der Pathogenese der Glomerulosklerose nimmt auch die Schädigung der Podozyten eine zentrale Rolle ein: Die Dehnung der Podozyten und die daraus resultierende Freilegung der glomerulären Basalmembran führen zu einer Adhäsion an der Bowmannschen Kapsel und bedingen eine Schädigung des Glomerulums (Meguid El Nahas und Bello 2005). Die genannten pathologischen Veränderungen im Glomerulum sind in Abbildung 3-3 noch einmal zusammengefasst dargestellt.

Nach langer Krankheitsdauer entsteht als Folge der abgelaufenen pathologischen Prozesse in den Glomeruli eine diffuse, noduläre Glomerulosklerose Kimmelstiel-Wilson.

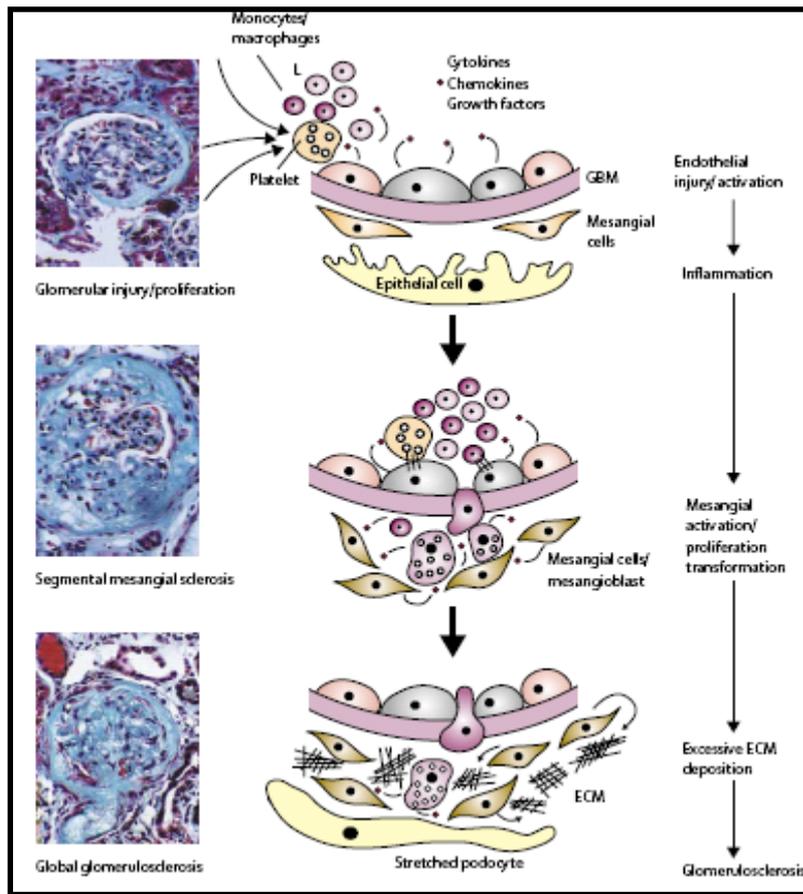


Abbildung 3-3: *Pathophysiologie der Glomerulosklerose*
(Meguid El Nahas und Bello 2005)

Tubulointerstitielle Fibrose

Tubulointerstitielle Vernarbungen und Fibrosierungen sind assoziiert mit einer Störung der physiologischen Nierenfunktion. Die tubulointerstitielle Fibrose beinhaltet, wie die Glomerulosklerose, eine pathophysiologische Kaskade bestehend aus Inflammation, Proliferation, Apoptose und Fibrose (siehe Abbildung 3-4).

Ein entscheidender auslösender Faktor für die tubulointerstitielle Inflammation ist die erhöhte Reabsorption von Albumin, welches zu einer gesteigerten Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren führt. Die Mediatoren bewirken eine Einwanderung von Leukozyten, die durch die Synthese von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (TGF β) zu einer Proliferation und Aktivierung der renalen Fibro- und Myoblasten führen. Diese synthetisieren in gesteigertem Maße extrazelluläre Matrix und bedingen so eine zunehmende Fibrosierung (Meguid El Nahas und Bello 2005).

Einen weiteren Punkt in der Pathogenese der tubulointerstitiellen Fibrose stellt die gesteigerte Apoptose der Tubuluszellen und die daraus resultierende tubuläre Atrophie dar (Meguid El

Nahas und Bello 2005). Die genannten Prozesse sind im Folgenden in Abbildung 3-4 noch einmal zusammengefasst dargestellt.

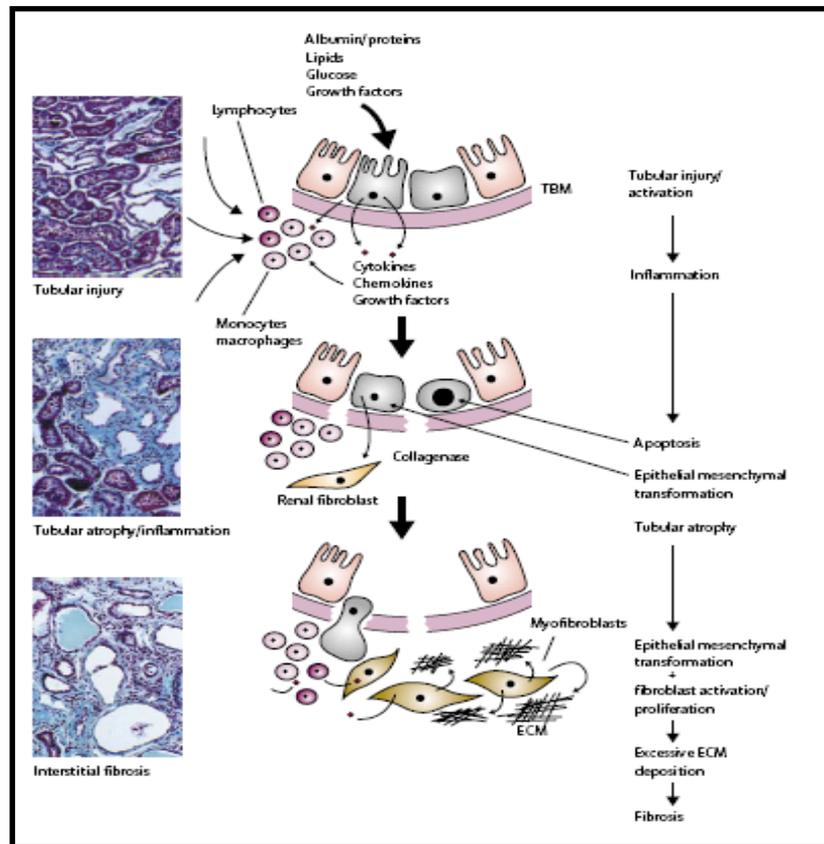


Abbildung 3-4: Pathophysiologie der tubulointerstitiellen Fibrose
(Meguid El Nahas und Bello 2005)

Die Summe dieser Pathomechanismen führt so zu einer irreversiblen Fibrosierung des tubulointerstitiellen Kompartiments der Niere und bedingt eine zunehmende Einschränkung ihrer Funktionalität.

Initiationsfaktoren der Nephropathie

Entscheidende Initiationsfaktoren der Nephropathie sind die arterielle Hypertension (Soergel und Schaefer 2002) und die Hyperglykämie (Meguid El Nahas und Bello 2005). Letztere stimuliert durch Aktivierung der Proteinkinase C, des Polyol-Weges und der AGE die Synthese von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie TGF β . In Folge dessen werden die glomerulären, tubulären, vaskulären und interstitiellen Zellen geschädigt, was entscheidend die Pathomechanismen der Glomerulosklerose und der tubulointerstitiellen Sklerose fördert (Carey und Siragy 2003). Des Weiteren bedingt eine hohe Plasmaglukose die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), wobei für die diabetische Nephropathie das

renale RAAS von großer Bedeutung ist. Das systemische RAAS spielt nur eine untergeordnete Rolle (Carey und Siragy 2003).

Das RAAS

Die klassische Kaskade des RAAS beginnt mit der Synthese von Renin durch die juxtaglomerulären Zellen, welches aus Angiotensinogen Angiotensin I (Ang I) freisetzt. Dieses wird durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in Angiotensin II (Ang II) convertiert. Zudem bewirkt ACE den Abbau des vasodilatatorisch wirkenden Bradykinins. Angiotensin II, eines der Haupteffektor-Enzyme des RAAS, bewirkt in einem letzten Schritt der Kaskade die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde.

Renin

Renin ist eine Protease, welche als Prorenin in den juxtaglomerulären Zellen vorliegt und in seiner aktiven Form das in der Leber synthetisierte Angiotensinogen in Angiotensin I umsetzt. Im hyperglykämischen Stoffwechsel wird Renin vermehrt freigesetzt (Carey und Siragy 2003). Die Nebenwirkungen des Renins führen zu einer zunehmenden Schädigung der Niere. Die Bindung des Renins an die mesangialen Zellen bedingt eine Zell-Hypertrophie und eine Aktivierung des PAI-1 (Carey und Siragy 2003). PAI-1 ist ein Inhibitor des Fibrinolyse-Systems, welcher bei hohem Plasmaspiegel eine Schädigung der Niere, vordergründig durch eine Fibrose, bedingt: Durch die Aktivierung von Wachstumsfaktoren und die Steigerung der Syntheserate der extrazellulären Matrix führt PAI-1 sowohl zu einer glomerulären, als auch zu einer tubulointerstitiellen Fibrose (Hollenberg 2004).

Angiotensin II

Physiologisch wirkt Angiotensin II über den Angiotensin-Rezeptor-Typ 1 (ATR1) vasokonstriktorisch auf die afferenten, die glomerulären und efferenten Arteriolen der Niere. Angiotensin II bewirkt außerdem eine Kontraktion der mesangialen Zellen, woraus eine Reduktion des renalen Blutflusses, der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und somit des Natriumverlusts resultiert. Daneben vermindert Ang II den medullären Blutdurchfluss und stimuliert die aktive Natrium-Reabsorption. Die Synthese von Ang II bewirkt zudem eine Stimulation der Aldosteron-Freisetzung, eine Synthese von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie TGF β . Ferner stimuliert es den Sympathikus.

Damit erhöht Ang II den Blutdruck in der Niere (Ang-II-Wirkung), sowie peripher (durch die Aktivierung des Sympathikus), und initiiert eine Verminderung der GFR, eine Steigerung der

Natrium-Resorption und eine Freisetzung von Wachstumshormonen und Aldosteron (Carey und Siragy 2003).

Während einer Hyperglykämie wird vermehrt Angiotensinogen synthetisiert, welches zu Ang II convertiert wird. Die daraus resultierenden Schädigungen der Niere sind vielfältig. So bedingt Ang II direkt oder indirekt, durch die Förderung der Synthese von Wachstumsfaktoren, die Bildung von extrazellulärer Matrix. Dies stellt einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese der glomerulo- und tubulointerstitiellen Fibrose dar. Durch die Erhöhung des glomerulären Kapillardrucks und der daraus folgenden Schädigungen des Endothels, sowie durch die Steigerung der glomerulären Permeabilität wird die Fibrosierung zusätzlich forciert. Auch die Erhöhung des systemischen Drucks durch die Sympathikus-Aktivierung und die Flüssigkeitsretention verursachen eine zunehmende Schädigung der Niere. Aus der Verminderung der Kontraktionsfläche, bedingt durch eine von Ang II induzierte mesangiale Kontraktion, resultiert eine zusätzliche Verminderung der Flüssigkeitsausscheidung. Eine weitere Schädigung der Niere bewirkt Ang II durch die Induktion der Entstehung von reaktiven Superoxiden (Carey und Siragy 2003). Durch Peroxidation der Membranlipide und Denaturierung von Proteinen, sowie der Aktivierung des RAAS verursachen diese eine Progression der Nephropathie, die nicht zuletzt durch die von Ang II stimulierte Aldosteron-Freisetzung beeinflusst wird.

Aldosteron

Aldosteron ist ein Mineralcorticoid, welches hauptsächlich in der Nebennierenrinde synthetisiert wird. Seine Funktion im Salz- und Wasserhaushalt besteht in einer Förderung der Natrium-Resorption und der damit verbundenen Antidiurese, sowie der Kaliumausscheidung. Die gesteigerte Ang-II-Synthese verursacht eine vermehrte Aldosteron-Freisetzung und eine Aktivierung von PAI-1, TGF- β sowie eine vermehrte Bildung reaktiver Superoxide. Dies bedingt neben der Einschränkung des fibrinolytischen Systems, eine zunehmende Zellschädigung und Einwirkung inflammatorischer Reize auf die renalen Zellen und eine vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix. Letztendlich bedeutet dies eine Forcierung der glomerulären und tubulointerstitiellen Fibrose. Auch eine Dysfunktion des Gefäßendothels und der glatten Muskelzellen wird durch den erhöhten Aldosteron-Spiegel induziert. Die endotheliale Dysfunktion beinhaltet eine Reduktion der Vasodilatation, als auch prothrombotische Eigenschaften des Gefäßendothels unter gleichzeitiger Einwirkung inflammatorische Reize auf das Endothel (Endemann und Schiffrin 2004). Aldosteron führt durch Hemmung der NO- und Förderung der Endothelinfreisetzung zu einer verstärkten Vasokonstriktion und durch die erhöhten PAI-1-, TGF- β - und Superoxid-Level im Blut zu

inflammatorischen Reizeinwirkungen auf das Endothel. Die endotheliale Dysfunktion bedeutet damit zum einen eine Erhöhung des Blutdrucks, zum anderen spielt sie, durch die Änderung der Permeabilität der glomerulären Basalmembran, eine Rolle in der Entstehung der Mikroalbuminurie (Hollenberg 2004).

Die vermehrte Aldosteron-Freisetzung verstärkt durch eine Hoch-Regulation der Rezeptoren den vasokonstriktorischen Effekt von Ang II. Eine vaskuläre Hyperreaktivität auf Mineralkortikoide wird des Weiteren durch den vermehrten Einbau von Natrium-Kanälen in die Membran der glatten Gefäßmuskeln durch Aldosteron induziert. Zusammenfassend führen diese pathophysiologischen Prozesse zu einer Hypertrophie und Dysfunktion der glatten Muskelzellen (Hollenberg 2004).

Die komplette Pathophysiologie der hyperglykämie-induzierten RAAS-Aktivierung sei im Folgenden in der Abbildung 3-5 noch einmal veranschaulicht dargestellt

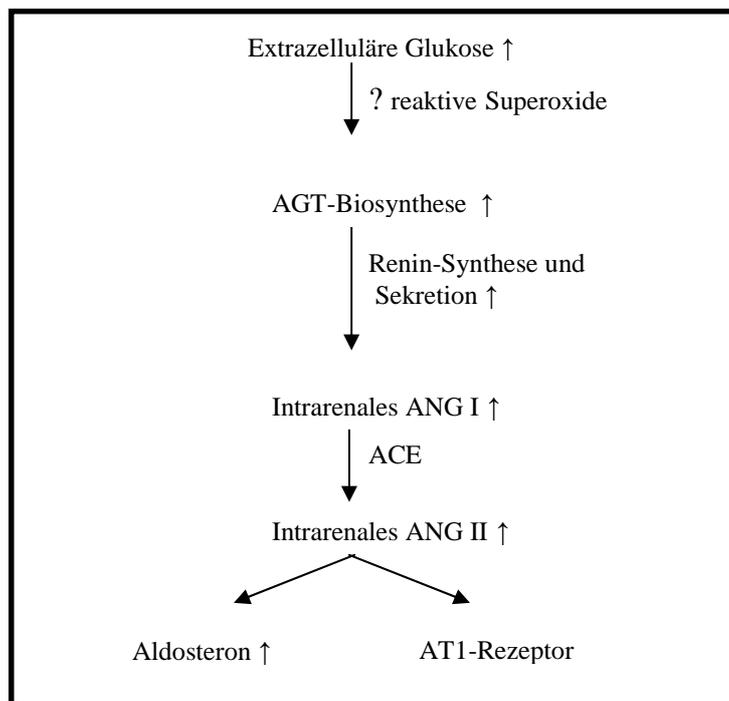


Abbildung 3-5: Die hyperglykämie-induzierte RAAS-Aktivierung
(Carey und Siragy 2003)

Der Sympathikus

Die renale Ischämie initiiert eine Aktivierung afferenter renaler Nerven (Neumann, Ligtenberg et al. 2004) und führt somit, wie auch das vermehrt gebildete Ang II, zu einer Aktivierung des Sympathikus. Die Wirkung des Sympathikus kann durch eine eventuell vorliegende diabetische Neuropathie mit Schädigung des Parasympathikus verstärkt werden: Aus der Abschwächung des Parasympathikus resultiert eine relative Dominanz des Sympathikus. Die Hyperaktivität des Sympathikus führt durch eine Erhöhung des peripheren

und des renalen Blutdrucks, zu einer Schädigung des Endothels und Parenchyms. Die gesteigerte Katecholamin-Ausschüttung führt zu einer Aktivierung des Sympathikus. Aus dieser Aktivierung resultieren, vermittelt über β -Adrenorezeptoren, proliferative Effekte und infolgedessen eine renale Schädigung. Zusätzlich wird die Funktion der Podozyten gestört, was zu einer Beeinträchtigung der glomerulären Funktion führt (Neumann, Ligtenberg et al. 2004).

Hypertonie

Die arterielle Hypertonie stellt einen entscheidenden Risikofaktor in der Pathogenese der Nephropathie dar: Vorgeschädigte Nieren reagieren aufgrund einer gestörten arteriolären Autoregulation empfindlicher auf eine systolische Blutdruckerhöhung als gesunde Nieren und haben somit nicht mehr die Möglichkeit eine Hypertonie durch Gegenregulation der afferenten Arteriole zu kompensieren. Die dadurch entstehende intraglomeruläre Hypertension führt zu einer Proteinurie, die wiederum eine RAAS-Aktivierung initiiert; deren Folgen wurden bereits beschrieben. In diesem Zusammenhang ist die vasokonstriktorische Wirkung des, durch die Aktivierung des RAAS freigesetzten, Ang II hervorzuheben, da dieses eine zusätzliche intraglomeruläre Druckerhöhung bedingt. Speziell bei Kindern führt schon eine geringe Erhöhung des arteriellen Blutdrucks zu einer Proteinurie und damit zu einer Progression der Nephropathie. Vor allem eine nächtliche Blutdruckerhöhung stellt einen Risikofaktor für eine rapide Progression der pathologischen renalen Veränderungen dar (Soergel und Schaefer 2002). Die Auswirkungen einer arteriellen Blutdruckerhöhung sind im Folgenden in Abbildung 3-6 noch einmal veranschaulichend dargestellt.

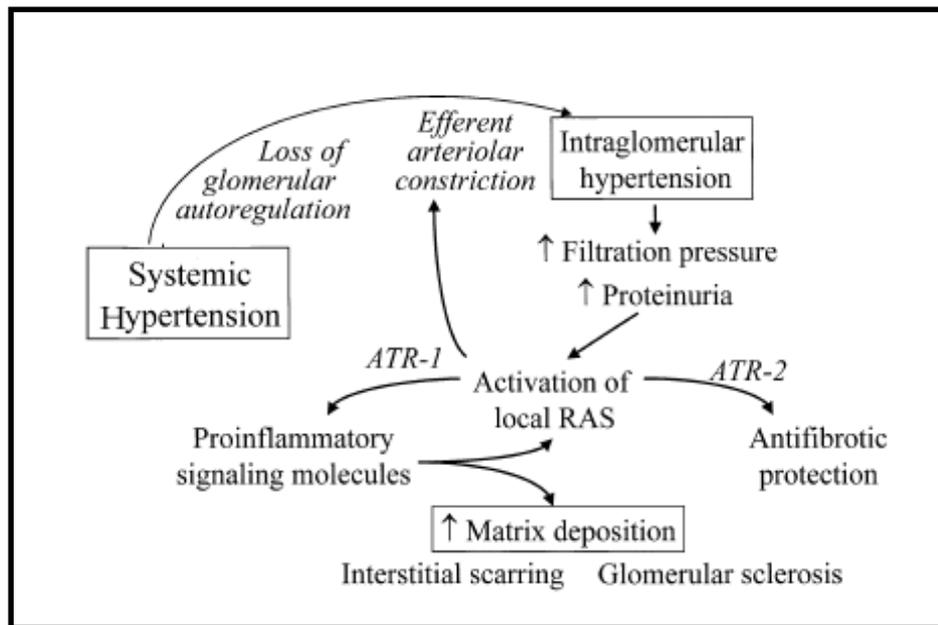


Abbildung 3-6: ***Pathophysiologische Folgen einer arteriellen Hypertonie bei vorliegender Nephropathie*** (Soergel und Schaefer 2002)

Stadien der Nephropathie

Die renale Schädigung im Rahmen einer Nephropathie verläuft in fünf Stadien (Meguid El Nahas und Bello 2005): Im ersten Stadium findet sich eine Hypertrophie und Hyperfunktion der Niere mit einem gesteigerten renalen Plasmafluss und einer gesteigerten GFR. Im zweiten Stadium zeigt die Niere erste strukturelle Veränderungen, wie eine Verdickung der Basalmembran und eine Expansion des Mesangiums. Diese Veränderungen sind nur eingeschränkt reversibel. Das dritte Stadium wird durch eine Mikroalbuminurie (30mg – 300 mg Albumin/24 h) und einen Anstieg des arteriellen Blutdrucks klinisch apparent. Die Schädigung der Niere ist in diesem Stadium irreversibel, so dass durch eine Behandlung lediglich ihre Progredienz verzögert werden kann. Im vierten Stadium findet sich eine persistierende Proteinurie mit Übergang in eine Makroalbuminurie (> 300 mg Albumin/24 h), eine Abnahme der GFR, sowie bei 60 % der Patienten eine Hypertonie. Für das Endstadium ist eine Erhöhung des Serumkreatinins und anderer Retentionsparameter, sowie eine Hypertonie bei 80 % der Patienten charakteristisch.

3.3.2. Diabetische Neuropathie

Die diabetische Neuropathie bezeichnet eine subklinische oder klinisch manifeste Erkrankung, die im Rahmen des Diabetes auftritt und auf keine andere Ursache als eine peripheren Neuropathie zurückzuführen ist (Bretzel 2000). Sie manifestiert sich im somatischen und/oder autonomen Teil des peripheren Nervensystems.

Im Verlauf der Erkrankung entwickelt nahezu jeder Diabetiker eine Polyneuropathie. Bei Betrachtung der Altersverteilung ist die autonome Neuropathie besonders bei jugendlichen Diabetikern, die distal-symmetrisch-sensible Polyneuropathie häufiger bei den älteren Diabetikern anzutreffen. (Bretzel 2000). Die Pathogenese dieser Sekundärkomplikation wird noch immer kontrovers diskutiert, wobei es als gesichert gilt, dass vordergründiger pathogenetischer Faktor die hyperglykämische Stoffwechsellage ist.

Die periphere Neuropathie lässt sich in drei Unterformen differenzieren:

- Symmetrische Form, gekennzeichnet durch distal-symmetrisch-sensible oder sensorische Reiz- und Ausfallerscheinungen
- Asymmetrische Form, gekennzeichnet durch proximal motorische Ausfälle; Sonderform: diabetische Amyotrophie (Schwäche und Atrophie der Oberschenkel-Beckenmuskulatur)
- Mononeuropathie, gekennzeichnet durch den Ausfall einzelner Nerven, vorwiegend der Hirnnerven (Bretzel 2000)

Die häufigste Form der peripheren Neuropathie ist die distal-symmetrisch-sensible Polyneuropathie. Klinisch manifestiert sie sich als Parästhesie (z.B. Kribbeln der Füße) und Dysästhesie (z.B. Brennen der Füße), die meist strumpfförmig an Füßen und Unterschenkeln beginnt und sich nach proximal ausbreitet. Bei Fortschreiten der Erkrankung tritt eine Abschwächung oder Aufhebung der Sehnenreflexe und eine zunehmende Fußherberschwäche- bzw. -lähmung auf. Eine Hauptkomplikation der peripheren Neuropathie ist die Entwicklung des diabetischen Fußsyndroms: Dies entsteht vordergründig durch kleinste Verletzungen am Fuß, welche aufgrund der verminderten Schmerzempfindung nicht bemerkt werden und sich entzünden. Durch die Mikroangiopathie heilen diese Verletzungen schlecht und weiten sich zu einem Ulkus aus. Abszeßbildung mit Knochenbeteiligung, gefolgt von Amputationen, sind nicht selten die Folge (Bretzel 2000).

Die autonome Neuropathie manifestiert sich hauptsächlich in einer Kardioneuropathie (reduzierte Herzfrequenzvariabilität, Ruhetachykardie, QT-Zeit-Verlängerung), Gastropathie (gastroösophagealer Reflux, Gastroparese, diabetische Diarrhö oder Obstipation,

Stuhlinkontinenz) und einer urogenitalen Neuropathie (diabetische Zystopathie, erektile Dysfunktion). Über die Lebenserwartung des Diabetikers entscheidet die kardiale Neuropathie: Die primäre Schädigung des Parasympathikus und die relative Dominanz des Sympathikus bergen die Gefahr von Ruhetachykardien und ventrikulären Arrhythmien. Die gestörte Schmerzwahrnehmung des Diabetikers kann außerdem zu schmerzlosen koronaren Ischämien und stummen Myokardinfarkten führen, woraus eine fortschreitende, nicht bemerkte Schädigung des Herzens resultiert, die zu einer Herzinsuffizienz führt (Bretzel 2000).

3.3.3. Diabetische Retinopathie

Die diabetische Retinopathie stellt eine weitere mikroangiopathische Folgeerkrankung dar. Sie umfasst neben der nicht-proliferativen und der proliferativen Retinopathie auch die diabetische Makulopathie. Von einer Patientengruppe welche in den Jahren von 1960 bis 1965 an einem Diabetes mellitus Typ 1 erkrankte, war nach 25 Jahren fast jeder Zweite an einer proliferativen Retinopathie erkrankt (47 %). Patienten mit einer Manifestation zwischen 1971 und 1975 zeigten nur noch in 24 % (Rossing 2005) eine Retinopathie. Diese Zahlen verdeutlichen zum einen die enorme Bedeutung der Retinopathie als Folgeerkrankung des Diabetes mellitus Typ 1 und zum anderen die Wichtigkeit der Entwicklung effektiver Therapien um die Anzahl der Neu-Manifestationen in Zukunft noch weiter verringern zu können.

Die Retinopathie beginnt zunächst als nicht-proliferative Retinopathie (sog. Background-Retinopathie). Die ersten Retinaveränderungen imponieren als Mikroaneurysmen. Der weitere Verlauf der Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine Kombination aus gesteigerter Gefäßpermeabilität und progressivem Gefäßverschluss. Dies führt zur Entstehung harter Exsudate (scharf abgegrenzte weißliche Flecken, Hinweis auf Extravasation) und weicher Exsudate (cotton-wool-Herde, unscharf begrenzte weißliche Flecken als Folge von Arteriolen- und Venolen-Verschlüssen). Der zunehmende Gefäßverschluss bedingt eine Ischämie der Retina, die eine vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren bewirkt, die Neovaskularisationen induzieren (Lichtenauer, Seissler et al. 2003). So geht die nicht-proliferative Retinopathie in die proliferative Form über. Die neu gebildeten Gefäße neigen zu präretinalen Ausbreitungen und führen, aufgrund ihrer Fragilität, leicht zu Blutungen. Auch werden sie häufig von einsprossenden Bindegewebszellen begleitet, welche Membranen bilden, die durch Traktion die Netzhaut ablösen können. Der Komplex aus Glaskörperblutung und traktiver Netzhautblutung bedingt das stark erhöhte Erblindungsrisiko der proliferativen Retinopathie (Bretzel 2000).

Neben dem proliferativen Stadium ist auch die diabetische Makulopathie abzugrenzen. Sie entsteht vordergründig durch einen Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke, was eine Zunahme der Gefäßpermeabilität verursacht, die wiederum zur Bildung eines Netzhautödems im Makulabereich und zur Beeinträchtigung des zentralen Sehvermögens führt (Bretzel 2000).

3.3.4. Kardiovaskuläre Erkrankungen

Der Diabetes mellitus ist mit verfrüht einsetzenden und beschleunigt ablaufenden arteriosklerotischen Gefäßveränderungen vergesellschaftet. Diese sind mit einem deutlich erhöhten Risiko für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen verknüpft.

Die Pathogenese der Makroangiopathie ergibt sich aus den Stoffwechselveränderungen des Diabetikers, d.h. insbesondere der Hyperglykämie. Die bereits beschriebenen biochemischen Änderungen induzieren funktionelle Störungen, die zunächst in ihrer Ausprägung reversibel sind. Als Folge einer permanenten Hyperglykämie dekompenziert die Reparaturfähigkeit des Gewebes, so dass bleibende Schäden entstehen.

Eine der Hauptkomplikationen der chronischen Hyperglykämie ist die Arteriosklerose. Diese ist histologisch gekennzeichnet durch eine generalisierte Hypertrophie der Gefäßwand und eine Ausbildung arteriosklerotischer Plaques (Bretzel 2000).

In der Literatur wird die Entstehung der Arteriosklerose allgemein als ein pathophysiologischer Prozess beschrieben, dessen auslösende Ursache ein, auf die Endothelzellen wirkender, entzündlicher Reiz ist (Libby, Ridker et al. 2002). In dessen Folge kommt es zur Anheftung und Einwanderung von Leukozyten in die Intima. Dort schütten diese Wachstumsfaktoren und Zytokine aus. Durch deren Einwirkung verändern sich die Endothelzellen, die glatten Muskelzellen, das extrazelluläre Bindegewebe, sowie die Leukozyten selbst in ihren Eigenschaften, so dass daraus die Ausbildung einer Plaque und eine Hypertrophie der Gefäßwand entsteht, was eine arteriosklerotische Gefäßerkrankung darstellt (Libby, Ridker et al. 2002).

Unter hyperglykämischen Bedingungen zeigt die Arteriosklerose, und damit die Makroangiopathie, eine starke Progredienz. Durch die auftretenden biochemischen Veränderungen werden einige wesentliche Schritte der pathogenetischen Entwicklung forciert: Aus der vermehrten Expression proinflammatorischer Enzyme (PKC ↑) sowie aus der Schädigung der Endothelzellen und dem oxidativen Stress (Polyol-Weg) (Brownlee 2001) resultieren zwei der hauptauslösenden Ursachen der Arteriosklerose. Die gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen (Basta, Del Turco et al. 2004) und die Synthese von

Zytokinen (AGE-Wirkung) bewirken eine Anheftung von Leukozyten. Diese durchwandern die Endothelzellschicht, was durch die Erhöhung der Permeabilität (Basta, Del Turco et al. 2004) der Basalmembran begünstigt wird. Die Permeabilitätssteigerung resultiert aus der vermehrten Synthese von VEGF (PKC ↑), sowie den Veränderungen der Zell-Matrix- und Matrix-Matrix-Interaktionen (AGE-Wirkung) (Brownlee 2001). Durch die AGE-Modifikation wird außerdem eine Akkumulation von glatten Muskelzellen und Makrophagen (Basta, Del Turco et al. 2004) in den entstehenden Plaque, sowie eine Oxidation von freiem LDL (Basta, Del Turco et al. 2004) verursacht. Das LDL wird von den Schaumzellen phagozytiert, was zu einer Akzeleration des Wachstums der arteriosklerotischen Plaque beiträgt. Durch die prokoagulatorische Wirkung der AGE (Basta, Del Turco et al. 2004) und die vermehrte Synthese von PAI-1 (AGE-, Hexosamin-Wirkung) (Brownlee 2001) steigt neben dem Risiko eines durch die Plaque bedingten stenotischen Verschlusses die Gefahr eines thrombogenen Verschlusses. Die Expression von Wachstumsfaktoren (AGE-Wirkung) (Brownlee 2001) bewirkt neben der Proliferation der in der Intima befindlichen glatten Muskelzellen auch eine Steigerung der Synthese von Bindegewebe, was zu einer Hypertrophie der Gefäßwand führt. Aus den dargestellten Zusammenhängen wird deutlich, dass durch die Hyperglykämie sowohl die Entstehung des arteriosklerotischen Plaque, als auch die Hypertrophie der Gefäßwand induziert und beschleunigt wird. Somit stellt sie eine der hauptauslösenden Ursachen der diabetischen Makroangiopathie dar. Die Schädigung der Gefäße manifestiert sich in Form kardiovaskulärer Erkrankungen wie der koronaren Herzerkrankung (KHK), sowie der zerebralen ischämischen Durchblutungsstörung und der peripheren arterieller Verschlusskrankheit (pAVK). Diese seien im Anschluss kurz dargestellt.

Koronare Herzerkrankung

Die KHK und der sich daraus entwickelnde Myokardinfarkt spielen im Rahmen der diabetischen Erkrankung eine ganz entscheidende Rolle: So haben Diabetiker das gleiche Risiko einen Herzinfarkt zu erleiden wie Nicht-Diabetiker einen Reinfarkt, wobei das Überleben des Myokardinfarktes eine weit schlechtere Prognose hat als bei Nicht-Diabetikern (Bretzel 2000). Da viele an einer KHK erkrankte Diabetiker gleichzeitig auch eine Neuropathie aufweisen, verlaufen myokardiale Schädigungen häufig klinisch asymptomatisch („stumm“). Daraus ergibt sich die Problematik, dass viele Patienten erst (zu) spät erkannt und einer entsprechenden Behandlung zugeführt werden können.

Begründet ist die hohe Prävalenz der koronaren Herzerkrankung durch die hyperglykämiebedingte Schädigungen der Gefäßwand. Diese führen zu Schädigungen des Gefäßendothels mit Bildung diffus verteilter arteriosklerotischer Gefäßveränderungen, die nach langer

Krankheitsdauer stenotische oder thrombogene Gefäßverschlüsse verursachen. Forciert wird dies auch durch die Hyperkoagulabilität (Basta, Del Turco et al. 2004) des Blutes und die eingeschränkte Fibrinolyse (Brownlee 2001).

Zerebrale ischämische Durchblutungsstörungen

Zerebrale Durchblutungsstörungen treten bei 12,5 % aller Diabetiker auf (Renz-Polster 2004; Dietel, Suttorp et al. 2005). Sie stellen eine Folge der makroangiopathischen Veränderungen der zerebralen Gefäße dar und manifestieren sich als transitorische ischämische Attacke (TIA) oder als ischämischer Insult, ausgelöst durch thrombotische Verschlüsse bei arteriosklerotischen Stenosen und/oder ulzeröse Plaques der Carotiden (Dietel, Suttorp et al. 2005).

Periphere arterielle Verschlusskrankheit

Die arteriosklerotischen Veränderungen des Diabetikers zeigen eine diffuse und peripher gelegene Ausbreitung. Somit ist die diabetische AVK, im Vergleich zur nicht-diabetischen AVK, bevorzugt peripher-akral lokalisiert (Unterschenkelverschlusstyp). Während der Bildung eines stenotischen Verschlusses ist die physiologische Kollateralenbildung beim Diabetiker gestört, da auch die Kollateralen durch die Angiopathie geschädigt werden (Renz-Polster 2004; Dietel, Suttorp et al. 2005). Somit entstehen häufig sehr komplizierte Krankheitsverläufe, die nicht selten zu Amputationen führen.

3.4. Hypertonie und Diabetes

Da die diabetische Erkrankung und der Hypertonus in synergistischer und additiver Weise das Herz und Gefäßsystem schädigen, ergibt sich, bei Vorliegen einer Kombination aus diesen Erkrankungen, eine Häufung von Kardiovaskulopathien (Jandeleit-Dahm und Cooper 2002). Ursächlich dafür ist, dass eine Erhöhung des systemischen Blutdruckes und die damit verbundenen Scherkräfte ebenso wie eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels, einen inflammatorischen Reiz für das Gefäßendothel darstellen, und dadurch wesentlich zur Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen beitragen (Libby, Ridker et al. 2002). Die Schädigung des Endothels führt weiterhin zu einer erhöhten Steifigkeit der arteriellen Gefäße und zu einer endothelialen Dysfunktion, was eine zusätzliche Erhöhung des Blutdruckes nach sich zieht. Weiterhin führt eine Hypertonie zu einer Aggravation der im Rahmen einer sich entwickelnden diabetischen Kardiomyopathie auftretenden linksventrikulären Hypertrophie (LVH) und der diastolischen Dysfunktion (Jandeleit-Dahm und Cooper 2002).

Die durch die Hypertonie verursachte Progression der kardiovaskulären Veränderungen, erklärt die Notwendigkeit ihrer frühzeitigen Diagnose und Therapie, um das Herz und das Gefäßsystem schützen zu können.

3.4.1. Pathogenese der Hypertonie

Die Pathogenese der Hypertonie ist sehr komplex und beinhaltet endokrine, vaskuläre, neuronale und renale Faktoren, und trägt selbst zur Progression einzelner ursächlicher Faktoren bei. Zentraler Auslöser für die Pathogenese der Hypertonie ist die Schädigung wichtiger Organ-Funktionen unter einer hyperglykämischen Stoffwechsellage.

Renale Faktoren

Ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der Hypertonie stellt die diabetische Nephropathie dar, die die Genese im Wesentlichen durch drei Effekte beeinflusst:

- Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)
- Aktivierung des Sympathikus
- Salz- und Wasserretention infolge der RAAS-Aktivierung und (im fortgeschrittenen Stadium) eine Verminderung der renalen Ausscheidungskapazität

Ein zentraler Punkt in der Pathogenese der Hypertonie ist die Aktivierung des RAAS. In diesem Zusammenhang ist vor allem die vermehrte Freisetzung von Ang II von entscheidender Bedeutung: Ang II führt zum einen durch direkte vasokonstriktorische Effekte am Angiotensin-II- Rezeptor Typ 1, als auch durch eine Aktivierung des Sympathikus, zu einer Erhöhung des systemischen Blutdrucks. Durch die Induktion von Wachstumsfaktoren, wie TGF- β , induziert Ang II zudem eine vermehrte Synthese extrazellulärer Matrix, woraus ein Elastizitätsverlust der peripheren Gefäße und damit eine Erhöhung des systolischen Blutdrucks resultiert. Auch die Stimulation der Natrium-Reabsorption und die Verminderung der GFR durch Ang II tragen, durch die sich daraus ergebende Volumenretention, zur Pathogenese der arteriellen Hypertonie bei.

Die Antidiurese wird weiterhin um ein Vielfaches durch die von Ang II induzierte Stimulation der Aldosteron-Freisetzung verstärkt. Aldosteron trägt mittels Stimulation von TGF- β und PAI-1, sowie durch Veränderung der Eigenschaften der glatten Gefäßmuskelzellen, zu einer Schädigung und Versteifung der peripheren Gefäße bei. Dies verursacht eine Erhöhung des peripheren Widerstands. Forciert wird dies durch die Hemmung der NO- und Förderung der Endothelin-Freisetzung durch Aldosteron, was zu einer endothelialen Dysfunktion und somit zu einer Einschränkung der vasodilatatorischen Fähigkeiten des Gefäßsystems führt.

