

Aus der Klinik für Nephrologie der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Univ.-Prof. Dr. med. B. Grabensee

**Einfluss des ACE I/D-Polymorphismus, des AGT M235T-  
Polymorphismus, des AT<sub>1</sub>R A1166C-Polymorphismus und  
anderer Faktoren auf die Nierentransplantatfunktion und  
den Bluthochdruck**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Magdalena M. Siekierka-Harreis

2008

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. B. Nürnberg  
Dekan

Referent: PD. Dr. med. C. Blume  
Korreferent: Prof. Dr. med. T. Hohlfeld

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                                                                                  |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>                                                                                                                                                                   | <b>I</b>   |
| <b>ABKÜRZUNGEN .....</b>                                                                                                                                                                         | <b>III</b> |
| <b>1 EINLEITUNG.....</b>                                                                                                                                                                         | <b>1</b>   |
| 1.1 DIE CHRONISCHE TRANSPLANTATDYSFUNKTION.....                                                                                                                                                  | 1          |
| 1.1.1 Die chronische Transplantatdysfunktion, Mechanismen der Progression                                                                                                                        | 2          |
| 1.1.1.1 Proteinurie .....                                                                                                                                                                        | 2          |
| 1.1.1.2 Arterielle Hypertonie.....                                                                                                                                                               | 3          |
| 1.1.1.3 Serum-Lipidspiegel .....                                                                                                                                                                 | 3          |
| 1.1.1.4 Einfluss anderer Faktoren auf die chronische Transplantatdysfunktion .....                                                                                                               | 4          |
| 1.2 NIERENTRANSPLANTATION UND BLUTHOCHDRUCK .....                                                                                                                                                | 4          |
| 1.3 RAAS (RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON SYSTEM).....                                                                                                                                              | 7          |
| 1.3.1 Angiotensin I-Converting Enzym (ACE) Gen I/D-Polymorphismus                                                                                                                                | 7          |
| 1.3.2 Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus                                                                                                                                             | 8          |
| 1.3.3 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT <sub>1</sub> R)-Gen A1166C-Polymorphismus                                                                                                                | 8          |
| 1.4 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG .....                                                                                                                                                          | 9          |
| 1.4.1 Zielsetzung .....                                                                                                                                                                          | 11         |
| <b>2 PATIENTEN UND METHODEN.....</b>                                                                                                                                                             | <b>12</b>  |
| 2.1 ÜBERSICHT.....                                                                                                                                                                               | 12         |
| 2.1.1 Studiendesign und Aufarbeitung der Daten                                                                                                                                                   | 12         |
| 2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien                                                                                                                                                               | 15         |
| 2.1.3 Patienten                                                                                                                                                                                  | 15         |
| 2.2 GESUNDES KONTROLLKOLLEKTIV .....                                                                                                                                                             | 15         |
| 2.3 ALLGEMEINE DATEN.....                                                                                                                                                                        | 16         |
| 2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....                                                                                                                                                          | 21         |
| 2.4.1 Material                                                                                                                                                                                   | 21         |
| 2.4.1.1 DNA .....                                                                                                                                                                                | 21         |
| 2.4.1.1.1 DNA-Extraktion                                                                                                                                                                         | 21         |
| 2.4.1.1.2 Quantifizierung der DNA (DNA-Konzentration und DNA-Reinheit)                                                                                                                           | 22         |
| 2.4.1.1.3 DNA-Verdünnung für den ACE-Gen I/D- Polymorphismus                                                                                                                                     | 22         |
| 2.4.1.1.4 DNA-Lagerung                                                                                                                                                                           | 22         |
| 2.4.2 Bestimmung der genetischen Polymorphismen des RAAS mit der PCR                                                                                                                             | 22         |
| 2.4.2.1 ACE-Gen I/D-Polymorphismus: PCR-Protokoll .....                                                                                                                                          | 23         |
| 2.4.2.2 ACE-Gen I/D-Polymorphismus: Gelelektrophorese .....                                                                                                                                      | 24         |
| 2.4.2.3 ACE-Gen I/D-Polymorphismus: Insertionsspezifische (ISP) PCR: .....                                                                                                                       | 25         |
| 2.4.2.4 ACE-Gen I/D-Polymorphismus: Gelelektrophorese (ISP) .....                                                                                                                                | 26         |
| 2.4.2.5 Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus: PCR-Protokoll.....                                                                                                                       | 26         |
| 2.4.2.6 Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus: Gelelektrophorese .....                                                                                                                  | 26         |
| 2.4.2.7 Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus: Restriktionsenzymverdau .....                                                                                                            | 27         |
| 2.4.2.8 Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus: Gelelektrophorese .....                                                                                                                  | 27         |
| 2.4.2.9 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT <sub>1</sub> R)-Gen A1166C Polymorphismus: PCR-Protokoll .....                                                                                         | 28         |
| 2.4.2.10 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT <sub>1</sub> R)-Gen A1166C-Polymorphismus: Gelelektrophorese.....                                                                                     | 29         |
| 2.4.2.11 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT <sub>1</sub> R)-Gen A1166C Polymorphismus: Restriktionsenzymverdau (DdeI).....                                                                        | 29         |
| 2.4.2.12 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT <sub>1</sub> R)-Gen A1166C-Polymorphismus: Gelelektrophorese.....                                                                                     | 29         |
| 2.5 QUALITÄTSSICHERUNG.....                                                                                                                                                                      | 31         |
| 2.6 PATIENTENALTER UND PRÄVALENZ DER GENOTYPEN .....                                                                                                                                             | 31         |
| 2.7 STATISTIK.....                                                                                                                                                                               | 33         |
| 2.7.1 Erster statistischer Ansatz: Einzelfaktoranalyse (Chi-Quadrat-Test, Kruskal-Wallis-Test, ANOVA)                                                                                            | 33         |
| 2.7.2 Zweiter statistischer Ansatz: Gruppenanalyse (Chi-Quadrat-Test, Two-sample-proportion-Test, Kaplan Meier Überlebens-Analyse mit Log-rank-Test, „pattern recognition“ nach der KNN-Methode) | 33         |
| 2.8 DATENSCHUTZ UND ETHISCHE ASPEKTE.....                                                                                                                                                        | 38         |
| <b>3 ERGEBNISSE.....</b>                                                                                                                                                                         | <b>39</b>  |
| 3.1 PATIENTEN UND GESUNDES KONTROLLKOLLEKTIV .....                                                                                                                                               | 39         |
| 3.2 ERSTER STATISTISCHER ANSATZ: AUSWIRKUNG DER POLYMORPHISMEN AUF DIE PRÜFGRÖßEN: ECC, MAD, SUMAH: ALLGEMEINE BEMERKUNGEN.....                                                                  | 39         |