Eine Einschränkung der Vasodilatation entsteht auch mit dem Abbau von Bradykinin durch ACE, so dass die Relaxation der Gefäßwände durch die Aktivierung des RAAS auf den verschiedensten Ebenen gestört wird und so zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt.

Im fortgeschrittenen Stadium der Nephropathie spielt, neben den genannten Faktoren, die zunehmend verminderte Ausscheidungskapazität der Nieren eine immer größere Rolle. Die Schädigung der Nieren führt zum einen zu einer Hypertonie durch eine Erhöhung des peripheren Widerstands und zum anderen durch eine verstärkte Retention des Volumens.

Endokrine Faktoren und endotheliale Dysfunktion

Die Hyperglykämie induziert eine Störung der endokrinen Funktion der Endothelzellen: So zeigt sich unter einem erhöhten Blutzuckerspiegel eine Verminderung der NO-Produktion (Cosentino, Hishikawa et al. 1997) und NO-Wirkung (Lash, Nase et al. 1999). Dies bedeutet eine Einschränkung der Vasodilatation. Auch ist im Rahmen einer Hyperglykämie eine Zunahme der Endothelin-Freisetzung feststellbar (Yamauchi, Ohnaka et al. 1990). Bezüglich des Endothelins werden 3 Isoformen unterschieden: Endothelin 1, 2 und 3 (Inoue, Yanagisawa et al. 1989). Endothelin 1 ist ein aus 21 Aminosäuren bestehendes Peptid, welches in den Endothelzellen synthetisiert wird (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988). Es spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Blutdruck-Niveaus, der Zell-Proliferation und der Modulation des Vasomotoren-Tonus. Des Weiteren trägt Endothelin 1 einen entscheidenden Anteil zu den pathophysiologischen Prozessen der Arteriosklerose-Entstehung und der Pathogenese der Hypertension bei (Asai, Ohkubo et al. 2001). Letztere beeinflusst Endothelin 1 insofern, als dass es zum einen zu einer Erhöhung des Sympathiko-Tonus und zum anderen zu einer Störung der Vasodilatation führt, woraus eine Verstärkung der Vasokonstriktion resultiert. Weiterhin bedingt Endothelin 1 eine Stimulation der Aldosteron-Sekretion und damit eine Volumenretention (Dong, Wang et al. 2004). Die durch Endothelin 1 verstärkte vasokonstriktorische Komponente des Gefäßsystems unter gleichzeitiger Störung der Vasodilatation wird auch zu dem Symptomkomplex der endotheliale Dysfunktion zusammengefasst, die einen entscheidenden Faktor in der Genese der arteriellen Hypertension darstellt.

Vaskuläre Faktoren

Die diabetische Erkrankung ist mit einer zunehmenden Versteifung der arteriellen Gefäße (Brooks, Molyneaux et al. 2001) verknüpft. Diese Versteifung stellt ein Resultat der hyperglykämischen Stoffwechsellage des Diabetikers dar: Durch die AGE-induzierte Quervernetzung des Kollagens der Gefäßwände und deren Hypertrophie verlieren diese ihre

Elastizität. Dies bedeutet eine Einschränkung der Compliance, was zu einer Zunahme des systolischen Blutdrucks und der Blutdruckamplitude (pulse pressure) führt.

Neuronale Faktoren

Durch die Neuropathie entstehen mannigfaltige Veränderungen im Organismus, die zum Fortschreiten der Pathogenese einer Hypertonie wesentlich beitragen.

An dieser Stelle ist die durch die autonome Neuropathie bedingte relative Dominanz des Sympathikus hervorzuheben. Dieser führt zum einen zu einer Aktivierung des RAAS und einer Erhöhung des peripheren arteriellen Widerstandes (Perin, Maule et al. 2001) und zum anderen zu einer zunehmenden Versteifung der arteriellen Gefäße (van Ittersum, Schram et al. 2004). Dies bedeutet eine Verminderung der Compliance und damit eine Erhöhung des Blutdrucks.

Weitere Folgen der Neuropathie stellen sich im Bereich des Urogenitaltrakts dar: Die Störung der autonomen Innervation bedingt eine diabetische Cystopathie, welche zu Harnstauungen, gehäuften Pyelonephritiden und damit zu Nierenschädigungen führt (Vinik, Maser et al. 2003). Auch eine Zunahme des intraglomerulären Drucks (Monteagudo, Nobrega et al. 1996), verursacht durch die Neuropathie, trägt wesentlich zur Progression der diabetischen Nephropathie und damit zur Hypertonie bei.

Genetische Faktoren

Genetische Faktoren bestimmen 30 – 50 % der Blutdruckvariationen in der Normalbevölkerung (Munroe und Caulfield 2000). Als wahrscheinliche Ursache der genetisch bedingten Variabilität des Blutdrucks werden polymorphe Allele von an der Blutdruckregulation beteiligten Genen angesehen. Daher wurden sie in jüngster Zeit auf einen kausalen Zusammenhang mit der Entstehung essentieller und sekundärer Hypertonie-Formen untersucht. Gen-Polymorphismen des RAAS, sowie des Endothelin-Systems wurden mit z.T. kontroversen Ergebnissen, in ihrer Bedeutung für die Genese und Progression der arteriellen Hypertonie geprüft. Bezüglich des RAAS sind polymorphe Allele des Angiotensinogen-, ACE-, Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1- und das Aldosteron-Synthase-Gen von Bedeutung, für das Endothelin-System das Endothelin1.

Für das Angiotensin-Converting Enzym kodiert ein aus 21 kb und 26 Exons bestehendes Gen, welches auf dem langen Arm des Chromosom 17 (17q23) lokalisiert ist. Im Intron 16 nahe des 3'-Endes dieses Gens findet sich ein Insertions-/Deletions-Polymorphismus (Zaman, Yoshiike et al. 2001). Dieser ist charakterisiert durch das Fehlen oder Vorhandensein eines 287bp-Fragments (Scott, Moran et al. 2005). Bei Vorhandensein des Fragments liegt das I-

Allel, bei Fehlen das D-Allel vor. Im Jahre 1990 wurde von Rigat et al. (Rigat, Hubert et al. 1990) ein Zusammenhang zwischen dem jeweiligen Genotyp und dem Serum-ACE-Spiegel beschrieben: So war mit Vorliegen des D-Allels eine Erhöhung des ACE-Serum-Konzentration feststellbar. (Rigat, Hubert et al. 1990). Dies hat zur Folge, dass bei Vorliegen des D-Allels eine vermehrte Conversion von Angiotensin I zu Angiotensin II erfolgt.

Für das Protein Angiotensinogen (AGT) codiert ein auf Chromosom 1 lokalisiertes Gen (1q42-43). Bezüglich dieses Gens, welches aus 13 kb besteht und sich aus 5 Exons und 4 Introns zusammensetzt, sind zahlreiche genetische Variationen bekannt, wobei der c.704T>C-Polymorphismus für die Genese der arteriellen Hypertension von Bedeutung ist (Staessen, Kuznetsova et al. 1999). Bei diesem Polymorphismus wird an Position 704 im Exon 2 des AGT-Gens Thymidin durch die Base Cytosin ersetzt. (c.704T>C). Diese Veränderung der Basensequenz bedingt die Codierung der Aminosäure Threonin, die bei der Synthese des Angiotensinogens an Position 235 anstelle von Methionin eingefügt wird (p.Met235Thr). Die sich daraus ergebenden Allele sind das T-Allel und das C-Allel. Bei Vorliegen des C-Allels ist eine Erhöhung des Angiotensinogen-Plasmaspiegels nachweisbar (Reinhardt, Sigusch et al. 2000).

Das für den Angiotensin-II-Rezeptor-Typ-1 (ATR1) codierende Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 3 lokalisiert (3q21-q25) (Dzida, Sobstyl et al. 2001). Es umfasst 55 kb und besteht aus 5 Exons, von denen die ersten 4 Exons für die 5'-untranslatierten Sequenzen codieren (Duncan, Scholey et al. 2001). Ein Polymorphismus des ATR1-Gens ist durch einen Austausch von Adenosin gegen Cytosin an Position 1166 des 5'-Endes der 3'-untranslatierten Region (Stankovic, Zivkovic et al. 2003) im Exon 5 charakterisiert (c.1166A>C) (Duncan, Scholey et al. 2001). Die biologischen Auswirkung ist bislang nicht vollständig geklärt, es wurden aber Korrelationen des C-Allels mit arterieller Hypertension, KHK, arterieller Gefäßversteifung und Nephropathie beschrieben, wobei als Wirkmechanismus eine Zunahme der Sensitivität des ATR1-Rezeptors bei Vorliegen der genannten Mutation angenommen wird (Marre, Jeunemaitre et al. 1997; Miller, Thai et al. 2000; Zhang, Erdmann et al. 2000).

Für die Aldosteron-Synthase codiert das Gen CYP11B2, welches auf dem kurzen Arm des Chromosom 8 (8q24) lokalisiert ist (Mulatero, Schiavone et al. 2000). In der 5'-Promotor-Region an Position -344, welche die mutmaßliche Bindungsregion des Transkriptions-Faktors SF-1 darstellt (Connell, Fraser et al. 2004), findet sich der C/T-Polymorphismus (Freel und Connell 2004). Der Polymorphismus ist durch einen Austausch von Cytosin gegen Thymin charakterisiert (c.-344C>T). Die Genotypen C/C (Wildtyp), C/T (heterozygoter Genotyp), und T/T (Risikogenotyp) unterscheiden sich in ihrer Blut-Aldosteron-Konzentration: Das T-

Allel bedingt eine Erhöhung der Aldosteron-Sekretion und somit eine vermehrte Aldosteron-Wirkung (Hautanen, Toivanen et al. 1999).

Das für das Endothelin-1 codierende Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert, umfasst 5.5 kb und gliedert sich in 5 Exons und 4 Introns (Treiber, Barbeau et al. 2003). Bezüglich dieses Gens sind zahlreiche Polymorphismen bekannt, wobei in dieser Arbeit der Fokus auf den p.Lys198Asn-Polymorphismus gelegt werden soll. Im Falle dieses Polymorphismus findet sich an Position +5665 im Exon 5 ein Basenaustausch von Guanin durch Thymin (g.5665G>T). Daraus resultiert eine Veränderung im Codon 198, aus welchem ein Austausch von Lysin durch Asparagin im Proteinmolekül resultiert (p.Lys198Asn) (Tiret, Poirier et al. 1999). Die sich daraus ergebenden Allele sind somit das T- und das G-Allel. Bei den Trägern des T-Allels ist, im Vergleich zu den Trägern des G-Allels, ein erhöhter Endothelin-Plasma-Spiegels feststellbar (Barden, Herbison et al. 2001), was als prädisponierend für die Entstehung und Progression einer arteriellen Hypertonie angenommen wird (Shichiri, Hirata et al. 1990).

Die untersuchten Polymorphismen, ihre Benennung und Lokalisation, sowie ihre funktionelle Bedeutung sind in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

Name	Abkürzung	Polymorphismus	Locus	Funktionelle Bedeutung
Angiotensin-Converting-Enzym	ACE	ACE Intron 16 I/D	Intron 16	ACE-Aktivität ↑
Angiotensinogen	AGT	c.704T>C	Exon 2	AGT-Spiegel ↑
Angiotensin II-Rezeptor Typ1	ATR1	c.1166A>C	3'-UTR	ATR1-Aktivität ↑
Aldosteron-Synthetase	Aldo-S	c.-344C>T	Promotor	Aldosteron ↑
Endothelin	End1	g.5665G>T	Exon 5	Endothelin-Plasmaspiegel ↑

Tabelle 1: Gen-Polymorphismen und ihre pathophysiologische Bedeutung

3.5. Fragestellung

Die Bedeutung genetischer Polymorphismen für die Progression der arteriellen Hypertension ist bei Kindern und Jugendlichen weitestgehend unbekannt.

In dieser prospektiven Studie wurden deshalb Polymorphismen des RAAS (ACE, AGT, ATR1, Aldo-S) und des Endothelin-Systems (End1) bei Kindern und Jugendlichen mit Diabetes mellitus Typ 1 bestimmt und mit 24-h-Blutdruckprofilen verglichen. Untersucht wurde, ob eine Assoziation zwischen den untersuchten Polymorphismen und den auftretenden Veränderungen in den Blutdruckprofilen im Verlauf von 2 Jahren bestand.

4. Patienten und Methoden

4.1. Patienten

4.1.1. Patientenkollektiv

In diese Studie, die Teil einer prospektiven interdisziplinären Langzeitstudie zur Frage genetischer Risikofaktoren vaskulärer Erkrankungen bei Kindern ist, wurden vom 14.07.1999 bis zum 09.12.2004 konsekutiv insgesamt 95 Kinder und Jugendliche (50 männliche und 45 weibliche), die in der Diabetes-Ambulanz und der Diabetes-Station der Universitätskinderklinik Gießen behandelt wurden, aufgenommen. Das Mindestalter betrug 9 Jahre. Die Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt (Genehmigungsnummer 10/02). Eine Einverständniserklärung der Eltern/Sorgeberechtigten oder des Patienten, im Falle einer Volljährigkeit, lag vor.

Im Rahmen der regelmäßigen Routineuntersuchungen wurden stets die Gewichtsentwicklung und Größenzunahme und der sich daraus ergebende BMI der Kinder protokolliert. Insbesondere Veränderungen des Insulinbedarfs wurden engmaschig kontrolliert. Des Weiteren wurden bei den Kindern routinemäßig HbA1c und Gesamt-Cholesterin sowie Albumin und Kreatinin im Urin bestimmt. Zusätzlich wurden den Kindern für diese Studie einmalig im Rahmen der Routine-Blutentnahmen 3 ml EDTA-Blut entnommen. Im Abstand von durchschnittlich 25 Monaten wurden zwei ambulante 24 h- Blutdruckmessungen (ABPM) durchgeführt.

4.1.2. Kontrollkollektiv

Die Allel- und Genotypfrequenz der einzelnen Polymorphismen wurde in einer Kontrollpopulation von 100 gesunden Kindern und 300 gesunden Blutspendern mit gleicher ethnischer Abstammung und Geschlechtsverteilung bestimmt (siehe Tabelle 2 im Anhang).

4.2. Blutdruckmessung

Die 24-h-Blutdruckmessung erlaubt zum einen die Beobachtung des Blutdrucks sowohl tagüber als auch nachts in einer dem Patienten vertrauten Umgebung und zum anderen die Quantifizierung der zirkadianen Blutdruckvariabilität (Wuhl, Witte et al. 2002). 24h-Blutdruckmessungen zeigen eine bessere Korrelation zwischen möglichen sekundären Organschädigungen, kardiovaskulärer Morbidität und Hypertonie als einmalige Blutdruckmessungen (Hansen, Jeppesen et al. 2006; Kikuya, Hansen et al. 2007). Eine

Verschlechterung der nächtlichen Blutdruckregulation wurde in der Literatur wiederholt bei Kindern und Jugendlichen mit Diabetes mellitus Typ I beschrieben (Cohen, Filho et al. 2001; Darcan, Goksen et al. 2006). Trotzdem wird der Beitrag eines erhöhten systolischen und diastolischen Blutdrucks zu einem veränderten Blutdruckprofil und die Entstehung sekundärer Organschäden noch immer kontrovers diskutiert. Die Identifikation und Kontrolle von Risikofaktoren die zur Entwicklung von Komplikationen führt und deren Akzelleration fördert ist somit gerade bei Kindern und Jugendlichen mit Diabetes mellitus Typ 1 von enormer Wichtigkeit.

Die beschriebene nächtliche Blutdruckabsenkung wird auch als sogenanntes „Dipping“ bezeichnet. Bezüglich dieses Parameters ist die Definition einer pathologischen nächtlichen Blutdruckabsenkung teilweise in so fern kompliziert, als sie in der Literatur zum Teil sehr kontrovers dargestellt wird: Bezüglich des systolischen Dippings ist allgemein eine Absenkung von weniger als 10 % gegenüber dem jeweiligen Tagwert als pathologisch anzusehen (Holl, Pavlovic et al. 1999). Bezüglich des diastolischen Dippings bezeichnen einige Autoren eine Absenkung des nächtlichen Blutdrucks um weniger als 20 % als pathologisch (Holl, Pavlovic et al. 1999), während andere erst ab einer Absenkung von unter 10 % gegenüber dem jeweiligen Tagwert als pathologisch ansehen (Verdecchia, Schillaci et al. 1990).

Die ambulanten 24 h-Blutdruckmessungen erfolgten im Rahmen dieser Studie mit dem Spacelabs ABPM 90207 Monitor (Spacelabs, Kaarst) mittels oszillometrischer Verfahren und angepasster Manschettengröße. Die Auswertung wurde mit Hilfe der zugehörigen Software (90121, Version 1.03.15) vorgenommen (Holl, Pavlovic et al. 1999). Der Tagesverlauf und die Aktivitäten der Patienten wurden jeweils protokolliert. Die Messzeiträume lagen zum einen zwischen 6.00 und 20.00 Uhr (Tagphase) und zum anderen zwischen 20.00 und 6.00 Uhr (Nachtphase). In der Tagphase erfolgten die Messungen alle 20 Minuten, in der Nachtphase wurden sie stündlich durchgeführt. Zeigte der protokollierte Tagesablauf eine Abweichung vom angenommenen, wurden die Zuordnungen zu Tag- und Nachtphasen entsprechend angepasst. So war separat der mittlere systolische (SBP) und diastolische (DBP) Blutdruck für die Tag- und die Nachtperiode berechenbar. Eine Untersuchung der zirkadianen Variabilität des Blutdruckes erfolgte, indem das Verhältnis der mittleren Tag- und Nachtwerte (Dipping: [mittlerer Tagwert – mittlerer Nachtwert]/mittlerer Tagwert) gebildet wurde, um so eine Aussage über die nächtliche prozentuale Absenkung des mittleren systolischen und diastolischen Blutdruckes zu erhalten. Die Messwerte wurden auf die Normwerte der deutschen Multicenter-Studie zur 24 h-Blutdruckmessung bezogen (Soergel, Kirschstein et al.

1997). Grenzwerte der nächtlichen Blutdruckabsenkung waren für die Systole ein Abfall von mindestens 10% gegenüber dem Tagwert und für die Diastole eine Verminderung des nächtlichen Wertes von mindestens 20% gegenüber dem entsprechenden Tagwert (Verdecchia, Porcellati et al. 1994; Sorof und Portman 2000)

In der quantitativen Analyse wurde entsprechend der Verteilungsparameter der Referenzstudie jeder berechnete Mittelwert des systolischen und diastolischen Blutdrucks als SDS-LMS-Wert angegeben.

Blutdruckwerte von Kindern und Jugendlichen liegen in einer non-parametrischen Verteilung vor. Um die Werte in eine Normalverteilung zu überführen, wurde die sogenannte LMS-Transformation von Wühl et al. (Wühl, Witte et al. 2002) angewandt. Wühl et al. erhoben in einer Studie mit 949 Kindern und Jugendlichen im Alter von 5-20 Jahren 24 h-Blutdruckprofile mit dem Ziel parametrisch verteilte LMS-Blutdruck-Referenzwerte für Kinder und Jugendliche zu erstellen. Dazu wurden die erhaltenen 24 h-Blutdruckprofile zunächst in zwei Gruppen, abhängig vom jeweiligen Geschlecht, eingeteilt. Da bekannt ist, dass der Blutdruck neben dem Geschlecht auch abhängig ist von Alter und Größe eines Kindes, wurden innerhalb dieser geschlechtsabhängigen Gruppen Blutdruck-Referenzwerte zum einen dem jeweiligen Alter und zum anderen der Körpergröße zugeordnet. Da diese Normwertkurven nicht in einer Normalverteilung vorlagen, wurde die bereits erwähnte LMS-Transformation durchgeführt, um so eine Gaußsche Verteilung zu erhalten. Die LMS-Transformation wird nach folgender Formel, die den Median, den Variationskoeffizienten und die Steilheit der jeweiligen Verteilungskurve miteinbezieht, berechnet:

$$C_{\alpha}(t) = M(t) \times [1 + L(t) \times S(t) \times z_{\alpha}]^{1/L(t)}$$

$C_{\alpha}(t)$: Gesuchte Perzentile im α -Quantil entsprechend der korrespondierenden Werte bezüglich Alter (oder Größe) t

$M(t)$: Median entsprechend der korrespondierenden Werte bezüglich Alter (oder Größe) t

$L(t)$: Steilheit der Kurve entsprechend der korrespondierenden Werte bezüglich Alter (oder Größe) t

$S(t)$: Variationskoeffizient entsprechend der korrespondierenden Werte bezüglich Alter (oder Größe) t;

z_{α} : Der Perzentile entsprechende Standardabweichung (vor allem für $\alpha = 97\%$, $z_{\alpha} = 1.88$)

Nach dieser Transformation lagen sowohl für Jungen als auch für Mädchen normalverteilte Werte, sogenannte LMS-Werte, vor, die sowohl dem jeweiligen Alter als auch der jeweiligen Körpergröße einen bestimmten Referenzwert zuordneten.

Sollte nun ein individueller LMS-Blutdruck-Wert eines Kindes in seiner Abweichung von diesen Norm-Werten eingeschätzt werden, war dies insofern schwierig, als dass ein absoluter Wert zur Beschreibung der Abweichung von der Norm in der Pädiatrie keine wirkliche Aussagekraft hat. Deshalb wurde der sogenannten SDS-Wert berechnet. Dieser ermöglicht eine objektive Einschätzung des Ausmaßes der Abweichung vom alters- oder größenabhängigen Normwert.

Der SDS-Wert errechnet sich wie folgt:

$$\text{SDS: } [(Y/M(t))^{L(t)} - 1] / (L(t) \times S(t))$$

Y : Individueller systol. oder diastol. Blutdruck, mittlerer arterieller Druck, Herzfrequenz

L(t), M(t), S(t): Geschlechtsspezifische Werte von L, M, und S entsprechend des Alters oder der Größe des Kindes

Die dargestellten Zusammenhänge sollen nun kurz anhand eines Patienten-Beispiels erläutert werden: Ein 10jähriger Junge und ein ebenso altes Mädchen weisen in der 24 h-Blutdruckmessung einen mittleren systolischen Blutdruck am Tag von 113.4 mmHg (Junge) bzw. 113.3 mmHg (Mädchen) auf. Sechs Jahre später stellen sie sich wieder vor. Eine ABPM wird durchgeführt. Nun weist der Junge einen mittleren systolischen Blutdruck von 128.2 mmHg und das Mädchen von 119.6 mmHg auf. Ohne die Kenntnisse von der Geschlechts-Gewichts- und Altersabhängigkeit kindlicher Blutdrucke würde man eventuell davon ausgehen, dass die Jugendlichen einen Hypertonus entwickelt hätten, wobei bezüglich des Jungen ein sehr schlechter Verlauf anzunehmen wäre. Transformiert man nun aber die Werte in SDS-LMS-Werte, so stellt man fest, dass sie zu beiden Messzeitpunkten einen SDS-Wert von „0.00“ aufwiesen, dass also die Blutdruck-Werte völlig der Norm entsprechend waren.

Aus Gründen der aus den SDS-LMS-Werten resultierenden objektiven Vergleichbarkeit der Blutdruckwerte von Kindern unterschiedlichen Geschlechts, Alters oder Körpergröße, werden in der folgenden Arbeit, wenn nicht anders vermerkt, SDS-LMS-Werte aufgeführt. Der Vollständigkeit halber sind die absoluten Blutdruckwerte der Kinder und Jugendlichen, die an dieser Studie teilnahmen, in Tabelle 14 im Anhang aufgeführt.

4.3. Klinisch-chemische Analyse

Der HbA1c-Wert wurde in der Diabetes-Ambulanz der Kinderklinik Giessen immunologisch aus Kapillarblut (DCA 2000; Bayer, Leverkusen) bestimmt. Als Normbereich galten Werte von 4.0-6.1 %. Verwandt wurde in der Datenanalyse der mediane HbA1c-Wert aus 2-6 Messungen, die im Rahmen der regelmäßigen Routineuntersuchungen durchgeführt worden

waren. Jährlich wurde zudem die Albuminausscheidung im Spontanurin bestimmt und auf die Kreatinin-Konzentration im Urin bezogen. Als Normbereich galten Werte von <29mg Albumin/g Kreatinin.

Als physiologische Cholesterinwerte galten Werte >200 mg/dl bei postprandialer Blutentnahme (Schwab, Doerfer et al. 2006).

4.4. Extraktion der DNA

Die Extraktion der DNA gliederte sich grundlegend in zwei Teilabschnitte. Zunächst erfolgte die eigentliche Isolierung der DNA aus dem Patienten-Blut. Um diese anschließend verwenden zu können, erfolgte danach eine photometrische Quantifizierung und dementsprechend die Einstellung der gewünschten DNA-Konzentration.

4.4.1. Isolierung der DNA

Unter Verwendung des QIAamp[®] DNA Mini Kit und DNA Blood Mini von Qiagen (QIAGEN GmbH, Max-Volmer-Strasse 4, 40724 Hilden; Katalognummer 51306) wurde aus dem oben genannten Patientenblut die DNA extrahiert.

Hierfür wurde das Extraktionskit wie folgt vorbereitet:

- die Proteinase K (Mat.-Nummer 1017738) wurde zu je 20µl in Eppendorfgefäßen aliquotiert und bei -20°C bis zum Gebrauch aufbewahrt
- zu den 95ml AW1-Puffer-Konzentrat (Mat. Nummer 1014795) wurden einmalig 120 ml Ethanol hinzugegeben und bei Raumtemperatur aufbewahrt
- zu den 66ml AW2-Puffer-Konzentrat (Mat.-Nummer 1014577) wurden einmalig 160 ml Ethanol hinzugegeben und bei Raumtemperatur aufbewahrt

Vor der eigentlichen Extraktion waren folgende Vorbereitungen zu treffen:

- die Blutproben wurden auf Raumtemperatur erwärmt
- der Thermoblock (Techne, DRI-Block[®] DB-2A) wurde auf 56°C erhitzt
- die Proteinase K wurde aufgetaut

Dann konnte mit der Extraktion begonnen werden: Ziel war es, pro Blutprobe in 250 µl AE-Puffer DNA zu extrahieren. Zu diesem Zweck wurden pro Patientenprobe zwei Extraktionen parallel durchgeführt, da man so pro Ansatz jeweils zwei in 125 µl AE-Puffer gelöste DNA-Proben erhielt. Zu Beginn wurden zu der Proteinkinase K je 200 µl Blut und 200 µl AL-Lysis Puffer (Mat.-Nummer: 1014604) hinzugegeben. Dann wurde das Gemisch 15 Sekunden

pulsierend gevortext und abzentrifugiert. Eine zehnmünütige Inkubation im auf 56°C vorgeheizten Thermoblock folgte anschließend. Im weiteren Verlauf wurde 200 µl 100%iges Ethanol hinzugefügt und durch 15sekündiges pulsierendes Vortexen und anschließende Abzentrifugation untergemischt. Danach wurde das komplette Reaktionsgemisch in eine QIAamp spin column (Lot.-No.:11556826) überführt. Hierbei war vor allem darauf zu achten, dass sich zum einen auf dem Ring am oberen Rand der Säule kein Reaktionsgemisch ablagerte, und zum anderen, dass die überaus empfindliche Membran der Säule nicht z.B. durch die Pipettenspitze, zerstört wurde. Im nächsten Schritt wurde die Säule in der Zentrifuge (Hettich, Typ 1110) bei 8000 rpm eine Minute zentrifugiert und nach der Zentrifugation auf ein neues Auffangröhrchen (Lot No. 11554506) gesetzt. Nachdem im Anschluss daran 500 µl AW1-Wasch Puffer (Mat.-Nummer: 1014795) in die Säule pipettiert worden waren, wurde sie wieder eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Im Folgenden wurde die Säule auf ein neues Auffanggefäß gestellt und 500 µl AW2-Wasch-Puffer (Mat.-Nummer 1014577) hinzupipettiert. Nun folgte eine 3minütige Zentrifugation bei 14000 rpm. Im weiteren Verlauf wurde die Säule, nach erneuter Auswechslung des Auffangröhrchens, eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Auffangröhrchen nochmals ausgetauscht und 125 µl AE-Puffer (Mat-Nummer: 101 7847) direkt auf die Membran der Extraktionssäule gegeben. Nach einer Wartezeit von fünf Minuten folgte eine abschließende einminütige Zentrifugation bei 8000 rpm. Hiermit war die Extraktion abgeschlossen und die DNA lag in 125 µl AE-Puffer gelöst vor.

4.4.2. Photometrische Quantifizierung der DNA

Nach der DNA-Isolierung folgte nun ihre Quantifizierung. Zunächst mussten hierfür jedoch einige Vorbereitungen getroffen werden:

- Von der extrahierten DNA musste eine Verdünnung im Verhältnis 1:20 hergestellt werden. Hierzu wurden in einem Eppendorfgefäß 95 µl Wasser und 5 µl Extraktionsprodukt vermischt.
- Das benötigte Photometer (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech) musste einige Minuten vor der Messung eingeschaltet werden, um die UV-Lampe vorzuwärmen.
- Nach der Einstellung des Programms Multi λ wurde das Photometer mit Wasser kalibriert.

Dann konnte mit den Messungen begonnen werden: Diese erfolgten entsprechend dem Programm Multi λ bei 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm. Danach musste zunächst die Reinheit der extrahierten DNA festgestellt werden, indem der erhaltene Wert der Messung bei

260 nm durch den Wert, den die Messung bei 280 nm ergeben hatte, dividiert wurde. Dieser Quotient sollte einen Wert zwischen 1,8 und 2,0 ergeben.

Als nächstes folgte nun die eigentliche Quantifizierung der DNA. Hierzu wurde der erhaltene Wert der Messung bei 260 nm mit dem Faktor 1000 multipliziert. Das so errechnete Ergebnis gab die Menge DNA in ng pro μl an; beispielsweise bedeutete ein Messwert von 0,032 bei 260 nm eine DNA-Menge von 32 ng/ μl Extraktionsprodukt. Für die im weiteren Verlauf durchgeführten PCR's wurden jedoch DNA-Mengen von je 50 ng benötigt, daher wurde wie folgt verfahren:

- Lag die isolierte DNA-Menge unter 50 ng/ μl , so wurde bei den folgenden PCR-Ansätzen das verwendete Volumen des Extraktionsprodukts entsprechend erhöht. Hier war allerdings zu berücksichtigen, dass das Volumen des PCR-Ansatzes (50 μl) nicht verändert werden durfte. Daher wurde entsprechend der Erhöhung des DNA-Volumens das Volumen des im PCR-Ansatz enthaltenen Wassers reduziert.
- Lag die extrahierte DNA-Menge über 50 ng/ μl , so wurde sie mit AE-Puffer so verdünnt, dass 1 μl Extraktionsprodukt 50 ng genomischer DNA enthielt.

Nach Beendigung der oben genannten Schritte war die Quantifizierung der DNA abgeschlossen.

4.4.3. Lagerung der DNA

Die DNA wurde in 2 ml-Eppendorfgefäßen in AE-Puffer bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

4.5. Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation der Genotypen der jeweiligen Polymorphismen wurde mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt: Die PCR stellt ein anerkanntes Verfahren, um definierte Ziel-DNA-Sequenzen selektiv zu vermehren, dar (Strachan 2005). Für die Durchführung einer PCR werden zunächst für den jeweiligen Gen-Abschnitt spezifische Oligonukleotidprimer benötigt (siehe hierzu Kapitel „Primer“). Diese Primer, die so genannten Amplimere, binden spezifisch an komplementäre Sequenzen, welche die gesuchte DNA-Sequenz einrahmen. Werden nun eine hitzestabile DNA-Polymerase, sowie als DNA-Vorstufen, die vier Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP hinzugegeben, können Amplimere die Synthese neuer DNA-Stränge starten. Die entstehenden DNA-Stränge sind komplementär zu denen der gesuchten Zielsequenz und überlappen einander. Diese Neusynthesen laufen in Kettenreaktionen ab, in denen die jeweils neu synthetisierten DNA-Stränge als Matrizen für die weitere DNA-Synthese dienen. So werden

in meist ca. 30 Zyklen bis zu 10^5 Kopien der erwünschten DNA-Zielsequenz synthetisiert. Diese Menge ist in einer daran anschließenden Agarose- Gelelektrophorese als diskrete Bande erkennbar (Strachan 2005).

Wird die hitzestabile Taq-Polymerase verwendet, gliedert sich die PCR meist in drei Schritte:

- 1. Denaturierung:** Bei $93-95^\circ\text{C}$ wird menschliche genomische DNA denaturiert.
- 2. Renaturierung:** Diese erfolgt normalerweise bei $50-70^\circ\text{C}$.
- 3. DNA-Synthese:** Sie erfolgt in der Regel bei $70-75^\circ\text{C}$ (Strachan 2005).

Der Ablauf einer PCR-Reaktion ist im Folgenden schematisch dargestellt.

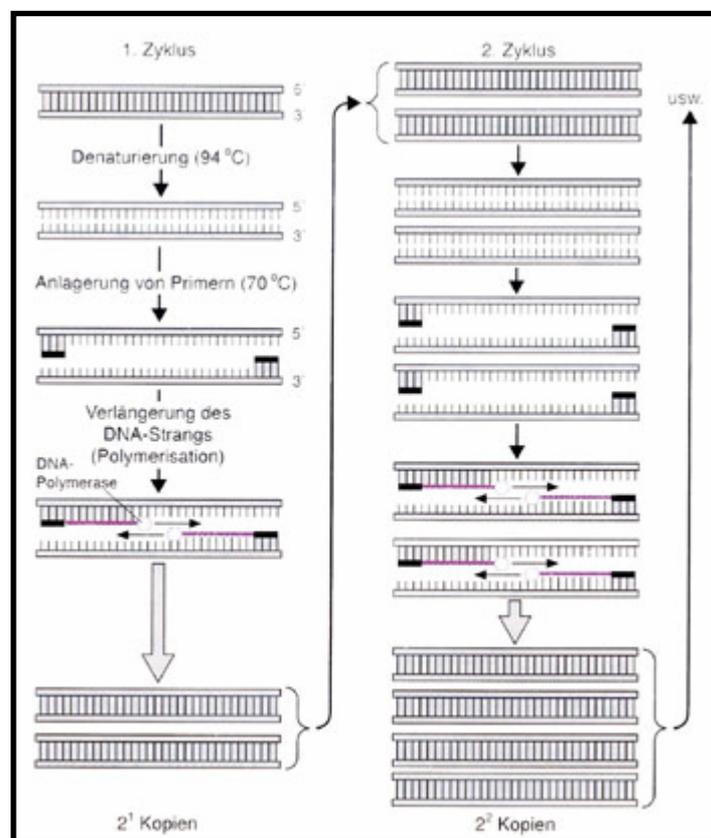


Abbildung 4-1: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion

(Quelle: <http://sina.eetezadi.de/inhalt/referate/dna-replikation-pcr/page/3>)

Unterschieden werden bezüglich der PCR eine so genannte Single-Run-PCR von einer nested-PCR. Der Unterschied besteht darin, dass bei einer Single-Run-PCR, direkt selektiv die Ziel-DNA vermehrt wird, wohingegen bei einer nested-PCR (verschachtelte PCR) in der ersten PCR-Reaktion der DNA-Abschnitt vermehrt wird, auf dem sich die Zielsequenz befindet. In einer anschließenden Reaktion wird aus dem Produkt des ersten PCR-Laufs die Zielsequenz von dem darin vorliegenden DNA-Teilabschnitt amplifiziert. Hierdurch wird das

Risiko, falsche Amplifikationsprodukte zu erhalten, auf ein Minimum reduziert (Strachan 2005).

Die Polymorphismen wurden zum Teil in einer Single-Run (ACE und AGT) und in einer nested-PCR (Aldo, ATR1, End1) amplifiziert. Die genauen Angaben zur Durchführung der jeweiligen PCRs sind im Anhang in Tabelle 5 und 6 dargestellt.

4.5.1. Primer

Bei der Konstruktion eines Primers liegt die Schwierigkeit darin, einen nur für die Zielsequenz spezifischen Primer herzustellen. Für das komplexe menschliche Genom reicht es meist zwei Primer von jeweils 20 Nukleotiden Länge anzufertigen (Strachan 2005), denn die Wahrscheinlichkeit, dass einer der beiden Primer an einer weiteren Stelle im Genom genau mit einer Sequenz übereinstimmt, ist verschwindend gering. Um dennoch auftretende falsche Amplifikationsprodukte zu vermeiden, wählt man die Bedingungen stets so, dass nur die Duplices aus Primer und Ziel-DNA stabil sind. Doch trotz allem findet man immer wieder falsche Amplifikationsprodukte (Strachan 2005).

Um die Zahl der dennoch falschen Amplifikationen zu verringern, kann man mit Hilfe sogenannter nested-Primer eine oben beschriebene nested-PCR durchführen. Durch die vorausgehende Amplifikation des DNA-Abschnittes, auf sich die jeweilige Zielsequenz befindet, werden Fehlpaarungen des Primers in dem zweiten PCR-Lauf nahezu komplett ausgeschlossen

Besonders wichtig ist bei der Herstellung eines Primers eine genaue Paarung am 3'-Ende des Primers. Es gilt hier zu vermeiden, dass die Basen am 3'-Ende der Primer komplementär sind und sich so Primer-Dimere bilden, die die Effizienz der Reaktion enorm verringern würden (Strachan 2005).

Zum Nachweis der zu untersuchenden Polymorphismen wurden Primer der Firma Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe verwendet. Die Spezifität der Primer für die jeweiligen Polymorphismen wurde in der Datenbank von NCBI (National center of biotechnology Interaction; www.ncbi.nlm) mit Hilfe der Blast-Funktion überprüft und sichergestellt. Die verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 3 aufgeführt.

4.5.2. Reagenzien

Ein PCR-Ansatz enthielt neben den Primern, der zu amplifizierenden DNA und der bereits erwähnten hitzestabilen Taq-Polymerase, die vier DNA-Vorstufen in Form der Desoxyribonucleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Zur Sicherstellung des pH-Optimum wurde außerdem ein PCR-Puffer hinzugefügt. Um die, durch die teilweise

unterschiedlichen Zusammensetzungen der PCR-Ansätze entstehenden Volumenschwankungen auszugleichen, wurden jeweils entsprechende Mengen an Li-Chrosolv-Wasser hinzugegeben.

Die verwendeten Reagenzien sind im Folgenden dargestellt.

Reagenz	Name	Firma	Bestellnummer	Konzentration/ Aktivität
Polymerase	AmpliTaq Gold	Applied Biosystems	N808-0240	250 U
PCR-Puffer	PCR Gold Puffer	Applied Biosystems	N808-0240	10x
dNTP's	Roti-Mix PCR 1	Carl Roth & Co.KG	L541.1/2	10 mM
H ₂ O	Li-Chrosolv	Merck	1.1533	%

Tabelle 4: Übersicht über die für die PCR verwendeten Reagenzien

4.5.3. Durchführung der PCR

Die Durchführung der PCR ist in zwei Teile zu untergliedern:

1. Herstellung des PCR-Ansatzes
2. Programmierung des Thermocyclers und Ablauf der Reaktion

Im Anhang sind die PCR's bezüglich der Zusammensetzung ihrer PCR-Ansätze und die Programmierungen des Thermocyclers in Tabelle 5 und Tabelle 6 dargestellt. An dieser Stelle sei nur kurz beschreibend auf die differenten PCR's der Polymorphismen eingegangen.