|           |                                                                                                                                                         |    |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1     | ECC (endogene Kreatinin-Clearance)                                                                                                                      | 40 |
| 3.2.1.1   | Ergebnisse (ECC): ACE-Gen I/D-Polymorphismus                                                                                                            | 41 |
| 3.2.1.2   | Ergebnisse (ECC): Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus                                                                                              | 42 |
| 3.2.1.3   | Ergebnisse (ECC): Angiotensin II-Typ1 Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus                                                                                | 43 |
| 3.2.2     | MAD (mittlerer arterieller Blutdruck)                                                                                                                   | 44 |
| 3.2.2.1   | Ergebnisse (MAD): ACE-Gen I/D-Polymorphismus                                                                                                            | 45 |
| 3.2.2.2   | Ergebnisse (MAD): Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus                                                                                              | 46 |
| 3.2.2.3   | Ergebnisse (MAD): Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus                                                                               | 47 |
| 3.2.3     | SumAH (Summe der eingenommenen antihypertensiven Medikamente)                                                                                           | 48 |
| 3.2.3.1   | Ergebnisse (SumAH): ACE-Gen I/D-Polymorphismus                                                                                                          | 49 |
| 3.2.3.2   | Ergebnisse (SumAH): Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus                                                                                            | 50 |
| 3.2.3.3   | Ergebnisse (SumAH): Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus                                                                             | 51 |
| 3.2.4     | Zusammenfassung: Auswirkung der Polymorphismen auf die Prüfgrößen: ECC, MAD, SumAH                                                                      | 52 |
| 3.3       | ERSTER STATISTISCHER ANSATZ, ZWEITER SCHRITT: VARIANZANALYSE (ANOVA, GEMISCHTES MODELL)                                                                 | 52 |
| 3.3.1     | ANOVA: Überprüfung des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAAS auf den Verlauf der ECC                                                       | 52 |
| 3.3.1.1   | ANOVA: ECC: ACE-Gen I/D-Polymorphismus                                                                                                                  | 53 |
| 3.3.1.2   | ANOVA: ECC: Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus:                                                                                                   | 54 |
| 3.3.1.3   | ANOVA: ECC: Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus                                                                                     | 55 |
| 3.3.2     | ANOVA für den Einfluss anderer Variablen auf den Verlauf der ECC/die Transplantatfunktion                                                               | 56 |
| 3.3.2.1   | ANOVA: Einfluss von metabolischen Faktoren auf die ECC                                                                                                  | 56 |
| 3.3.2.2   | ANOVA: Einfluss externer Faktoren auf den Verlauf der ECC                                                                                               | 58 |
| 3.3.2.2.1 | ANOVA: Einfluss von ACE-Hemmern/AT <sub>1</sub> R-Antagonisten                                                                                          | 59 |
| 3.4       | ZWEITER STATISTISCHER ANSATZ: CHI-QUADRAT-TEST UND TWO-SAMPLE-PROPORTION-TEST                                                                           | 60 |
| 3.5       | ZWEITER STATISTISCHER ANSATZ: LOG-RANK-TEST UND KAPLAN-MEIER ÜBERLEBENSANALYSE                                                                          | 61 |
| 3.6       | ZWEITER STATISTISCHER ANSATZ: MUSTERERKENNUNGSANALYSE („PATTERN RECOGNITION“) MITTELS K-NEAREST-NEIGHBOUR (KNN) METHODE, BERECHNUNG DER ODDS RATIO (OR) | 64 |
| 4         | DISKUSSION                                                                                                                                              | 66 |
| 4.1       | DIE CHRONISCHE TRANSPLANTATDYSFUNKTION                                                                                                                  | 66 |
| 4.2       | AUSWIRKUNG DER RAAS-POLYMORPHISMEN AUF DIE ARTERIELLE HYPERTONIE NACH NIERENTRANSPLANTATION                                                             | 67 |
| 4.2.1     | Auswirkung der RAAS-Polymorphismen auf den MAD und die SumAH                                                                                            | 68 |
| 4.2.2     | Bewertung der Ergebnisse zum Einfluss der RAAS-Polymorphismen auf die posttransplant-Hypertonie                                                         | 68 |
| 4.3       | AUSWIRKUNG DER RAAS-POLYMORPHISMEN AUF DIE NIERENTRANSPLANTATFUNKTION                                                                                   | 70 |
| 4.3.1     | Bewertung der Ergebnisse zum Einfluss der RAAS-Polymorphismen auf die Nierentransplantatfunktion                                                        | 72 |
| 4.4       | EINFLUSS KONKURRIERENDER FAKTOREN AUF DIE TRANSPLANTATFUNKTION                                                                                          | 73 |
| 4.4.1     | Einfluss von metabolischen Faktoren auf die ECC                                                                                                         | 73 |
| 4.4.2     | Einfluss externer Faktoren auf die ECC                                                                                                                  | 74 |
| 4.4.3     | Einfluss von ACE-Hemmern/AT <sub>1</sub> -Rezeptor-Antagonisten auf die ECC                                                                             | 75 |
| 4.5       | SCHLUSSFOLGERUNG                                                                                                                                        | 76 |
| 5         | ZUSAMMENFASSUNG                                                                                                                                         | 79 |
| 6         | DANKSAGUNG                                                                                                                                              | 80 |
| 7         | CURRICULUM VITAE                                                                                                                                        | 81 |
| 8         | ANHANG                                                                                                                                                  | 82 |
| 8.1       | K/DOQI-STADIEN DER NIERENFUNKTION [GFR IN ML/MIN] [129]:                                                                                                | 82 |
| 9         | ABBILDUNGSVERZEICHNIS                                                                                                                                   | 83 |
| 10        | TABELLENVERZEICHNIS                                                                                                                                     | 85 |
| 11        | BIBLIOGRAPHIE                                                                                                                                           | 87 |

---

**ABKÜRZUNGEN**

|                   |                                                     |
|-------------------|-----------------------------------------------------|
| ACE               | Angiotensinkonversionsenzym                         |
| AGT               | Angiotensinogen                                     |
| ANV               | akutes Nierenversagen                               |
| AT                | Angiotensin II                                      |
| AT <sub>1</sub> R | Angiotensin II Typ 1 Rezeptor                       |
| CSA               | Cyclosporin A                                       |
| CMV               | Cytomegalie Virus                                   |
| dia               | diastolisch                                         |
| Dm                | Diabetes mellitus                                   |
| DNA               | Desoxyribonukleinsäure                              |
| ECC               | endogene Kreatininclearance                         |
| GFR               | glomeruläre Filtrationsrate                         |
| HDL               | „high density“ Lipoproteine                         |
| HLA               | Human Leukocyte Antigene                            |
| HMG-CoA           | 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A                |
| I/D               | Insertion/Deletion                                  |
| IgA               | Immunglobulin A                                     |
| KH                | Krankenhaus                                         |
| LDL               | „low density“ Lipoproteine                          |
| MAD               | mittlerer arterieller Blutdruck                     |
| MMF               | Mycophenolat Mofetil                                |
| NTX               | Nierentransplantation                               |
| PCR               | polymerase chain reaction/Polymerasenkettenreaktion |
| RAAS              | Renin Angiotensin Aldosteron System                 |
| RR                | Blutdruck (nach Riva Rocci)                         |
| SumAH             | Summe der Antihypertensiva                          |
| sys               | systolisch                                          |
| Tac               | Tacrolimus                                          |
| TG                | Triglyceride                                        |
| UV                | ultraviolett                                        |

## 1 EINLEITUNG

Für die meisten Patienten stellt die Nierentransplantation eine erhebliche Verbesserung der Lebensqualität dar. Auch wird ihre Lebenserwartung durch die Transplantation positiv beeinflusst.