ACE

Die Genotypisierung ACE-Polymorphismus erfolgte mittels direktem Nachweis primär längendifferenzierter PCR-Produkte in einer Single-Run-PCR. Aufgrund eines Amplifikationsvorteils des D-Allels gegenüber dem I-Allel, wurde nach der Alleldifferenzierung mittels Gelelektrophorese bei Vorliegen eines D/D-Genotyps eine zweite PCR angeschlossen. Diese PCR (ACE-ins) wurde mit insertionsspezifischen Primern durchgeführt (Shanmugam, Sell et al. 1993).

AGT

Der AGT-Polymorphismus wurde in einer so genannten mutagenically-separated-PCR nachgewiesen (Rust, Funke et al. 1993). Dieses Verfahren beruht auf der Verwendung von drei Primern. Zwei dieser Primer sind längendifferente, partiell homologe Antisense-Primer.

Der dritte Primer dient der Amplifikation des komplementären Stranges. Die partiell homologen Primer konkurrieren miteinander um die Bindung an der Ziel-DNA. Einer der beiden Primer bindet präferentiell bei Vorliegen des Wild-Allels, der zweite Primer bindet präferentiell bei Vorliegen der Mutation. Bei heterozygoten Genotypen binden beide Primer. Aufgrund der Längendifferenz der Primer entstehen so zwei längendifferente PCR-Produkte, die in der anschliessenden Gelelektrophorese als differente Banden identifiziert werden können.

ATR1, Aldo-S und End1

Die Genotypisierung von ATR1, End1 und Aldo-S erfolgte in nested-PCRs. Zur Genotypisierung wurde im Anschluß daran ein Restriktionsenzymverdau durchgeführt.

4.5.4. Kontrollen

Parallel zu jeder PCR wurden sowohl eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle durchgeführt.

Als Positivkontrolle wurde stets in einem PCR-Ansatz das Abl-Gen amplifiziert. Bei dem Abl-Gen handelt es sich um ein auf dem langen Arm des Chromosom 9 liegendes Protoonkogen (Wilda, Fuchs et al. 2002). Dieses Gen eignet sich sehr gut, um eine Positivkontrolle im Rahmen einer PCR durchzuführen, da es bei jedem Menschen nachweisbar ist. Bei einem negativen PCR-Produkt-Nachweis konnte daher davon ausgegangen werden, dass ein Fehler in der Durchführung der PCR vorgelegen haben musste, da bei regelrechtem Ablauf eine Amplifikation des Abl-Gens erfolgt wäre. Die Amplifikation des Abl-Gens konnte sowohl in einer Single-Run- als auch in einer nested-PCR erfolgen. Die hierfür verwendeten Primer wurden von der Firma Roth bezogen (die verwendeten Primer sind in Tabelle 3 im Anhang dargestellt).

Als Negativkontrolle wurde zusätzlich stets ein PCR-Ansatz erstellt, welcher anstelle von DNA steriles Aqua dest. enthielt. So konnten eventuelle Verschmutzungen des PCR-Ansatzes nachgewiesen werden.

4.6. Gelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese lassen sich Proteine, Nukleinsäuren und andere geladene Teilchen auftrennen. Die Trennung der Molekülgemische erfolgt unter Anlegen eines elektrischen Feldes auf einem so genannten Träger-Gel. In dem elektrischen Feld entwickelt jedes Molekül eine spezifische Wanderungsgeschwindigkeit, die abhängig ist von seiner Größe, Form und Nettoladung (die pH-abhängig ist) und der angelegten Spannung. Auch die

Poren des Agarose-Gels beeinflussen die Wanderungsgeschwindigkeit, da sie die verschieden großen DNA-Stücke unterschiedlich stark in ihrer Wanderung behindern. Die negative Eigenladung der DNA-Moleküle beruht auf ihren Phosphorsäure-Resten. Bei Anlegen eines elektrischen Feldes wandern sie daher auf den positiven Pol zu (Strachan 2005).

Die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten bedingen die Entstehung eines typischer Bandenmuster (Ansammlung gleich gewanderter, also identischer Moleküle) (Strachan 2005) welches nach einer anschließenden Anfärbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht und abfotografiert werden können.

4.6.1. Bestandteile des Gels

Die hergestellten Gele hatten grundsätzlich folgende Inhaltsstoffe:

- 1x TAE-Puffer
- Agarose

Diese beiden Inhaltsstoffe sollen zunächst genauer beschrieben werden.

Agarose

Bei der Herstellung der Agarose-Gele wurden entweder eine Universal Agarose (peqGold Universal Agarose, peq-Lab Biotechnologie GmbH, Bestell-Nr: 35-1020) oder eine Wide-Range Agarose (Sigma, Best-No. A 7431) verwendet.

Herstellung des Tris- Acetat- EDTA- Puffers

Der Tris-Acetat-EDTA-Puffer (im Folgenden TAE-Puffer) wurde aus folgenden Substanzen hergestellt:

1. Tetranatrium-Ethyldiamin-Tetraacetat-Hydrat; M 380,2 (Firma Sigma, Katalog-Nr:EDASS)
2. Tris-Base: $C_4H_{11}NO_3$; M 121,14 (Firma Roth; Art-Nr: 4855,2)
3. Essigsäure 96% (Firma Roedel-de-Häen, Kat.-Nr: 33206)

Das oben genannte Tetranatrium-Ethyldiamin-Tetraacetat-Hydrat wurde zur Herstellung von EDTA-Lösung benötigt. Um einen halben Liter 0,5 molare EDTA-Lösung herzustellen, wurden 85,05 g Tetranatrium-Ethyldiamin-Tetraacetat-Hydrat zu 414,95 ml Millipore-Wasser gegeben und durch ca. 15-minütiges Rühren gelöst. Danach folgte die Einstellung des pH-Wertes der Lösung: Hierzu wurde vorbereitend eine Messelektrode zur digitalen pH-Messung in Eichlösungen mit den Werten 4, 7 und 10 geeicht. Diese Elektrode wurde dann in die EDTA-Lösung gestellt, so dass unter ständiger Überwachung des pH-Werts dieser mit 96%iger Essigsäure auf den gewünschten Wert von 8 heruntertitriert werden konnte.

Nun wurden zu 78 ml Essigsäure und 700 ml Millipore-Wasser 242 g Tris-Base hinzugegeben. Diese ging nach 15minütigem Rühren in Lösung. Anschließend wurden 100ml der hergestellten 0,5 molaren EDTA-Lösung zu dem Tris-Acetat hinzugegeben und durch erneutes kräftiges Rühren vermischt.

Zum Abschluss musste der pH-Wert des TAE-Puffers eingestellt werden. Dieser wurde erneut unter ständiger pH-Bestimmung durch die o.g. Messelektrode mit 96%igen Essigsäure auf einen Wert von 7,6- 7.8 heruntertitriert. Hierzu wurden ca. 120 ml Essigsäure benötigt (das Volumen der Essigsäure war bei den verschiedenen Herstellungen variabel, schwankte aber um den genannten Wert).

Nach der Titration wurde abschließend durch Zugabe von Millipore-Wasser ein Puffer-Gesamtvolumen von 1000 ml hergestellt.

Dieser TAE-Puffer war 50x konzentriert.

Abschließend wurde der Puffer im Autoklaven sterilisiert.

4.6.2. Herstellung des Gels

Je nach zu erwartender Größe der PCR-Amplifikate wurden nun verschiedene Gele hergestellt. Diese unterschieden sich, zum einen in der jeweiligen Agarosekonzentration und zum anderen, wie bereits erwähnt, in der verwendeten Agarose.

Vor Herstellung des Gels wurde zunächst mit Millipore-Wasser (Leitfähigkeit 18,2 MΩcm) der 50-fach konzentriert TAE-Puffer auf eine 1-fache Konzentration verdünnt. Hierzu wurden 20ml 50x TAE-Puffer mit 1000 ml Millipore-Wasser vermischt.

Nun konnte mit der Herstellung der Gele begonnen werden. Hierzu wurden, je nach benötigter Agarosekonzentration, verschiedene Mengen an Agarose und 1x TAE-Puffer in einem Gefäß zusammengegeben. Die benötigten Agarosekonzentrationen sind im Folgenden angegeben:

PCR	peq Gold Universalagarose-Gel	Sigma-Agarose-Gel
ACE	1,5%	/
ACE-ins	1,5%	/
AGT	/	4,5%
ATR1	1,5%	/
Aldo-S	1,5%	/
End1	1,5%	/

Tabelle 7: Konzentration der für die Gelelektrophoresen verwendeten Agarosen

Nach der Vermischung der Agarose und des Puffers, wurde dies aufgeköcht, bis die gesamte Agarose in dem Puffer gelöst vorlag. Danach wurde das heiße Gel in einen Gelschlitten gegossen. Dieser Schlitten enthielt einen Kamm zur Herstellung der Slots. Nach Abkühlung, und infolgedessen Erhärtung des Gels, war dieses gebrauchsfertig. Nun konnte der Kamm entfernt und der Schlitten (mit dem darauf befindlichen Gel) in die Gelelektrophoresekammer gestellt werden. Hierbei war es wichtig, darauf zu achten, dass das Gel mit dem in der Kammer befindlichen 1x TAE-Puffer komplett bedeckt war. War dies der Fall, konnte mit der Befüllung der Slots begonnen werden.

4.6.3. Beschickung des Gels

Die amplifizierte DNA-Fragmente sollten unter einer künstlich angelegten Spannung im Agarose-Gel aufgetrennt werden. Zur Bestimmung des entstehenden Bandenmusters lief im ersten Slot stets ein DNA-Längenstandard (Firma Roche, Cat.No. 1721925) mit. Dieser Längenmarker enthielt 15 doppelsträngige DNA-Fragmente, die den Größenbereich von 50 bp bis 750 bp abdeckten, sowie eine Zusatzbande von 2642 bp. Die 250 bp- und 500 bp-Fragmente erschienen 2-3-fach verstärkt. Bei elektrophoretischer Auftrennung der Längenstandards entstand so ein leiterartiges Muster, mit dessen Hilfe eine Größenbestimmung der DNA-Fragmente nach Auftrennung im Agarosegel möglich war. Dieser DNA-Längenstandard wurde, ebenso wie die PCR-Produkte, mit einem Probenpuffer versetzt. Dieser Probenpuffer lag in einer 5-fach konzentrierten Form vor, wurde allerdings nur in einer 1-fachen benötigt, so dass bei Verwendung eines 12er- oder 14-er Kammes wie folgt verdünnt wurde:

- PCR-Produkt: 3µl Probenpuffer
15µl PCR-Produkt
- DNA-Längenmarker: 3µl Probenpuffer
4µl DNA-Längenmarker
11µl Li-Chrosolv-Wasser

Die Proben wurden dann in die Slots gefüllt, wobei, wie oben beschrieben, der DNA-Längenmarker jeweils in den ersten Slot, des jeweiligen Gels gefüllt wurde.

Dann wurde eine Spannung angelegt, die bei peq Gold Universalagarose-Gelen jeweils zwischen 90V und 130V und bei Sigma-Agarose-Gelen zwischen 90V und 110V lag.

Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel angefärbt und ausgewertet.

4.6.4. Färbung und Fotografie des Gels

Nach der Gelelektrophorese folgte nun die Anfärbung mit Ethidiumbromid. Hierzu wurde das Gel ca. 10 Minuten in ein Ethidiumbromidbad gelegt. Dieses Ethidiumbromidbad bestand aus 1 ml des o.g. Ethidiumbromids und 1 l Millipore-Wasser. Anschließend wurde das Gel für weitere 10 Minuten in reines Millipore-Wasser gelegt.

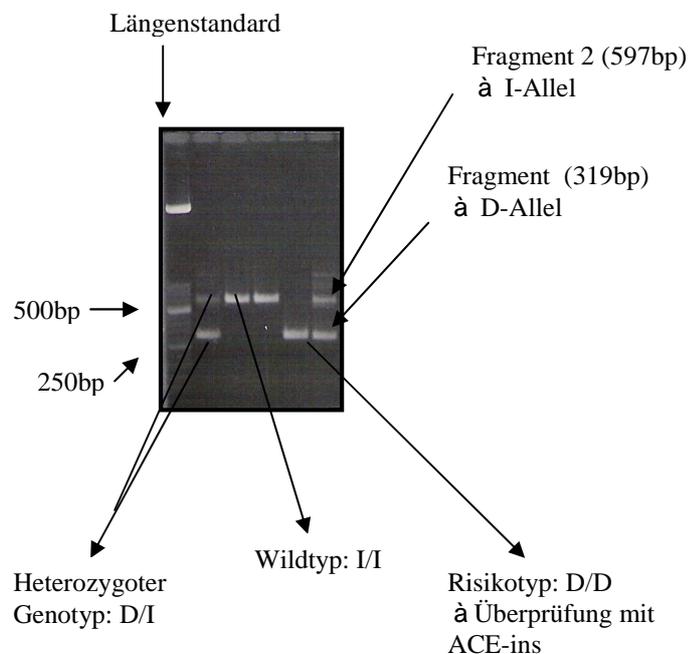
Hiermit war die Färbung abgeschlossen. Das Gel wurde unter UV-Licht, welches die angefärbten Banden der PCR-Produkte sichtbar machte, abfotografiert (Shanmugam, Sell et al. 1993).

4.6.5. Auswertung

Mit Hilfe des Fotos konnten nun die einzelnen Banden identifiziert werden. Die ACE- und AGT-PCRs konnten an dieser Stelle durch Nachweis primär längendifferenzierender PCR-Produkte ausgewertet werden. Für die Auswertung der übrigen PCRs war eine Restriktionsenzym-Fragment-Längenanalyse (RFLP) erforderlich. Die hier dargestellten Gelelektrophoresen von ATR1, Aldo-S und End1 nach deren zweitem Lauf dienten dem Zweck eines positiven Fragment-Nachweises, um anschließend einen Restriktionsenzymverdau zu beginnen.

Im Folgenden ist für jede PCR beispielhaft ein Foto mit dazugehöriger Auswertung dargestellt.

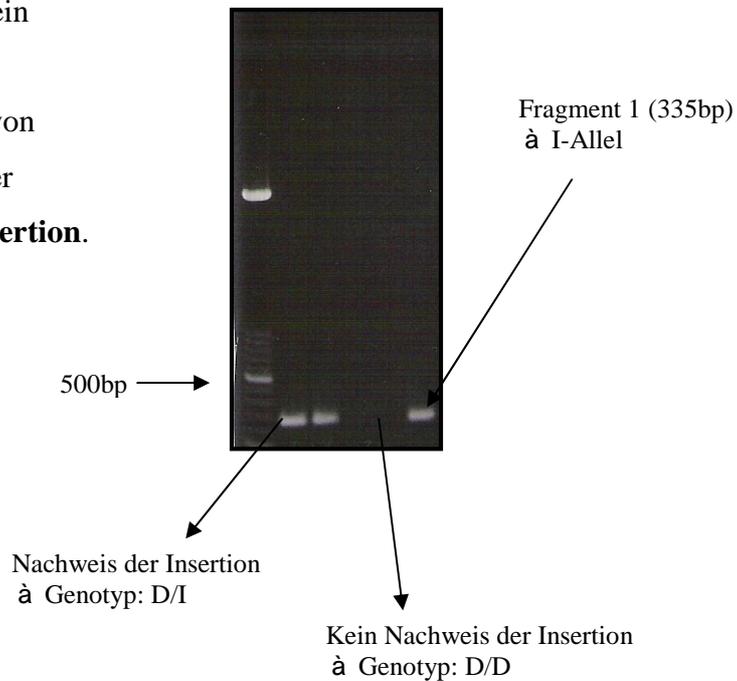
- **ACE:** Nachweisbar sind zwei Fragmente mit einer Länge von 319bp und 597bp. Bei Vorliegen des längeren Fragments liegt das **I-Allel**, bei Vorliegen des kürzeren das **D-Allel** vor (was bei D/D-Genotypen in der ACE-ins überprüft wurde).



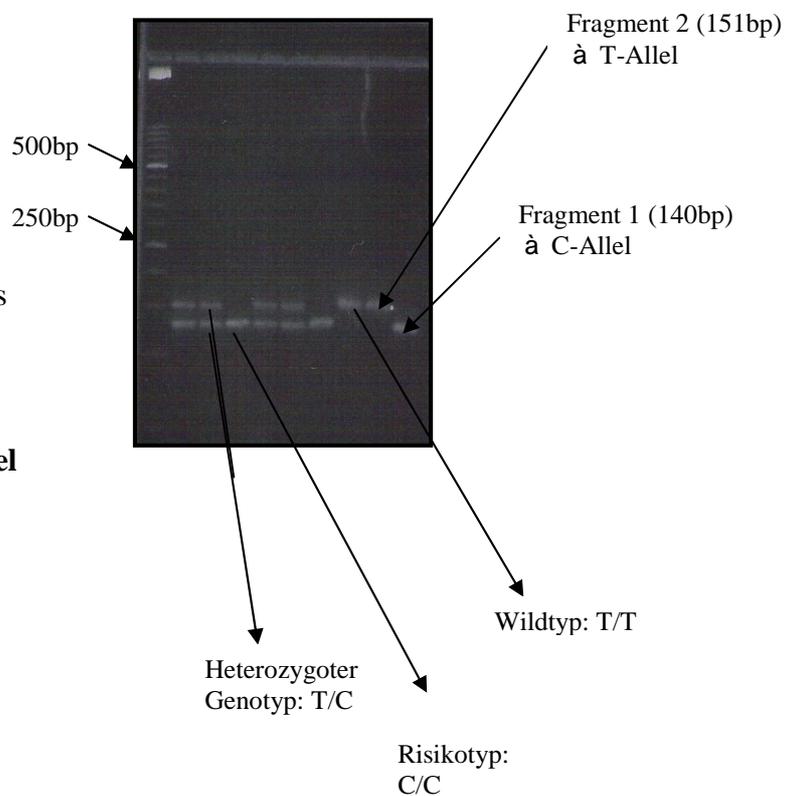
Proben, die in der Auswertung der ACE-PCR einen D/D-Genotyp aufwiesen, wurden, um auszuschliessen, dass eine nicht amplifizierte Insertion vorlag, zusätzlich in der ACE-ins-PCR amplifiziert.

Bei der Auswertung der ACE-ins zeigte sich folgendes Bild:

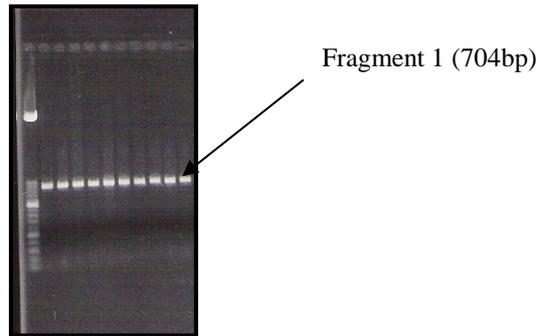
- **ACE-ins:** Nachweisbar ist ein Fragment mit einer Länge von 335bp à positiver Nachweis der **Insertion**.



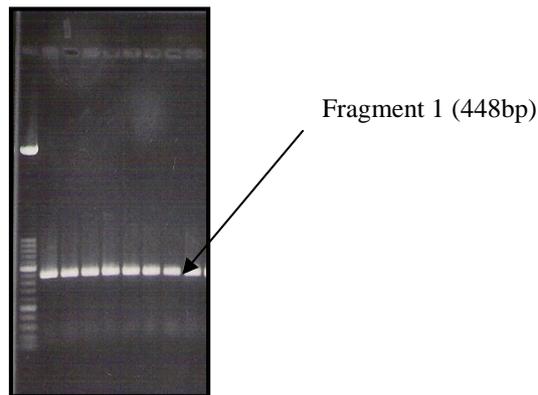
- **AGT:** Nachweisbar sind zwei Fragmente mit einer Länge von 140bp und 151bp. Bei Vorliegen des kürzeren Fragments liegt das **C-Allel**, bei Vorliegen des längeren das **T-Allel** vor.



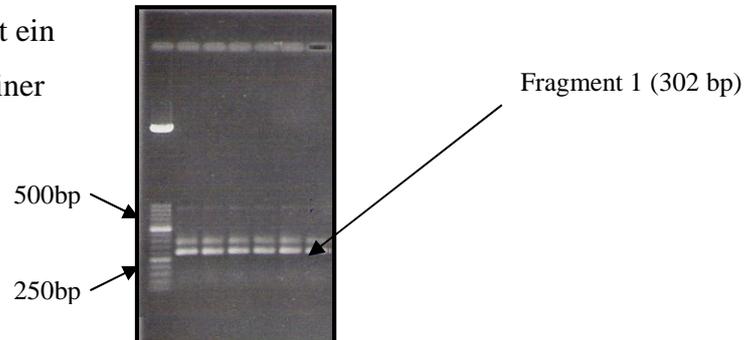
- **ATR1:** Nachweisbar ist ein Fragment mit einer Länge von 704bp.



- **Aldo-S:** Nachweisbar ist ein Fragment mit einer Länge von 448bp.



- **End1:** Nachweisbar ist ein Fragment mit einer Länge von 302bp.



4.7. Restriktionsenzymverdau

Die amplifizierten DNA-Abschnitte der Aldo-S-, ATR1- und End1-Polymorphismen wurden nun in einem Restriktionsenzymverdau verdaut. Das Prinzip eines solchen Verdau beruht darauf, dass die Restriktionsschnittstelle der selektiven Restriktionsendonukleasen durch den Polymorphismus verändert wurde. Weist ein Allel eine Mutation auf, kann das Restriktionsenzym nicht schneiden, wodurch die PCR-Produkte ihre ursprüngliche Länge behalten. Liegt keine Mutation vor, schneidet die Nuklease und zwei Teilstücke entstehen. Nach dem Verdau können die längendifferenten Fragmente mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Anfärbung identifiziert werden (Shanmugam, Sell et al. 1993).

Das Prinzip des Restriktionsenzymverdaus soll anhand des folgenden Schemas (modifiziert in Anlehnung an Strachan 2005) verdeutlicht werden.

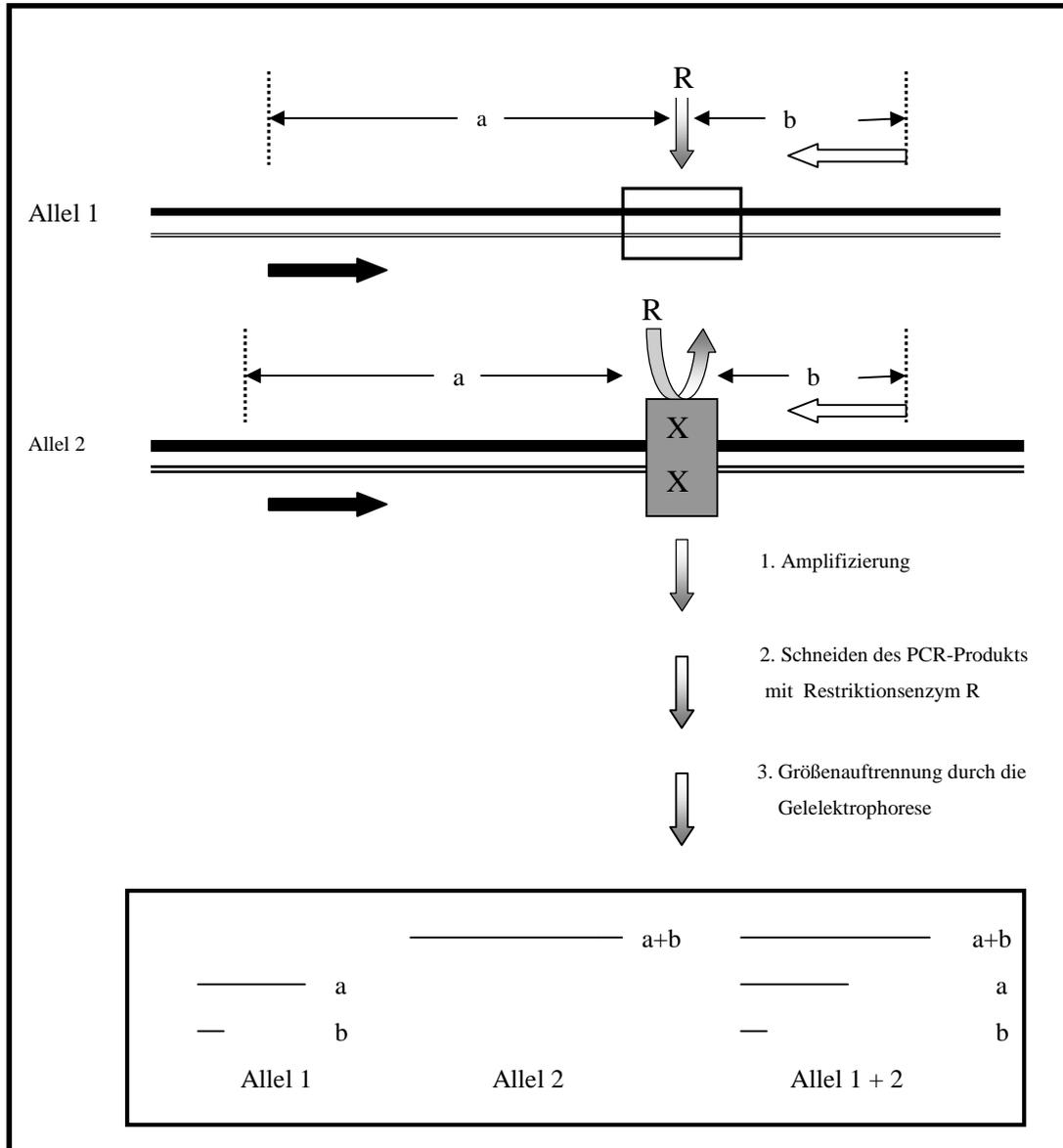


Abbildung 4-2: Ablauf eines Restriktionsenzymverdaus
 (Modifiziert in Anlehnung an Strachan 2005)

4.7.1. Reagenzien

Für den Verdau wurde neben dem jeweiligen Restriktionsenzym ein hierzu zugehöriger Puffer und LiChrosolv- Wasser verwendet. Die im Einzelnen verwendeten Reagenzien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Reagenz	Name	Schnittstelle	Firma	Bestellnummer	Konzentration/ Aktivität
Restriktionsenzyme	Dde I	5'...C↓TNAG...3' 3'...GANT↓C...5'	Biolabs	RO1755	10 000 U/ml
	Taq ^o I	5'...T↓CGA...3' 3'...AGC↓T...5'	Biolabs	RO149S	20 000 U/ml
	Hae III	5'...GG↓CC...3' 3'...CC↓GG...5'	Biolabs	RO1085	10 000 U/ml
Puffer für Restriktionsenzyme	NEPuffer DdeI	%	Biolabs	RO1755	10 x
	NEPuffer Taq ^o I	%	Biolabs	RO149S	10 x
	NEPuffer Hae III	%	Biolabs	RO1085	10 x
H ₂ O	Li- Chrosly	%	Merck	1.1533	%

Tabelle 8: Übersicht über die für den Restriktionsenzymverdau verwendeten Reagenzien

4.7.2. Reinigung des PCR-Produkts

Vor dem eigentlichen Verdau musste das PCR-Produkt gereinigt werden. Diese Reinigung wurde mit Hilfe des PCR-Purification-Kits von Qiagen (Best. Nr. 28106) durchgeführt.

Zu Beginn der Reinigung wurde das PCR-Produkt mit PB-Puffer in einem Cap vermischt. Die Menge des PB-Puffers entsprach der jeweils fünffachen Menge des PCR-Produkts. Die verwendeten Volumina der einzelnen PCR-Produkte waren:

PCR	verwendetes Volumen
ATR1	45µl
Aldo-S	45µl
End1	35µl

Tabelle 9: Verwendete Volumina der PCR-Produkte für den Restriktionsenzymverdau

Nachdem die PCR-Produkte und der Puffer gevortext und abzentrifugiert worden waren, wurde das Gemisch in eine QIAquick Spin Column überführt und in der Zentrifuge eine Minute bei 13 000rpm abzentrifugiert. Daraufhin wurde der Inhalt des Auffangröhrchens verworfen. Nun wurden 740µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und ebenfalls eine Minute bei

mit 13 000rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Auffangröhrchen ausgetauscht und bei 13 000rpm eine Minute zentrifugiert.

Mit diesem Schritt war die eigentliche Reinigung abgeschlossen und das PCR-Produkt konnte eluiert werden. Die Elutionsvolumina der verschiedenen PCRs sind nun im Folgenden aufgelistet.

PCR	EB-Puffer	H ₂ O
ATR	/	30µl
Aldo-S	30µl	/
End1	30µl	/

Tabelle 10: Elutionsvolumina der verwendeten Reagenzien

Nachdem das Wasser oder der EB-Puffer direkt auf die Membran der Spin column gegeben worden war, wurde diese noch einmal abschließend zentrifugiert und somit das gereinigte PCR-Produkt aufgefangen.

4.7.3. Restriktionsenzymverdau

Für den Verdau wurden nun, je nach PCR, verschiedene Restriktionsansätze erstellt. Für den Verdau des PCR-Produktes von ATR1 wurde Dde I (Xiang, Zheng et al. 1998), für das Produkt von Aldo-S HaeIII (Hautanen, Toivanen et al. 1999), und für End1 Taq^αI (Berge und Berg 1990) verwendet. Die genauen Zusammensetzungen der Restriktionsansätze und die jeweiligen Inkubationszeiten sind im Folgenden zusammengestellt:

Polymorphismus	Menge des PCR-Produkts	Menge des Enzyms	Menge des Puffers	Menge des Wassers	Inkubationszeit und Temperatur
ATR	14µl	0,8µl (=8U) DdeI	2µl NE-Puffer	3,2µl	6h/37°C
Aldo-S	14µl	0,8µl (=8U) HaeIII	2µl NE-Puffer	3,2µl	6h/37°C
End1	11µl	0,5 µl (=10U) Taq ^α I	2µl NE-Puffer	6,5µl	6h/65°C

Tabelle 11: Verwendete Reagenzien und Inkubationszeiten des Restriktionsenzymverdaus

Nachdem die Restriktionsenzymverdaue abgeschlossen waren, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

4.7.4. Gelelektrophorese

Für die Elektrophoresen wurden je nach PCR verschiedene Gele hergestellt. Diese unterschieden sich in der Art der verwendeten Gele und deren Agarosekonzentrationen. Die Gele und die Agarose-Konzentrationen sind im Folgenden dargestellt.

PCR	peq Gold Universalagarose-Gel	Sigma-Agarose-Gel
ATR1	3.0%	/
Aldo-S	2,5%	/
End1	/	4,5%

Tabelle 12: Konzentration der für die Gelelektrophoresen des Restriktionsenzymverdaus verwendeten Agarosen

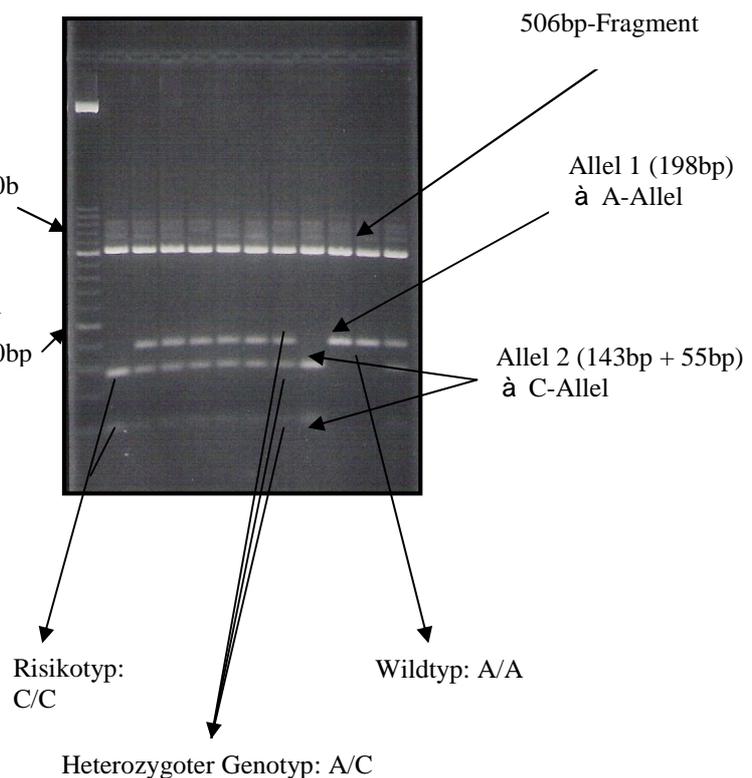
Die Elektrophoresen wurden wie bereits beschrieben mit einer Spannung von 90-130V bei peq Gold Universalagarose-Gelen bzw. 90-110V bei Sigma-Agarose-Gelen durchgeführt und anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt, unter UV-Licht-Bestrahlung fotografiert und ausgewertet.

4.7.5. Auswertung

Anhand der Photos der Verdauung konnte nun eine genaue Alleldifferenzierung vorgenommen werden. Im Folgenden sind die Auswertungen an Hand der Fotos dargestellt.

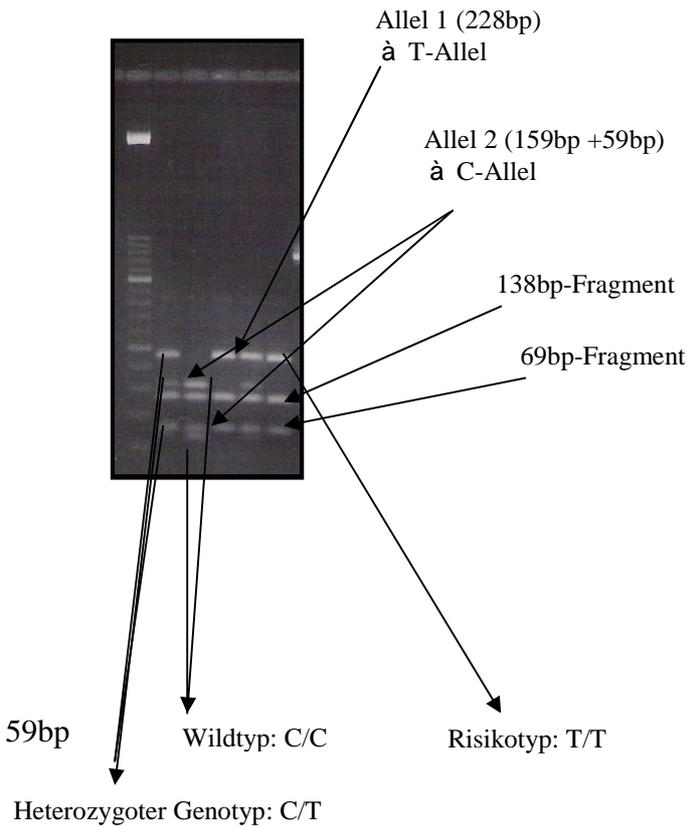
- ATR:** Die Differenzierung der Allele wurde wie folgt durchgeführt:

 - zunächst positiver Nachweis eines Fragments von 506bp bei allen Proben
 - bei Vorliegen von 250bp Fragmenten der Länge 506bp + 143bp + 55bp **à C-Allel**
 - bei Vorliegen von Fragmenten der Länge 506+ 198 bp **à A-Allel**



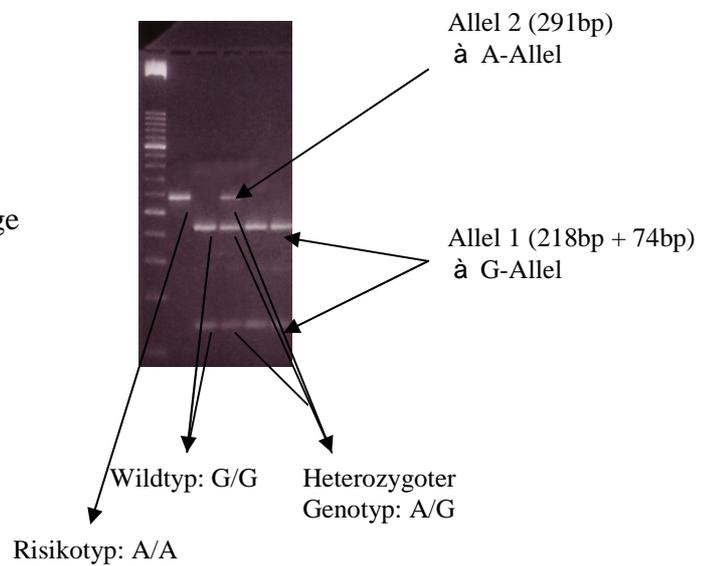
- Aldo-S:** Die Differenzierung der Allele wurde wie folgt durchgeführt:

 - zunächst positiver Nachweis von Fragmenten der Länge 138bp + 69 bp
 - bei Vorliegen von Fragmenten der Länge 138bp+ 69bp + 228bp
à **T-Allel**
 - bei Vorliegen von Fragmenten der Länge 138bp + 69bp + 159bp + 59bp
à **C-Allel**



- END1:** Die Differenzierung der Allele wurde wie folgt durchgeführt:

 - bei Vorliegen von Fragmenten der Länge 218bp+ 74bp
à **G-Allel**
 - bei Vorliegen eines Fragments der Länge 291bp
à **A-Allel**



4.8. Statistische Auswertung

Die statistische Datenanalyse fand am Institut für medizinische Informatik, Arbeitsgruppe medizinische Statistik, Leiter Dr. R.-H. Bödeker, bei Frau Marion Mann statt. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des SAS-Programms, Version 8.3 (SAS Institute, Cary, NC) durchgeführt.

Zur Überprüfung der Häufigkeitsverteilungen entsprechend der Hardy-Weinberg-Verteilung bei den verschiedenen Genotypen und Allelen wurden der χ^2 -Anpassungs-Test und Fisher's-exact-Test verwendet.

In der globalen Betrachtung der Entwicklung der Blutdruckvariablen wurden die dichotomen Parameter mit Kontingenztafeln deskriptiv beschrieben und mit Hilfe des Fisher's Exact Test auf mögliche Veränderungen überprüft. Für die stetigen Variablen wurde als Maß für den Zusammenhang der Wilcoxon-Rangsummen-Test angewendet

Um die Blutdruckentwicklung in Abhängigkeit von den Genotypen beurteilen zu können, wurde das Patientenkollektiv in Abhängigkeit von den Genotypen in drei Subgruppen unterteilt. Zum Vergleich der einzelnen Genotypgruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test für non-parametrische Variablen angewandt. Wurden, aufgrund zu geringer Gruppengrößen, einzelne Genotypen-Gruppen zusammengefasst, diente zum Vergleich dieser Gruppen der Mann-Whitney-U-Test. Dieser fand weiterhin Anwendung, um im Kruskal-Wallis-Test erkennbare Zusammenhänge der Genotypen mit der Blutdruckregulation zu überprüfen.

Weiterhin wurde eine logistische Regressionsanalyse mit festen Einflussfaktoren (mittlere Diabetesdauer, mittlerer HbA1c zum Zeitpunkt 2, Insulinbedarf zum Zeitpunkt 2, SDS-BMI) und variablen zusätzlichen prognostischen Faktoren, den Genotypen der jeweiligen Polymorphismen, durchgeführt.

Gemäß den Konventionen wurde das α -Fehler-Niveau bei zweiseitigen Signifikanztests auf 5% festgelegt. Im Falle von Mehrfachvergleichen erfolgte eine Bonferroni-Korrektur des Alpha-Fehlers. Bei einem α -Fehler von 10 % wurde eine Tendenz zu einem Zusammenhang zwischen den untersuchten Variablen angenommen.

5. Ergebnisse

5.1. Patienten-Charakteristika

Das Alter der Kinder lag zu den beiden Zeitpunkten der 24 h-Blutdruckmessungen im Median bei 12 bzw. 14 Jahren (diese und die im Folgenden genannten Patientendaten sind im Anhang in Tabelle 13 zusammengefasst dargestellt). Die mediane Diabetesdauer betrug durchschnittlich 44 Monate zum ersten und 70 Monate zum zweiten Messzeitpunkt. Der HbA1c stieg im Zeitverlauf von 7.3% auf 7.6% leicht an. Ähnlich verhielt sich der BMI, bei dem eine leichte Zunahme von 19.2 kg/m^2 auf 21.5 kg/m^2 zu beobachten war, entsprechend einem Anstieg BMI-SDS von 0.870 auf 1.040. Der Insulinbedarf hingegen blieb mit durchschnittlich 1.00 E/kg KG im üblichen Normbereich für Patienten mit einem Diabetes mellitus Typ 1. Die Konzentration des Cholesterins zeigte zum ersten bzw. zweiten Messzeitpunkt einen Wert von 176.00 mg/dl bzw. 173.00 mg/dl . Des Weiteren fanden sich zum Zeitpunkt 1 bei sechs Kindern und zum Zeitpunkt 2 bei fünf Kindern eine pathologische Albuminausscheidung ($> 30 \text{ mg/g Kreatinin}$), wobei die mittlere Urinalbumin-Konzentration 7.80 mg/g (Zeitpunkt 1) und 8.30 mg/g (Zp. 2) Kreatinin betrug. Eine manifeste Nephropathie bestand bei einem Patienten ($> 300 \text{ mg Albumin /g Kreatinin}$). Keiner der Patienten erhielt einen ACE-Hemmer oder eine antihypertensive Therapie.

Die dargestellten Patientendaten wurden mit Hilfe des DPV-Programms generiert, dokumentiert und in anonymer Form gespeichert (Schwab, Doerfer et al. 2006).

5.2. Globale Blutdruckanalyse

Zur Untersuchung der Entwicklung des Blutdrucks im Patientenkollektiv wurde unter anderem eine qualitative und eine quantitative Analyse unabhängig vom Einfluß der Polymorphismen durchgeführt, um unabhängig von ihrer Beeinflussung eine Aussage über die Blutdruckveränderungen im Zeitraum von zwei Jahren machen zu können. Die Ergebnisse dieser Analysen sind im Folgenden dargestellt.

5.2.1. Qualitative Analyse

In der qualitativen Analyse wurde der prozentuale Anteil pathologischer Blutdruckwerte der beiden Messzeitpunkte verglichen. Als pathologisch galt jeweils der Prozentsatz der Werte, die oberhalb der 95. Perzentile des Vergleichskollektivs von Soergel et al. (Soergel, Kirschstein et al. 1997) lagen.

In der vorliegenden Arbeit wurden das Vorliegen eines systolischen Dippings von weniger als 10 % und eines diastolischen Dippings von weniger als 20 % als pathologisch definiert.

Mit Hilfe des Fisher's-exact Test waren keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit pathologischer Blutdruckwerte zwischen den beiden Messzeitpunkten feststellbar ($p= 0.1537 - 0.9999$). Im Folgenden werden diese Ergebnisse im Hinblick aufgrund ihrer klinischen Relevanz kurz dargestellt.

Allgemein fiel auf, dass zu beiden Messzeitpunkten ein epidemiologisch relevanter Teil der Kinder pathologische Blutdruckwerte aufwies. Im Zeitverlauf nahm der Anteil der Patienten mit erhöhten Blutdruckwerten zu, wenn auch nicht statistisch signifikant. Einzige Ausnahme bildete das systolische Dipping. Bezüglich der Tagwerte stieg der Anteil der Patienten mit pathologischen Werten von 15.79 % ($n= 15$) auf 20 % ($n= 19$) für die systolische Messung, und von 5.26 % ($n= 5$) auf 7.37 % ($n= 7$) für die diastolische Messung an. Bei Untersuchung der Nachtwerte wurde eine ähnliche Entwicklung deutlich: Dem Anteil von 20 % ($n= 19$) der Patienten, die zum ersten Zeitpunkt der Messung pathologische systolische Nachtwerte aufwiesen, standen bei der zweiten Messung 34.74 % ($n= 33$) gegenüber, was eine signifikante Zunahme pathologischer Werte bedeutete (siehe Tabelle 15).

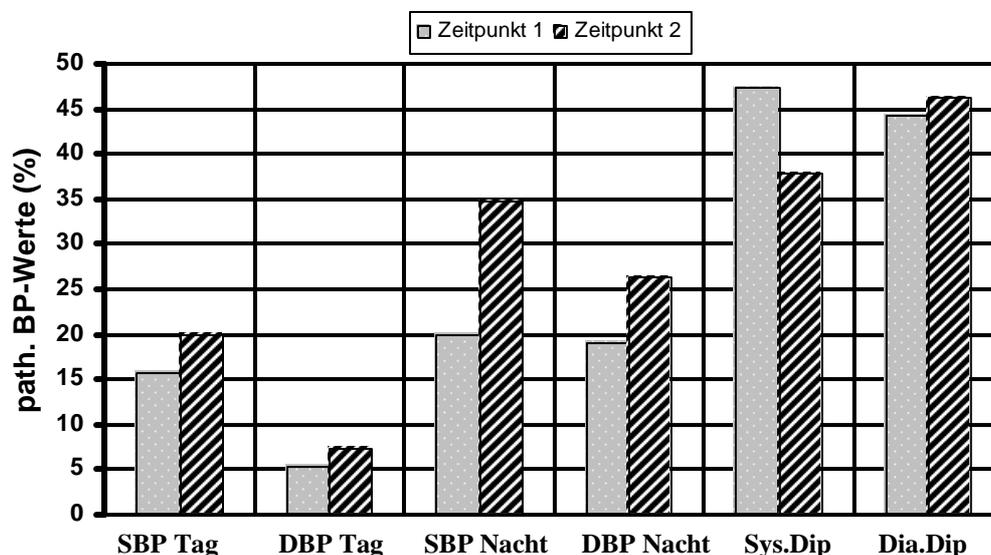


Abbildung 5-1: Prozentuale Anteile pathologischer Blutdruckparameter zu den Messzeitpunkten 1 und 2
 Angegeben ist jeweils der Prozentsatz der über der 95. Perzentile des Vergleichskollektivs gelegenen Blutdruckwerte der 95 diabetischen Patienten.

Bei der Analyse des diastolischen Nachtwertes war eine Zunahme pathologisch erhöhter Blutdruckwerte von 18.95 % ($n= 18$) auf 26.32 % ($n= 25$) feststellbar. Auch der Anteil der Patienten, die ein pathologisches diastolisches Dipping aufwiesen, nahm von 44.21 % ($n= 42$) auf 46.32 % ($n= 44$) zu. Im Gegensatz dazu war bezüglich des systolischen Dippings eine Abnahme pathologischer Werte von 47.37 % ($n= 45$) auf 37.89 % ($n= 36$) zu beobachten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl zum Zeitpunkt 1, als auch zum Zeitpunkt 2 ein bedeutsamer Teil der Kinder erhöhte Blutdruckparameter aufwies, wobei dieser Anteil im Zeitraum von zwei Jahren (mit Ausnahme des systolischen Dippings) zugenommen hatte. Am häufigsten fanden sich pathologische Werte bei der nächtlichen prozentualen Absenkung des diastolischen Blutdrucks zu beiden Zeitpunkten. Als direkte Messgröße des Blutdruck-Niveaus zeigte der systolische Nachtwert zu den beiden Messzeitpunkten am häufigsten pathologische Werte und wies, im Vergleich zu den übrigen Blutdruck-Parametern, die schlechteste Entwicklungstendenz auf.

Die Ergebnisse der globalen qualitativen Analyse sind im Anhang in Tabelle 15 dargestellt.

5.2.2. Quantitative Analyse

In der quantitativen Analyse wurden die systolischen und diastolischen Tag- und Nachtwerte in LMS-SDS-Werte transferiert, um so eine Aussage über das Ausmaß einer Werteänderung machen zu können. Zur objektiven Beurteilung der Blutdruckentwicklung wurden die Differenzen der LMS- bzw. der Dippingwerte jedes einzelnen Blutdruck-Wertes wie folgt gebildet:

$$\text{LMS bzw. Dip. Zp. 2} - \text{LMS bzw. Dip. Zp.1} = \text{Diff LMS-SDS bzw. Diff Dip.}$$

LMS/Dip.:LMS- bzw Dipping-Wert des Blutdruckparameters zum jeweiligen Messzeitpunkt

Zp.:Messzeitpunkt 1 oder 2

Diff LMS-SDS bzw. Diff Dip.: Differenz der einzelnen LMS-Werte angegebenen als Standardabweichungswert bzw. Differenz der Dipping-Werte in Prozent

Aus dem Ergebnis dieser Subtraktion konnte dann geschlossen werden, ob eine Veränderung eines Blutdruckparameters vorlag, welches Ausmaß diese Veränderung aufwies und in welche Richtung sie zeigte. Bei Vorliegen eines negativen Wertes konnte bezüglich der systolischen und diastolischen Tag- und Nachtwerte auf einen Abfall des Blutdrucks im Zeitverlauf geschlossen werden. Hingegen entsprach ein positiver Wert einem Anstieg des Blutdruck-Wertes. Bei der Bewertung des Dippings verhielt es sich umgekehrt: Hier zeigte ein negativer Differenzbetrag eine Reduktion des Dippings an, wohingegen ein positiver Wert einer Zunahme entsprach. Zur Beurteilung der Blutdruck-Entwicklung des Gesamt-Kollektivs wurden die Mediane der Diff-LMS-SDS-Werte bzw. der Diff-Dip.-Werte für die einzelnen Blutdruck-Parameter verglichen.

Statistisch war bezüglich der allgemeinen Blutdruckentwicklung im Wilcoxon-Rangsummen-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den LMS-Werten der beiden Messzeitpunkte

nachweisbar ($p= 0.3314 - 0.9032$). Im Folgenden sollen der Vollständigkeit halber die Differenzen der LMS-Werte aus den Blutdruck-Werten der Messzeitpunkte 1 und 2 in Abbildung 5-2 a-b graphisch dargestellt werden (die zugehörigen Werte sind in Tabelle 18 und Tabelle 19 im Anhang aufgeführt).

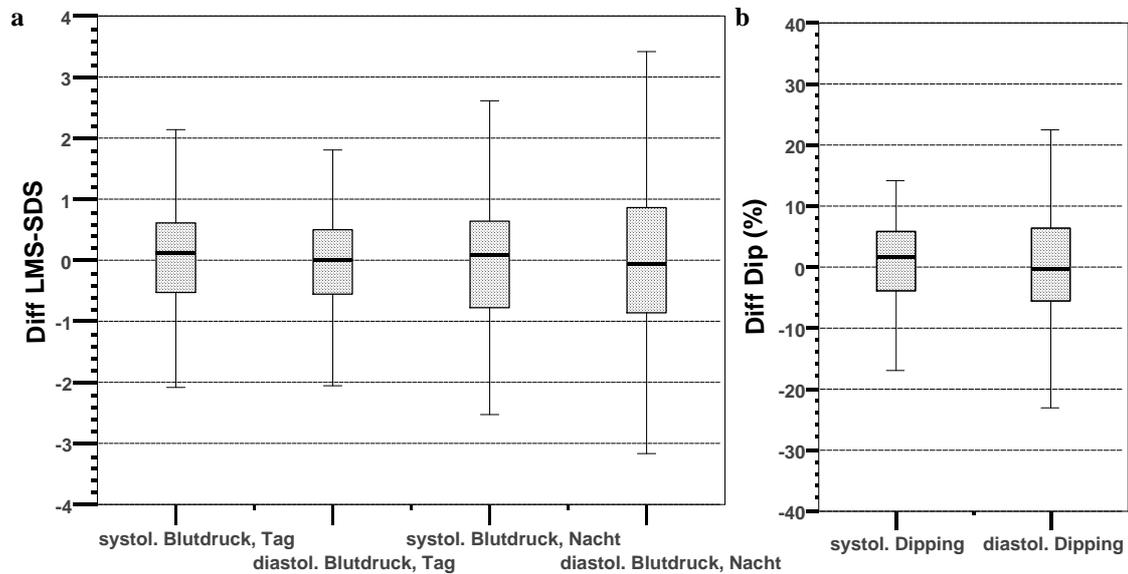


Abbildung 5-2 a-b: Differenzen der LMS- SDS- und der Dipping-Werte für das Gesamtkollektiv

Die Differenzen wurden aus den jeweiligen Werten der Messzeitpunkte 1 und 2 ermittelt. Systolischer Blutdruck (Tag und Nacht) und diastolischer Blutdruck (Tag und Nacht) sind als Diff-LMS-SDS-Werte, die Differenzen der systolischen und diastolischen Dippings als prozentuale Werte angegeben. Dargestellt ist jeweils der Median, das erste und dritte Quartil, sowie der minimale und maximale Wert.

5.3. Verteilung der Genotypen- und Allelfrequenzen

Die Überprüfung der Variablen mit Hilfe des Shapiro-Wilk's Test wies eine nonparametrische Verteilung nach. Die Verteilung der Polymorphismen entsprach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ($p= 0.6091 - 0.8678$) (Tiret and Cambien 1995). Die Genotypen der Polymorphismen waren hinsichtlich Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, BMI und HbA1c homogen. Eine Geschlechtsabhängigkeit der Blutdruckentwicklung war für keinen der Polymorphismen nachweisbar ($p > 0.05$).

Das untersuchte Patientenkollektiv und die Kontrollgruppe zeigten eine identische Verteilung der jeweiligen Genotypen- und Allelfrequenzen (Genotypfrequenz: $p= 0.0827 - 0.2604$; Allelfrequenz: $p=0.1098 - 0.9263$). Hinsichtlich des ACE I/D-Polymorphismus lag bei den Kindern mit Diabetes bzw. in der Kontrollgruppe eine vermehrte Heterozygotenrate vor. Die Verteilungen der Genotypen sowie der Allele in den Kollektiven sind im Anhang in Tabelle 2 dargestellt.

5.4. Einfluss der Gen-Polymorphismen auf die Entwicklung des Blutdrucks

5.4.1. Qualitative Analyse

Die Prävalenz pathologischer Blutdruckwerte am Tag bzw. in der Nacht oder eines pathologischen Dippings für den systolischen und diastolischen Blutdruck zu den jeweiligen Messzeitpunkten ist im Anhang, aufgegliedert nach den jeweiligen Genotypen, in den Tabellen 16 und 17 dargestellt.

5.4.2. Quantitative Analyse

Anhand der Differenzen der SDS-Werte wurde überprüft, ob in Abhängigkeit von den Genotypen der fünf untersuchten Polymorphismen eine differente Entwicklung der Blutdruckvariablen feststellbar war. Im Folgenden sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen, geordnet nach den Polymorphismen, dargestellt.

5.4.2.1. ACE

Für den ACE-Polymorphismus zeigte das systolische Dipping eine, vom D-Allel abhängige, Abnahme der nächtlichen Blutdruck-Absenkung (siehe Tabelle 20 im Anhang) an. Ein signifikanter Unterschied in der Genotyp-Verteilung (I/I vs. I/D vs. D/D) war nachweisbar ($p=0.0178$), wobei sowohl der heterozygote I/D-Genotyp (I/I vs. I/D; $U=447.000$; $p=0.020$), als auch der homozygote DD-Genotyp (I/I vs. D/D; $U=121.000$; $p=0.009$) signifikant mit einer Abnahme der SDS-Werten assoziiert waren.

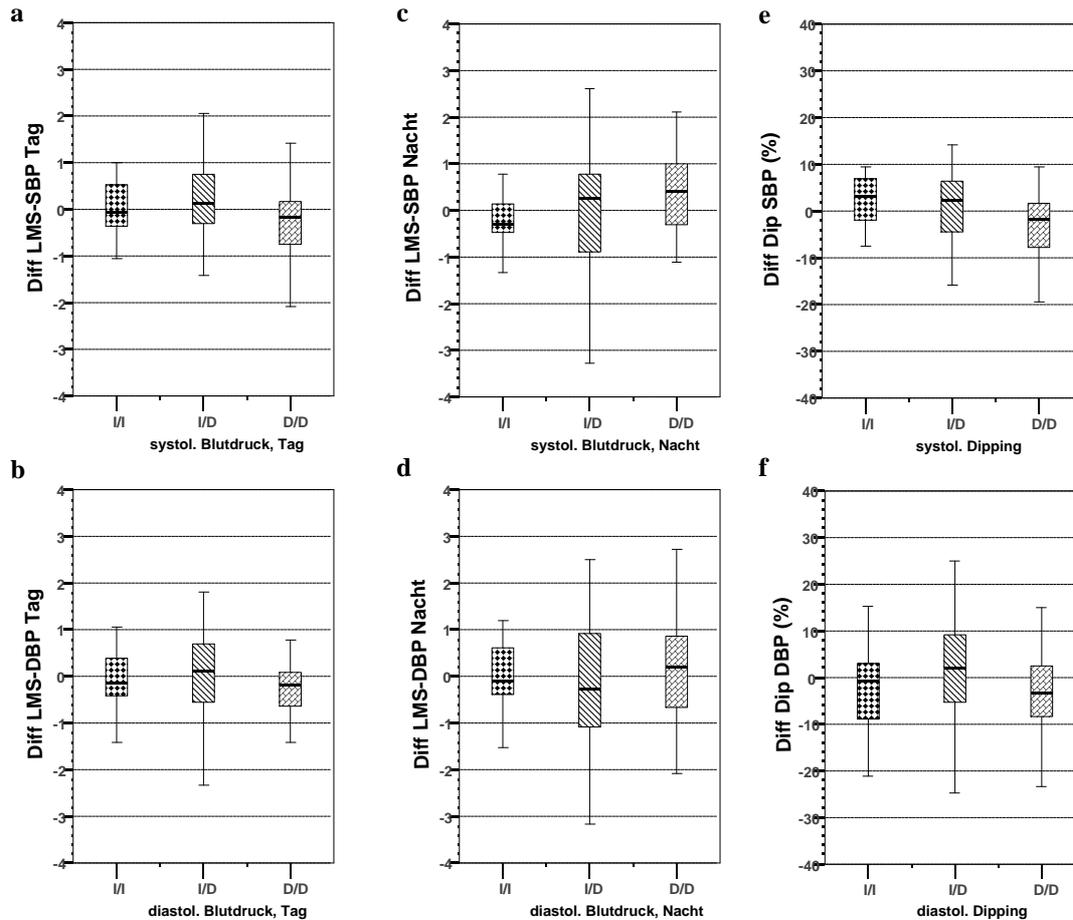


Abbildung 5-3 a-f: Differenzen der LMS-SDS- und Dipping-Werte für die Genotypen von ACE

Die Differenzen wurden aus den jeweiligen Werten der Messzeitpunkte 1 und 2 ermittelt. Systolischer Blutdruck (Tag und Nacht) und diastolischer Blutdruck (Tag und Nacht) sind als Diff-LMS-SDS-Werte, die Differenzen der systolischen und diastolischen Dippings als prozentuale Werte angegeben. Dargestellt ist jeweils der Median, das erste und dritte Quartil, sowie der minimale und maximale Wert.

Der systolische Nachtwert zeigte bei den Trägern des D-Allels eine Tendenz zur Entwicklung erhöhter SDS-Werte (I/I vs I/D vs D/D; $p=0.0642$). Diese Entwicklung war bezüglich der homozygoten Träger des Risiko-Allels als signifikant nachweisbar (I vs. D: $U=132.000$; $p=0.019$).

Eine ähnliche Entwicklungstendenz zeigte der nächtliche diastolische Blutdruck. Auch hier schien eine Erhöhung der Werte mit dem D-Allel assoziiert zu sein (siehe Tabelle 20 im Anhang). Eine Varianz in der Genotyp-Verteilung konnte aber nicht bestätigt werden (I/I vs I/D vs D/D; $p=0.1624$).

Bei der Analyse des diastolischen Dippings war eine starke Abnahme des diastolischen Dippings bei den D/D-Genotypen feststellbar. Eine differente Ausprägung des Blutdrucks in Abhängigkeit von den Genotypen konnte statistisch nicht nachgewiesen werden (I/I vs. I/D vs. D/D; $p=0.1207$).

Die übrigen Blutdruckparameter ließen keine von dem jeweiligen Genotyp abhängige Entwicklungstendenz erkennen (siehe Tabelle 20 im Anhang).

5.4.2.2. AGT

Allgemein konnte festgestellt werden, dass insbesondere die nächtlichen Blutdruckwerte vom T- zum C- Haplotyp abnahmen, so auch der systolische Nachtwert: Dieser zeigte eine Verringerung des Blutdruckwertes bei Vorliegen des C-Allells (siehe Tabelle 21 im Anhang). Im Vergleich der Diff-SDS-Werte ergab sich eine signifikante Varianz in der Genotyp-Verteilung ($p=0.0144$), wobei der homozygoten C/C-Genotyp (C/C vs. T/T-Genotypen) eine signifikante Tendenz zu einer Abnahme der Werte zeigte ($U=138.000$; $p=0.004$).

Im Vergleich der Diff-Werte der jeweiligen Genotypen war auch für das systolische Dipping ein Trend zu einer Zunahme des Dippings bei den Trägern des C-Allells zu beobachten (siehe Tabelle 21 im Anhang) (C/C vs T/C vs T/T: $p=0.0499$). Signifikant assoziiert mit einer Steigerung des Dippings war der homozygote Risikogenotyp (C/C vs. T/T: $U=159.000$; $p=0.015$).

Auch die Entwicklung des diastolischen Dippings und des Nachtwertes deutete eine, mit Auftreten des C-Allells, Tendenz zu einer Zunahme der nächtlichen Blutdruckabsenkung an. Der Vergleich der Diff-Werte (C/C vs. T/C vs. T/T) zeigte jedoch keinen belegbaren Unterschied in der Verteilung der Genotypen (diastolisches Dipping: $p=0.1895$; diastol Nachtwert: $p=0.5209$).

Die beschriebenen Blutdruck-Entwicklungen seien zur besseren Verdeutlichung im Folgenden in Abbildung 5-4 a-f graphisch dargestellt:

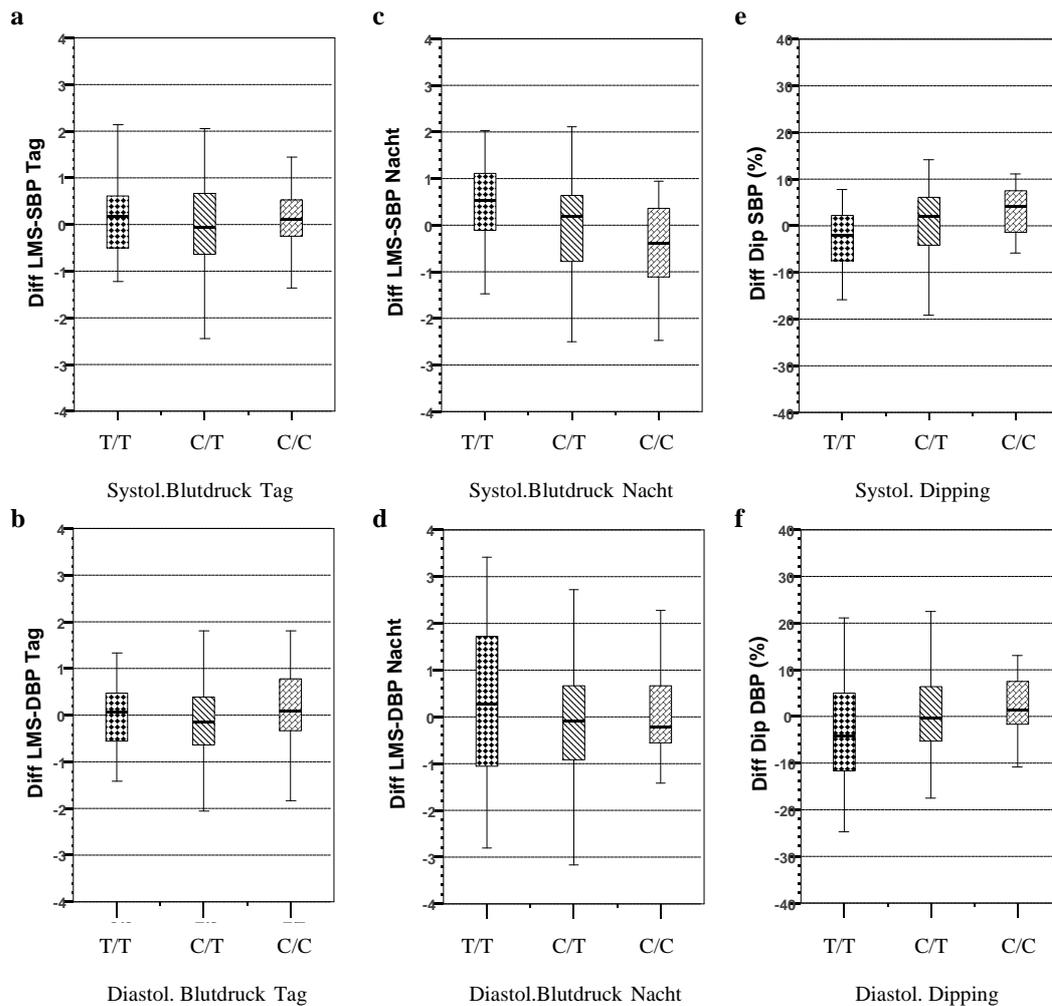


Abbildung 5-4 a-f: Differenzen der LMS-SDS- und Dipping-Werte für die Genotypen von AGT

Die Differenzen wurden aus den jeweiligen Werten der Messzeitpunkte 1 und 2 ermittelt. Systolischer Blutdruck (Tag und Nacht) und diastolischer Blutdruck (Tag und Nacht) sind als Diff-LMS-SDS-Werte, die Differenzen der systolischen und diastolischen Dippings als prozentuale Werte angegeben. Dargestellt ist jeweils der Median, das erste und dritte Quartil, sowie der minimale und maximale Wert.

Zusammenfassend lässt sich für den AGT-Polymorphismus sagen, dass das Vorliegen des C-Allels mit einer signifikanten Abnahme des systolischen Nachtwertes und einer Zunahme des systolischen Dippings assoziiert war.

Die Veränderungen der übrigen Blutdruck-Parameter zeigten bezüglich der Verteilung der Genotypen keine signifikanten Varianzen (siehe Tabelle 21 im Anhang).

5.4.2.3. ATR1

Bezüglich der Polymorphismen von ATR1 zeigte die Entwicklung des diastolischen Dippings einige Auffälligkeiten. Hier wiesen sowohl der A- als auch der C-Haplotyp eine numerische Zunahme des Dippings auf (siehe Tabelle 22 im Anhang), während im Gegensatz dazu für den heterozygoten Genotyp eine Abnahme der nächtlichen prozentualen Blutdruckabsenkung feststellbar war. Im Vergleich der Genotypen (A/A vs. A/C vs. C/C) konnte eine vom

Genotyp abhängige Veränderung des Blutdrucks allerdings nicht bestätigt werden ($p=0.6088$).

In den nachfolgenden Diagrammen soll die Blutdruckentwicklung der Genotypen noch einmal veranschaulichend dargestellt werden.

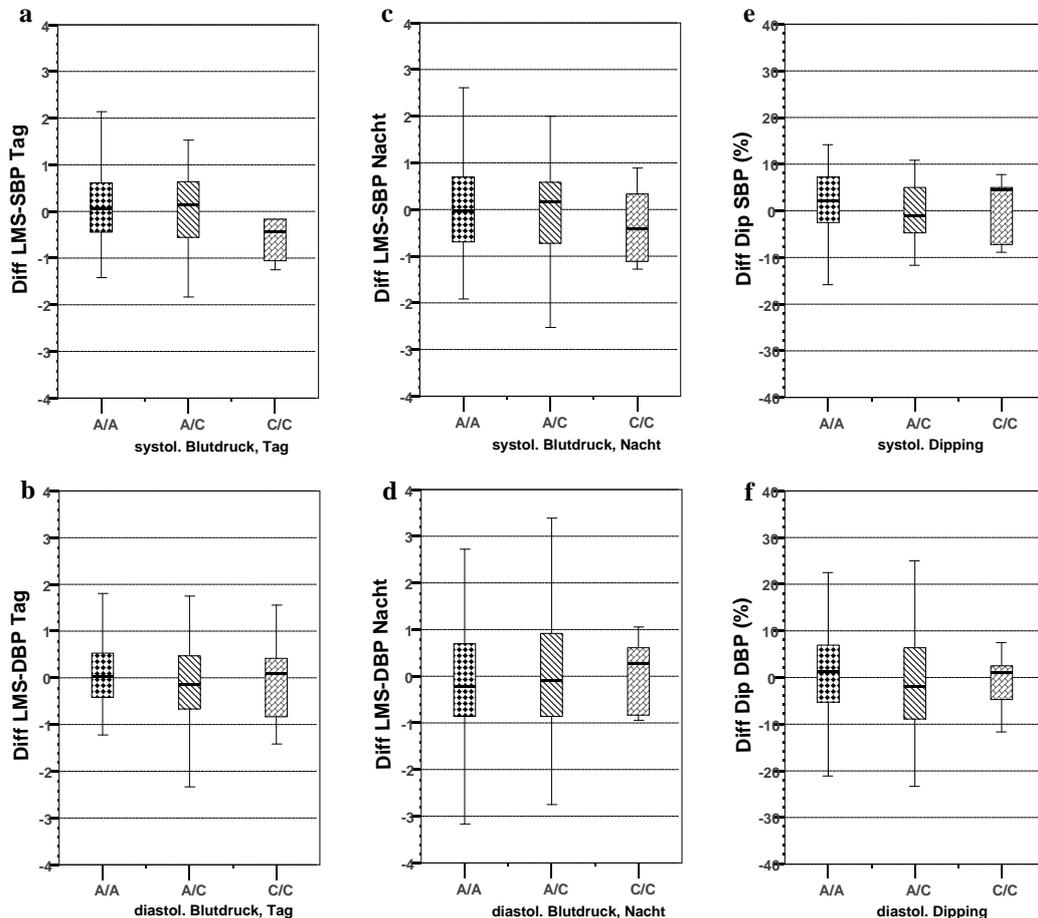


Abbildung 5-5 a-f: Differenzen der LMS-SDS- und Dipping-Werte für die Genotypen von ATR1

Die Differenzen wurden aus den jeweiligen Werten der Messzeitpunkte 1 und 2 ermittelt. Systolischer Blutdruck (Tag und Nacht) und diastolischer Blutdruck (Tag und Nacht) sind als Diff-LMS-SDS-Werte, die Differenzen der systolischen und diastolischen Dippings als prozentuale Werte angegeben. Dargestellt ist jeweils der Median, das erste und dritte Quartil, sowie der minimale und maximale Wert.

Für die übrigen Blutdruckparameter waren keine, vom jeweiligen Genotypen abhängige Entwicklungstendenzen, feststellbar (siehe Tabelle 22 im Anhang).

5.4.2.4. Aldo-S

Die Blutdruckentwicklung zeigte für die Träger des T-Allels in Bezug auf die Dipping-Werte eine positive Veränderung des Blutdrucks an. Die übrigen Parameter veränderten sich nur sehr geringfügig und zeigten keine vom Genotyp abhängige Entwicklungstendenz (siehe Tabelle 23 im Anhang).

Bezüglich des diastolischen Dippings konnte eine, von den jeweiligen Genotypen abhängige signifikante Varianz für die Werte-Entwicklung nachgewiesen werden (C/C vs. C/T vs. T/T;

$p= 0.0404$), wobei die homozygoten Träger des T-Allels signifikant mit einer Zunahme des Dippings assoziiert waren (C/C vs.T/T; $U= 81.000$; $p= 0.015$).

Auch das systolischen Dipping schien bei den hetero- und homozygoten Trägern des T-Allels am wenigsten eingeschränkt zu sein. Eine Varianz in der Genotyp-Verteilung konnte nicht nachgewiesen werden ($p= 0.2105$).

Nachfolgend ist die Entwicklung aller Blutdruck-Parameter unter der Beeinflussung der Genotypen des Aldo-Polymorphismus graphisch dargestellt.

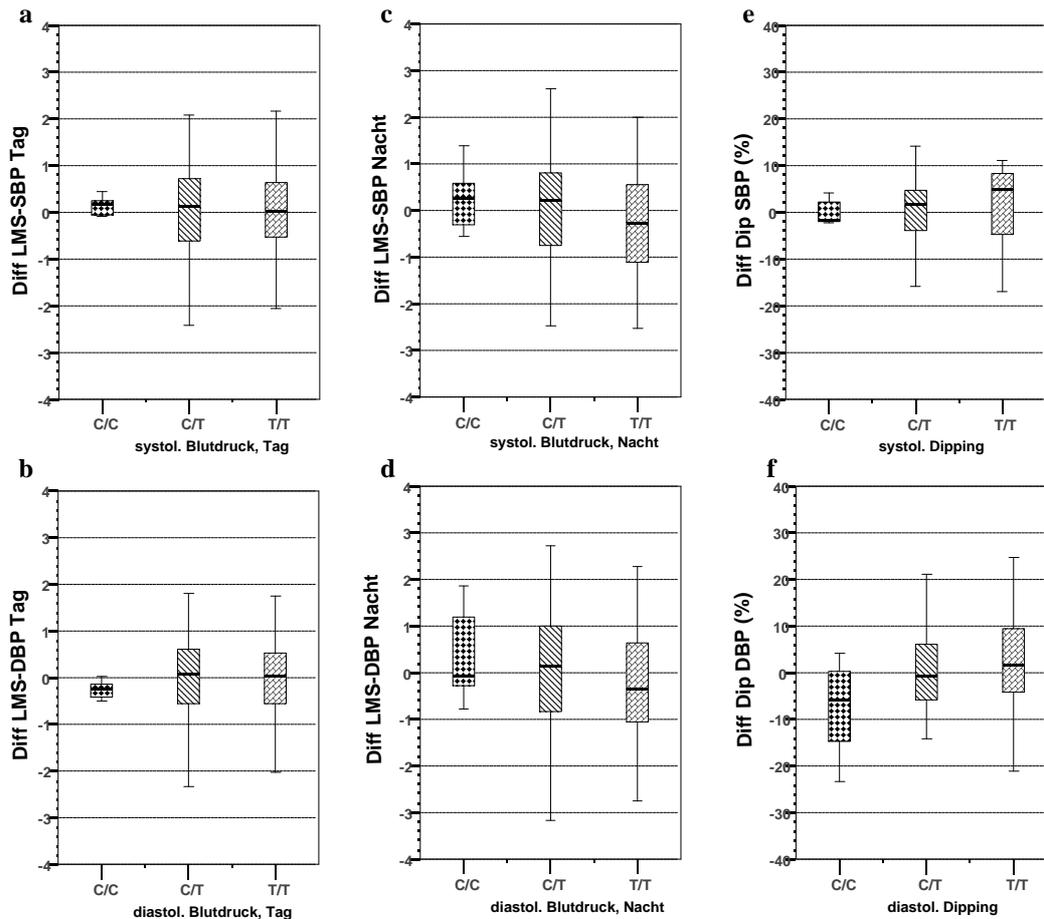


Abbildung 5-6 a-f: Differenzen der LMS-SDS- und Dipping-Werte für die Genotypen von Aldo-S

Die Differenzen wurden aus den jeweiligen Werten der Messzeitpunkte 1 und 2 ermittelt. Systolischer Blutdruck (Tag und Nacht) und diastolischer Blutdruck (Tag und Nacht) sind als Diff-LMS-SDS-Werte, die Differenzen der systolischen und diastolischen Dippings als prozentuale Werte angegeben. Dargestellt ist jeweils der Median, das erste und dritte Quartil, sowie der minimale und maximale Wert.

5.4.2.5. End1

Der End1-Polymorphismus zeigte eine von den Genotypen abhängige Veränderung des systolischen Tagwertes: Der TT-Genotyp wies einen Trend zu erhöhten SDS-Werten auf (siehe Tabelle 24 im Anhang), der G/T-Genotyp hingegen zeigte von allen Genotypen die am geringsten ausgeprägte Tendenz zu einer Zunahme der Blutdruckwerte. Eine Varianz in der Genotypverteilung (G/G vs G/T vs T/T) wurde nur angedeutet bestätigt ($p=0.0846$).

Die Entwicklung des systolischen und diastolischen Dippings ließ keine Assoziation mit dem T-Allel erkennen (G/G vs G/T vs T/T; Dip sys: $p=0.7207$; Dip dia: $p=0.7411$).

Zur Verdeutlichung der genannten Blutdruckveränderung, seien diese in den nachfolgenden Diagrammen noch einmal graphisch dargestellt.