Trotz weiterer Fortschritte in der Transplantationsmedizin mit Verbesserung der immunsuppressiven Medikamente oder besserer HLA-Übereinstimmung, erfährt dennoch ein Teil der Patienten einen vorzeitigen Verlust des Organs. Ein Großteil der Transplantatverluste ist in immunologischen Faktoren, die durch akute oder chronische Rejektion ein Transplantatversagen bedingen, begründet. Aber auch andere, nicht-immunologische Faktoren, beeinflussen das Transplantatüberleben.

Gerade das Kurzzeitüberleben der Transplantate erfuhr in den letzten beiden Jahrzehnten mit der Einführung des Cyclosporins und dem ständig weiter optimiertem Management des Patienten in der peri- und postoperativen Versorgung eine enorme Verbesserung. Der Langzeitverlauf konnte bisher nicht wesentlich optimiert werden. Neben Infektionen, einer Rezidiv- oder de-novo-Nierenerkrankung, Rejektionsereignissen, der Medikamententoxizität und anderen metabolischen Schäden, spielen der systemische Blutdruck und die renale Hämodynamik eine besondere Rolle. Diese Faktoren definieren größtenteils die chronische Transplantatdysfunktion.

### 1.1 Die chronische Transplantatdysfunktion

Die chronische Transplantatdysfunktion ist ein multifaktorielles Geschehen [1], [2], [3], [4], [5], [6].

Bei ihrer Entstehung spielen sowohl immunologische als auch nicht immunologische Faktoren eine wichtige Rolle.

Manche dieser Faktoren, wie HLA-Mismatche oder vorangegangene Abstoßungsreaktionen, sind für die Nierentransplantation spezifisch. Andere, wie z.B. der Bluthochdruck, gelten als Risikofaktor sowohl für native als auch transplantierte Nieren.

### **1.1.1 Die chronische Transplantatdysfunktion, Mechanismen der Progression**

Eine große Anzahl experimenteller Studien zeigte, dass chronische Nephropathien im Endstadium, einschließlich der chronischen Rejektion, gleiche pathogenetische Mechanismen, die schließlich zur terminalen Niereninsuffizienz führen, aufweisen [1], [7], [8], [9], [10], [11], [12].

#### **1.1.1.1 Proteinurie**

Proteine im Urin werden normalerweise mittels Endozytose im proximalen Tubulus reabsorbiert. Glomeruläre Hypertension führt zur erhöhten glomerulären Permeabilität und erhöhter Proteinfiltration. Diese filtrierte Proteine akkumulieren in Lysosomen der proximalen Tubuli, was zur Zerstörung der Tubuli, interstitieller Entzündung und Narbenbildung [12], [13], [14], [15] führt. Das Ausmaß der Proteinurie korreliert in experimentellen Modellen mit dem Ausmaß der Nierenschädigung, wobei auch die Schädigung der Podozyten und die Entwicklung einer Glomerulosklerose einen möglichen zusätzlichen pathophysiologischen Mechanismus darstellen [16]; Reduktion der Proteinurie trägt zur Eindämmung der Nierenschädigung bei [15], [17].

Klinische Daten zeigten, dass die Proteinurie im Verlauf einer festgestellten Niereninsuffizienz mit einem signifikanten GFR-Abfall sowohl bei diabetischen als auch bei nicht-diabetischen Patienten korreliert [18], [19]. Eine mit Urin-Streifentest festgestellte Proteinurie konnte in einer 20-jährigen Beobachtungsstudie als unabhängiger Risikofaktor einer Progression zur terminalen Niereninsuffizienz und als unabhängiger Mortalitätsfaktor identifiziert werden [20].

Die MDRD (Modification of Diet in Renal Disease)-Studie bewies, dass mit der Reduktion der Proteinurie unabhängig von der Senkung des Blutdrucks die Rate des GFR-Abfalls vermindert werden konnte, wobei der Grad der Renoprotektion abhängig von der Höhe der initialen Proteinurie war [21]. Die REIN (Ramipril Efficacy In Nephropathy)-Studie, in der Nicht-Diabetiker mit chronischer Nephropathie eingeschlossen wurden, zeigte ebenfalls, wie die anhaltende Senkung der Proteinurie den Abfall der GFR vermindern oder sogar verhindern konnte [22], [8]. Patienten mit initial höherer Proteinurie profitierten demnach am meisten von einer antihypertensiven Therapie, insbesondere mit einem ACE-Hemmer oder einem Angiotensin II Typ 1 (AT<sub>1</sub>)-Rezeptor-Antagonisten.

Die Proteinurie der chronischen Transplantatdysfunktion beträgt meistens 1-2 g/die [23], [24], sie reicht in nephrotische Bereiche oft beim Vorliegen einer Transplantatglomerulopathie.

Das Vorliegen einer Proteinurie ein Jahr nach Nierentransplantation ist von prognostischem Wert für den weiteren Verlauf [25]. Je höher die Proteinurie, desto evidenter ihre Assoziation mit einer chronischen Transplantatdysfunktion in der Histologie [24]. Eine diätetische Proteinrestriktion zeigte in einer Studie einen günstigen Einfluss auf den Verlauf einer chronischen Transplantatdysfunktion [26].

#### **1.1.1.2 Arterielle Hypertonie**

Die arterielle Hypertonie wurde als unabhängiger Risikofaktor der terminalen Niereninsuffizienz identifiziert [27]. Im Tiermodell der chronischen Nephropathien ist sie mit einer Erhöhung des intraglomerulären Drucks verbunden, was für die Progression der Nephropathie eine wichtige Determinante darstellt [7], [13], [14]. Die Senkung des erhöhten Blutdrucks trägt zur Verlangsamung der Progression und Minimierung der Nierenschädigung entscheidend bei [13], [28]. Die MDRD-Studie, in die Patienten mit chronischem Nierenversagen eingeschlossen wurden, konnte zeigen, dass Patienten mit niedrigeren Blutdrücken auch eine langsamere Progression aufwiesen [21]. Die REIN-Studie zeigte, dass der systolische und der morgendliche Blutdruck die stärksten Prädiktoren des Krankheitsverlaufes waren [29].

Auf die arterielle Hypertonie nach Nierentransplantation im Speziellen wird weiter unten noch enger eingegangen (Punkt 1.2).

#### **1.1.1.3 Serum-Lipidspiegel**

Für Lipoproteine, die als Träger der Lipide fungieren, verfügen sowohl Endothelzellen als auch Mesangiumzellen über Oberflächenrezeptoren. Durch die Ähnlichkeit der Mesangiumzelle mit der glatten Muskelzelle und die Rolle der Letzteren in der Pathogenese der Arteriosklerose, wurde die Entwicklung einer Glomerulosklerose mit der Akkumulation von Lipiden in der Mesangiumzelle in Verbindung gebracht. Der Lipideinschluß in der Mesangiumzelle stimuliere demnach die Produktion von Kollagen und Proteoglykanen, die Verdickung der Basalmembran sowie die Proliferation der mesangialen Zelle [30], [31]. Die Bindung von Lipoproteinen an polyanionische Glykosaminoglykane der mesangialen Matrix neutralisiere die negativen Ladungen und alteriere damit die Permeabilität der Basalmembran [32]. Zum Entzündungsprozeß innerhalb der Glomeruli tragen low density-Lipoproteine (LDL, Lipoproteine geringer Dichte) bei, indem sie die Adhärenz von Monozyten zum Endothelium induzieren [32]. Eine Verdoppelung des Lipid-Gehaltes der glomerulären Basalmembran wurde bei nierentransplantierten Patienten beobachtet.

Im Tierexperiment führte die Senkung des Serumlipidspiegels – sei es durch die medikamentöse Therapie mit HMG-CoA-Hemmern (Statinen) sowie Fibraten oder Muskularbeit – zu einer positiven Beeinflussung der Glomerulosklerose und damit auch der renalen Funktion [33], [34]. Beim Menschen wurde in der 4D-Studie geprüft, ob der Lipidsenker Atorvastatin die Prognose dialysepflichtiger Diabetiker im Vergleich zu Placebo bessert. In Bezug auf den primären Endpunkt (kardio- und zerebrovaskuläre Ereignisse) bestätigte sich dies aber nicht. In der SHARP-Studie (Study of Heart and Renal Protection), deren Ergebnisse im Jahre 2009 erwartet werden und die Nierenkranke mit einem Kreatininwert von 1,5 mg/dl für Frauen, bzw. 1,7 mg/dl für Männer und dialysepflichtige Patienten einschließt, wird geprüft, ob eine lipidsenkende Therapie die Gefäße der Patienten schützt. In der dreiarmligen Studie werden 9000 Patienten entweder mit Placebo oder mit Simvastatin oder mit Simvastatin plus Ezetimib (Inegy®) behandelt. Zur Beantwortung der Frage, ob eine lipidsenkende Therapie auf die Entwicklung einer chronischen Transplantatdysfunktion einen Einfluss nimmt, gibt es zwar Hinweise, es fehlen aber prospektiv randomisierte Studien in diesem Bereich [35], [36], [37], [38].

#### **1.1.1.4 Einfluss anderer Faktoren auf die chronische Transplantatdysfunktion**

Einige zusätzliche klinische Parameter spielen bei der Entwicklung einer chronischen Transplantatdysfunktion eine Rolle. Dabei scheinen immunologische Faktoren eine initiiierende Funktion auszuüben: so ist die Anzahl der akuten Rejektionen bei Patienten mit Transplantatdysfunktion höher [39]. Die Bedeutung der HLA-Mismatche wird diskutiert, jedoch kontrovers behandelt [40], [41], [24], [39], [42].

Andere klinischen Ereignisse koinzidieren zumindest mit der chronischen Transplantatdysfunktion. Hier sind die rekurrierende Nierenerkrankung [43], die CSA-Toxizität [44], die Transplantatarterienstenose [45], die Ureterstenose oder die de-novo Nierenerkrankung [1] zu nennen.

## **1.2 Nierentransplantation und Bluthochdruck**

Eine arterielle Hypertonie liegt auch bei nierentransplantierten Patienten definitionsgemäß bei einem Blutdruck über 140/90 mmHg, oder wenn der Patient antihypertensive Medikamente einnimmt [46], [47], vor. Manche Zentren, ebenso wie unseres, wählen zur Definition der arteriellen Hypertonie die Kriterien der WHO (World Health Organization)/International Society of Hypertension mit einem Blutdruck von  $> 130/85$  mmHg [48].

Die Inzidenz des Bluthochdrucks bei nierentransplantierten Patienten in der Prä-Cyclosporin Ära lag bei 40-50 % [49], [50].

Seit der Einführung von Cyclosporin A im Jahre 1983 ist die Prävalenz des Bluthochdrucks nach Transplantation auf 60-90 % gestiegen [51], [52], [53]. Die Gründe einer arteriellen Hypertonie nach Nierentransplantation sind verschiedenartig [54]. Nach First et al. [55] und Martinez-Castelao et al. [56], spielen in der Entstehung der arteriellen Hypertonie in der frühen posttransplant-Periode eine positive Natrium- und Wasser-Bilanz, die akute tubuläre Nekrose, akute Rejektionen, hohe Steroiddosen [57], die Transplantatarterienstenose und die Hypercalcämie eine wichtige Rolle [58]. In der späteren Phase (nach 3-6 Monaten) werden Steroide [57], [59], die Cyclosporin- [60] und Tacrolimus-Nephrotoxizität [61], die Körperoberfläche des Empfängers und somit die Adipositas [62], die Transplantatarterienstenose [55], [54], [63], [64], die Renin-abhängige Hypertonie (der nativen Niere) [65], und schließlich die de novo oder rekurrente Nephropathie für einen erhöhten Blutdruck verantwortlich gemacht. Auch das Transplantat eines hypertonen Spenders wurde mit der Induktion einer posttransplant-Hypertonie in Verbindung gebracht [66]. Andere Gründe einer arteriellen Hypertonie nach Nierentransplantation sind ein gleichzeitig vorliegender Hyperaldosteronismus, ein Phäochromocytom oder die Hypercalcämie aufgrund eines persistierenden Hyperparathyreoidismus [55]. Meist liegt beim jeweiligen Patienten ein multikausales Geschehen [55], [67] vor, wobei zu den häufigsten Gründen die Cyclosporin-induzierte Hypertonie und die chronische Rejektion zählen [68].

Die arterielle Hypertonie als potenter kardiovaskulärer Risikofaktor wurde seit vielen Jahren mit einem verminderten Patienten- und Transplantatüberleben in Zusammenhang gebracht. Seit der Einführung neuer Immunsuppressiva verbesserte sich zwar die allgemeine Patienten- und Transplantatüberlebensrate, jedoch sind Langzeitergebnisse immer noch nicht zufriedenstellend. In einer großen Follow-up-Studie von über 29000 Leichennierentransplantierten konnten Opelz et al. [69] die Assoziation der arteriellen Hypertonie mit der chronischen Transplantatdysfunktion zeigen. In der Cox-Regressionsanalyse stellte sich der erhöhte Blutdruck als unabhängiger Risikofaktor des Transplantatverlustes heraus. Auch Mange et al. bestätigten in ihrer Untersuchung die Bedeutung der arteriellen Hypertonie in der Progression der Transplantatdysfunktion [70].