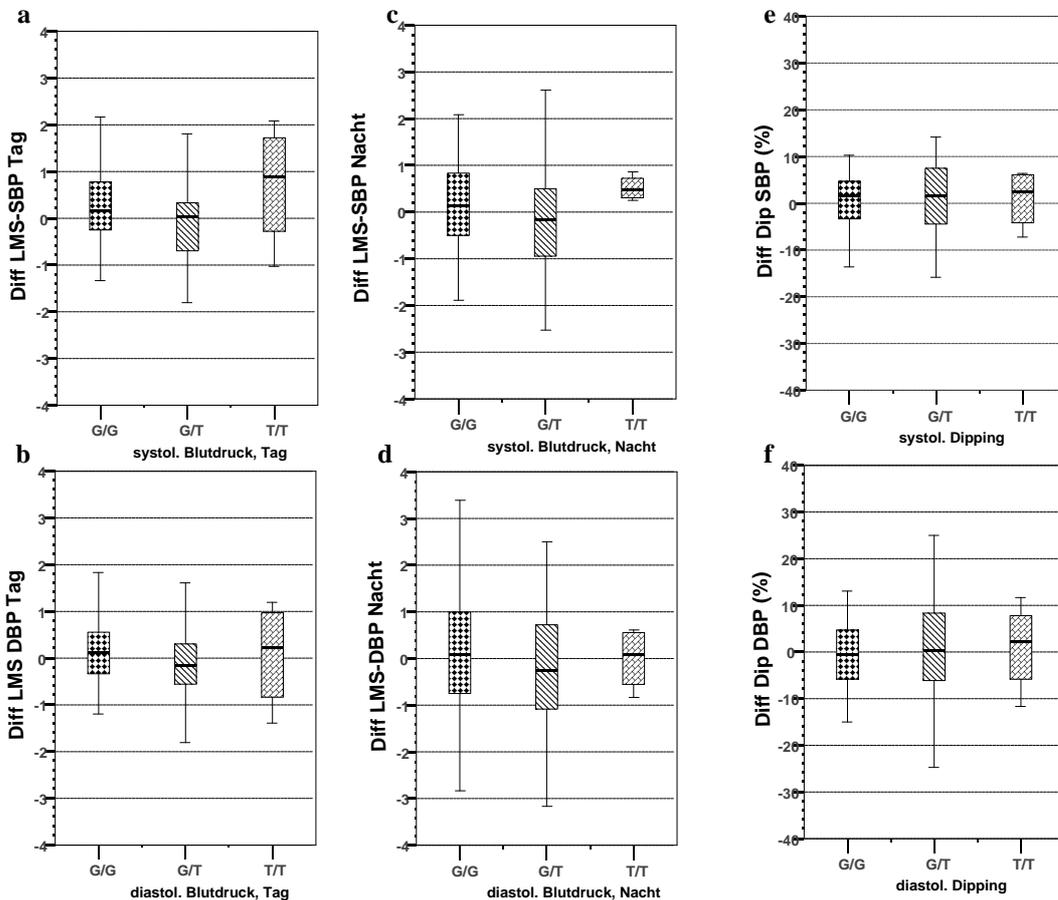


Abbildung 5-7 a-f: Differenzen der LMS-SDS- und Dipping-Werte für die Genotypen von End1

Die Differenzen wurden aus den jeweiligen Werten der Messzeitpunkte 1 und 2 ermittelt. Systolischer Blutdruck (Tag und Nacht) und diastolischer Blutdruck (Tag und Nacht) sind als Diff-LMS-SDS-Werte, die Differenzen der systolischen und diastolischen Dippings als prozentuale Werte angegeben. Dargestellt ist jeweils der Median, das erste und dritte Quartil, sowie der minimale und maximale Wert.

5.5. Logistische Regressionsanalyse

Die logistische Regressionsanalyse wurde mit festen Einflussfaktoren (mittlere Diabetesdauer, mittlerer HbA1c zum Zeitpunkt 2, Insulinbedarf zum Zeitpunkt 2, SDS-BMI) und variablen zusätzlichen prognostischen Faktoren, den Genotypen der jeweiligen Polymorphismen, durchgeführt. Die variablen Polymorphismen wurden zusätzlich in das Modell integriert, um einen Risikozuwachs bezüglich des Auftretens pathologischer Blutdruck-Werte für die jeweiligen Genotypen zu erhalten. Bei der Modellierung wurde der jeweilige Genotyp im Risikoverhalten auf den Wildtyp als Referenz bezogen, so dass Aussagen über einen Risikozuwachs von heterozygotem Risikotyp zu Wildtyp und

homozygotem Risikotyp zu Wildtyp möglich wurden. Bei den Polymorphismen End1 und ATR1 wurden aufgrund des geringen Auftretens des Risikotyps, dem Wildtyp als Referenz die hetero- und homozygoten Risiko-Genotypen zusammengefasst gegenübergestellt.

Die im Rahmen der logistischen Regressionsanalyse untersuchten Blutdruck-Parameter, waren zum einen das systolische und diastolische Dipping und zum anderen der diastolische Nachtwert. Die Auswahl dieser Parameter begründete sich insofern, als dass diese die Entwicklung einer Pathologie der Blutdruckregulation frühzeitig anzeigen. Im Folgenden sind die Polymorphismen, die in der Regressionsanalyse eine Entwicklungstendenz in Abhängigkeit von den jeweiligen Genotypen erkennen ließen, dargestellt.

5.5.1. AGT

Für AGT ergab sich in der Regressionsanalyse bezüglich des Auftretens einer Verringerung des systolischen Dippings, eine vom C- zum T-Allel angedeutet prognostisch günstige Tendenz (Odd's Ratio 0.334; 95% KI [0.091; 1.221]; $p= 0.0989$). Hingegen vom C- zum C/T-Genotyp ergab sich keine nachweisbare Entwicklungstendenz (Odd's Ratio 0.770; 95% KI [0.266; 2.228]; $p= 0.6294$). Die Regressionsanalysen zur Untersuchung des Risikos für das Auftreten einer Erhöhung des diastolischen Nachtwertes oder einer Abnahme des Dippings, wiesen keine relevanten Ergebnisse auf (siehe Tabelle 26 im Anhang).

5.5.2. Aldo-S

Für Aldo-S ergab sich, bezüglich des Auftretens einer Verringerung des diastolischen Dippings, eine prognostisch günstige Tendenz vom C- zum T-Haplotyp (Odd's Ratio 0.216; 95% KI [0.043; 1.085]; $p= 0.0628$). Vom C/C- zum C/T-Genotyp stellte diese sich nicht dar (Odd's Ratio 0.321; 95% KI [0.069; 1.499]; $p= 0.1483$). Bezüglich der übrigen untersuchten Blutdruckparameter ergab die Regressionsanalyse für diesen Polymorphismus keine weiteren Änderungen des Risikoverhaltens für die jeweiligen Genotypen (siehe Tabelle 28 im Anhang).

5.5.3. End1

Für den G/T- und T/T-Genotyp von End1 zeigte sich gegenüber dem G/G-Genotyp eine signifikante Abnahme des diastolischen Nachtwerts (Odd's Ratio 0.349; 95% KI [0.126; 0.971]; $p= 0.0438$). Die Analysen für die übrigen Blutdruck-Parameter lieferten negative Ergebnisse (siehe Tabelle 29 im Anhang).

Die Regressionsanalysen der ACE- und ATR1-Polymorphismen ergaben keine relevanten Ergebnisse (siehe Tabelle 25 (ACE) und Tabelle 27 (ATR1)).

6. Diskussion

6.1. Verteilung der Genotypen- und Allelfrequenzen

Die Verteilung der Genotypen- und Allelfrequenzen stimmte bei dem AGT-, ATR1, Aldo-S- und End1-Polymorphismus bezüglich des Patienten- und des Kontrollkollektivs überein. Auch stimmten die Verteilungsmuster der Genotypen und Allele der Polymorphismen mit den Ergebnissen anderer Studien überein (Pontremoli, Ravera et al. 2000; Asai, Ohkubo et al. 2001; Wojciechowska, Staessen et al. 2004).

Die Ursache für das Ungleichgewicht der Genotypen des ACE I/D-Polymorphismus in der Kontrollgruppe mit Überschuß an I-Allelen ist unklar. Eine methodische Ursache wäre, da das D-Allel einen Amplifikationsvorteil in der PCR besitzt nicht auszuschließen. Mit Hilfe der insertionsspezifischen PCR wurde dieser methodische Fehler aber ausgeschlossen (Shanmugam, Sell et al. 1993).

Da die Genotyp- und Allelfrequenz des Patientenkollektivs mit publizierten Daten anderer Studien (Marre, Jeunemaitre et al. 1997; Pontremoli, Ravera et al. 2000) übereinstimmt, kann der ACE-Polymorphismus in die Analyse der genetisch bedingten Variation des Blutdrucks mit einbezogen werden.

6.2. Globale Entwicklung des Blutdrucks

Die Studie belegt, dass bei Kindern und Jugendlichen mit insulinpflichtigem Diabetes mellitus schon nach kurzer Krankheitsdauer eine Erhöhung des Blutdrucks feststellbar ist (siehe Abbildung 5-1). Diese Erhöhung der Blutdruckwerte ist durch schon einleitend erwähnte Pathomechanismen begründet, die im Folgenden, bezogen auf das von uns untersuchte Patientenkollektiv, genauer erläutert werden sollen.

Feststellbar war, zu beiden Messzeitpunkten, bezüglich aller Blutdruckparameter eine Überschreitung der entsprechenden Grenzwerte bei einem Teil der Patienten (siehe Tabelle 15 im Anhang). Ursache hierfür könnten u.a. die Hyperglykämie-bedingten Veränderungen im Organismus sein. Die generelle Anhebung des Blutdrucks könnte Ausdruck einer Störung des Endokrins sein: Diese wird zum Symptomkomplex der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst und beinhaltet eine unter Hyperglykämie auftretende verminderte NO-Synthese und -Wirkung, sowie eine vermehrte Endothelin-Ausschüttung. Diese Dysfunktion bedingt eine Zunahme der vasokonstriktorischen Komponente des Gefäßsystems, was zu einer Anhebung des peripheren Blutdrucks führt, die nach längerem Zeitverlauf in Form einer Hypertonie manifest werden kann (Endemann und Schiffrin 2004).

Weiterhin fand sich zu beiden Messzeitpunkten bei einem klinisch relevanten Teil von Patienten, sowohl in der Tag-, als auch in der Nachtperiode (siehe Tabelle 15 im Anhang) ein Überschreiten der Referenzwerte des systolischen Blutdrucks. Hingegen ein oberhalb der Norm gelegener diastolischer Blutdruck war seltener feststellbar. Dem entsprechend machten auch andere Arbeitsgruppen diesbezüglich übereinstimmende Beobachtungen: So führten Holl et al. im Rahmen einer Studie mit 354 pädiatrischen IDDM-Patienten 24h-Blutdruckmessungen durch und kamen zu einem mit unserem Ergebnis konformem Resultat (Holl, Pavlovic et al. 1999). Die vordergründige Erhöhung des systolischen Blutdrucks könnte Ausdruck einer verminderten Compliance der elastischen Arterien sein (Brooks, Molyneaux et al. 2001), welche bei jugendlichen Diabetikern teilweise schon nach kurzer Krankheitsdauer feststellbar ist (Parikh, Sochett et al. 2000). Bei einem Teil der Patienten der Giessener Ambulanz fand sich eine funktionelle Störung der Vasomotorik als möglicherweise erstes Zeichen einer endothelialen Dysfunktion (Rosengarten, Dost et al. 2002). Ursache für diese Compliance-Störung könnte eine diabetische Neuropathie des autonomen Nervensystems sein, die zu einer Versteifung der Gefäße, somit zu einer Verminderung der Elastizität der Arterien und daraus folgend zu einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks führt (van Ittersum, Schram et al. 2004). Auch eine beginnende Arteriosklerose könnte zu einer Verminderung der Compliance beitragen, wobei dies vordergründig bei älteren Patienten anzunehmen wäre.

Dass auch bei einem Teil der Patienten eine Erhöhung des diastolischen Blutdrucks sowohl für die Tag-, als auch für die Nachtperiode (siehe Tabelle 15 im Anhang) erkennbar war, könnte durch die teilweise recht lange Krankheitsdauer (Maximum: bis 186 Monate) einiger Patienten begründet sein, da der diastolische Blutdruck mit zunehmender Krankheitsdauer Störungen in der Regulation aufweist, wie Holl et al. in einer neun Jahre andauernden Studie bewiesen (Holl, Pavlovic et al. 1999). Dies erklärt auch die Zunahme pathologischer diastolischer Blutdruckwerte zwischen den Messzeitpunkten eins und zwei.

Sowohl das diastolische, als auch das systolische Dipping waren bei einem großen Anteil der Patienten (siehe Tabelle 15 im Anhang) beeinträchtigt. Somit stellte das Dipping den sensitivsten Parameter für eine gestörte Blutdruckregulation im 24h-Blutdruckprofil dar, welcher schon zu Beginn einer hypertonen Genese Veränderungen erkennen ließ. Ebenso zeigte der systolische und diastolische nächtliche Blutdruck gehäuft erhöhte Werte. Übereinstimmende Erkenntnisse zeigte auch eine Untersuchung von Madacsy et al. (Madacsy, Yasar et al. 1994). Sie führten eine Studie mit 28 an Diabetes erkrankten Kindern ohne Mikroalbuminurie durch, bei denen, ebenso wie in unseren Untersuchungen, eine

Erhöhung der nächtlichen Blutdruckwerte festgestellt wurde. Daraus könnte geschlossen werden, dass eine Anhebung des Blutdruckniveaus, auch ohne Überschreitung der entsprechenden Grenzwerte, schon frühzeitig eine klinisch (noch) nicht apparente Nierenschädigung anzeigt. Somit könnte eine solche Blutdruckerhöhung einen Frühmarker für eine beginnende Nephropathie darstellen. In der Literatur wird eine Störung der zirkadianen Blutdruckregulation als typisches Zeichen einer renal bedingten Hypertonie, bzw. als Anzeichen einer beginnenden Nephropathie beschrieben (Hansen, Mau Pedersen et al. 1992; Torffvit und Agardh 1993; Lurbe, Redon et al. 2001). Im Rahmen einer diabetischen Nephropathie ist die verminderte zirkadiane Blutdruckregulation Ausdruck einer gestörten intrarenalen Hämodynamik mit Aktivierung des lokalen RAAS. Die gestörte zirkadiane Regulation des Blutdrucks könnte auch Hinweis auf eine klinisch asymptomatische kardiale diabetische Neuropathie sein (Monteagudo, Nobrega et al. 1996; Duvnjak, Vuckovic et al. 2001). Die autonome diabetische Neuropathie tritt bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 häufig (Bretzel 2000), auch schon nach kurzer Krankheitsdauer, auf. Durch die relative Dominanz des Sympathikus zu Beginn der diabetischen Neuropathie wird zum einen eine direkte Erhöhung des peripheren Widerstandes bedingt und zum anderen auch indirekt durch eine Aktivierung des RAAS (Perin, Maule et al. 2001). Allerdings zeigt die diabetische Neuropathie neben der Krankheitsdauer einen engen Bezug zur metabolischen Einstellung (Chessa, Butera et al. 2002). Unsere Daten ließen keinen Bezug zwischen einer gestörten Blutdruckregulation und metabolischen Parametern erkennen.

Ein Beleg für die nur geringe Verschlechterung des Blutdruckverhaltens während des Zeitraums von zwei Jahren ist, dass in der quantitativen Analyse keine statistische Signifikanz mit Ausnahme des SBP nachts, nachgewiesen werden konnte. Begründend hierfür könnte eine zu kurze Dauer der Studie gewesen sein. So beschrieben Holl et al. (Holl, Pavlovic et al. 1999) im Rahmen einer 9-jährigen Langzeitstudie, dass die Blutdruck-Tagwerte auch nach 4-jähriger Dauer keine Veränderungen erkennen ließen. Weiterhin könnte eine im Durchschnitt eventuell zu kurze Diabetesdauer die geringen Blutdruckveränderungen erklären. So fanden Holl et al. (Holl, Pavlovic et al. 1999) eine Assoziation zwischen der Krankheitsdauer und Veränderungen des Blutdrucks, wobei die mittlere Krankheitsdauer in dieser Studie 5,6 Jahre \pm 5,0 Jahre betrug. Die mittlere Krankheitsdauer in der vorliegenden Studie im Median lediglich 44 Monate betrug, was auch eine Erklärung für die nur geringe Ausprägung der Änderungen der Blutdruckwerte sein könnte. Weiterhin könnte auch die verhältnismäßig gute Stoffwechseleinstellung (siehe Tabelle 13 im Anhang) der Patienten die nur leichten Veränderungen der Blutdruckwerte erklären. Auf diese Weise wurden diabetische

Risikofaktoren, die wesentlich zu der Pathologie einer Hypertonie beitragen, stark minimiert, und somit die Wahrscheinlichkeit für eine frühzeitige Entwicklung einer arteriellen Hypertension vermindert.

Dennoch könnten auch die geringen Zunahmen der Blutdruckwerte im Zeitraum zwischen den beiden Messzeitpunkten, auf ein Fortschreiten der diabetischen Erkrankung und der damit u.a. verbundenen Hypertonie hindeuten

6.3. Entwicklung des Blutdrucks unter Beeinflussung der Polymorphismen

Genetische Polymorphismen sind, mit zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnissen, auf ihre Bedeutsamkeit für eine erbliche Prädisposition der Entwicklung einer Hypertonie untersucht worden. In dieser Studie wurden Polymorphismen zum einen von Komponenten des RAAS, wie der I/D-Polymorphismus von ACE, der c.704T>C-Polymorphismus von AGT, der c.1166 A>C-Polymorphismus von ATR1 und der c.-344 C>T-Polymorphismus von Aldo-S und zum anderen von einer Komponente des Endothelin-Systems, dem g.5665G>T-Polymorphismus von Endothelin 1, untersucht. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Studie geordnet nach den Polymorphismen diskutiert werden.

6.3.1. ACE

Bei der Untersuchung des ACE-Polymorphismus konnte das Risiko-Allel als bedeutsam für eine Verschlechterung des systolischen nächtlichen Blutdrucks, als auch des systolischen Dippings nachgewiesen werden. Ein schwacher Bezug zwischen dem Polymorphismus und einer Verschlechterung des diastolischen Blutdrucks wurde weiterhin deutlich.

Die beschriebenen Veränderungen der Blutdruckwerte bei den Risiko-Genotypen könnten auf die durch das D-Allel bedingte Erhöhung des ACE-Spiegels zurückzuführen sein. Eine Erhöhung des ACE-Spiegels führt unter anderem zu einer höheren interindividuellen Variabilität des Blutdrucks und beeinflusst die Genese der primären und sekundären arteriellen Hypertonie und den Verlauf Hypertonie-assoziiierter Endorganschäden (Fornage, Amos et al. 1998; O'Donnell, Lindpaintner et al. 1998; Soubrier 1998).

Die dargestellten Ergebnisse dieser Studie lassen vordergründig eine gestörte zirkadiane Blutdruckvariabilität bei den Trägern des Risiko-Allels erkennen. Ursächlich für diese Blutdruckerhöhung könnte eine klinisch noch nicht apparente diabetische Nephropathie sein. Eine renal bedingte Hypertonie äußert sich zu Beginn der Erkrankung typischerweise in einer Verminderung des nächtlichen Blutdruckabfalls (Middeke und Schrader 1994). Speziell im Zusammenhang mit dem ACE-I/D-Polymorphismus ist insofern eine diabetische

Nephropathie als Ursache einer Störung der Blutdruckregulation möglich, als dass das D-Allel als ein entscheidender Risikofaktor sowohl für die Entstehung und Progression einer diabetischen Nephropathie bekannt ist (Kennon, Petrie et al. 1999; Vleming, van der Pijl et al. 1999; Azar, Zalloua et al. 2001; Hadjadj, Belloum et al. 2001; Soergel und Schaefer 2002). Die Ursachen hierfür sind vielfältig. Von großer Bedeutung für das gehäufte Auftreten der diabetischen Nephropathie bei Trägern des Risiko-Allels ist unter anderem, die bei I/D- und D/D-Genotypen feststellbare Erhöhung des renalen Gefäßwiderstandes. Diese bedingt eine Zunahme des intraglomerulären Drucks, was zu einer Schädigung der Glomeruli führt (Fukumoto, Ishimura et al. 1996). Diese pathologischen Veränderungen werden durch die vermehrte Konversion von Ang I zu Ang II, eine Folge des erhöhten ACE-Spiegel, verstärkt. Die vermehrte Synthese von Ang II führt zusätzlich zu einer Erhöhung des intraglomerulären Drucks und somit zur einer Nephropathie (Marre, Bouhanick et al. 1999). Diese Schädigung äußert sich unter anderem in einer bei Trägern des D-Allels gehäuft feststellbaren Verminderung der GFR und des renalen Plasmaflusses (Miller, Scholey et al. 1997). Entscheidend für Diabetiker ist, dass Träger des D-Allels während Hyperglykämien in besonderem Maße anfällig sind für eine Schädigung der Nieren. Begründet ist dies dadurch, dass eine Erhöhung des Blutzuckers eine präglomeruläre Vasodilatation bedingt, welche zu einer verstärkten Durchblutung, und damit Druckbelastung, des Glomerulums führt. Die dabei wirkenden Scherkräfte führen zu einer glomerulären Schädigung und nach langer Krankheitsdauer zu einer Glomerulosklerose. Bei Trägern des I-Allels sind diese Hyperglykämie-induzierten Veränderungen an den renalen Gefäße nicht festzustellen, was einen besseren Schutz der Niere bedeutet (Marre, Bouhanick et al. 1999).

Die Störung der zirkadianen Blutdruckvariabilität könnte weiterhin Ausdruck einer beginnenden autonomen Dysfunktion sein (Ikeda, Matsubara et al. 1993), jedoch findet sich bislang kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des I- oder D-Allels und der Entwicklung bzw. der Progression der diabetischen Neuropathie.

Weiterhin könnte die Erhöhung des Blutdrucks durch den, aus dem erhöhten ACE-Spiegel resultierenden, vermehrten Abbau des Bradykinins bedingt sein. Bradykinin ist ein Peptid, welches in die Gruppe der Kinine einzuordnen ist und bei Freisetzung zu einer ausgeprägten Gefäßdilatation führt (Kreutzig 2000). Da ACE Bradykinin abbaut, führt der erhöhte ACE-Plasmaspiegel bei Trägern des D-Allels zu einer Verminderung des verfügbaren Bradykinins, was zu einer Einschränkung der Vasodilatation (van der Kleij, de Jong et al. 2002; Jalil, Palomera et al. 2003) und damit zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt.

Die Einschränkung der Vasodilatation ist weiterhin begründet durch die, gehäuft bei Trägern des D-Allels nachweisbare, endotheliale Dysfunktion (Butler, Morris et al. 1999). So ist bei Trägern des Risiko-Allels eine Abschwächung der NO-vermittelten Vasodilatation bei jungen gesunden Männern feststellbar. Auch die durch Acetylcholin bedingte Vasodilatation zeigt eine Abschwächung bei I/D- und D/D-Genotypen. Dies ist insofern zu erklären, als durch die schon geschilderte Hydrolyse des Bradykinins unter anderem die Rezeptor-vermittelte NO-Freisetzung vermindert wird. Des Weiteren bedingt die Erhöhung des ACE-Spiegels eine vermehrte Ang II-Synthese, woraus eine Freisetzung von Superoxiden resultiert. Diese Superoxide setzen die Bioaktivität von NO herab (Butler, Morris et al. 1999).

Zu einer Verminderung der Vasodilatation führt weiterhin die bei Trägern des D-Allels nachweisbare Abnahme des Angiotensin-(1-7). Angiotensin-(1-7) ist ein Enzym des RAAS und wird durch eine gewebeständige Peptidase aus Angiotensin I und II abgespalten. Physiologisch hat Angiotensin-(1-7) vasodilatatorische Eigenschaften und trägt somit zur Senkung des Blutdrucks bei. Unter einem erhöhten ACE-Plasma-Spiegel wird Angiotensin-(1-7) rapide hydrolysiert und kann so seine Wirkung nicht mehr entfalten, was zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt (Jalil, Palomera et al. 2003).

Die teilweise undeutliche Darstellung einer Blutdruckerhöhung könnte insofern begründet sein, als dass die Variabilität des Blutdrucks teilweise geschlechtsabhängig ist. So beschrieben O'Donnell et al. (O'Donnell, Lindpaintner et al. 1998) den ACE-Polymorphismus als eine genetische Variabilität, die lediglich geschlechtsspezifisch zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt. Sie konnten eine mit dem ACE-Locus assoziierte Hypertension nur bei männlichen, nicht aber bei weiblichen Patienten feststellen. Dieser Zusammenhang war im Rahmen unserer Studie nicht feststellbar. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass eine Geschlechtsabhängigkeit erst bei Vergrößerung des Patientenkollektivs deutlich erkennbar würde. Somit könnte sich die geschlechtsabhängige Variabilität des Blutdrucks aufgrund der Größe unseres Kollektivs (95 Patienten; 50 männlich, 45 weiblich) nicht darstellen. Weiterführende Untersuchungen mit größeren Patientenkollektiven sollten diesen Sachverhalt klären.

Die nur andeutungsweise erkennbare Erhöhung des nächtlichen diastolischen Blutdrucks bei den I/D- und D/D-Genotypen könnte weiterhin durch die pathologische Wirkung des D-Allels bedingt sein. Übereinstimmende Beobachtungen wurden auch in Studien mit pädiatrischen diabetischen Patienten gemacht: So beschrieben Pavlovic et al. eine Erhöhung des diastolischen nächtlichen Blutdrucks (als auch des systolischen) bei Kindern mit Typ 1 Diabetes. Diese Störung der zirkadianen Blutdruckregulation führten Pavlovic et al. auf eine

klinisch noch inapparente diabetische Nephropathie oder auf eine beginnende autonome Neuropathie zurück (Pavlovic, Holl et al. 1999), wobei diesbezüglich noch immer Unklarheit besteht.

Bezüglich des nicht eindeutig nachzuweisenden Zusammenhangs zwischen dem Polymorphismus und der Änderung des diastolischen Blutdrucks muss beachtet werden, dass diese Assoziation eine Altersabhängigkeit zeigt: So beschrieben Rudnichi et al. (Rudnichi, Safar et al. 2004) eine Verstärkung des Einflusses des ACE-Polymorphismus auf den diastolischen Blutdruck bei Patienten, die das 50. Lebensjahr überschritten hatten. So wäre möglich, dass in der vorliegenden Studie ein Einfluß des Polymorphismus auf den diastolischen Blutdruck teilweise nur schwach bzw. bezüglich des Dippings, gar nicht erkennbar war, da das Durchschnittsalter der in die Studie eingeschlossenen Kinder und Jugendlichen zu gering war. So könnte aus genannten Gründen die Assoziation des D-Allels mit dem diastolischen Blutdruckwert (noch) nicht nachweisbar gewesen sein.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass die pathologische Erhöhung des Blutdrucks bei Trägern des D-Allels auf diabetische Folgeerkrankungen wie die diabetische Nephro- und Neuropathie zurückgeführt werden könnte. Auch könnte eine Störung der Vasodilatation durch den Abbau vasodilatatorischer Mediatoren und eine endotheliale Dysfunktion, welche bei Trägern des D-Allels gehäuft auftritt, die Progression der hypertonen Blutdruckentwicklung erklären.

6.3.2. AGT

In der Untersuchung einer Assoziation des AGT-Polymorphismus und einer Progression einer arteriellen Hypertension zeigte sich in der vorliegenden Studie eine für den Risiko-Genotyp positive Entwicklung bezüglich des systolischen Blutdrucks nachts und des systolischen Dippings. Diese Entwicklungstendenz wurde in der Regressionsanalyse bestätigt. Eine Verbesserung des diastolischen Dippings in Abhängigkeit von dem Auftreten des Risiko-Allels war nur andeutungsweise feststellbar.

Ein hiermit übereinstimmendes Ergebnis zeigte die Studie von Mondy et al.: Auch sie beschrieben eine Verminderung des Risikos der Entstehung einer Hypertonie bei C/C-Genotypen (Mondry, Loh et al. 2005). Dem Risiko-Allel kam in dieser Studie, mit unseren Ergebnissen konform, eine Schutzfunktion bezüglich einer Erhöhung des peripheren Blutdrucks zu. Eine Vergleichbarkeit unserer Studie und der Mondry's war insofern gegeben, als dass sowohl die Methodik, als auch die Studien- und Kontrollpopulation der unsrigen sehr ähnlich waren. Die Genotypisierung erfolgte in beiden Studien mittels PCR, so dass hier eine

grundlegende Übereinstimmung gewährleistet war. Bezüglich der Studien- und Kontrollpopulationen bestand insofern eine gute Vergleichbarkeit, als dass die Studienpopulation von Mondry et al. u.a. Typ 1 Diabetiker beinhaltete und sich die Kontrollgruppe, ebenso wie die unsrige, aus Blutspendern zusammensetzte. Anzumerken ist auch, dass sowohl die Studien-, als auch die Kontrollpopulation deutscher Abstammung war, so dass ethnische Variabilitäten ausgeschlossen werden konnten. So ist zusammenfassend festzustellen, dass, aufgrund der Ähnlichkeiten der Methodik und der Kontroll- und Patientenkollektive, eine Vergleichbarkeit der beiden Studien gewährleistet ist. Die von uns nachgewiesene Schutzfunktion des C-Risiko-Allels bezüglich der Weiterentwicklung einer arteriellen Hypertension wurde somit von Mondry et al. bestätigt.

Diesen Erkenntnissen widersprechend wird das C-Allel in der Literatur mehrfach als genetische Prädisposition für eine arterielle Hypertension angesehen: So beschrieben Petrovic et al. (Petrovic, Bidovec et al. 2002) in einer Studie mit 57 Kindern- und Jugendlichen im Alter von 8-19 Jahren eine Assoziation zwischen dem Risiko-Allel des AGT-Polymorphismus und der Entwicklung einer essentiellen Hypertonie. Übereinstimmend zu diesem Ergebnis fanden auch Procopciuc et al. (Procopciuc, Popescu et al. 2002) und Pereira et al. (Pereira, Mota et al. 2003) einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des C-Allels und der Entwicklung einer Hypertonie. Auch andere Studien zeigten damit übereinstimmende Erkenntnisse (Caulfield, Lavender et al. 1994; Petrovic, Bidovec et al. 2002; Procopciuc, Popescu et al. 2002; Luther, Bantis et al. 2003; Sethi, Nordestgaard et al. 2003).

Im Gegensatz hierzu konnten andere Untersuchungen keine relevante Assoziation zwischen dem AGT-Polymorphismus und einer arteriellen Hypertension nachweisen: So zeigte eine Untersuchung mit 199 jugendlichen Typ I Diabetikern (mittleres Alter 16.5 Jahre) von Pavlovic et al. (Pavlovic, Holl et al. 1999) keinen Zusammenhang zwischen dem jeweiligen AGT-Genotyp und dem Auftreten erhöhter Blutdruckwerte. Auch im Rahmen anderer Studien konnte kein relevanter Bezug zwischen dem AGT-Polymorphismus und der Blutdruckregulation nachgewiesen werden (Fornage, Turner et al. 1995; Fernandez-Llama, Poch et al. 1998; Niu, Yang et al. 1999; Rodriguez-Perez, Rodriguez-Esparragon et al. 2000; Lovati, Richard et al. 2001).

Für die Kontroverse hinsichtlich der Bedeutung dieser genetischen Variabilität könnte vordergründig erklärend der multifaktorielle Ursprung der arteriellen Hypertonie sein. So beeinflussen neben den genetischen Komponenten auch das Alter, das Gewicht, das Geschlecht, die Ernährungsgewohnheiten und auch die körperliche Aktivität ihre Pathogenese (Pereira, Mota et al. 2003). Letzteren Einflußfaktor wiesen Ortlepp et al. nach: So stellten sie

in einer Studie bei den Trägern des Risiko-Allels einen in Ruhe höheren Blutdruck, als bei Trägern des Wild-Allels, fest. Dieser Differenz des Blutdruckwertes war unter körperlicher Aktivität nicht mehr nachweisbar (Ortlepp, Metrikat et al. 2003).

Die Bedeutung des Körpergewichts für die Pathogenese einer arteriellen Hypertonie, speziell für den AGT-Polymorphismus, verdeutlicht eine Untersuchung von Petrovic et al.: In dieser Studie, durchgeführt mit 57 Kindern im Alter von 8-19 Jahren, zeigte sich bei Zunahme des Körpergewichts eine verstärkte Assoziation des C-Risiko-Allels mit einer Erhöhung des Blutdrucks (Petrovic, Bidovec et al. 2002). Die in unsere Studie integrierten Kinder und Jugendlichen wiesen zu beiden Messzeitpunkten einen im Median erhöhten BMI auf (siehe Tabelle 13 im Anhang). Doch trotz des erhöhten BMI war bei den Kindern und Jugendlichen keine Assoziation zwischen dem Risiko-Allel und der Entwicklung eines Hypertonus zu beobachten. Dies könnte dadurch begründet sein, dass der Einfluss eines erhöhten BMI auf die Entwicklung eines Hypertonus bei Trägern des C-Allels möglicherweise nur relativ gering ist. So könnte seine Auswirkung sich nur bei einer massiven Erhöhung des BMI zeigen. Möglicherweise war der BMI bei den von uns untersuchten Kindern und Jugendlichen nicht in einer solch starken Weise erhöht, als dass daraus eine Aggravation der hypertone Pathogenese hätte folgen können.

Auch ist der Einfluss des Alters auf die Pathogenese der Hypertonie zu berücksichtigen: Da die Mehrzahl der Studien, die eine positive Korrelation des Polymorphismus mit erhöhten Blutdruckparametern nachwiesen, an Erwachsenen durchgeführt wurden (Petrovic, Bidovec et al. 2002; Pereira, Mota et al. 2003), sollte auch eine Altersabhängigkeit der Korrelation bedacht werden. So wäre es möglich, dass die Effekte des Polymorphismus eventuell erst im fortgeschrittenen Lebensalter zur Ausprägung kommen. Dies würde erklären, warum einige Studien mit Kindern, wie beispielsweise Pavlovic, Holl et al. 1999, negative Ergebnisse lieferten.

Weiterhin könnten die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse verschiedener Studien auf ethnische Variabilitäten in der Auswirkung des Polymorphismus begründet sein. Schon im Jahre 1995 wiesen Fornage et al. auf eine Inkonsistenz ihrer negativen Ergebnisse bezüglich verschiedener ethnischer Gruppen hin (Fornage, Turner et al. 1995). Dieser Überlegung entsprechend fanden Lovati et al. auf der einen Seite ein gehäuftes Vorkommen des AGT-Polymorphismus in der amerikanischen und französischen Bevölkerung, auf der anderen Seite aber nicht bei weißen Europäern und Afrikanern (Lovati, Richard et al. 2001). Auch Staessen et al. (Staessen, Kuznetsova et al. 1999) zogen ethnische Unterschiede als mögliche Erklärungen für teilweise differente Auswirkungen der AGT-Allele in Betracht. Sie wiesen,

Lovati et al. widersprechend, in einer Meta-Analyse positive Assoziationen bei weißen Individuen nach. Übereinstimmend mit Lovati et al. zeigten sie bei Schwarzen und weiterhin bei Asiaten eine positive Assoziation auf. Auch in weiteren Studien (Barbeau, Kulharya et al. 2002) fand sich eine stärkere Beeinflussung des Blutdrucks durch den AGT-Polymorphismus bei weißen, als bei schwarzen Menschen. Somit ist durchaus die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass die Durchführung von Studien innerhalb unterschiedlicher Populationen für die Variabilität der jeweiligen Ergebnisse verantwortlich ist.

Abschließend ist auch zu beachten, dass in der Literatur mehrfach Interaktionen des AGT – Gens mit anderen Genen beschrieben wurden. Speziell für die Entwicklung eines Hypertonus in jungen Lebensjahren wiesen Porto et al. (Porto, Garcia et al. 2003) in einer Studie mit 54 Jugendlichen mit diagnostizierter Hypertonie unter anderem für den T>C-Polymorphismus des AGT-Gens Interaktionen mit anderen Genen und Genvariationen nach, die nachweislich die Suszeptibilität für eine Hypertonie erhöhten. So könnte aufgrund von Gen-Gen-Interaktionen die große Vielfalt der Auswirkungen des AGT-Polymorphismus auf die Blutdruckregulation und damit die Variabilität verschiedener Studienergebnisse erklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich für den AGT-Polymorphismus feststellen, dass sein Einfluss auf die Blutdruckregulation noch immer kontrovers diskutiert wird, wobei unterschiedlichste Faktoren die Effekte des Polymorphismus beeinflussen (z.B. Körpergewicht, körperliche Aktivität, Gen-Gen-Interaktionen). Abschließend sei jedoch erwähnt, dass neueste Daten (Mondry, Loh et al. 2005) die Erkenntnisse der vorliegenden Studie, d.h. einen positiven Einfluss des C-Allels auf die Blutdruckentwicklung, bestätigen.

6.3.3. ATR1

In dieser Studie konnte kein Bezug zwischen c.1166A>C-Polymorphismus mit erhöhten Blutdruckwerten nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieser genetischen Variation für die Genese der arteriellen Hypertonie wird noch immer kontrovers diskutiert: So beschrieben im Jahre 1994 Bonnardeux et al. erstmals eine Verknüpfung des Polymorphismus mit der Genese einer arteriellen Hypertension (Bonnardeaux, Davies et al. 1994), die in weiteren Studien auf der einen Seite bestätigt (Kainulainen, Perola et al. 1999; Stankovic, Zivkovic et al. 2003) und auf der anderen Seite widerlegt wurde (Schmidt, Beige et al. 1997; Kikuya, Sugimoto et al. 2003; Ono, Mannami et al. 2003; Sugimoto, Katsuya et al. 2004), so dass bezüglich der Bedeutsamkeit des c.1166A>C-Polymorphismus für die interindividuelle Variabilität des Blutdrucks bis heute Unklarheit besteht.

Ursächlich für diese zum Teil widersprüchlichen Erkenntnisse bezüglich der Rolle des Polymorphismus, könnte die multifaktorielle Ätiopathogenese der Hypertonie sein. So wird die arterielle Hypertension als Erkrankung beschrieben, deren Pathogenese sowohl durch eine genetische Prädisposition, als auch durch verschiedenste Umwelt-Einflüsse, sowie die Lebensweise des einzelnen Individuums beeinflusst wird (Stankovic, Zivkovic et al. 2003). Für die Entwicklung erhöhter Blutdruckwerte bedeutsame Einflußfaktoren sind beispielsweise ethnische, geschlechts-, gewichts- und altersabhängige Größen. Die Variabilität der Ausprägung dieser Größen, die unterschiedlichen Kombinations-Varianten, in denen diese vorliegen können und die daraus folgende gegenseitigen Beeinflussung, könnten erklärend für die, teils widersprüchlichen, Ergebnisse verschiedener Studien sein. Speziell für den c.1166A>C-Polymorphismus des ATR1-Gens sind, bezüglich seiner Assoziation mit der Blutdruckregulation, diverse Einflüsse bekannt. Deren Bedeutung soll im Folgenden genauer erläutert werden.

Die Assoziation zwischen dem ATR1-Polymorphismus und der Entwicklung erhöhter Blutdruckwerte scheint unter anderem abhängig zu sein von der ethnischen Herkunft des untersuchten Patienten-Kollektivs: So stellten Barbeau et al. in einer Studie eine stärkere Verknüpfung zwischen dem C-Risiko-Allel und der Blutdruckentwicklung bei Weißen, als bei Schwarzen fest (Barbeau, Kulharya et al. 2002). Die Ohasama-Studie (Sugimoto, Katsuya et al. 2004), die ein japanisches Patienten-Kollektiv untersuchte, fand keine Hinweise auf eine mögliche Verknüpfung des Polymorphismus und der Blutdruckentwicklung, ebenso wie Studien in Indien (Ashavaid, Shalia et al. 2000) und Mitteleuropa (Schmidt, Beige et al. 1997). Letztere Studie ist an dieser Stelle hervorzuheben: Schmidt et al. führten ihre Studie an einem deutschen Patientenkollektiv durch und fanden, übereinstimmend mit unseren Ergebnissen, keine Assoziation des ATR1-Polymorphismus mit der Pathogenese eines arteriellen Hypertonus. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass Schmidt et al. so bei Untersuchungen eines ethnisch vergleichbaren Kollektivs übereinstimmende Ergebnisse erhielten.