Tabelle 1-1 fasst die Gründe der Entstehung einer arteriellen Hypertonie nach NTX zusammen.

| <b>Posttransplant-Hypertonie: Gründe</b>                                            |                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.) Faktoren vor Nierentransplantation:                                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• prä-existierende Hypertonie</li> <li>• LVH (linksventrikuläre Hypertrophie)</li> <li>• BMI (body mass index)</li> <li>• Nierengrunderkrankung</li> </ul>                                                  |
| 2.) Spenderbezogene Gründe                                                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• hohes Spenderalter</li> <li>• weiblicher Spender</li> <li>• rechte Spenderniere</li> </ul>                                                                                                                |
| 3.) Durch den Transplantationvorgang bedingte Gründe                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• lange Ischämiezeit</li> <li>• verzögerte Funktionsaufnahme des Transplantates</li> </ul>                                                                                                                  |
| 4.) Immunsuppressive Therapie                                                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Calcineurininhibitoren (CSA, Tacrolimus)</li> <li>• Corticosteroide</li> </ul>                                                                                                                            |
| 5.) Erkrankung des Transplantates                                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Chronische Rejektion</li> <li>• CSA-Nephrotoxizität</li> <li>• Tacrolimus-Nephrotoxizität</li> <li>• Rekurrente oder de novo Glomerulonephritis</li> <li>• Rekurrente diabetische Nephropathie</li> </ul> |
| 6.) Transplantatnierenarterienstenose                                               |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 7.) Abflusshindernis                                                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lymphozele</li> <li>• Uretherstenose</li> </ul>                                                                                                                                                           |
| 8.) Rekurrente arterielle Hypertonie oder Transplantat eines hypertensiven Spenders |                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 9.) Verschiedene (Auswahl):                                                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Primärer Hyperaldosteronismus</li> <li>• Phäochromozytom</li> <li>• Hypercalcämie</li> </ul>                                                                                                              |

**Tabelle 1-1: Gründe einer arteriellen Hypertonie nach Nierentransplantation. Überarbeitet nach [55], [71].**

### 1.3 RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron System)

Dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) als multifaktoriellem Effektorsystem kommt sowohl in der Regulation des systemischen Blutdrucks als auch in der Regulation der renalen Hämodynamik eine entscheidende Rolle zu. Zusätzlich stellen seine Endprodukte über die Interaktion mit Zytokinen, proliferativen und trophischen Wirkungen eine Verbindung zur immunologischen Komponente im Netzwerk der komplexen Pathogenese des Transplantatversagens her.

Die Effektorgene innerhalb des RAAS sind vor einigen Jahren bereits identifiziert und sequenziert worden. Einige von ihnen weisen Polymorphismen, das heißt genetische Variationen, auf, die in Vergangenheit mit dem Progress von Glomerulonephritiden, der polyzystischen Nierenerkrankung, der diabetischen Nephropathie, der koronaren Herzkrankheit aber auch der arteriellen Hypertonie und der Nierentransplantation in Zusammenhang gebracht wurden.

#### 1.3.1 Angiotensin I-Converting Enzym (ACE) Gen I/D-Polymorphismus

Der Angiotensin I-Converting Enzym (ACE) Gen I/D-Polymorphismus wurde im Jahr 1990 zum ersten Mal von Rigat et al beschrieben [72]. Hierbei handelt es sich um eine Insertions- oder Deletions-Sequenz am Intron 16 des ACE-Gens. Bei dem Vorliegen einer Insertion ist ein 287 Basenpaare langes DNA-Fragment im Gen vorhanden (I-Allel), bei dem Vorliegen einer Deletion (D-Allel) fehlt es. Entsprechend ergeben sich für diesen Polymorphismus drei mögliche Genotypen: DD, DI, II.

Rigat et al. konnten zeigen, dass dieser Polymorphismus funktionell ist, denn das D-Allel ist mit einer höheren ACE-Serumaktivität und mit höheren ACE-Serumspiegeln nicht nur des zirkulierenden RAAS, sondern auch des lokalen RAAS in der Niere [73], im Myokard [74] oder den T-Lymphozyten [75] in der gesunden Bevölkerung assoziiert.

Die klinische Bedeutung des ACE-Gen-I/D-Polymorphismus wurde für einige Erkrankungen/Fragestellungen belegt: so konnte ein Zusammenhang mit einem höheren Risiko für eine koronare Herzkrankheit [76], [77], [78], den Myokardinfarkt [79], [80], den Hirninfarkt [81], [82], die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie [83], [84], [85], der Entwicklung einer ischämischen oder idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie [86] gezeigt werden.

Bei der Ig-A-Nephropathie zeigte sich das D-Allel als Risikofaktor des chronischen Nierenfunktionsverlustes und als Marker der Therapieeffektivität von ACE-Hemmern [87], [88], [89], [90]. Andere klinische Fragestellungen fanden nur widersprüchliche Ergebnisse: so

wurden die erhöhte Prävalenz des D-Allels unter insulinpflichtigen Diabetikern [91], der Zusammenhang mit der Manifestation und den Verlauf der autosomal dominant vererbten Zystennieren [92], [93], die Beziehung zur arteriellen Hypertonie [94], [95], [96], und schließlich der Einfluss auf das Langzeitüberleben nach Nierentransplantation [97], [98], [99], [100], [101], [102] nur kontrovers beurteilt. Auch bei Kindern konnte der ACE-Gen-I/D-Polymorphismus mit einer verminderten Transplantatfunktion in Zusammenhang gebracht werden [103].

### **1.3.2 Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus**

Der Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus ist eine Punktmutation innerhalb des Angiotensinogen (AGT)-Gens, die die punktuelle Substitution von Thymin durch Cytosin am Kodon 702 im 2. Exon des DNA-Stranges beinhaltet und hierdurch bei der Translation zu einer Änderung der Primärstruktur des produzierten Angiotensinogens durch den Austausch der 235. Aminosäure Methionin (M) gegen Threonin (T) führt; sie wurde erstmals von Jeunemaitre et al. [104] beschrieben. Das 12000 bp lange Gen ist auf dem Chromosom 1 in q42-43 [105], [106] lokalisiert und setzt sich aus 5 Exonen und 4 Intronen zusammen [107], [108]. Innerhalb der 5 Exone wurden 15 Polymorphismen des AGT-Gens gefunden, nur der M235T-Polymorphismus weist aber eine klinische Relevanz auf. Für den M235T Polymorphismus ergeben sich somit drei Genotypen: TT, MT, MM.

Das T-Allel wurde mit höheren AGT (Angiotensinogen) Serumspiegeln assoziiert [104]. Die Basis-Serumkonzentration selbst ist nur mit geringen intraindividuellen aber großen interindividuellen Schwankungen verbunden [109], was am ehesten genetisch bedingt sein könnte.

Klinisch wurde der Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus mit einem höheren Risiko für den Myokardinfarkt [110], für die koronare Herzkrankheit [111], [112], [113] und mit der Entwicklung der arteriellen Hypertonie [104] in Verbindung gebracht. Für die Nierentransplantation wurde die Rolle des M235T-Polymorphismus bezüglich der Transplantatfunktion und der arteriellen Hypertonie nur kontrovers beurteilt [114], [115], [102].

### **1.3.3 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C-Polymorphismus**

Bonnardeaux et al. beschrieben im Jahr 1994 eine Punktmutation (Ersatz von Adenosin durch Cytosin) des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gens am Kodon 1166 in der Region q21-q25 [116], [117], im Chromosom 3. Das 55 kb lange Gen enthält 5 Exone und 4 Introne, wobei die gesamte kodierende Region im fünften Exon enthalten ist [118], [119], [120]. Fünf Punktmutationen des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gens wurden beschrieben, keine

bewirkt eine Änderung der Primärstruktur des Rezeptors. Der AT<sub>1</sub>R-A1166C-Polymorphismus mit den drei Genotypen CC, AC, AA fand jedoch klinische Relevanz, da eine gesteigerte Vasokonstriktion der Arterien auf Angiotensin II beim C-Allel festgestellt wurde [121].

So fand sich der Einfluss des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C-Polymorphismus bei Patienten mit essentieller Hypertonie [122], teilweise bei koronarer Herzkrankheit [123], [124], [125], [126] und linksventrikulärer Hypertrophie [127]. In der Nierentransplantation dagegen ist die Bedeutung dieses Polymorphismus hinsichtlich der Nierentransplantatfunktion und der Hypertonie eher fraglich [102]. Jedoch bestehen tierexperimentelle Hinweise zu einem möglichen Beitrag dieses Polymorphismus in der Entwicklung der chronischen Transplantatdysfunktion [128].

## 1.4 Fragestellung und Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung des potentiellen Einflusses des ACE I/D-Polymorphismus, des AGT-M235T-Polymorphismus und des AT<sub>1</sub>R-A1166C-Polymorphismus auf die Nierentransplantatfunktion und auf den Bluthochdruck nach Nierentransplantation. Die genetischen Polymorphismen wurden in einem ersten statistischen Ansatz erst einzeln, dem entsprechenden Gen zugeordnet, betrachtet, in einem zweiten statistischen Ansatz wurden sie auch in Gruppen kombiniert. Die Transplantatfunktion wurde als ECC (endogene Kreatininclearance) mittels der Cockcroft-Formel anhand des Serumkreatinins, des Alters, des Gewichtes und der Größe abgeschätzt. In der zweiten hier vorgestellten statistischen Analyse wurde der Funktionsverlust des Transplantates als Abfall der GFR unter 15 ml/min oder als Abfall der Nierenfunktion um 2 Stadien nach K/DOQI [129] seit dem Zeitpunkt der Entlassung aus dem Krankenhaus nach NTX definiert.

Als der zugrunde gelegte Blutdruck galt der mittlere arterielle Blutdruck (MAD).

Als weiteres Ausmaß für die Schwere des Bluthochdruckes wurde die Summe der eingenommenen antihypertensiven Medikamente ermittelt, wobei die Substanzgruppe der ACE-Hemmer und Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Antagonisten gesondert festgehalten wurde. Hier galt es, eine Untergruppe derjenigen Patienten zu bilden, die eine oder beide Medikamentenklassen dieser das RAAS-beeinflussenden Substanzen einnahmen und diese Gruppe gegen das Restkollektiv der mit anderen Antihypertensiva behandelten Patienten zu vergleichen.

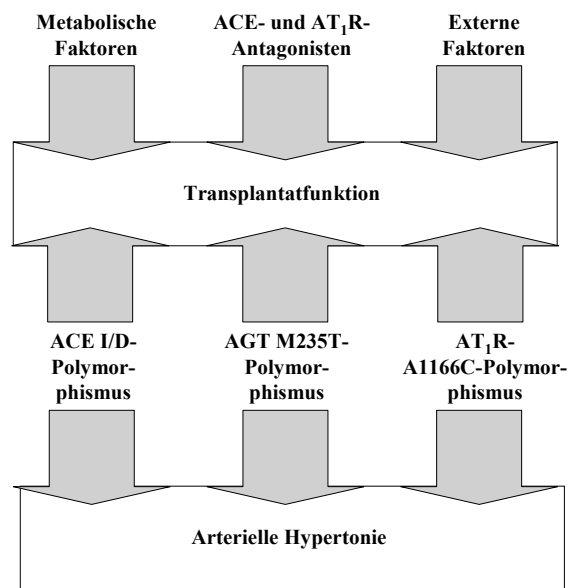
Darüber hinaus sollte konkurrierend zu den Gen-Polymorphismen der Einfluss anderer metabolischer und externer Faktoren auf die Transplantatfunktion untersucht werden. Dies waren

metabolische Faktoren wie die Höhe des Gesamtcholesterins ( $\geq 200$  mg/dl versus  $< 200$  mg/dl), die LDL ( $\geq 100$  mg/dl,  $< 100$  mg/dl)-Konzentration, die Höhe der Triglyceridkonzentration ( $\geq 200$  mg/dl,  $< 200$  mg/dl), die Proteinurie ( $\geq 1$ g/24h versus  $< 1$ g/24h) und das Vorliegen eines Diabetes mellitus. Des weiteren wurde der Einfluss externer Faktoren wie Spenderalter ( $\geq 65$  Jahre,  $< 65$  Jahre), Spendergeschlecht, kalte ( $\geq 12$  Stunden,  $< 12$  Stunden) und warme ( $\geq 30$  Minuten,  $< 30$  Minuten) Ischämiezeit, Anzahl der HLA-Mismatches ( $\geq 2$ ,  $< 2$ ), Anzahl der Transplantationen ( $\geq 1$ ,  $< 1$ ), Dauer des Krankenhausaufenthaltes nach Nierentransplantation ( $\geq 30$  Tage,  $< 30$  Tage), Dialysepflichtigkeit post transplantationem (ja- oder nein-Entscheidung), CMV-Infektion post transplantationem (ja- oder nein- Entscheidung), akutes Nierenversagen post transplantationem (ja- oder nein- Entscheidung), Anzahl der Rejektionen ( $\geq 2$ ,  $< 2$ ), Wechsel der Immunsuppression und der Einfluss der antihypertensiven Medikation auf die Transplantatfunktion überprüft.