Ein weiterer Grund für den nicht nachzuweisenden Einfluß des ATR1-Polymorphismus könnte das junge Alter des von uns untersuchten Patientenkollektivs sein. Die Mehrzahl der Studien, die eine positive Korrelation zwischen der genetischen Variation von ATR1 und der Blutdruckentwicklung nachwiesen, wurden mit älteren Personen durchgeführt (Kainulainen, Perola et al. 1999; Stankovic, Zivkovic et al. 2003), wohingegen die Altersgruppe unserer Patienten kaum mit einbezogen wurde. Somit muss aufgrund unseres negativen Ergebnisses eine Altersabhängigkeit bezüglich des Einfluß' des ATR1-Polymorphismus auf die

Blutdruckregulation in Betracht gezogen werden. Diesen wiesen Szombathy et al. in einer Studie nach: Sie fanden einen Bezug zwischen dem C-Allel und einem arteriellen Hypertonus vorzugsweise bei älteren Personen (Szombathy, Szalai et al. 1998). Mögliche Ursache für diese Altersabhängigkeit könnte eine unter dem Einfluss des Polymorphismus auftretende arterielle Versteifung sein (Benetos, Topouchian et al. 1995). Diese ist erst bei älteren Patienten feststellbar und wird erst im fortgeschrittenen Alter durch eine Erhöhung des systolischen Blutdrucks klinisch apparent. Dies belegt eine Studie von Lajemi et al. (Lajemi, Labat et al. 2001) mit Personen im Alter von 18-74 Jahren. Da die Kinder und Jugendlichen, die an unserer Studie teilnahmen, deutlich jünger waren (siehe Tabelle 13 im Anhang), könnte das Ausbleiben einer Blutdruckerhöhung, auch bei Nachweis des Polymorphismus, durch die noch nicht genügend ausgeprägte arterielle Versteifung erklärt werden.

Weiterhin könnte der nur leicht erhöhte BMI (siehe Tabelle 13 im Anhang) der untersuchten Kindern und Jugendlichen erklärend für die fehlende Assoziation zwischen dem c.1166A>C-Polymorphismus und der Entwicklung erhöhter Blutdruckwerte sein. Diese Annahme gründet sich auf Beobachtungen von Szombathy et al., die eine positive Korrelation des Polymorphismus und einer Blutdruckerhöhung in der Mehrzahl nur bei übergewichtigen Studienteilnehmern nachwies (Szombathy, Szalai et al. 1998). Dies verdeutlicht, dass die Assoziation des Blutdrucks und der genetischen Variation unter anderem von dem Körpergewicht des jeweiligen Individuums abhängig ist. Bei den von uns untersuchten Kindern und Jugendlichen war der BMI jedoch nicht übermäßig stark erhöht. Zieht man die Möglichkeit in Betracht, dass das Körpergewicht nur bei starker Erhöhung Einfluss auf die Pathogenese einer arteriellen Hypertension nimmt, könnte dies für die fehlende Assoziation erklärend sein.

Von Bedeutung für den Einfluss des Polymorphismus auf die Blutdruckregulation dürften weiterhin Wechselwirkungen mit anderen Genen sein. So ergab eine Studie von Dzida et al. (Dzida, Sobstyl et al. 2001) eine Interaktion des I/D-Polymorphismus von ACE mit dem jeweiligen Genotyp von ATR1 bezüglich der Beeinflussung der Blutdruckregulation. Somit besteht die Möglichkeit, dass nur bei bestimmten Genkombinationen eine Assoziation zur Blutdruckregulation besteht und somit nicht immer nachweisbar ist.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist außerdem die biologische Funktion des Polymorphismus. So befindet sich der ATR1-Polymorphismus in einer nicht-translatierten Promotor-Region, und bewirkt somit keine Änderung der Aminosäure-Sequenz im Genprodukt. Bisher konnte die biologische Relevanz des Polymorphismus nicht geklärt werden. Möglicherweise ergibt sich eine fehlende Assoziation des Polymorphismus mit einer arteriellen Hypertension durch eine

geringe Bedeutung der Regulation der Promotorregion, bzw. durch nur geringe Folgen des Polymorphismus für die Regulation der Translation. Auch wäre ein fehlender Einfluss des Polymorphismus auf die Regulation des Promotors denkbar (Zhang, Erdmann et al. 2000). Somit ergeben sich vor allem aufgrund der nicht bekannten biologischen Relevanz der Änderung der Basensequenz in der nicht-translatierten Region des ATR1-Gens, immer wieder Zweifel an der Bedeutung des Polymorphismus für den Organismus.

Abschließend ist, speziell für diese Studie, die besondere Wirkung des Polymorphismus unter hyperglykämischen Bedingungen zu beachten. So belegte eine Studie von Miller et al. einen Anstieg des mittleren arteriellen Drucks bei Trägern des Risiko-Allels, der bei Gabe von Insulin vollständig reversibel war (Miller, Thai et al. 2000). Dies ist insofern von größter Bedeutung, als dass somit die Möglichkeit besteht, dass aufgrund der guten Stoffwechseleinstellung (siehe Tabelle 13 im Anhang) der Kinder und Jugendlichen, die an dieser Studie teilnahmen, auch bei den Trägern des ATR1-Risiko-Allels die Entwicklung und Progression einer Hypertonie nicht nachweisbar war.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass in Übereinstimmung mit verschiedenen anderen Studien, für diesen Polymorphismus keine Verschlechterung des Blutdrucks nachweisbar war. Dies ist durch multiple Einflüsse, wie zum Beispiel das Alter, Gewicht oder die ethnische Abstammung der Patienten, aber auch durch die Einstellung des Stoffwechsels oder durch Gen-Gen-Interaktionen zu erklären.

6.3.4. Aldo-S

Der c.-344C>T-Polymorphismus zeigte in dieser Studie keinen Einfluss auf die Entwicklung der systolischen und diastolischen Blutdruck-Level, wohl aber auf die zirkadiane Blutdruckvariabilität: Sowohl das systolische, als auch das diastolische Dipping wiesen eine positive Entwicklungstendenz bei den hetero- und homozygoten Trägern des T-Allels auf. Diese Tendenz wurde bezüglich des diastolischen Dippings auch in der Regressionsanalyse bestätigt. Somit war bei den C/C-Genotypen die größte Einschränkung der nächtlichen prozentualen Blutdruckabsenkung feststellbar.

Zu übereinstimmenden Ergebnissen kamen u. a. Mulatero et al. (Mulatero, Morello et al. 2004), ebenso wie weitere in Japan durchgeführte Studien (Matsubara, Kikuya et al. 2001; Tamaki, Iwai et al. 1999): In diesen Untersuchungen wiesen die C/C-Genotypen signifikant geringere Dippingwerte auf als die C/T- und T/T-Genotypen. Eine Vergleichbarkeit dieser Studien mit der unsrigen ist insofern gegeben, als dass die Genotypisierung, gleich unserer Methodik, mit Hilfe einer PCR und anschließender RFLP mit Hae III erfolgte. Weiterhin erfolgte die Messung des Blutdrucks, in allen Studien vergleichbar, als 24h-Blutdruck-

Analyse. Gerade die Erfassung des Blutdrucks in Form eines 24 h-Profiles ist in diesem Zusammenhang als sehr wichtig anzusehen: Dieser erfasst zum einen neben den absoluten Blutdruckwerten auch die zirkadiane Variation des Blutdrucks, was bei einer punktuellen Messung nicht möglich ist. Zum anderen schließt diese Messmethode Störfaktoren, wie z.B. einen „Weißkittel-Hypertonus“ (Verdecchia, Porcellati et al. 1994) oder andere Einflussfaktoren (z.B. körperliche Betätigung direkt vor einer Einzelmessung, Blutdruckvariabilitäten während des Tagesverlaufs) aus bzw. kann sie, durch die stets durchgeführte Protokollierung der Tagesaktivität des Patienten, berücksichtigen. Somit sind die erhaltenen Messergebnisse als sehr aussagekräftig und zuverlässig anzusehen. Die Erkenntnisse von Matsubara et al., Tamaki et al. und Mulatero et al. lassen darauf schließen, dass nicht, wie angenommen, das T- sondern das C-Allel das Risiko-Allel für eine gestörte zirkadiane Blutdruckregulation darstellt.

Übereinstimmend zeigte sich in anderen Studien auch ein Bezug des C-Allels mit der Entwicklung erhöhter Blutdruckwerte: Sarzani et al. konnte eine Verknüpfung zwischen dem C/C-Genotyp und einer Erhöhung des systolischen Blutdrucks bei jungen italienischen Männern nachweisen (Sarzani, Salvi et al. 2003). Auch Tsukada et al. wiesen eine durch das C-Allel bedingte Prädisposition für die Entwicklung einer Hypertonie bei Japanern nach (Tsukada, Ishimitsu et al. 2002). Dazu konforme Erkenntnisse lieferten auch die Untersuchungen von Mulatero et al., die eine Assoziation des C-Allels mit einer arteriellen Hypertension zeigten. Diese Studie belegte weiterhin, dass hingegen für Franzosen und Schotten das T-Allel eine Prädisposition für eine essentielle Hypertonie darstellt (Mulatero, Schiavone et al. 2000). Übereinstimmend mit diesen Erkenntnissen bewiesen Tiago et al. eine Assoziation des T-Allels mit einer Erhöhung des Blutdrucks bei Afrikanern (Tiago, Badenhorst et al. 2003), welche von Henderson et al. für afrikanisch stämmige Amerikaner bestätigt wurde (Henderson, Haiman et al. 2004). Diese sehr differenten Ergebnisse verdeutlichen, dass bezüglich der Auswirkungen der Allele deutliche ethnische Unterschiede bestehen, die die Kontroverse verschiedener Studienergebnisse zum Teil begründen. Daher kann keine allgemeingültige Aussage dazu gemacht werden, welches der beiden Allele als Risiko-Allel anzusehen ist.

Die Definition des Risiko-Allels der Aldosteron-Synthase ist abhängig davon, welches Allel zu einer Erhöhung des Aldosteron-Spiegels führt. Diesbezüglich finden sich in der Literatur widersprüchliche Aussagen: So zeigten auf der einen Seite einige Studien eine unter dem Einfluss des C-Allels auftretende Erhöhung des Aldosteron-Spiegels (Tamaki, Iwai et al. 1999; Safar, Cattani et al. 2005), während andere Studien eine vermehrte Aldosteron-Sekretion

bei T/T-Genotypen zeigten (Connell, Fraser et al. 2004; Freel und Connell 2004). Übereinstimmend wurde in allen Studien festgestellt, dass durch die unregulierte Mehrsynthese von Aldosteron ein sogenannter Low-Renin-Aldosteronismus entsteht. Dies bedeutet, dass unter einem niedrigen Renin-Plasmaspiegel übermäßig viel Aldosteron sezerniert wird. Die so entstehende Überaktivität dieses Mineralcortikoids führt dadurch zu einer Hypertonie. Ein idiopathischer Hyperaldosteronismus ist bei 10-15% der Hypertoniker feststellbar. Bezüglich seiner Ätiologie wird eine genetische Veränderung vermutet (Freel und Connell 2004). Bei den Kindern und Jugendlichen, die an unserer Studie teilnahmen war jedoch weder bei den Trägern des C- noch des T-Allels, bis auf die Störung der zirkadianen Blutdruckvariabilität, eine Erhöhung des systolischen oder diastolischen Blutdrucks feststellbar. Begründend hierfür könnte, wie auch bei den übrigen untersuchten Polymorphismen des RAAS, eine Abhängigkeit des genetischen Einflusses des Polymorphismus von Faktoren wie beispielsweise Alter, Geschlecht und/ oder BMI der Probanden sein, die im Folgenden erörtert werden sollen.

Wie aus einigen Studien ersichtlich, besteht eine vom Alter des Patienten abhängige Assoziation zwischen dem Polymorphismus und der Entwicklung erhöhter Blutdruckwerte. So beschrieben Freel et al. eine bei Trägern des T-Allels feststellbare Erhöhung des Blutdrucks nur bei Individuen im fortgeschrittenen Lebensalter. Bei jungen Männern war dieser Zusammenhang nicht feststellbar (Freel und Connell 2004). Übereinstimmend mit dieser Erkenntnis beschrieben auch Barbato et al. eine Zunahme des Einflusses des T-Allels auf die Blutdruckregulation und eine Entwicklung erhöhter Werte erst bei älteren Patienten (Barbato, Russo et al. 2004). Ebenso zeigte die Untersuchung von Tamaki et al. eine deutliche Altersabhängigkeit der Assoziation des Risiko-Allels (in diesem Fall dem C-Allel) und der Genese einer Hypertonie (Tamaki, Iwai et al. 1999). Aus diesen Erkenntnissen wird deutlich, dass sowohl das C- als auch das T-Allel erst im fortgeschrittenen Lebensalter zu einer Erhöhung des Blutdrucks führen und damit die Möglichkeit besteht, dass die an unserer Studie teilnehmenden Kinder und Jugendlichen ein noch zu junges Alter aufwiesen, als das ein Effekt des Polymorphismus auf den Blutdruck erkennbar hätte sein können. Die Verminderung des Dippings bei den C/C-Genotypen könnte allerdings ein Frühzeichen einer beginnenden Blutdruckregulationsstörung darstellen. Eine Störung der zirkadianen Blutdruckvariabilität könnte begründet sein durch den erhöhten Aldosteron-Spiegel und die dadurch bedingten Schädigungen von ZNS und Niere (Freel und Connell 2004). Dies ergibt sich daraus, dass sowohl renale Hypertonien als auch solche, für die eine Neuropathie den

ursächlichen Faktor darstellt, im Anfangsstadium durch eine Verminderung der nächtlichen Blutdruckabsenkung auffällig werden.

Ein Grund für die Altersabhängigkeit des Einflusses des Risiko-Allels könnte sein, dass unter dem Einfluß des jeweiligen Risiko-Allels eine Versteifung der arteriellen Gefäße feststellbar ist, der eine Erhöhung des Blutdrucks bedingt. Dies wurde in verschiedenen Studien zum einen für das C-Allel (Wojciechowska, Staessen et al. 2004; Safar, Cattan et al. 2005), zum anderen auch für das T-Allel (Balkestein, Wang et al. 2002) beschrieben. Die daraus folgende Verminderung der Elastizität der großen Arterien konnte fast ausschließlich bei Personen nachgewiesen werden, die das mittlere Lebensalter schon überschritten hatten. Hieraus lässt sich ableiten, dass diese pathologische Veränderung bei unseren Probanden, die noch im jugendlichen Alter waren, nicht so weit zur Ausprägung gekommen sein konnte, als dass sie die Höhe des Blutdrucks hätte beeinflussen können.

Weiterhin könnte die fehlende Assoziation des Polymorphismus mit der Entwicklung pathologischer Blutdruck-Level durch die nur mäßig ausgeprägte BMI-Erhöhung begründet sein. Dies wäre insofern möglich, als dass Tamaki et al. bei C/C- und C/T-Genotypen die Blutdruckerhöhung in Assoziation zu dem jeweiligen BMI der Patienten feststellten (Tamaki, Iwai et al. 1999). Daher ist davon auszugehen, dass, da in unserem Patientenkollektiv die Mehrzahl der Kinder und Jugendlichen normal- oder aber leicht übergewichtig waren, eine Assoziation des Polymorphismus mit einer Erhöhung des Blutdrucks nicht bestand. Neben dem Ernährungszustand spielt in besonderem Maße bei Untersuchungen des Blutdrucks auch die Ernährung eine große Rolle. So ist allgemein bekannt, dass beispielsweise die Aufnahme stark salzhaltiger Nahrungsmittel zu einer Anhebung des Blutdrucks führt. Speziell bei Patienten mit einem erhöhten Aldosteron-Spiegel hat die Aufnahme großer Salzmengen starken Einfluß auf den Blutdruckwert: Schon die Wirkung des Aldosterons bedingt eine verstärkte Salz- und damit Volumenretention, die zu einer Erhöhung des Blutdrucks führt. Bei zusätzlicher Aufnahme großer Salzmengen werden die Effekte auf den Blutdruck nochmals verstärkt. Dieser Sachverhalt ist insofern von besonderer Bedeutung, als dass er auch verantwortlich sein könnte für die kontroversen Ergebnisse verschiedener Studien: So wiesen Wojciechowska et al. darauf hin, dass die Salzaufnahme bei der Durchführung vieler Studien nicht berücksichtigt würde, was zu einer Verfälschungen der Ergebnisse führen kann (Wojciechowska, Staessen et al. 2004).

Die Assoziation des Polymorphismus mit einer Entwicklung erhöhter Blutdruckwerte zeigt weiterhin eine Abhängigkeit vom Geschlecht der untersuchten Individuen, wobei auf diesem Gebiet sehr kontrovers diskutiert wird. So beschrieben Sarazani et al. einen Bezug des C-

Allels mit erhöhten Blutdruckwerten nur bei Männern (Tamaki, Iwai et al. 1999; Sarzani, Salvi et al. 2003), während Gu et al. das T-Allel assoziiert mit einer arteriellen Hypertonie nur bei Frauen feststellen konnten (Gu, Ge et al. 2004). Somit kann, obwohl die Frage noch nicht beantwortet werden konnte, eine Beeinflussung unserer Ergebnisse durch das jeweilige Geschlecht nicht ausgeschlossen werden. Diesen Sachverhalt gilt es in weiterführenden Studien zu untersuchen und endgültig zu klären.

Begründend für die fehlende Nachweisbarkeit einer Progression der hypertensiven Erkrankung könnte ein zu geringer Zeitabstand zwischen den durchgeführten Messungen sein: Wang et al. wiesen in einer Langzeitstudie erst nach neun Jahren Studiendauer eine Erhöhung des Blutdrucks bei C/C-Genotypen nach. Allerdings konnten sie diese nur nachweisen unter Berücksichtigung einer Wechselbeziehung mit dem ACE D/D-Genotyp und einem Polymorphismus des α -Adducins (Wang, Liu et al. 2004). Aus dieser Beobachtung ergibt sich zum einen, dass die von uns durchgeführten Messungen im Abstand von zwei Jahren ein eventuell zu kurzes Messintervall darstellten, um Blutdruckveränderungen nachweisen zu können und zum anderen, dass die Auswirkung des Genotyps auf die Blutdruckregulation abhängig ist von Interaktionen mit anderen Gen-Polymorphismen. Passend zu dieser Erkenntnis beschrieben beispielsweise Freel et al. eine zusätzliche Erhöhung des Aldosteron-Spiegels bei gleichzeitigem Vorliegen des T/T-Genotyps und einer homozygoten Conversion im Intron 2 der Aldosteron-Synthetase (Freel und Connell 2004). Balkenstein et al. zeigten eine Interaktion des Aldo-S-Polymorphismus und einem Polymorphismus des α -Adducin auf. Aus den Kombinationen dieser Polymorphismen ergab sich eine verstärkte Salz- und damit Volumenretention, die zu einer chronischen Expansion des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens und damit zu Blutdruckerhöhung führte (Balkestein, Wang et al. 2002). Aus diesen Studien geht hervor, dass der Aldo-S-Polymorphismus nicht nur durch dessen alleinige Wirkung die Blutdruckregulation beeinflusst, sondern dass er auch mit anderen Genen und ihren Polymorphismen interagiert. Bestätigt wird dies von Wang et al. insofern, als dass sie in ihrer Studie neben der Untersuchung der Interaktionen zwischen verschiedenen Polymorphismen auch Analysen einzelner Gene durchführten. Bezüglich des Aldo-Polymorphismus fanden sie keine nachweisbaren Assoziationen der Genotypen mit der Blutdruckregulation, wohl aber bei Berücksichtigung von Gen-Gen-Interaktionen (Wang, Liu et al. 2004). In der vorliegenden Studie waren eventuell keine Auswirkungen des Aldo-S-Polymorphismus auf die Regulation des Blutdruck-Levels feststellbar, da mögliche Interaktionen mit anderen Polymorphismen nicht berücksichtigt wurden. In weiterführenden Studien gilt es diese Interaktionen zu untersuchen und zu klären.

Als letzten wichtigen Gesichtspunkt bezüglich der positiven Entwicklung des Dippings bei den Trägern des T-Allels gilt es die teilweise sehr unzuverlässige Aussagekraft des Dippings zu bedenken: So untersuchten Cuspidi et al. in einer Kohorten-Studie mit 414 Personen die Kurz-Zeit-Variabilität des systolischen und diastolischen Dippings. Dazu wurde der Blutdruck der Probanden in einem Zeitraum von vier Wochen zwei Mal in 24 h-Blutdruckmessungen erfasst. Hierbei zeigte sich, dass 25 % der Patienten eine Änderung der initial festgestellten Dipping-Werte aufwiesen (Cuspidi, Meani et al. 2004). Des Weiteren finden sich Hinweise, dass die nächtliche prozentuale Blutdruckabsenkung von diversen Einflussfaktoren abhängig ist: So konnten Dimsdale et al. zeigen, dass ambulant und stationär erfasste 24 h-Blutdruckprofile intraindividuelle Unterschiede aufwiesen (Dimsdale und Heeren 1998), während weitere Studien eine Abhängigkeiten des Dippings von der körperlichen Aktivität des Probanden am Tag (O'Shea und Murphy 2000) und in der Nacht (Leary, Donnan et al. 2000) zeigten. Des Weiteren konnten Kamilla et al. nachweisen, dass schon allein ein Hochlegen des Arms auf ein Kissen zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann. In diesem Fall führte die Veränderung der Armposition zu der Erfassung extremer Dipping-Werte (Kammila, Campbell et al. 2002). Daraus ergibt sich, dass eine gute Aufklärung und eine hohe Compliance der Patienten wichtig sind für den Erhalt zuverlässiger Daten. Dies allerdings stellt in der Pädiatrie ein großes Problem dar, so dass unter Berücksichtigung der genannten Einflussfaktoren festgestellt werden kann, dass das Dipping ein störanfälligen Parameter ist, dessen Aussage bei nur einmaliger Messung mit Vorsicht interpretiert werden sollte.

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass für den Aldo-Polymorphismus kein Einfluß auf die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte, wohl aber für das nächtliche Dipping mit positiver Entwicklungstendenz für den T/T-Genotyp feststellbar war.

6.3.5. End1

Für den End1-Polymorphismus zeigte sich als Trend eine vom Risiko-Allel abhängige negative Entwicklungstendenz für den systolischen Tagwert. Weitere vom jeweiligen Genotyp abhängige Veränderungen des Blutdrucks konnten nicht nachgewiesen werden.

Das T-Allel des End1-Polymorphismus führt, wie Studien belegen (Tiret, Poirier et al. 1999; Tanaka, Kamide et al. 2004), durch eine Erhöhung des End1-Plasma-Spiegels (Barden, Herbison et al. 2001) zu einer Erhöhung des Blutdrucks. Daher sind die kontroversen Ergebnisse unserer Studie, das heißt die Verbesserung des nächtlichen diastolischen Blutdrucks bei den Trägern des Risiko-Allels, zunächst verwunderlich. Entscheidend jedoch ist, dass der Polymorphismus nur in Interaktion mit anderen Einflussfaktoren zu einer

Erhöhung des Blutdruckniveaus führt. So beschrieben beispielsweise Treiber et al. einen Einfluß des sozioökonomischen Status auf die Blutdruckvariation bei Trägern des T-Allels: In ihrer Studie wiesen sie nach, dass Probanden die aus niedrigen sozialen Schichten stammten und den G/T- oder G/G-Genotyp aufwiesen einen höheren reaktiven Blutdruck unter Stress (Spielen eines Videospiele) aufwiesen, als Probanden mit dem gleichen Genotyp aus höheren Sozialschichten (Treiber, Barbeau et al. 2003). Dies zeigt, dass nicht allein der Genotyp, sondern auch auf das jeweilige Individuum wirkende Umweltfaktoren das Blutdruck-Level bestimmen. Weiterhin wiesen Barden et al. eine Veränderung der Auswirkung des End1-Genotyps während der Schwangerschaft nach: So waren bei graviden Frauen die einen T/T-Genotyp aufwiesen gesteigerte Blutdruckwerte während der Schwangerschaft feststellbar, die sich nach der Geburt wieder normalisierten (Barden, Herbison et al. 2001). Aus den Erkenntnissen Treibers und Bardens geht somit deutlich hervor, dass bezüglich der Assoziation des Polymorphismus mit einer Entwicklung erhöhter Blutdruckwerte eine Abhängigkeit von zusätzlichen Einflussfaktoren besteht.

Ganz entscheidend interagiert der Polymorphismus mit dem BMI. Mehrere Studien wiesen bei Trägern des End1-Risiko-Allels mit einer Erhöhung des BMI auch gleichzeitig eine Steigerung des Blutdruck-Levels nach: So war in der ECTIM-Studie (Etude Cas-Témoin sur l'infarctus du Myocarde) eine Interaktion des G/T-Polymorphismus mit dem BMI in Bezug auf die Determination des Blutdruck-Levels feststellbar. Auch wurde eine stärkere Zunahme des Blutdrucks bei T-Allel-Trägern mit erhöhtem BMI beobachtet als bei Normalgewichtigen. So zeigte sich ein signifikanter Anstieg des SBP und DBP bei übergewichtigen G/T- und T/T-Genotypen, während ein Effekt des T-Allels auf den Blutdruck bei normalgewichtigen Individuen nicht festgestellt werden konnte (Tiret, Poirier et al. 1999). Auch in der Glasgow Heart Scan Study (GHSS) war ein Einfluß des T-Allels auf den Blutdruck feststellbar: Probanden mit einem G/T- und T/T-Genotyp wiesen eine pathologische Erhöhung des Ruhe-Blutdrucks und des Blutdrucks unter körperlicher Anstrengung auf. Die pathologische Regulation des Blutdrucks unter körperlicher Anstrengung bei Vorliegen des Risiko-Allels war assoziiert mit einem erhöhten BMI (Tiret, Poirier et al. 1999). Weiterhin konnten Jin et al. nachweisen, dass Individuen, die Träger des T-Allels waren, vermehrt zu Gewichtszunahmen neigten (Jin, Nakura et al. 2003). Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich für unsere Studie die Möglichkeit, dass bei der mäßigen Erhöhung des BMI im Gesamtkollektiv diejenigen Kinder und Jugendlichen, die Träger des End1-Risiko-Allels waren, gleichzeitig auch einen zu hohen BMI aufwiesen. Durch die Kombination des Übergewichts und der durch das T-Allel gegebenen genetischen Prädisposition könnte somit die Erhöhung des

Blutdruck-Levels entstanden sein. Da in der GHSS der Ruhe-Blutdruck eine Erhöhung alleine durch die Wirkung des T-Allels zeigte, könnten auch einige der Kinder und Jugendlichen mit einem normalen BMI eine Verschlechterung des Blutdrucks aufgewiesen haben.

Der in unserer Studie nur geringe Einfluß des Polymorphismus auf die Blutdruckentwicklung könnte auf das noch geringe Alter unserer Probanden zurückzuführen sein. So zeigte eine Studie mit jungen Probanden (Alter 18 ± 2.7 Jahre) von Dong et al. keine Assoziation des Polymorphismus mit der Höhe des Blutdrucks (Dong, Wang et al. 2004). So besteht durchaus die Möglichkeit, dass erst mit zunehmendem Alter ein Einfluß des Polymorphismus auf den Blutdruck besteht. Dass im Fall der vorliegenden Studie nur ein Einfluss auf den SBP bestand, könnte somit auf den noch geringen Einfluß des Polymorphismus zurückzuführen sein. Darüber hinaus wurde auch in anderen Studien teilweise eine Beeinflussung einzelner Blutdruckwerte durch den Polymorphismus beobachtet: In der Ohasama-Studie war nur eine signifikante Zunahme des DBP bei adipösen Trägern des T-Allels feststellbar, während ein Einfluß auf den SBP sich nur undeutlich darstellte (Asai, Ohkubo et al. 2001). Somit wäre in unserer Studie eine alleinige Beeinflussung des SBP durch das T-Allel möglich.

Zusammenfassend ergibt sich speziell für den End1-Polymorphismus eine starke Abhängigkeit der Effekte des T-Allels von Interaktionen mit variablen Faktoren und Größen. In weiteren Studien gilt es diese Aspekte weiter zu untersuchen

6.4. Limitationen

Bezüglich der im Rahmen dieser Studie gewonnen Erkenntnisse sei an dieser Stelle auf einige Faktoren hingewiesen, die eine Generierung der Ergebnisse nur eingeschränkt erlauben. So sei zum einen auf den kleinen Stichprobenumfang der vorliegenden Studie hinzuweisen, welcher vor allem bezüglich der einzelnen Genotypen-Gruppen zu mitunter sehr kleinen Subpopulationen führte.

Zum anderen sei auf den Beobachtungszeitraum hingewiesen, welcher mit einer Dauer von zwei Jahren von relativ kurzer Dauer war.

Auch sollte angemerkt werden, dass mit dem Dipping als einem der beobachteten Blutdruckparameter ein sehr störanfälliger Parameter gewählt wurde (siehe Diskussionspunkt 6.3.5 Aldo-S).

Somit sollten zur Sicherstellung der Erkenntnisse der vorliegenden Studie, diese in weiteren multizentrischen Studien mit einem größeren Patientenkollektiv über einen längeren

Beobachtungszeitraum weiter untersucht werden, wobei die Variabilität und Störanfälligkeit des Dippings als Beobachtungsparameter für die Blutdruckregulation zu überdenken wären.

6.5. Ausblick

Die vorliegende Studie legt nahe, dass bei Kindern und Jugendlichen mit relativ kurzer Diabetesdauer genetische Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems einen prädiktiven Charakter für die Entstehung und Progression einer arteriellen Hypertonie haben. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs dieser Studie sollten zur Sicherstellung der Erkenntnisse diese in weiteren multizentrischen Studien genauer untersucht und evaluiert werden.

Aus den gewonnen Erkenntnissen könnte sich somit die Möglichkeit ergeben, a) eine arterielle Hypertonie und sekundäre Organschäden vorzeitig im Sinne einer Risikostratifizierung zu erkennen und b) frühzeitig eine effektive Behandlung einzuleiten. So wäre beispielsweise bei Vorliegen bestimmter Risiko-Allele eine engmaschigere Blutdruck- und auch HbA1c-Kontrolle, als bisher standardmäßig durchgeführt, denkbar. Weiterhin könnte bei Auftreten einer Hypertonie die Einstellung des Blutdrucks mit hoher Effektivität erfolgen: Trägern des D-Allels des ACE-Polymorphismus könnten beispielsweise ACE-Hemmer (Mulder, van Geel et al. 2003; Dimopoulos-Xicki und Haas 2005) verabreicht werden, wohin Träger des Aldosteron-Risiko-Allels adäquat mit einem Aldosteron-Antagonisten zu versorgen wären (Safar, Cattan et al. 2005). Bezüglich des AGT-Polymorphismus wären aufgrund der positiven Blutdruck-Entwicklung bei Trägern des Risiko-Allels die bisherigen Therapie-Ansätze nochmals zu überdenken. Auch der End1-Polymorphismus könnte durchaus interessante Therapie-Ansätze bieten aufgrund der Verfügbarkeit von Endothelin1-Rezeptor-Antagonisten. Eventuell könnte allein aus einer Reduktion des Gewichts eine signifikante Verbesserung der Blutdruckwerte resultieren. In weiterführenden Studien könnte untersucht werden, welche Medikamente zu welchem Zeitpunkt in welchen Kombinationen am sinnvollsten eingesetzt werden könnten, um die beste Prävention vor einer hypertensiven Erkrankung zu gewährleisten. Damit würden in Zukunft sekundäre Organschädigungen wie cardiale und vaskuläre Erkrankungen oder auch renale Schädigungen, die im Speziellen für den Diabetiker von Bedeutung sind, verhindert und somit die Prognose des Diabetes mellitus Typ 1 entscheidend verbessert werden.

7. Zusammenfassung

Ein wesentlicher Bestandteil der erhöhten kardiovaskulären Morbidität von Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 (D.m.1) ist die arterielle Hypertonie. Für die Ätiopathogenese und den Verlauf der arteriellen Hypertension wird der Einfluß genetischer Variationen zunehmend erkannt.

In dieser Studie wurden im Zeitraum von 2 Jahren zu 2 Zeitpunkten (Zp.) ambulante 24 h-Blutdruckprofile (Spacelabs ABPM) bei 95 Patienten mit D.m. 1 (Geschlecht: 50 m., 45 w.; Alter (im Median):12 (Zp.1), 14 (Zp.2); mittleres HbA1c (Med): 7.3% (Zp.1), 7.6% (Zp.2); Diabetesdauer (Med): 47 Monate (Zp.1), 60 Monate (Zp.2)) durchgeführt. Die Blutdruck-Entwicklung wurde mit genomischen Polymorphismen der folgenden Proteine, die in die Blutdruckregulation eingebunden sind, verglichen: Angiotensin-Converting Enzym (ACE): Insertion/Deletion (I/D); Angiotensinogen (AGT): 235 M→T; Angiotensin II Rezeptor 1 (ATR1): 1166 A→C; Aldosteron-Synthetase (Aldo-S): 344 C→T; Endothelin 1 (End1): Guanin/Thymin (G/T). Die 24 h-Blutdruckprofile wurden qualitativ und quantitativ durch Berechnung des Standardabweichungswertes (SDS) analysiert.

Die Genotypen und Allele der einzelnen Polymorphismen lagen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht vor und zeigten, mit Ausnahme von ACE, hinsichtlich ihrer Verteilung keine relevanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (n=300) und der der D.m. 1-Patienten. Der Blutdruck (BP) stieg zwischen den beiden Messzeitpunkten an (angegeben sind die Prozentzahlen der oberhalb der 95. Perzentile liegenden Werte): Systolischer BP (SBP) Tag: 15.79 % (Zp.1), 20 % (Zp.2); SBP Nacht: 20 % (Zp.1), 34.74 % (Zp.2); Diastolischer BP (DBP) Tag: 5.26 % (Zp.1), 7.37 % (Zp.2); DBP Nacht: 18.95 % (Zp.1), 26.32 % (Zp.2); Systolisches Dipping (sys. Dip.): 47.37 % (Zp.1), 37.89 % (Zp.2); Diastolisches (dia.) Dip: 44.21 % (Zp.1), 46.32 % (Zp.2).

Die ACE-Genotypen differierten in der quantitativen Analyse beim SBP in der Nacht (Differenz SDS: I/I<D/I<D/D) und beim sys. Dip. (Diff. SDS: I/I>D/I>D/D), was eine Verschlechterung beim Risiko-Genotyp anzeigte. Der AGT-Genotyp variierte ebenfalls beim SBP nachts (Diff. SDS: T/T>M/T>M/M) und beim sys. Dip. (Diff. SDS: T/T<M/T<M/M) und zeigte so eine Verbesserung abhängig vom Risiko-Allel an. Die Aldo-Genotypen differierten beim sys. Dip. (Diff SDS: C/C<C/T<T/T) und zeigten so eine für den Risiko-Genotyp positive Entwicklung. Die Genotypen von End1 variierten bezüglich des SBP am Tag (G/G<G/T<T/T) und belegten so eine Verschlechterung des SBP bei den Trägern des Risiko-Allels. In der logistischen Regressionsanalyse bestanden Assoziationen zwischen dem AGT-

Genotyp und sys. Dip., dem DBP nachts und den End1-Genotypen, sowie des Aldo-S-Genotypen und dem dia. Dip.. Sie alle belegten positive Entwicklungstendenzen für den jeweiligen Risiko-Genotyp. Geschlecht, Alter, Diabetesdauer, HbA1c und BMI zeigten keine Assoziation zu diesen Variablen.

Diese Ergebnisse belegen, dass einige Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems und des Endothelin-Systems bei Kindern und Jugendlichen im Vergleich zu anamnestischen und metabolischen Faktoren einen prädiktiven Charakter für die Entwicklung und den Verlauf eines hypertensiven Blutdruckverhaltens besitzen und Ansätze für eine präventive Therapie bieten könnten. Jedoch sollten diese Erkenntnisse in größer angelegten multizentrischen Studien weiter untersucht und evaluiert werden.

8. Summary

Arterial hypertension is one of the major causes for enhanced kardiovascular morbidity in diabetes type 1 (d.m.1). The influence of genetic polymorphisms on the pathogenesis and progression of arterial hypertension are being increasingly recognized.

In this investigation over a period of 24 months two ambulatory 24 h- BP-profiles of 95 patients with d.m. 1 were recorded using the Spacelab ABP Monitor (50 boys / 45 girls; median age 12 yrs (t_1), 14 yrs (t_2); median HbA1c 7.3 % (t_1), 7.6 (t_2); average diabetes duration 47 months (t_1), 60 months (t_2)). BP-values were compared to genetic polymorphisms encoding proteins that are involved in blood-pressure-regulation: Angiotensin-converting enzyme (ACE): insertion/deletion (I/D); Angiotensinogen (AGT): 235 M→T; Angiotensin type 1 receptor (ATR1): 1166 A→C; Aldosterone-synthase (Aldo-S): 344 C→T; Endothelin 1 (End1): Guanine/Thymine (G/T). The BP-profiles were analyzed for the frequency of pathological values and for the extend of deviation from the controls by calculating SDS-LMS-Scores.

The genotypes and alleles were distributed according to hardy-weinberg-equilibrium. All polymorphisms were similarly distributed in the controls (n= 300) and in the diabetic patients, except of the ACE-polymorphism. The rate of pathological BP-values increased from t_1 to t_2 for all BP-parameters but the systolic dipping. Over the duration of 2 years BP showed alterations (percent over the 95th percentile): systolic BP (SBP) day: 15.79 % (t_1) , 20 % (t_2); SBP night: 20 % (t_1), 34.74 % (t_2); diastolic BP (DBP) day: 5.26 % (t_1), 7.37 % (t_2); DBP night: 18.95 % (t_1), 26.32 % (t_2); systolic dipping (sys. Dip.): 47.37 % (t_1), 37.89 % (t_2); diastolic dipping (dia. Dip.): 44.21 % (t_1), 46.32 % (t_2).

BP-values increased depending on the genotype of ACE (Diff SBP night: I/I<I/D<D/D), the AGT- (Diff SBP night: C/C < C/T < T/T), the Aldo-S- (Diff Dip SBP: C/C < C/T < T/T) and the End1-polymorphism (G/G < G/T < T/T). Systolic dipping was reduced in patients with the AGT-risk-allele (T-allele) to the carriers of the C-allele and in patients with the ACE I-allele to the patients with the D risk-allele. The carriers of the risk-allels of AGT had higher BP-levels for the sys. Dip., of the End1 for the nocturnal DBP and of Aldo-S for dia. Dipping in the logistic regression analysis. Sex, age, duration of diabetes, HbA1c and BMI showed no compound with these parameters.

These results suggest, that polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and the endothelin-system influence the pathogenesis and progression of arterial hypertension and

might be a valuable tool for preventive therapy. Further investigations with higher numbers of subjects are necessary to confirm these findings.