Folgende Fragestellungen wurden erörtert:

- Welchen Einfluss nehmen die drei Polymorphismen des RAAS auf den Blutdruck – ermittelt über den mittleren arteriellen Blutdruck (MAD) und die Summe der eingenommenen Antihypertensiva (SumAH)?
- Wie ist der Einfluss der drei Polymorphismen auf die Transplantatfunktion über die Zeit?
- Welchen Einfluss auf die Transplantatfunktion haben den Polymorphismen gegenüber andere Faktoren, die in eine metabolische und externe Gruppe subsummiert wurden?
- Welche Bedeutung hat die Einnahme von ACE-Hemmern und Angiotensin II Typ 1 Rezeptor-Antagonisten auf die Transplantatfunktion?
- Welchen Stellenwert haben mögliche Beeinflussungen durch die genannten Gen-Polymorphismen im Rahmen aller auf die Transplantatfunktion vorhandener Faktoren?

Die folgende Abbildung 1-1 gibt schematisch die Kernpunkte der Untersuchung wieder.



**Abbildung 1-1: Schaubild zur Veranschaulichung der Fragestellung.**

### 1.4.1 Zielsetzung

Eine der Transplantation vorausgehende Genotypisierung der Patienten hinsichtlich der untersuchten Polymorphismen könnte dem Kliniker in der Identifizierung derjenigen Patienten helfen, die ein höheres Risiko einer chronischen Transplantatdysfunktion aufweisen. Gleichzeitig könnte möglicherweise eine gezieltere Therapigestaltung in Abhängigkeit vom vorliegenden Genotyp, wie heutzutage in pharmakogenetischen Ansätzen zur individuellen Therapieplanung propagiert, erfolgen.

---

## **2 PATIENTEN UND METHODEN**

### **2.1 Übersicht**

Es wurden Polymorphismen des RAAS bei nierentransplantierten Patienten bestimmt und ihre Krankengeschichte mit klinischen und laborchemischen Parametern erfasst und statistisch ausgewertet. Die Genotyphäufigkeiten wurden mit einem zuvor von Herrn Dr. med. C. Bantis beschriebenen Kontrollkollektiv von gesunden Probanden verglichen.

#### **2.1.1 Studiendesign und Aufarbeitung der Daten**

In der vorliegenden Studie wurden Patienten eingeschlossen, die im Zeitraum 1998-2001 in unserem Zentrum nierentransplantiert wurden. Als Kontrollgruppe diente ein zuvor von Herrn Dr. med. C. Bantis beschriebenes Kollektiv von gesunden Probanden.

Der ACE-Gen I/D-Polymorphismus, der Angiotensinogen-Gen M235T Polymorphismus und der Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C-Polymorphismus wurden aus dem peripheren Blut, nach vorangehender Einverständniserklärung der Patienten, bestimmt. Die Krankengeschichte und relevante klinische und laborchemische Daten wurden retrospektiv zu vorgegebenen Zeitpunkten aus den Patientenakten erhoben. Während der ersten beiden Jahre nach Nierentransplantation erfolgte die Datenerhebung zum Zeitpunkt der Entlassung und bis einschließlich Monat 24 in 3-monatlichen-Abständen. Bis zum Monat 54 wurden danach 6-monatliche Abstände gewählt.

Folgende klinische Daten und Laborparameter wurden erfasst:

- Initialen, Geburtsjahr, Geschlecht
- Größe und Gewicht
- Nierengrunderkrankung
- Vorliegen eines Diabetes mellitus
- Kardiovaskuläre Erkrankungen
- Zeitpunkt der Nierentransplantation
- Anzahl der Transplantationen
- Dialyseart
- HLA-Konstellation
- Anzahl der Rejektionen
- Akutes Nierenversagen post transplantationem
- CMV-Infektion post transplantationem
- Dialysepflichtigkeit post transplantationem

- Dauer des Krankenhausaufenthaltes post transplantationem
- Spenderalter
- Warme und kalte Ischämiezeit
- Nierenfunktion (Kreatinin, Harnstoff, ECC) im Verlauf
- Proteinurie im Verlauf
- Blutdruckwerte (systolischer und diastolischer Blutdruck, MAD = mittlerer arterieller Blutdruck) im Verlauf
- Medikation (Immunsuppressiva, deren Wechsel oder Grund des Wechsels im Verlauf; Art und Anzahl der antihypertensiven Medikamente, insbesondere der ACE-Hemmer und der Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-Antagonisten) im Verlauf
- Anzahl der Abstoßungsreaktionen
- Kardiale Komorbidität vor der Transplantation
- Kardiale Komorbidität nach der Transplantation
- Metabolische Parameter (Gesamtcholesterin, LDL, TG) im Verlauf
- Transplantatverlust
- Tod des Patienten.

Die Nierentransplantatfunktion wurde nach der *Cockcroft-Formel*, in die das Geschlecht, das Alter, Körpergewicht und Serum-Kreatinin eingehen, berechnet:

Für Männer gilt:

$$\text{ECC} = [(140 - \text{Alter}) \times \text{Körpergewicht (kg)}] / [72 \times \text{Kreatinin (mg/dl)}].$$

Für Frauen gilt:

$$\text{ECC} = [(140 - \text{Alter}) \times \text{Körpergewicht (kg)}] / [85 \times \text{Kreatinin (mg/dl)}].$$

In einem später entwickelten Ansatz wurde zusätzlich der Nierentransplantatverlust oder die *Transplantatdysfunktion* als

- Abfall der GFR (glomerulären Filtrationsrate)  $<15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$
- oder über eine Verschlechterung der Nierenfunktion um zwei Grad nach K/DOQI Kriterien [129] unterhalb des zum Entlassungszeitpunkt vorliegenden Grades

definiert.

Der *mittlere arterielle Blutdruck (MAD)* wurde aus dem systolischen und diastolischen Blutdruck nach folgender Formel berechnet:

$$\text{MAD} = (\text{RR}_{\text{sys}} - \text{RR}_{\text{dia}}) / 3 + \text{RR}_{\text{dia}} \text{ (mmHg)}.$$

Ebenfalls wurde die *einfache Summe* der eingenommenen blutdrucksenkenden (i.e. antihypertensiven) (SumAH) Medikamente gebildet.

Hier interessierte eine besondere Untergruppe der Antihypertensiva: Die ACE-Hemmer und/oder AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten (Sartane). Patienten, die nach der Nierentransplantation diese Medikamente ununterbrochen über mindestens 6 Monate eingenommen haben, auch in Kombination mit allen anderen antihypertensiven Medikamenten, sind dann als sog. "user" definiert worden und wurden den Patienten entgegengesetzt, die diese bestimmte Klasse von Antihypertensiva nicht einnahmen.