9. Literaturverzeichnis

- Asai, T., T. Ohkubo, T. Katsuya, J. Higaki, Y. Fu, M. Fukuda, A. Hozawa, M. Matsubara, H. Kitaoka, I. Tsuji, T. Araki, H. Satoh, S. Hisamichi, Y. Imai und T. Ogihara (2001). "Endothelin-1 gene variant associates with blood pressure in obese Japanese subjects: the Ohasama Study." Hypertension **38**(6): 1321-4.
- Ashavaid, T. F., K. K. Shalia, K. G. Nair und J. J. Dalal (2000). "ACE and AT1R gene polymorphisms and hypertension in Indian population." J Clin Lab Anal **14**(5): 230-7.
- Azar, S. T., P. A. Zalloua, R. Medlej und G. Halabi (2001). "The DD genotype of the ACE gene polymorphism is associated with diabetic nephropathy in the type-1 diabetics." Endocr Res **27**(1-2): 99-108.
- Balkestein, E. J., J. G. Wang, H. A. Struijker-Boudier, C. Barlassina, G. Bianchi, W. H. Birkenhager, E. Brand, E. Den Hond, R. Fagard, S. M. Herrmann, L. M. Van Bortel und J. A. Staessen (2002). "Carotid and femoral intima-media thickness in relation to three candidate genes in a Caucasian population." J Hypertens **20**(8): 1551-61.
- Barbato, A., P. Russo, A. Siani, E. J. Folked, M. A. Miller, A. Venezia, C. Grimaldi, P. Strazzullo und F. P. Cappuccio (2004). "Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-344T polymorphism, plasma aldosterone, renin activity and blood pressure in a multi-ethnic population." J Hypertens **22**(10): 1895-901.
- Barbeau, P., A. Kulharya, G. Harshfield, H. Snieder, H. Davis und F. Treiber (2002). "Association between angiotensin II type I receptor polymorphism and resting hemodynamics in black and white youth." Ethn Dis **12**(1): S1-68-71.
- Barden, A. E., C. E. Herbison, L. J. Beilin, C. A. Michael, B. N. Walters und F. M. Van Bockxmeer (2001). "Association between the endothelin-1 gene Lys198Asn polymorphism blood pressure and plasma endothelin-1 levels in normal and pre-eclamptic pregnancy." J Hypertens **19**(10): 1775-82.
- Basta, G., S. Del Turco und R. De Caterina (2004). "[Advanced glycation endproducts: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes]." Recenti Prog Med **95**(2): 67-80.
- Benetos, A., J. Topouchian, S. Ricard, S. Gautier, A. Bonnardeaux, R. Asmar, O. Poirier, F. Soubrier, M. Safar und F. Cambien (1995). "Influence of angiotensin II type 1 receptor polymorphism on aortic stiffness in never-treated hypertensive patients." Hypertension **26**(1): 44-7.
- Berge, K. E. und K. Berg (1990). "A TaqI RFLP at the EDN1 gene locus." Nucleic Acids Res **18**(20): 6176.
- Bonnardeaux, A., E. Davies, X. Jeunemaitre, I. Fery, A. Charru, E. Clauser, L. Tiret, F. Cambien, P. Corvol und F. Soubrier (1994). "Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension." Hypertension **24**(1): 63-9.
- Bretzel, R. G. (2000). Prävention und Therapie diabetischer Folgeerkrankungen, UNI-MEd Verlag AG.
- Brooks, B. A., L. M. Molyneaux und D. K. Yue (2001). "Augmentation of central arterial pressure in Type 2 diabetes." Diabet Med **18**(5): 374-80.
- Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." Nature **414**(6865): 813-20.
- Butler, R., A. D. Morris, B. Burchell und A. D. Struthers (1999). "DD angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is associated with endothelial dysfunction in normal humans." Hypertension **33**(5): 1164-8.
- Carey, R. M. und H. M. Siragy (2003). "The intrarenal renin-angiotensin system and diabetic nephropathy." Trends Endocrinol Metab **14**(6): 274-81.
- Caulfield, M., P. Lavender, M. Farrall, P. Munroe, M. Lawson, P. Turner und A. J. Clark (1994). "Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension." N Engl J Med **330**(23): 1629-33.

- Chessa, M., G. Butera, G. A. Lanza, E. Bossone, A. Delogu, G. De Rosa, G. Marietti, L. Rosti und M. Carminati (2002). "Role of heart rate variability in the early diagnosis of diabetic autonomic neuropathy in children." Herz **27**(8): 785-90.
- Cohen, C. N., F. M. Filho, M. de Fatima Goncalves und M. de Brito Gomes (2001). "Early alterations of blood pressure in normotensive and normoalbuminuric Type 1 diabetic patients." Diabetes Res Clin Pract **53**(2): 85-90.
- Connell, J. M., R. Fraser, S. M. MacKenzie, E. C. Friel, M. C. Ingram, C. D. Holloway und E. Davies (2004). "The impact of polymorphisms in the gene encoding aldosterone synthase (CYP11B2) on steroid synthesis and blood pressure regulation." Mol Cell Endocrinol **217**(1-2): 243-7.
- Cosentino, F., K. Hishikawa, Z. S. Katusic und T. F. Luscher (1997). "High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells." Circulation **96**(1): 25-8.
- Cuspidi, C., S. Meani, M. Salerno, C. Valerio, V. Fusi, B. Severgnini, L. Lonati, F. Magrini und A. Zanchetti (2004). "Reproducibility of nocturnal blood pressure fall in early phases of untreated essential hypertension: a prospective observational study." J Hum Hypertens **18**(7): 503-9.
- Darcan, S., D. Goksen, S. Mir, E. Serdaroglu, M. Buyukinan, M. Coker, A. Berdeli, T. Kose und A. Cura (2006). "Alterations of blood pressure in type 1 diabetic children and adolescents." Pediatr Nephrol **21**(5): 672-6.
- Dietel, M., N. Suttorp, M. Zeitz und R. Tinsley (2005). Harrison Innere Medizin, Abw Wissenschaftsverlag.
- Dimopoulos-Xicki, L. und M. Haas (2005). "[Therapeutic implications of ACE-gene polymorphism]." Wien Med Wochenschr **155**(3-4): 50-3.
- Dimsdale, J. E. und M. M. Heeren (1998). "How reliable is nighttime blood pressure dipping?" Am J Hypertens **11**(5): 606-9.
- Dong, Y., X. Wang, H. Zhu, F. A. Treiber und H. Snieder (2004). "Endothelin-1 gene and progression of blood pressure and left ventricular mass: longitudinal findings in youth." Hypertension **44**(6): 884-90.
- Duncan, J. A., J. W. Scholey und J. A. Miller (2001). "Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in humans: physiology and pathophysiology of the genotypes." Curr Opin Nephrol Hypertens **10**(1): 111-6.
- Duvnjak, L., S. Vuckovic, N. Car und Z. Metelko (2001). "Relationship between autonomic function, 24-h blood pressure, and albuminuria in normotensive, normoalbuminuric patients with Type 1 diabetes." J Diabetes Complications **15**(6): 314-9.
- Dzida, G., J. Sobstyl, A. Puzniak, P. Golon, J. Mosiewicz und J. Hanzlik (2001). "Polymorphisms of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor type 1 genes in essential hypertension in a Polish population." Med Sci Monit **7**(6): 1236-41.
- Endemann, D. H. und E. L. Schiffrin (2004). "Endothelial dysfunction." J Am Soc Nephrol **15**(8): 1983-92.
- Fernandez-Llama, P., E. Poch, J. Oriola, A. Botey, F. Rivera und L. Revert (1998). "Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphisms in essential hypertension: relation with target organ damage." Am J Hypertens **11**(4 Pt 1): 439-44.
- Fornage, M., C. I. Amos, S. Kardia, C. F. Sing, S. T. Turner und E. Boerwinkle (1998). "Variation in the region of the angiotensin-converting enzyme gene influences interindividual differences in blood pressure levels in young white males." Circulation **97**(18): 1773-9.
- Fornage, M., S. T. Turner, C. F. Sing und E. Boerwinkle (1995). "Variation at the M235T locus of the angiotensinogen gene and essential hypertension: a population-based case-control study from Rochester, Minnesota." Hum Genet **96**(3): 295-300.

- Freel, E. M. und J. M. Connell (2004). "Mechanisms of hypertension: the expanding role of aldosterone." J Am Soc Nephrol **15**(8): 1993-2001.
- Fukumoto, S., E. Ishimura, M. Hosoi, T. Kawagishi, T. Kawamura, G. Isshiki, Y. Nishizawa und H. Morii (1996). "Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and renal artery resistance in patients with insulin dependent diabetes mellitus." Life Sci **59**(8): 629-37.
- Gu, D., D. Ge, J. He, B. Li, J. Chen, D. Liu und R. Chen (2004). "Haplotypic analyses of the aldosterone synthase gene CYP11B2 associated with stage-2 hypertension in northern Han Chinese." Clin Genet **66**(5): 409-16.
- Hadjadj, S., R. Belloum, B. Bouhanick, Y. Gallois, G. Guilloteau, G. Chatellier, F. Alhenc-Gelas und M. Marre (2001). "Prognostic value of angiotensin-I converting enzyme I/D polymorphism for nephropathy in type 1 diabetes mellitus: a prospective study." J Am Soc Nephrol **12**(3): 541-9.
- Hansen, K. W., M. Mau Pedersen, S. M. Marshall, J. S. Christiansen und C. E. Mogensen (1992). "Circadian variation of blood pressure in patients with diabetic nephropathy." Diabetologia **35**(11): 1074-9.
- Hansen, T. W., J. Jeppesen, S. Rasmussen, H. Ibsen und C. Torp-Pedersen (2006). "Ambulatory blood pressure monitoring and risk of cardiovascular disease: a population based study." Am J Hypertens **19**(3): 243-50.
- Hautanen, A., P. Toivanen, M. Manttari, L. Tenkanen, M. Kupari, V. Manninen, K. M. Kayes, S. Rosenfeld und P. C. White (1999). "Joint effects of an aldosterone synthase (CYP11B2) gene polymorphism and classic risk factors on risk of myocardial infarction." Circulation **100**(22): 2213-8.
- Henderson, S. O., C. A. Haiman und W. Mack (2004). "Multiple Polymorphisms in the renin- angiotensin-aldosterone system (ACE, CYP11B2, AGTR1) and their contribution to hypertension in African Americans and Latinos in the multiethnic cohort." Am J Med Sci **328**(5): 266-73.
- Holl, R. W., M. Pavlovic, E. Heinze und A. Thon (1999). "Circadian blood pressure during the early course of type 1 diabetes. Analysis of 1,011 ambulatory blood pressure recordings in 354 adolescents and young adults." Diabetes Care **22**(7): 1151-7.
- Hollenberg, N. K. (2004). "Aldosterone in the development und progression of renal injury." Kidney Int **66**(1): 1-9.
- Hürter, P. und T. Danne (2005). Diabetes bei Kindern und Jugendlichen. Klinik, Therapie, Rehabilitation, Springer, Berlin.
- Ikeda, T., T. Matsubara, Y. Sato und N. Sakamoto (1993). "Circadian blood pressure variation in diabetic patients with autonomic neuropathy." J Hypertens **11**(5): 581-7.
- Inoue, A., M. Yanagisawa, S. Kimura, Y. Kasuya, T. Miyauchi, K. Goto und T. Masaki (1989). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2863-7.
- Jalil, J. E., C. Palomera, M. P. Ocaranza, I. Godoy, M. Roman, M. Chiong und S. Lavandero (2003). "Levels of plasma angiotensin-(1-7) in patients with hypertension who have the angiotensin-I-converting enzyme deletion/deletion genotype." Am J Cardiol **92**(6): 749-51.
- Jandeleit-Dahm, K. und M. E. Cooper (2002). "Hypertension and diabetes." Curr Opin Nephrol Hypertens **11**(2): 221-8.
- Jin, J. J., J. Nakura, Z. Wu, M. Yamamoto, M. Abe, Y. Tabara, Y. Yamamoto, M. Igase, K. Kohara und T. Miki (2003). "Association of endothelin-1 gene variant with hypertension." Hypertension **41**(1): 163-7.
- Kainulainen, K., M. Perola, J. Terwilliger, J. Kaprio, M. Koskenvuo, A. C. Syvanen, E. Vartiainen, L. Peltonen und K. Kontula (1999). "Evidence for involvement of the type 1 angiotensin II receptor locus in essential hypertension." Hypertension **33**(3): 844-9.

- Kammila, S., N. R. Campbell, R. Brant, R. deJong und B. Culleton (2002). "Systematic error in the determination of nocturnal blood pressure dipping status by ambulatory blood pressure monitoring." Blood Press Monit **7**(2): 131-4.
- Kennon, B., J. R. Petrie, M. Small und J. M. Connell (1999). "Angiotensin-converting enzyme gene and diabetes mellitus." Diabet Med **16**(6): 448-58.
- Kikuya, M., T. W. Hansen, L. Thijs, K. Bjorklund-Bodegard, T. Kuznetsova, T. Ohkubo, T. Richart, C. Torp-Pedersen, L. Lind, H. Ibsen, Y. Imai und J. A. Staessen (2007). "Diagnostic thresholds for ambulatory blood pressure monitoring based on 10-year cardiovascular risk." Circulation **115**(16): 2145-52.
- Kikuya, M., K. Sugimoto, T. Katsuya, M. Suzuki, T. Sato, J. Funahashi, R. Katoh, I. Kazama, M. Michimata, T. Araki, A. Hozawa, I. Tsuji, T. Ogihara, T. Yanagisawa, Y. Imai und M. Matsubara (2003). "A/C1166 gene polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor (AT1) and ambulatory blood pressure: the Ohasama Study." Hypertens Res **26**(2): 141-5.
- Lajemi, M., C. Labat, S. Gautier, P. Lacolley, M. Safar, R. Asmar, F. Cambien und A. Benetos (2001). "Angiotensin II type 1 receptor-153A/G and 1166A/C gene polymorphisms and increase in aortic stiffness with age in hypertensive subjects." J Hypertens **19**(3): 407-13.
- Lash, J. M., G. P. Nase und H. G. Bohlen (1999). "Acute hyperglycemia depresses arteriolar NO formation in skeletal muscle." Am J Physiol **277**(4 Pt 2): H1513-20.
- Leary, A. C., P. T. Donnan, T. M. MacDonald und M. B. Murphy (2000). "Physical activity level is an independent predictor of the diurnal variation in blood pressure." J Hypertens **18**(4): 405-10.
- Libby, P., P. M. Ridker und A. Maseri (2002). "Inflammation and atherosclerosis." Circulation **105**(9): 1135-43.
- Lichtenauer, U. D., J. Seissler und W. A. Scherbaum (2003). "[Diabetic complications. Micro and macroangiopathic end-organ damage]." Internist (Berl) **44**(7): 840-6, 848-52.
- Lovati, E., A. Richard, B. M. Frey, F. J. Frey und P. Ferrari (2001). "Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease." Kidney Int **60**(1): 46-54.
- Lurbe, E., J. Redon, J. M. Pascual, J. Tacons und V. Alvarez (2001). "The spectrum of circadian blood pressure changes in type I diabetic patients." J Hypertens **19**(8): 1421-8.
- Luther, Y., C. Bantis, K. Ivens, K. Fehsel, V. Kolb-Bachhofen und P. Heering (2003). "Effects of the genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system on focal segmental glomerulosclerosis." Kidney Blood Press Res **26**(5-6): 333-7.
- Madacsy, L., A. Yasar, T. Tulassay, A. Korner, J. Kelemen, M. Hobor und M. Miltenyi (1994). "Relative nocturnal hypertension in children with insulin-dependent diabetes mellitus." Acta Paediatr **83**(4): 414-7.
- Marre, M., B. Bouhanick, G. Berrut, Y. Gallois, J. J. Le Jeune, G. Chatellier, J. Menard und F. Alhenc-Gelas (1999). "Renal changes on hyperglycemia and angiotensin-converting enzyme in type 1 diabetes." Hypertension **33**(3): 775-80.
- Marre, M., X. Jeunemaitre, Y. Gallois, M. Rodier, G. Chatellier, C. Sert, L. Dusselier, Z. Kahal, L. Chaillous, S. Halimi, A. Muller, H. Sackmann, B. Bauduceau, F. Bled, P. Passa und F. Alhenc-Gelas (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**(7): 1585-95.
- Matsubara, M., M. Kikuya, T. Ohkubo, H. Metoki, F. Omori, T. Fujiwara, M. Suzuki, M. Michimata, A. Hozawa, T. Katsuya, J. Higaki, I. Tsuji, T. Araki, T. Ogihara, H. Satoh, S. Hisamichi, K. Nagai, H. Kitaoka und Y. Imai (2001). "Aldosterone synthase gene (CYP11B2) C-334T polymorphism, ambulatory blood pressure and nocturnal decline in blood pressure in the general Japanese population: the Ohasama Study." J Hypertens **19**(12): 2179-84.

- Meguid El Nahas, A. und A. K. Bello (2005). "Chronic kidney disease: the global challenge." *Lancet* **365**(9456): 331-40.
- Middeke, M. und J. Schrader (1994). "Nocturnal blood pressure in normotensive subjects and those with white coat, primary, and secondary hypertension." *Bmj* **308**(6929): 630-2.
- Miller, J. A., J. W. Scholey, K. Thai und Y. P. Pei (1997). "Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and renal hemodynamic function in early diabetes." *Kidney Int* **51**(1): 119-24.
- Miller, J. A., K. Thai und J. W. Scholey (2000). "Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and the response to hyperglycemia in early type 1 diabetes." *Diabetes* **49**(9): 1585-9.
- Mondry, A., M. Loh, P. Liu, A. L. Zhu und M. Nagel (2005). "Polymorphisms of the insertion / deletion ACE and M235T AGT genes and hypertension: surprising new findings and meta-analysis of data." *BMC Nephrol* **6**(1): 1.
- Monteagudo, P. T., J. C. Nobrega, P. R. Cezarini, S. R. Ferreira, O. Kohlmann, Jr., A. B. Ribeiro und M. T. Zanella (1996). "Altered blood pressure profile, autonomic neuropathy and nephropathy in insulin-dependent diabetic patients." *Eur J Endocrinol* **135**(6): 683-8.
- Mulatero, P., F. Morello und F. Veglio (2004). "Genetics of primary aldosteronism." *J Hypertens* **22**(4): 663-70.
- Mulatero, P., D. Schiavone, F. Fallo, F. Rabbia, C. Pilon, L. Chiandussi, L. Pascoe und F. Veglio (2000). "CYP11B2 gene polymorphisms in idiopathic hyperaldosteronism." *Hypertension* **35**(3): 694-8.
- Mulder, H. J., P. P. van Geel, M. J. Schalijs, W. H. van Gilst, A. H. Zwinderman und A. V. Bruscke (2003). "DD ACE gene polymorphism is associated with increased coronary artery endothelial dysfunction: the PREFACE trial." *Heart* **89**(5): 557-8.
- Munroe, P. B. und M. J. Caulfield (2000). "Genetics of hypertension." *Curr Opin Genet Dev* **10**(3): 325-9.
- Neumann, J., G. Ligtenberg, Klein, II, H. A. Koomans und P. J. Blankestijn (2004). "Sympathetic hyperactivity in chronic kidney disease: pathogenesis, clinical relevance, and treatment." *Kidney Int* **65**(5): 1568-76.
- Niu, T., J. Yang, B. Wang, W. Chen, Z. Wang, N. Laird, E. Wei, Z. Fang, K. Lindpaintner, J. J. Rogus und X. Xu (1999). "Angiotensinogen gene polymorphisms M235T/T174M: no excess transmission to hypertensive Chinese." *Hypertension* **33**(2): 698-702.
- O'Donnell, C. J., K. Lindpaintner, M. G. Larson, V. S. Rao, J. M. Ordovas, E. J. Schaefer, R. H. Myers und D. Levy (1998). "Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study." *Circulation* **97**(18): 1766-72.
- Ono, K., T. Mannami, S. Baba, N. Yasui, T. Ogihara und N. Iwai (2003). "Lack of association between angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and hypertension in Japanese." *Hypertens Res* **26**(2): 131-4.
- Ortlepp, J. R., J. Metrikat, V. Mevissen, F. Schmitz, M. Albrecht, P. Maya-Pelzer, P. Hanrath, K. Zerres und R. Hoffmann (2003). "Relation between the angiotensinogen (AGT) M235T gene polymorphism and blood pressure in a large, homogeneous study population." *J Hum Hypertens* **17**(8): 555-9.
- O'Shea, J. C. und M. B. Murphy (2000). "Nocturnal blood pressure dipping: a consequence of diurnal physical activity blipping?" *Am J Hypertens* **13**(6 Pt 1): 601-6.
- Parikh, A., E. B. Sochett, B. W. McCrindle, A. Dipchand, A. Daneman und D. Daneman (2000). "Carotid artery distensibility and cardiac function in adolescents with type 1 diabetes." *J Pediatr* **137**(4): 465-9.
- Pavlovic, M., R. W. Holl, U. Haeberle, K. Schwarz, E. Heinze, K. M. Debatin und D. Lang (1999). "Angiotensin I converting enzyme and angiotensinogen gene polymorphisms related to 24-h blood pressure in paediatric type I diabetes mellitus." *Eur J Pediatr* **158**(1): 18-23.

- Pereira, A. C., G. F. Mota, R. S. Cunha, F. L. Herbenhoff, J. G. Mill und J. E. Krieger (2003). "Angiotensinogen 235T allele "dosage" is associated with blood pressure phenotypes." Hypertension **41**(1): 25-30.
- Perin, P. C., S. Maule und R. Quadri (2001). "Sympathetic nervous system, diabetes, and hypertension." Clin Exp Hypertens **23**(1-2): 45-55.
- Petrovic, D., M. Bidovec und B. Peterlin (2002). "Gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system and essential arterial hypertension in childhood." Folia Biol (Krakow) **50**(1-2): 53-6.
- Pontremoli, R., M. Ravera, F. Viazzi, C. Nicoletta, V. Berruti, G. Leoncini, F. Giacomelli, G. P. Bezante, G. Sacchi, R. Ravazzolo und G. Deferrari (2000). "Genetic polymorphism of the renin-angiotensin system and organ damage in essential hypertension." Kidney Int **57**(2): 561-9.
- Porto, P. I., S. I. Garcia, G. Dieuzeide, C. Gonzalez und C. J. Pirola (2003). "Renin-angiotensin-aldosterone system loci and multilocus interactions in young-onset essential hypertension." Clin Exp Hypertens **25**(2): 117-30.
- Procopciuc, L., T. Popescu, G. Jebeleanu, D. Pop und D. Zdrenghia (2002). "Essential arterial hypertension and polymorphism of angiotensinogen M235T gene." J Cell Mol Med **6**(2): 245-50.
- Reinhardt, D., H. H. Sigusch, S. F. Vogt, C. Zeiss, K. Farker, A. Hoffmann und S. Muller (2000). "A common variant of the angiotensinogen gene and the risk of coronary artery disease in a German population." Pharmazie **55**(1): 69-71.
- Renz-Polster, K., Braun, Ed. (2004). Basislehrbuch Innere Medizin, Urban und Fischer.
- Rigat, B., C. Hubert, F. Alhenc-Gelas, F. Cambien, P. Corvol und F. Soubrier (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**(4): 1343-6.
- Rodriguez-Perez, J. C., F. J. Rodriguez-Esparragon, O. Hernandez-Perera, M. D. Fiuza-Perez, A. Anabitarte-Prieto und A. Losada-Cabrera (2000). "Effects of the angiotensinogen gene M235T and A(-6)G variants on blood pressure and other vascular risk factors in a Spanish population." J Hum Hypertens **14**(12): 789-93.
- Rosengarten, B., A. Dost, A. Kaufmann, L. Gortner und M. Kaps (2002). "Impaired cerebrovascular reactivity in type 1 diabetic children." Diabetes Care **25**(2): 408-10.
- Rossing, P. (2005). "The changing epidemiology of diabetic microangiopathy in type 1 diabetes." Diabetologia **48**(8): 1439-44.
- Rudnichi, A., M. E. Safar, M. Lajemi und A. Benetos (2004). "Gene polymorphisms of the renin-angiotensin system and age-related changes in systolic and diastolic blood pressure in subjects with hypertension." Am J Hypertens **17**(4): 321-7.
- Rust, S., H. Funke und G. Assmann (1993). "Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection." Nucleic Acids Res **21**(16): 3623-9.
- Safar, M. E., V. Cattan, P. Lacolley, R. Nzietchueng, C. Labat, M. Lajemi, N. de Luca und A. Benetos (2005). "Aldosterone synthase gene polymorphism, stroke volume and age-related changes in aortic pulse wave velocity in subjects with hypertension." J Hypertens **23**(6): 1159-66.
- Sarzani, R., F. Salvi, P. Dessi-Fulgheri, R. Catalini, D. Mazzara, G. Cola, N. Siragusa, D. Spagnolo, P. Ercolani, R. Gesuita, F. Carle und A. Rappelli (2003). "Aldosterone synthase alleles and cardiovascular phenotype in young adults." J Hum Hypertens **17**(12): 859-64.
- Schmidt, S., J. Beige, M. Walla-Friedel, M. C. Michel, A. M. Sharma und E. Ritz (1997). "A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with hypertension." J Hypertens **15**(12 Pt 1): 1385-8.

- Schwab, K. O., J. Doerfer, W. Hecker, J. Grulich-Henn, D. Wiemann, O. Kordonouri, P. Beyer und R. W. Holl (2006). "Spectrum and prevalence of atherogenic risk factors in 27,358 children, adolescents, and young adults with type 1 diabetes: cross-sectional data from the German diabetes documentation and quality management system (DPV)." Diabetes Care **29**(2): 218-25.
- Scott, R. A., C. Moran, R. H. Wilson, V. Onywera, M. K. Boit, W. H. Goodwin, P. Gohlke, J. Payne, H. Montgomery und Y. P. Pitsiladis (2005). "No association between Angiotensin Converting Enzyme (ACE) gene variation and endurance athlete status in Kenyans." Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.
- Sethi, A. A., B. G. Nordestgaard und A. Tybjaerg-Hansen (2003). "Angiotensinogen gene polymorphism, plasma angiotensinogen, and risk of hypertension and ischemic heart disease: a meta-analysis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(7): 1269-75.
- Shanmugam, V., K. W. Sell und B. K. Saha (1993). "Mistyping ACE heterozygotes." PCR Methods Appl **3**(2): 120-1.
- Shichiri, M., Y. Hirata, K. Ando, T. Emori, K. Ohta, S. Kimoto, M. Ogura, A. Inoue und F. Marumo (1990). "Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure." Hypertension **15**(5): 493-6.
- Soergel, M., M. Kirschstein, C. Busch, T. Danne, J. Gellermann, R. Holl, F. Krull, H. Reichert, G. S. Reusz und W. Rascher (1997). "Oscillometric twenty-four-hour ambulatory blood pressure values in healthy children and adolescents: a multicenter trial including 1141 subjects." J Pediatr **130**(2): 178-84.
- Soergel, M. und F. Schaefer (2002). "Effect of hypertension on the progression of chronic renal failure in children." Am J Hypertens **15**(2 Pt 2): 53S-56S.
- Sorof, J. M. und R. J. Portman (2000). "Ambulatory blood pressure monitoring in the pediatric patient." J Pediatr **136**(5): 578-86.
- Soubrier, F. (1998). "Blood pressure gene at the angiotensin I-converting enzyme locus: chronicle of a gene foretold." Circulation **97**(18): 1763-5.
- Staessen, J. A., T. Kuznetsova, J. G. Wang, D. Emelianov, R. Vlietinck und R. Fagard (1999). "M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk." J Hypertens **17**(1): 9-17.
- Stankovic, A., M. Zivkovic, S. Glisic und D. Alavantic (2003). "Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and essential hypertension in Serbian population." Clin Chim Acta **327**(1-2): 181-5.
- Strachan, R. (2005). Molekulare Humangenetik, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Sugimoto, K., T. Katsuya, T. Ohkubo, A. Hozawa, K. Yamamoto, A. Matsuo, H. Rakugi, I. Tsuji, Y. Imai und T. Ogihara (2004). "Association between angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism and essential hypertension: the Ohasama Study." Hypertens Res **27**(8): 551-6.
- Szombathy, T., C. Szalai, B. Katalin, T. Palicz, L. Romics und A. Csaszar (1998). "Association of angiotensin II type 1 receptor polymorphism with resistant essential hypertension." Clin Chim Acta **269**(1): 91-100.
- Tamaki, S., N. Iwai, Y. Tsujita und M. Kinoshita (1999). "Genetic polymorphism of CYP11B2 gene and hypertension in Japanese." Hypertension **33**(1 Pt 2): 266-70.
- Tanaka, C., K. Kamide, S. Takiuchi, Y. Kawano und T. Miyata (2004). "Evaluation of the Lys198Asn and -134delA genetic polymorphisms of the endothelin-1 gene." Hypertens Res **27**(5): 367-71.
- Tiago, A. D., D. Badenhorst, B. Nkeh, G. P. Candy, R. Brooksbank, P. Sareli, E. Libhaber, N. J. Samani, A. J. Woodiwiss und G. R. Norton (2003). "Impact of renin-angiotensin-aldosterone system gene variants on the severity of hypertension in patients with newly diagnosed hypertension." Am J Hypertens **16**(12): 1006-10.
- Tiret, L. und F. Cambien (1995). "Departure from Hardy-Weinberg equilibrium should be systematically tested in studies of association between genetic markers and disease." Circulation **92**(11): 3364-5.

- Tiret, L., O. Poirier, V. Hallet, T. A. McDonagh, C. Morrison, J. J. McMurray, H. J. Dargie, D. Arveiler, J. B. Ruidavets, G. Luc, A. Evans und F. Cambien (1999). "The Lys198Asn polymorphism in the endothelin-1 gene is associated with blood pressure in overweight people." Hypertension **33**(5): 1169-74.
- Torffvit, O. und C. D. Agardh (1993). "Day and night variation in ambulatory blood pressure in type 1 diabetes mellitus with nephropathy and autonomic neuropathy." J Intern Med **233**(2): 131-7.
- Treiber, F. A., P. Barbeau, G. Harshfield, H. S. Kang, D. M. Pollock, J. S. Pollock und H. Snieder (2003). "Endothelin-1 gene Lys198Asn polymorphism and blood pressure reactivity." Hypertension **42**(4): 494-9.
- Tsukada, K., T. Ishimitsu, M. Teranishi, M. Saitoh, M. Yoshii, H. Inada, S. Ohta, M. Akashi, J. Minami, H. Ono, M. Ohru und H. Matsuoka (2002). "Positive association of CYP11B2 gene polymorphism with genetic predisposition to essential hypertension." J Hum Hypertens **16**(11): 789-93.
- van der Kleij, F. G., P. E. de Jong, R. H. Henning, D. de Zeeuw und G. Navis (2002). "Enhanced responses of blood pressure, renal function, and aldosterone to angiotensin I in the DD genotype are blunted by low sodium intake." J Am Soc Nephrol **13**(4): 1025-33.
- van Ittersum, F. J., M. T. Schram, J. J. van der Heijden-Spek, L. M. Van Bortel, J. W. Elte, P. Biemond, J. A. Staessen, A. J. Donker und C. D. Stehouwer (2004). "Autonomic nervous function, arterial stiffness and blood pressure in patients with Type I diabetes mellitus and normal urinary albumin excretion." J Hum Hypertens **18**(11): 761-8.
- Verdecchia, P., C. Porcellati, G. Schillaci, C. Borgioni, A. Ciucci, M. Battistelli, M. Guerrieri, C. Gatteschi, I. Zampi, A. Santucci und et al. (1994). "Ambulatory blood pressure. An independent predictor of prognosis in essential hypertension." Hypertension **24**(6): 793-801.
- Verdecchia, P., G. Schillaci, M. Guerrieri, C. Gatteschi, G. Benemio, F. Boldrini und C. Porcellati (1990). "Circadian blood pressure changes and left ventricular hypertrophy in essential hypertension." Circulation **81**(2): 528-36.
- Vinik, A. I., R. E. Maser, B. D. Mitchell und R. Freeman (2003). "Diabetic autonomic neuropathy." Diabetes Care **26**(5): 1553-79.
- Vleming, L. J., J. W. van der Pijl, H. H. Lemkes, R. G. Westendorp, J. A. Maassen, M. R. Daha, L. A. van Es und C. van Kooten (1999). "The DD genotype of the ACE gene polymorphism is associated with progression of diabetic nephropathy to end stage renal failure in IDDM." Clin Nephrol **51**(3): 133-40.
- Wang, J. G., L. Liu, L. Zagato, J. Xie, R. Fagard, K. Jin, J. Wang, Y. Li, G. Bianchi und J. A. Staessen (2004). "Blood pressure in relation to three candidate genes in a Chinese population." J Hypertens **22**(5): 937-44.
- Wilda, M., U. Fuchs, W. Wossmann und A. Borkhardt (2002). "Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi)." Oncogene **21**(37): 5716-24.
- Wojciechowska, W., J. A. Staessen, K. Stolarz, T. Nawrot, J. Filipovsky, M. Ticha, G. Bianchi, E. Brand, M. Cwynar, T. Grodzicki, T. Kuznetsova, H. A. Struijker-Boudier, V. Svobodova, L. Thijs, L. M. Van Bortel und K. Kawecka-Jaszcz (2004). "Association of peripheral and central arterial wave reflections with the CYP11B2 -344C allele and sodium excretion." J Hypertens **22**(12): 2311-9.
- Wuhl, E., K. Witte, M. Soergel, O. Mehls und F. Schaefer (2002). "Distribution of 24-h ambulatory blood pressure in children: normalized reference values and role of body dimensions." J Hypertens **20**(10): 1995-2007.
- Xiang, K., T. Zheng, D. Sun und J. Li (1998). "[The relationship between angiotensin II type 1 receptor gene and coronary heart disease, hypertension and diabetes mellitus in Chinese]." Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi **15**(1): 9-12.
- Yamauchi, T., K. Ohnaka, R. Takayanagi, F. Umeda und H. Nawata (1990). "Enhanced secretion of endothelin-1 by elevated glucose levels from cultured bovine aortic endothelial cells." FEBS Lett **267**(1): 16-8.

- Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto und T. Masaki (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature **332**(6163): 411-5.
- Zaman, M. M., N. Yoshiike, C. Date, T. Yokoyama, Y. Matsumura, S. Ikemoto und H. Tanaka (2001). "Angiotensin converting enzyme genetic polymorphism is not associated with hypertension in a cross-sectional sample of a Japanese population: the Shibata Study." J Hypertens **19**(1): 47-53.
- Zhang, X., J. Erdmann, V. Regitz-Zagrosek, S. Kurzinger, H. W. Hense und H. Schunkert (2000). "Evaluation of three polymorphisms in the promoter region of the angiotensin II type I receptor gene." J Hypertens **18**(3): 267-72.

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Pathophysiologie der hyperglykämie-induzierten Stoffwechseländerungen _____	9
Abbildung 3-2: Pathophysiologische Folgen der Hyperglykämie-induzierten Aktivierung der PKC _____	11
Abbildung 3-3: Pathophysiologie der Glomerulosklerose _____	14
Abbildung 3-4: Pathophysiologie der tubulointerstitiellen Fibrose _____	15
Abbildung 3-5: Die hyperglykämie-induzierte RAAS-Aktivierung _____	18
Abbildung 3-6: Pathophysiologische Folgen einer arteriellen Hypertension bei vorliegender Nephropathie __	20
Abbildung 4-1: Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion _____	39
Abbildung 4-2: Ablauf eines Restriktionsenzymverdaus _____	49
Abbildung 5-1: Prozentuale Anteile pathologischer Blutdruckparameter zu den Messzeitpunkten 1 und 2 ____	56
Abbildung 5-2 a-b: Differenzen der LMS- SDS- und der Dipping-Werte für das Gesamtkollektiv _____	58
Abbildung 5-3 a-f: Differenzen der LMS-SDS- und Dipping-Werte für die Genotypen von ACE _____	60
Abbildung 5-4 a-f: Differenzen der LMS-SDS- und Dipping-Werte für die Genotypen von AGT _____	62
Abbildung 5-5 a-f: Differenzen der LMS-SDS- und Dipping-Werte für die Genotypen von ATR1 _____	63
Abbildung 5-6 a-f: Differenzen der LMS-SDS- und Dipping-Werte für die Genotypen von Aldo-S _____	64
Abbildung 5-7 a-f: Differenzen der LMS-SDS- und Dipping-Werte für die Genotypen von End1 _____	65

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gen-Polymorphismen und ihre pathophysiologische Bedeutung	30
Tabelle 2: Genotypenverteilung und Allelfrequenz im Patientenkollektiv	103
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primer	104
Tabelle 4: Übersicht über die für die PCR verwendete Reagenzien	41
Tabelle 5: Durchführung der PCR für die ACE-, ACE-ins-, AGT- und ATR1-PCR	105
Tabelle 6: Durchführung der PCR für die Aldo-S und End1-PCR	106
Tabelle 7: Konzentration der für die Gelelektrophoresen verwendeten Agarosen	44
Tabelle 8: Übersicht über die für den Restriktionsenzymverdau verwendeten Reagenzien	50
Tabelle 9: Verwendete Volumina der PCR-Produkte für den Restriktionsenzymverdau	50
Tabelle 10: Elutionsvolumina der verwendeten Reagenzien	51
Tabelle 11: Verwendete Reagenzien und Inkubationszeiten des Restriktionsenzymverdaus	51
Tabelle 12: Konzentration der für die Gelelektrophoresen des Restriktionsenzymverdaus verwendeten Agarosen	52
Tabelle 13: Allgemeine Angaben zum Patientenkollektiv	107
Tabelle 14: Absolute 24-Stunden-Blutdruckwerte der Messzeitpunkte 1 und 2	108
Tabelle 15: Anteil pathologischer Blutdrücke in der globalen Blutdruckanalyse zu den Messzeitpunkten 1 und 2	109
Tabelle 16: Prozentualer Anteil der Genotypen mit pathologischen Blutdruckwerten zum Messzeitpunkt 1	110
Tabelle 17: Prozentualer Anteil der Genotypen mit pathologischen Blutdruckwerten zum Messzeitpunkt 2	110
Tabelle 18: SDS-LMS-Werte der 24h-Blutdruckmessungen der Zeitpunkte 1 und 2	111
Tabelle 19: Differenzen der LMS-Blutdruckwerte der durchgeführten 24h-Blutdruckmessungen	111
Tabelle 20: Differenzen der SDS-Werte der Zeitpunkte 1 und 2 für die Genotypen von ACE	112
Tabelle 21: Differenzen der SDS-Werte der Zeitpunkte 1 und 2 für die Genotypen von AGT	113
Tabelle 22: Differenzen der SDS-Werte der Zeitpunkte 1 und 2 für die Genotypen von ATR1	114
Tabelle 23: Differenzen der SDS-Werte der Zeitpunkte 1 und 2 für die Genotypen von Aldo-S	115
Tabelle 24: Differenzen der SDS-Werte der Zeitpunkte 1 und 2 für die Genotypen von End 1	116
Tabelle 25: Logistische Regressionsanalyse für die Genotypen von ACE	117
Tabelle 26: Logistische Regressionsanalyse für die Genotypen von AGT	117
Tabelle 27: Logistische Regressionsanalyse für die Genotypen von ATR1	118
Tabelle 28: Logistische Regressionsanalyse für die Genotypen von Aldo-S	118
Tabelle 29: Logistische Regressionsanalyse für die Genotypen von End 1	119

12. Tabellen

	Genotypenverteilung						Allelfrequenz			
	Diabetes n=95			Kontrolle n=300 *			Diabetes		Kontrolle	
ATR 1	A/A 49.7 % (n= 47)	A/C 44.21 % (n= 42)	C/C 6..32 % (n= 6)	A/A 55.7 % (n= 167)	A/C 32.6 % (n= 98)	C/C 11.7 % (n= 35)	A 71.6 % (n= 136)	C 28.4 % (n= 54)	A 72.0 % (n= 432)	C 28.0 % (n= 168)
AGT	C/C 22.11 % (n= 21)	C/T 50.53 % (n= 48)	T/T 27.37 % (n= 26)	C/C 15.5 % (n= 46)	C/T 50.6% (n= 152)	T/T 33.9 % (n= 102)	C 47.4 % (n= 90)	T 52.6 % (n= 100)	C 40.8 % (n= 244)	T 59.2 % (n= 356)
ACE	D/D 29.03 % (n= 27)	D/I 52.69 % (n= 49)	I/I 18.28 % (n= 17)	D/D 14.6 % (n= 44)	D/I 63.8 % (n= 191)	I/I 21.5 % (n= 65)	D 55.4% (n= 103)	I 44.6 % (n= 83)	D 46.5 % (n= 279)	I 53.5 % (n= 321)
Aldo-S	C/C 10.53 % (n= 10)	C/T 54.74 % (n=52)	T/T 34.74 % (n= 33)	C/C 17.0 % (n= 51)	C/T 45.8 % (n= 137)	T/T 37.2 % (n= 112)	C 37.9 % (n= 72)	T 62.1 % (n= 118)	C 39.83 % (n= 239)	T 60.16 % (n= 361)
End 1	T/T 4.21 % (n= 4)	G/T 45.26 % (n= 43)	T/T 50.53 % (n= 48)	T/T 6.7 % (n= 10)	G/T 35.3 % (n= 53)	G/G 58.0 % (n= 87)	T 26.8 % (n= 51)	G 73.1 % (n= 139)	T 24.3 % (n= 73)	G 75.7 % (n= 227)

Tabelle 2: Genotypenverteilung und Allelfrequenz im Patientenkollektiv

Angegeben sind die Häufigkeiten der Genotypen bzw. der Allele in Prozent bei den diabetischen Patienten und der Kontrollgruppe. *Kontrollgruppe für ATR1, AGT, ACE, Aldo-S: n= 300; für End 1: n= 150

PCR	Externe Sense-Primer	Externe Anti-Sense-Primer	Interne Sense-Primer	Interne Anti-Sense-Primer
ACE	ACE-up: 5'> GCC CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT<3'	ACE-down: 5'> GGA TGG CTC TCC CCG CCT TGT CTC< 3'	/	/
ACE-ins	ACE-ins-up: 5'> TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC<3'	ACE-ins-down: 5'> TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA < 3'	/	/
AGT	AGT-int-up: 5'> TGG TCC TCC CAC GCT CTC TGG ACT TCA C <3'	AGT-2: 5'>CCA GGG TGC TGT CCA CAC TGG CTC CGG <3' AGT-3: 5'> AAG TGG ACG TAG GTG TTG AAA GGG AGG GTG CTG TCC ACA CTG GCT TCC A< 3'	/	/
ATR	ATR1-ex-up: 5'> AAT GCT TGT AGC CAA AGT CAC CT <3'	ATR1-ex-down: 5'> GGC TTT GCT TTG TCT TGT TG <3'	ATR1-int-up: 5'>GAG AAC ACC AAT ATT ACA GTT TGT G <3'	ATR1-int-down: 5'> AAG TCG GTT CAG TCC ACA TAA TG <3'
Aldo-S	Aldo-ex-up): 5'> CAG GAG GAG ACC CCA TGT GAC <3'	Aldo-ex-down: 5'> CCT CCA CCC TGT TCA GCC C <3'	Aldo-int-up: 5'> CGT ATC GAG ATT CCT CAC ATG GAA C <3'	Aldo-int-down: 5'> CTG CTC TGG AAA CAT ATC ACG TC <3'
End1	End1-up: 5'> AGT AGC AGA GAG ATC TAT GCA TCC<3'	End1-down: 5'> CAG CAT GTT CTA AAT TCT ACC AAC CC<3'	End1-int-up-neu: 5'>GCA GAG GAG ATC GAT GCA TCC TAT AG<3'	End1-int-down: 5'<ACT TAT TGA AGA ATT TGA TTA TCC ATG <3'
Abl	Abl-ex-up: 5'> CCA GTA GCA TCT GAC TTT GAG CCT <3'	Abl2-ex-down: 5'> CCA GAC TGT TGA CTG GCG TGA TGT < 3'	Abl3-int-up: 5'> TGA GTG AAG CCG CTC GTT GGA ACT <3'	Abl4-int-down: 5'> TTC ACA CCA TTC CCC ATT GTG ATT <3'

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Primer

PCR	Herstellung des PCR-Ansatzes											Programmierung des Thermocyclers			
	Single-Run-PCR	Nested-PCR	Lauf	Puffer (µl)	dNTP's (µl)	Sense-Primer	Anti-Sense-Primer	Taq-Polymerase (µl)	Genom. DNA bzw. PCR-Produkt (µl)	H ₂ O (µl)	Gesamt-volumen (µl)	Start-Temp.	Anzahl der PCR-Zyklen	Zyklen	End-Temperatur
ACE	X		1.	5.0	4.0	1.0 µl ACE-up (20 µM)	1.0 µl ACE-down (20 µM)	0.5	1.0 µl Genom. DNA (50 ng)	37.5	50.0	10 min: 94°C	35	15 sec.: 94 °C 30 sec.: 65°C 90 sec.: 72°C *	5 min: 72°C
ACE-ins	X		1.	5.0	4.0	1.0 µl ACE-ins-up (20 µM)	1.0 µl ACE-ins-down (20 µM)	0.5	1.0 µl Genom. DNA (50 ng)	37.5	50.0	10 min: 94°C	35	15 sec.: 94 °C 30 sec.: 67°C 60 sec.: 72°C *	5 min: 72°C
AGT	X		1.	5.0	4.0	1.0 µl AGT-int-up (20 µM)	je 1.0 µl AGT-2 (10 µM) + AGT-3 (20 µM)	0.5	1.0 µl Genom. DNA (50 ng)	36.5	50.0	10 min: 94°C	42	45 sec.: 94 °C 50 sec.: 62°C 60 sec.: 72°C *	5min : 72°C
ATRI		X	1.	5.0	4.0	0.4 µl ATR-ex-up (20 µM)	0.4 µl ATR-ex-down (20 µM)	0.5	1.0 µl Genom. DNA (50 ng)	38.7	50.0	10 min: 94°C	35	45 sec.: 94 °C 60 sec.: 55°C 120 sec.: 72°C *	X
			2.	5.0	4.0	1.0 µl ATR-int-up (20 µM)	0.4 µl ATR-int-down (20 µM)	0.5	2.0 µl PCR-Produkt	36.5	50.0	10 min: 94°C	30	45 sec.: 94 °C 60 sec.: 63°C 90 sec.: 72°C *	X

Tabelle 5: Durchführung der PCR für die ACE-, ACE-ins-, AGT- und ATRI-PCR

Angegeben sind die der Reagenzien und zugehörige Volumina uir Erstellung des PCR Ansatzes die Programmierung des Thermocyclers (*= +3 sec/Zyklus)

PCR	Herstellung des PCR-Ansatzes											Programmierung des Thermocyclers			
	Single-Run-PCR	Nested-PCR	Lauf	Puffer (µl)	dNTP's (µl)	Sense-Primer	Anti-Sense-Primer	Taq-Polymerase (µl)	Genom. DNA bzw. PCR-Produkt (µl)	H ₂ O (µl)	Gesamt-volumen (µl)	Start-Temp.	Anzahl der PCR-Zyklen	Zyklen	End-Temperatur
Aldo-S		X	1.	5.0	4.0	0.4 µl Aldo-ex-up (20 µM)	0.4 µl Aldo-ex-down (20 µM)	0.5	1.0 µl Genom. DNA (50 ng)	38.7	50.0	10 min: 94°C	35	45 sec.: 94 °C 50 sec.: 58°C 90 sec.: 72°C *	X
			2.	5.0	4.0	1.0 µl Aldo-int-up (20 µM)	1.0 µl Aldo-int-down (20 µM)	0.5	1.0 µl PCR-Produkt	37.5	50.0	10 min: 94°C	30	45 sec.: 94 °C 60 sec.: 63°C 90 sec.: 72°C *	X
End1		X	1.	5.0	4.0	0.4 µl End-ex-up (20 µM)	0.4 µl End-ex-down (20 µM)	0.5	1.0 µl Genom. DNA (50 ng)	38.7	50.0	10 min: 94°C	35	45 sec.: 94 °C 50 sec.: 55°C 75 sec.: 72°C *	X
			2.	5.0	4.0	1.0 µl End-int-up (20 µM)	1.0 µl End-int-down (20 µM)	0.5	1.0 µl PCR-Produkt	37.5	50.0	10 min: 94°C	25	45 sec.: 94 °C 50 sec.: 55°C 60 sec.: 72°C *	X

Tabelle 6: Durchführung der PCR für die Aldo-S und End1-PCR

Angegeben sind die der Reagenzien und zugehörige Volumina uir Erstellung des PCR Ansatzes die Programmierung des Thermocyclers (*= +3 sec/Zyklus)

Parameter n=95	Zeitpunkt 1					Zeitpunkt 2					Differenzen Zeitpunkt 1 und 2				
	Min	1. Quantil	Med	3. Quantil	Max	Min	1. Quantil	Med	3. Quantil	Max	Min	1. Quantil	Med	3. Quantil	Max
Alter	9.000	11.000	12.000	14.000	18.000	10.000	13.000	14.000	16.000	20.000	%	%	%	%	%
Diabetesdauer	1.000	16.000	44.000	81.000	152.000	13.000	45.000	70.000	102.000	186.000	%	%	%	%	%
Größe (cm)	118.000	146.300	155.300	164.000	180.800	133.700	156.100	165.000	172.000	184.000	%	%	%	%	%
BMI	13.700	17.900	19.200	22.200	30.800	15.400	19.600	21.500	23.500	33.100	-2.513	-0.390	0.110	0.659	3.030
SDS BMI	-1.900	0.200	0.870	1.770	7.650	-1.170	0.230	1.040	1.880	7.610	-2.513	-0.390	0.110	0.0659	3.030
Diabetesdauer (Monate)	1.000	16.000	44.000	81.000	152.000	13.000	45.000	70.000	102.000	186.000	%	%	%	%	%
Insulinbedarf (E/kg KG)	0.180	0.690	1.000	1.130	1.450	0.350	0.850	1.000	1.180	1.550	-0.590	-0.080	0.020	0.210	0.850
HbA1c (%)	5.500	6.800	7.300	8.100	14.00	5.600	7.000	7.600	8.100	10.900	-7.30	-0.100	0.200	0.500	3.300
Urinalbumin (mg/g Kreatinin)	2.000	4.700	7.800	14.200	999.00	2.100	4.500	8.300	14.900	90.400	-940.700	-4.400	0.200	5.700	88.400
Cholesterin (mg/dl)	124.000	155.000	176.000	201.000	350.000	112.000	153.000	173.000	194.000	267.000	-191.000	-23.000	0.000	19.000	62.000

Tabelle 13: Allgemeine Angaben zum Patientenkollektiv

Dargestellt sind die Werte der Routineüberwachungsparameter zu den Messzeitpunkten 1 und 2. Angegeben sind die Mediane, die Minimal- und die Maximalausprägung, das erste und dritte Quantil. Des Weiteren sind die Differenzen aus den SDS-Werten der Zeitpunkte 1 und 2 dargestellt.

	Zeitpunkt 1							Zeitpunkt 2						
Parameter n=95	Min	1. Quantil	Med	3. Quantil	Max	Path. absolut	Path. proz.	Min	1. Quantil	Med	3. Quantil	Max	Path. absolut	Path. proz.
SBP tag	104.00	112.00	119.00	124.00	138.00	15	15.79	106.00	116.00	120.00	127.00	142.00	19	20.00
DBP tag	64.00	69.00	73.00	76.00	88.00	5	5.26	60.00	69.00	72.00	76.00	87.00	7	7.37
SBP nacht	89.00	101.00	105.00	110.00	124.00	19	20.00	90.00	103.00	107.00	113.00	137.00	33	34.74
DBP nacht	46.00	54.00	58.00	63.00	72.00	18	18.95	45.00	55.00	59.00	63.00	71.00	25	26.32
Systol. Dipping	0.00	7.60	10.50	14.40	22.20	45	47.37	-13.20	7.70	11.60	15.40	23.30	36	37.89
Diastol. Dipping	0.00	14.50	20.30	24.70	32.40	42	44.21	-10.90	13.90	20.50	24.20	36.60	44	46.32

Tabelle 14: Absolute 24-Stunden-Blutdruckwerte der Messzeitpunkte 1 und 2

Angegeben sind die Mediane, die Minimal- und die Maximalausprägung, das erste und dritte Quantil, sowie die absoluten und prozentualen Häufigkeiten pathologischer, d.h. über der 95. Perzentile des Vergleichskollektivs gelegener, Blutdruckwerte.

Parameter n=95	Anteil patholog. Blutdruckwerte		p
	Zeitpunkt 1	Zeitpunkt 2	
SBP tag	15.79 % (n= 15)	20.00 % (n= 19)	nicht signifikant
DBP tag	5.26 % (n= 5)	7.37 % (n= 7)	nicht signifikant
SBP nacht	20.00 % (n= 19)	34.74 % (n= 33)	0,0338
DBP nacht	18.95 % (n= 18)	26.32 % (n= 25)	nicht signifikant
Systol. Dipping	47.37 % (n= 45)	37.89 % (n= 36)	nicht signifikant
Diastol. Dipping	44.21 % (n= 42)	46.32 % (n= 44)	nicht signifikant

Tabelle 15: Anteil pathologischer Blutdruckwerte in der globalen Blutdruckanalyse zu den Messzeitpunkten 1 und 2

	Genotyp	n	Patholog. Tagwerte (%)		Patholog. Nachtwerte (%)		Patholog. Dipping (%)	
			Systol. BP	Diastol. BP	Systol. BP	Diastol. BP	Systol.	Diastol.
ACE	I/I	17	11.76	0.00	29.41	17.65	58.82	41.18
	I/D	49	12.24	4.08	22.45	20.41	51.02	53.06
	D/D	27	25.92	11.11	11.11	18.52	33.33	29.63
AGT	T/T	21	9.52	4.76	4.76	9.52	9.52	23.81
	C/T	48	18.75	6.25	22.92	22.92	54.17	50.00
	C/C	26	15.38	3.85	26.92	19.23	65.38	50.00
ATRI	C/C	47	17.02	2.13	23.40	25.53	48.94	48.94
	A/C+A/A	48	14.58	8.33	14.58	12.50	45.83	39.58
Aldo-S	C/C	10	0.00	0.00	10.00	20.00	60.00	20.00
	C/T	52	17.31	5.77	23.07	19.23	38.46	46.15
	T/T	33	18.18	6.06	18.18	18.18	57.57	48.48
ENDI	G/G	48	18.75	6.25	16.67	12.50	41.67	43.75
	G/T+T/T	47	12.76	4.26	23.40	25.53	53.19	44.68

Tabelle 16: Prozentualer Anteil der Genotypen mit pathologischen Blutdruckwerten zum Messzeitpunkt 1
 Angegeben ist der Prozentsatz der über der 95. Perzentile des Vergleichskollektivs gelegenen Blutdruckwerte der 95 diabetischen Patienten für die einzelnen Genotypen.

	Genotyp	n	Patholog. Tagwerte (%)		Patholog. Nachtwerte (%)		Patholog. Dipping (%)	
			Systol. BP	Diastol. BP	Systol. BP	Diastol. BP	Systol.	Diastol.
ACE	I/I	17	11.76	5.88	29.41	17.65	35.29	52.94
	I/D	49	16.33	8.16	32.65	24.49	32.65	40.82
	D/D	27	29.63	3.70	40.74	33.33	51.85	51.85
AGT	T/T	21	28.57	0.00	47.62	33.33	47.62	57.14
	C/T	48	14.58	12.50	39.58	25.00	41.67	50.00
	C/C	26	23.08	3.85	15.38	23.08	23.08	30.77
ATRI	C/C	47	23.40	8.51	34.04	29.79	31.91	48.94
	A/C+A/A	48	16.67	6.25	35.42	22.92	43.75	43.75
Aldo-S	C/C	10	10	0.00	40.00	40.00	40.00	60.00
	C/T	52	21.15	11.54	40.38	25.00	42.31	48.08
	T/T	33	21.21	3.03	24.24	24.24	30.30	39.39
ENDI	G/G	48	29.17	10.42	37.50	35.42	31.25	43.75
	G/T+T/T	47	10.64	4.26	31.91	17.02	44.68	48.94

Tabelle 17: Prozentualer Anteil der Genotypen mit pathologischen Blutdruckwerten zum Messzeitpunkt 2
 Angegeben ist der Prozentsatz der über der 95. Perzentile des Vergleichskollektivs gelegenen Blutdruckwerte der 95 diabetischen Patienten für die einzelnen Genotypen.

Parameter n=95	Zeitpunkt 1					Zeitpunkt 2				
	Min	1. Quantil	Med	3. Quantil	Max	Min	1. Quantil	Med	3. Quantil	Max
SDS LMS SBP tag	-2.390	-0.368	0.335	0.906	3.000	-1.623	-0.143	0.298	0.863	3.135
SDS LMS DBP tag	-1.488	-0.472	0.151	0.661	2.861	-2.117	-0.516	0.000	0.673	2.735
SDS LMS SBP nacht	-1.643	-0.072	0.662	1.348	3.101	-1.643	-0.072	0.622	1.213	4.429
SDS LMS DBP nacht	-1.993	-0.178	0.486	1.169	2.696	-2.176	-0.053	0.426	1.134	2.470
Dip SBP	0.000	7.600	10.500	14.400	22.200	-13.200	7.700	11.600	15.400	23.300
Dip DBP	0.000	14.500	20.300	24.700	32.400	-10.900	13.900	20.500	24.200	36.600

Tabelle 18: SDS-LMS-Werte der 24h-Blutdruckmessungen der Zeitpunkte 1 und 2

Angegeben sind die Mediane, die Minimal- und die Maximalausprägung, das erste und dritte Quantil, sowie die absoluten und prozentualen Häufigkeiten pathologischer, d.h. über der 95. Perzentile des Vergleichskollektivs gelegener, Blutdruckwerte.

Parameter n=95	Min	1. Quantil	Med	3. Quantil	Max
Zeitdifferenz	11.00	20.00	25.00	30.00	54.00
Diff LMS SBP tag	-3.143	-0.539	0.114	0.641	2.149
Diff LMS DBP tag	-2.332	-0.549	0.000	0.543	2.308
Diff LMS SBP nacht	-3.281	-0.800	0.095	0.657	4.185
Diff LMS DBP nacht	-3.161	-0.848	-0.036	0.920	3.412
Diff Dip SBP	-34.300	-4.300	1.600	5.800	14.100
Diff Dip DBP	-35.900	-5.800	-0.300	6.400	24.900

Tabelle 19: Differenzen der LMS-Blutdruckwerte der durchgeführten 24h-Blutdruckmessungen

Angegeben sind die Mediane, das erste und dritte Quantil, sowie die Minimal- und die Maximalausprägungen der erhaltenen Werte. Dargestellt ist auch die Zeitdifferenz zwischen den Messungen in Monaten.

Parameter	Genotyp	n	Minimum	1.Quantil	Median	3.Quantil	Maximum
Diff Dip Dbp	I/I	17	-21.100	-9.100	-0.900	3.000	15.100
Diff Dip Dbp	D/I	49	-24.800	-5.400	1.800	9.200	24.900
Diff Dip Dbp	D/D	27	-35.900	-10.800	-3.300	4.000	14.800
Diff Dip SBP	I/I	17	-7.400	-2.000	3.200	6.900	9.600
Diff Dip SBP	D/I	49	-15.800	-4.500	2.300	6.300	14.100
Diff Dip SBP	D/D	27	-34.300	-7.800	-1.600	2.000	9.500
Diff HbA1c	I/I	17	-0.600	0.100	0.200	0.500	1.600
Diff HbA1c	D/I	49	-7.300	-0.100	0.200	0.400	3.300
Diff HbA1c	D/D	27	-2.700	-0.100	0.200	0.600	1.200
Diff_LMS_DIA_T	I/I	17	-1.389	-0.392	-0.126	0.392	1.076
Diff_LMS_DIA T	D/I	49	-2.332	-0.549	0.118	0.706	1.825
Diff_LMS_DIA_T	D/D	27	-2.023	-0.666	-0.193	0.152	2.308
Diff_LMS_DIA_N	I/I	17	-1.511	-0.378	-0.110	0.632	2.241
Diff_LMS_DIA_N	D/I	49	-3.161	-1.065	-0.274	0.920	2.515
Diff_LMS_DIA_N	D/D	27	-2.064	-0.848	0.196	0.977	3.412
Diff_LMS_SBP_T	I/I	17	-3.143	-0.349	-0.039	0.549	1.013
Diff_LMS_SBP_T	D/I	49	-2.426	-0.305	0.158	0.754	2.064
Diff_LMS_SBP_T	D/D	27	-2.080	-0.754	-0.159	0.195	2.149
Diff_LMS_SBP_N	I/I	17	-1.548	-0.482	-0.313	0.141	0.774
Diff_LMS_SBP_N	D/I	49	-3.281	-0.904	0.234	0.784	2.618
Diff_LMS_SBP_N	D/D	27	-2.511	-0.332	0.401	1.058	4.185
Diff_SDS_BMI	I/I	17	-2.513	-0.150	0.000	0.780	1.240
Diff_SDS_BMI	D/I	49	-1.970	-0.294	0.110	0.610	3.030
Diff_SDS_BMI	D/D	27	-2.480	-0.880	0.130	0.480	2.265

Tabelle 20: *Differenzen der SDS-Werte der Zeitpunkte 1 und 2 für die Genotypen von ACE*

Angegeben sind jeweils der Median, die minimale und maximale Merkmalsausprägung sowie das 1. und 3. Quantil. (Frequency Missing: n=2)

Parameter	Genotyp	n	Minimum	1.Quantil	Median	3.Quantil	Maximum
Diff Dip Dbp	T/T	21	-24.800	-11.900	-4.300	4.900	21.100
Diff Dip Dbp	C/T	48	-25.100	-5.450	-0.350	6.150	24.900
Diff Dip Dbp	C/C	26	-35.900	-1.700	1.350	7.300	12.900
Diff Dip SBP	T/T	21	-15.800	-7.700	-2.000	2.200	7.700
Diff Dip SBP	C/T	48	-34.300	-4.400	1.800	5.950	14.100
Diff Dip SBP	C/C	26	-17.100	-1.600	4.150	7.300	11.000
Diff HbA1c	T/T	21	-1.200	0.100	0.400	0.700	1.200
Diff HbA1c	C/T	48	-3.400	-0.100	0.200	0.400	1.500
Diff HbA1c	C/C	26	-7.300	-0.100	0.100	0.300	3.300
Diff_LMS_DIA_T	T/T	21	-2.171	-0.540	0.062	0.487	2.308
Diff_LMS_DIA T	C/T	48	-2.332	-0.629	-0.114	0.390	1.825
Diff_LMS_DIA_T	C/C	26	-2.023	-0.328	0.107	0.780	1.811
Diff_LMS_DIA_N	T/T	21	-2.821	-1.064	0.278	1.717	3.412
Diff_LMS_DIA_N	C/T	48	-3.161	-0.922	-0.083	0.671	2.726
Diff_LMS_DIA_N	C/C	26	-1.430	-0.547	-0.226	0.655	2.267
Diff_LMS_SBP_T	T/T	21	-1.219	-0.479	0.186	0.620	2.149
Diff_LMS_SBP_T	C/T	48	-3.143	-0.634	-0.054	0.677	2.064
Diff_LMS_SBP_T	C/C	26	-2.080	-0.251	0.134	0.555	1.781
Diff_LMS_SBP_N	T/T	21	-1.474	-0.120	0.529	1.115	2.024
Diff_LMS_SBP_N	C/T	48	-3.281	-0.771	0.184	0.640	4.185
Diff_LMS_SBP_N	C/C	26	-2.464	-1.104	-0.394	0.358	2.618
Diff_SDS_BMI	T/T	21	-1.970	-0.620	-0.070	0.367	1.550
Diff_SDS_BMI	C/T	48	-2.513	-0.270	0.239	0.773	3.030
Diff_SDS_BMI	C/C	26	-1.720	-0.340	-0.060	0.610	1.650

Tabelle 21: Differenzen der SDS-Werte der Zeitpunkte 1 und 2 für die Genotypen von AGT

Angegeben sind jeweils der Median, die minimale und maximale Merkmalsausprägung sowie das 1. und 3. Quantil.

Parameter	Genotyp	n	Minimum	1.Quantil	Median	3.Quantil	Maximum
Diff Dip Dbp	A/A	47	-35.900	-5.400	1.300	7.300	22.500
Diff Dip Dbp	A/C	42	-23.300	-9.100	-2.100	6.400	24.900
Diff Dip Dbp	C/C	6	-11.900	-4.800	1.000	2.400	7.400
Diff Dip SBP	A/A	47	-34.300	-2.600	2.000	7.100	14.100
Diff Dip SBP	A/C	42	-11.800	-4.800	-1.200	4.900	10.800
Diff Dip SBP	C/C	6	-9.000	-7.400	4.300	4.900	7.700
Diff HbA1c	A/A	47	-2.700	-0.100	0.200	0.500	1.800
Diff HbA1c	A/C	42	-7.300	-0.100	0.200	0.500	3.300
Diff HbA1c	C/C	6	-0.200	-0.100	0.150	0.300	0.300
Diff_LMS_DIA_T	A/A	47	-2.171	-0.416	0.054	0.551	2.308
Diff_LMS_DIA T	A/C	42	-2.332	-0.667	-0.114	0.487	1.774
Diff_LMS_DIA_T	C/C	6	-1.389	-0.833	0.108	0.439	1.561
Diff_LMS_DIA_N	A/A	47	-3.161	-0.928	-0.204	0.786	2.726
Diff_LMS_DIA_N	A/C	42	-2.747	-0.848	-0.073	0.934	3.412
Diff_LMS_DIA_N	C/C	6	-0.923	-0.826	0.291	0.632	1.057
Diff_LMS_SBP_T	A/A	47	-3.143	-0.449	0.059	0.648	2.149
Diff_LMS_SBP_T	A/C	42	-2.426	-0.551	0.163	0.641	1.553
Diff_LMS_SBP_T	C/C	6	-1.235	-1.039	-0.422	-0.159	1.470
Diff_LMS_SBP_N	A/A	47	-3.281	-0.836	-0.013	0.774	4.185
Diff_LMS_SBP_N	A/C	42	-2.511	-0.721	0.184	0.593	2.024
Diff_LMS_SBP_N	C/C	6	-1.267	-1.110	-0.400	0.350	0.900
Diff_SDS_BMI	A/A	47	-1.970	-0.320	0.000	0.620	2.265
Diff_SDS_BMI	A/C	42	-2.513	-0.395	0.245	0.780	3.030
Diff_SDS_BMI	C/C	6	-1.675	-1.380	-0.440	-0.110	0.310

Tabelle 22: Differenzen der SDS-Werte der Zeitpunkte 1 und 2 für die Genotypen von ATR1

Angegeben sind jeweils der Median, die minimale und maximale Merkmalsausprägung sowie das 1. und 3. Quantil.

Parameter	Genotyp	n	Minimum	1.Quantil	Median	3.Quantil	Maximum
Diff Dip Dbp	C/C	10	-23.300	-14.700	-5.800	0.200	4.200
Diff Dip Dbp	C/T	52	-25.100	-5.800	-0.900	6.100	21.100
Diff Dip Dbp	T/T	33	-35.900	-4.100	1.800	9.500	24.900
Diff Dip SBP	C/C	10	-8.500	-2.000	-1.750	2.100	4.100
Diff Dip SBP	C/T	52	-34.300	-4.100	1.450	4.750	14.100
Diff Dip SBP	T/T	33	-17.100	-4.800	4.900	8.300	11.000
Diff HbA1c	C/C	10	-2.300	-0.600	-0.050	0.300	0.900
Diff HbA1c	C/T	52	-7.300	0.050	0.200	0.500	1.800
Diff HbA1c	T/T	33	-3.400	-0.100	0.200	0.500	3.300
Diff_LMS_DIA_T	C/C	10	-1.817	-0.416	-0.233	-0.126	0.487
Diff_LMS_DIA T	C/T	52	-2.332	-0.553	0.107	0.637	1.825
Diff_LMS_DIA_T	T/T	33	-2.023	-0.552	0.044	0.543	2.308
Diff_LMS_DIA_N	C/C	10	-0.777	-0.286	-0.096	1.178	3.412
Diff_LMS_DIA_N	C/T	52	-3.161	-0.828	0.147	1.008	2.726
Diff_LMS_DIA_N	T/T	33	-2.747	-1.064	-0.378	0.627	2.267
Diff_LMS_SBP_T	C/C	10	-0.731	-0.063	0.146	0.239	0.951
Diff_LMS_SBP_T	C/T	52	-2.426	-0.621	0.136	0.719	2.064
Diff_LMS_SBP_T	T/T	33	-3.143	-0.539	0.013	0.620	2.149
Diff_LMS_SBP_N	C/C	10	-0.546	-0.291	0.256	0.593	1.403
Diff_LMS_SBP_N	C/T	52	-3.281	-0.732	0.245	0.808	4.185
Diff_LMS_SBP_N	T/T	33	-2.511	-1.104	-0.263	0.573	2.024
Diff_SDS_BMI	C/C	10	-2.513	-0.395	0.020	0.780	2.265
Diff_SDS_BMI	C/T	52	-2.480	-0.344	0.020	0.615	3.030
Diff_SDS_BMI	T/T	33	-1.675	-0.390	0.130	0.659	1.150

Tabelle 23: Differenzen der SDS-Werte der Zeitpunkte 1 und 2 für die Genotypen von Aldo-S

Angegeben sind jeweils der Median, die minimale und maximale Merkmalsausprägung sowie das 1. und 3. Quantil.

Parameter	Genotyp	n	Minimum	1.Quantil	Median	3.Quantil	Maximum
Diff Dip Dbp	G/G	48	-35.900	-5.800	-0.750	4.750	48
Diff Dip Dbp	G/T	43	-24.800	-6.800	0.200	9.100	43
Diff Dip Dbp	T/T	4	-11.900	-5.850	2.050	7.750	4
Diff Dip SBP	G/G	48	-19.400	-3.500	1.450	4.750	48
Diff Dip SBP	G/T	43	-34.300	-4.800	1.700	7.700	43
Diff Dip SBP	T/T	4	-7.400	-4.200	2.400	6.050	4
Diff HbA1c	G/G	48	-2.700	-0.050	0.200	0.500	48
Diff HbA1c	G/T	43	-7.300	-0.100	0.200	0.500	43
Diff HbA1c	T/T	4	-1.900	-0.950	0.050	0.100	4
Diff_LMS_DIA_T	G/G	48	-2.332	-0.360	0.107	0.555	48
Diff_LMS_DIA_T	G/T	43	-2.042	-0.592	-0.168	0.334	43
Diff_LMS_DIA_T	T/T	4	-1.389	-0.840	0.208	0.948	4
Diff_LMS_DIA_N	G/G	48	-2.821	-0.740	0.087	1.017	48
Diff_LMS_DIA_N	G/T	43	-3.161	-1.064	-0.245	0.797	43
Diff_LMS_DIA_N	T/T	4	-0.827	-0.556	0.107	0.565	4
Diff_LMS_SBP_T	G/G	48	-2.426	-0.253	0.157	0.777	48
Diff_LMS_SBP_T	G/T	43	-3.143	-0.731	0.013	0.323	43
Diff_LMS_SBP_T	T/T	4	-1.039	-0.301	0.888	1.701	4
Diff_LMS_SBP_N	G/G	48	-2.464	-0.480	0.137	0.829	48
Diff_LMS_SBP_N	G/T	43	-3.281	-0.959	-0.144	0.514	43
Diff_LMS_SBP_N	T/T	4	0.255	0.302	0.471	0.733	4
Diff_SDS_BMI	G/G	48	-2.513	-0.365	0.125	0.930	48
Diff_SDS_BMI	G/T	43	-2.480	-0.520	-0.030	0.580	43
Diff_SDS_BMI	T/T	4	-0.620	-0.215	0.220	0.330	4

Tabelle 24: Differenzen der SDS-Werte der Zeitpunkte 1 und 2 für die Genotypen von End 1

Angegeben sind jeweils der Median, die minimale und maximale Merkmalsausprägung sowie das 1. und 3. Quantil.

Blutdruckparameter	Genotyp	Odd's Ratio	95%-Konfidenzintervall	
Diastol. Dipping	D/I vs. I/I	0.641	0.193	2.132
	D/D vs. I/I	0.996	0.274	3.612
Systol. Dipping	D/I vs. I/I	0.700	0.201	2.436
	D/D vs. I/I	1.824	0.494	6.728
Diastole nachts	D/I vs. I/I	1.358	0.316	5.844
	D/D vs. I/I	2.298	0.507	10.422

Tabelle 25: Logistische Regressionsanalyse für die Genotypen von ACE

Angegeben sind die Odds-Ratios und deren 95%-Konfidenzintervall für die Berechnungen des Risikozuwachses für ein pathologisches diastolisches und systolisches Dipping, sowie einen pathologischen diastolischen Nachtwert zum Zeitpunkt 2. Gegenübergestellt ist dem zusammengefassten heterozygoten und homozygoten Risikogenotyp als Referenz der Wildtyp.

Blutdruckparameter	Genotyp	Odd's Ratio	95%-Konfidenzintervall	
Diastol. Dipping	C/T vs. C/C	0.780	0.270	2.256
	T/T vs. C/C	0.383*	0.111	1.326
Systol. Dipping	C/T vs. C/C	0.770	0.266	2.228
	T/T vs. C/C	0.334	0.091	1.228
Diastole nachts	C/T vs. C/C	0.662	0.213	2.058
	T/T vs. C/C	0.617	0.165	2.312

Tabelle 26: Logistische Regressionsanalyse für die Genotypen von AGT

Angegeben sind die Odds-Ratios und deren 95%-Konfidenzintervall für die Berechnungen des Risikozuwachses für ein pathologisches diastolisches und systolisches Dipping, sowie einen pathologischen diastolischen Nachtwert zum Zeitpunkt 2. Gegenübergestellt ist dem zusammengefassten heterozygoten und homozygoten Risikogenotyp als Referenz der Wildtyp. (* $p < 0,1$)

Blutdruckparameter	Genotyp	Odd's Ratio	95%-Konfidenzintervall	
Diastol. Dipping	A/C + C/C	0.894	0.378	2.112
	vs. A/A			
Systol. Dipping	A/C + C/C	1.670	0.691	4.036
	vs. A/A			
Diastole nachts	A/C + C/C	0.614	0.235	1.606
	vs. A/A			

Tabelle 27: Logistische Regressionsanalyse für die Genotypen von ATR1

Angegeben sind die Odds-Ratios und deren 95%-Konfidenzintervall für die Berechnungen des Risikozuwachses für ein pathologisches diastolisches und systolisches Dipping, sowie einen pathologischen diastolischen Nachtwert zum Zeitpunkt 2. Gegenübergestellt ist dem zusammengefassten heterozygoten und homozygoten Risikogenotyp als Referenz der Wildtyp.

Blutdruckparameter	Genotyp	Odd's Ratio	95%-Konfidenzintervall	
Diastol. Dipping	C/T vs. C/C	0.321	0.069	1.499
	T/T vs. C/C	0.216*	0.043	1.085
Systol. Dipping	C/T vs. C/C	0.705	0.159	3.119
	T/T vs. C/C	0.440	0.092	2.117
Diastole nachts	C/T vs. C/C	0.321	0.069	1.499
	T/T vs. C/C	0.216	0.043	1.085

Tabelle 28: Logistische Regressionsanalyse für die Genotypen von Aldo-S

Angegeben sind die Odds-Ratios und deren 95%-Konfidenzintervall für die Berechnungen des Risikozuwachses für ein pathologisches diastolisches und systolisches Dipping, sowie einen pathologischen diastolischen Nachtwert zum Zeitpunkt 2. Gegenübergestellt ist dem zusammengefassten heterozygoten und homozygoten Risikogenotyp als Referenz der Wildtyp. (* $p < 0,1$)

Blutdruckparameter	Genotyp	Odd's Ratio	95%-Konfidenzintervall	
Diastol. Dipping	G/T + T/T vs. G/G	0.936	0.389	2.253
Systol. Dipping	G/T + T/T vs. G/G	1.697	0.691	4.170
Diastole nachts	G/T + T/T vs. G/G	0.349*	0.126	0.971

Tabelle 29: Logistische Regressionsanalyse für die Genotypen von End 1

Angegeben sind die Odds-Ratios und deren 95%-Konfidenzintervall für die Berechnungen des Risikozuwachses für ein pathologisches diastolisches und systolisches Dipping, sowie einen pathologischen diastolischen Nachtwert zum Zeitpunkt 2. Gegenübergestellt ist dem zusammengefassten heterozygoten und homozygoten Risikogenotyp als Referenz der Wildtyp. (* $p < 0,05$)

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**

13. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. J. Kreuder bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Durchführung der Promotionsarbeit in der Abteilung allgemeine Pädiatrie und Neonatologie. Auch möchte ich mich für die hervorragende Betreuung bedanken.

Besonderst herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. med. A. Dost für die überaus gute Betreuung, das unermüdliche und schnelle Korrektur-Lesen und die stets zuverlässige Unterstützung bedanken.

Den MitarbeiterInnen der Laborabteilung der Kinderklinik Giessen danke ich für ihre kompetente Unterstützung. Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Kirstin Salser.

Für die gute Beratung und Durchführung des statistischen Anteils möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Marion Mann vom Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität bedanken.

Ich danke meiner Freundin und Mit-Doktorandin Nicole Heitland für die gute und schöne Zusammenarbeit.

Ich danke Nadine Reinhold für ihr immer „offenes Ohr“, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Lars Reinhold! Ich danke Dir, zum einen für die moralische Unterstützung während meiner Zeit im Labor und zum anderen für Deine stets verlässliche Schützenhilfe, wenn mein ewiger Kampf mit dem Computer (mal wieder) Gefahr lief in eine aussichtslose Lage zu geraten. Auch danke ich Dir für Deine bereitwillige Unterstützung bei all den anderen Schwierigkeiten und Problem(chen) die die Erstellung der Dissertation so mit sich brachte! Danke für Deine Engels-Geduld!!!

Mein größter Dank gilt meinen Eltern! Ich danke Euch dafür, dass Ihr mir das Studium überhaupt ermöglicht habt, dass Ihr mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden habt und dass ich mir Eurer Unterstützung immer sicher sein konnte!!

Ich danke Euch von ganzem Herzen, dass Ihr IMMER alle Höhen und Tiefen des Studiums mit mir durch- und erlebt habt und ich IMMER auf Euch zählen konnte!!

14. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.