Folgende Grenzwerte und Gruppen wurden für die anderen erhobenen klinischen und laborchemischen Daten verwendet:

- Anzahl der Transplantationen:  $\geq 1$ ,  $< 1$
- Vorliegen eines Diabetes mellitus: ja oder nein
- Anzahl der Rejektionen:  $\geq 2$ ,  $< 2$
- Akutes Nierenversagen post transplantationem: ja oder nein
- CMV-Infektion post transplantationem: ja oder nein
- Dialysepflichtigkeit post transplantationem: ja oder nein
- Dauer des Krankenhausaufenthaltes post transplantationem:  $\geq 30$  Tage,  $< 30$  Tage
- HLA-Konstellation: Anzahl der HLA-Mismatches  $\geq 2$ ,  $< 2$
- Spenderalter:  $\geq 65$  Jahre,  $< 65$  Jahre
- Spendergeschlecht
- Warme Ischämiezeit:  $\geq 30$  min,  $< 30$  min
- kalte Ischämiezeit:  $\geq 12$  Stunden,  $< 12$  Stunden
- Gesamtcholesterin-Konzentration im Serum:  $\geq 200$  mg/dl,  $< 200$  mg/dl
- LDL-Konzentration im Serum:  $\geq 100$  mg/dl,  $< 100$  mg/dl
- TG-Konzentration im Serum:  $\geq 200$  mg/dl,  $< 200$  mg/dl
- Proteinurie:  $\geq 1000$  mg/die,  $< 1000$  mg/die
- Einnahme von ACE-Hemmern und/oder AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten über mindestens 6 Monate: ja oder nein.
- Einnahme von Tacrolimus, CSA, MMF, Decortin im Verlauf: ja oder nein

- Wechsel der Immunsuppression im Verlauf: ja oder nein
- Grund des Wechsels der Immunsuppression im Verlauf
- Kardiale Komorbidität vor oder nach der Transplantation: ja oder nein

### **2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien**

Einschlusskriterien waren das Einverständnis der Patienten für die Teilnahme an der Studie, eine mindestens 3 Monate bestehende Transplantatfunktion, ausreichende Datenlage und das Vorhandensein von Blutmaterial für die Genotypisierung.

Ausgeschlossen wurden Patienten, die eine Transplantatfunktion oder ein Gesamtüberleben unter drei Monaten aufwiesen, Patienten von denen kein Blutmaterial oder eine nur unzureichende Datenlage vorlagen.

Als Endpunkte der Studie wurden ein Wiederauftreten einer erneuten Dialysepflicht, ein Transplantatverlust, Tod des Patienten, sogenanntes „lost to follow up“ und das Ende des Beobachtungszeitraums im September 2002 definiert.

### **2.1.3 Patienten**

Das Gesamtkollektiv der Patienten setzte sich aus  $n = 296$  Nierentransplantierten zusammen, die zwischen 1998-2001 in der Heinrich-Heine Universität nierentransplantiert wurden. Aus dem Gesamtkollektiv von 296 Patienten wurden bis Ende September 2002  $n = 229$  Patienten in die Studie eingeschlossen, was einem Prozentsatz von 78 % Patienten entsprach. Dies waren zu 59 % Männer und zu 41 % Frauen. Das mittlere Alter betrug  $48 \pm 13$  Jahre.

28 % ( $n = 67$ ) der Patienten sind bis September 2002 nicht in die Studie eingeschlossen worden. Bei 80 % ( $n = 50$ ) dieser Patienten lag eine unzureichende Datenlage oder kein Blutmaterial vor. 17 % ( $n = 11$ ) in diesem ausgeschlossenen Patientenkollektiv erlitten frühzeitig (bis zum Zeitpunkt von 3 Monaten nach erfolgter Nierentransplantation) einen Transplantatverlust, 3 % ( $n = 2$ ) verstarben während der ersten drei Monate nach Transplantation.

Von den 229 Patienten, die eingeschlossen wurden, erlitten 10 % ( $n = 23$ ) einen Transplantatverlust während des maximalen Beobachtungszeitraums von 54 Monaten, 0,9 % ( $n = 2$ ) der Patienten verstarben.

## **2.2 Gesundes Kontrollkollektiv**

Die Kontrollgruppe setzte sich aus einem zuvor von Herrn Dr. med. Christos Bantis beschriebenen Kollektiv von 120 gesunden Probanden ohne anamnestische oder klinische Hinweise

einer Nierenerkrankung oder einer arteriellen Hypertonie zusammen. Zu 51 % waren dies Probanden männlichen, und zu 49 % weiblichen Geschlechts. Das mittlere Alter betrug  $39 \pm 14$  Jahre. Das gesunde Kontrollkollektiv war somit dem Patientenkollektiv demographisch vergleichbar.

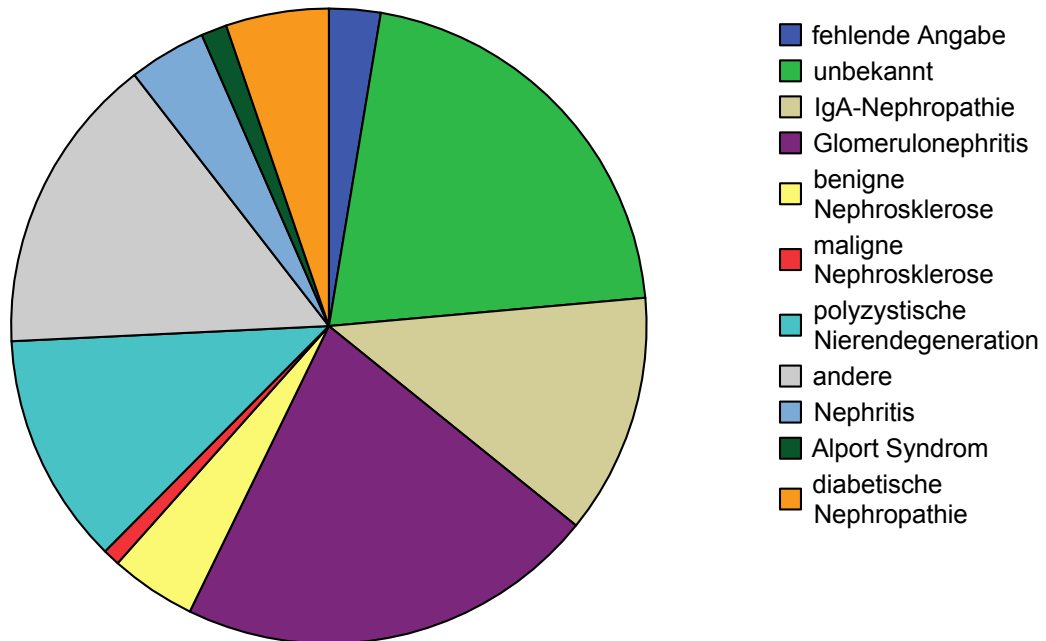
### 2.3 Allgemeine Daten

Die mittlere Beobachtungsdauer betrug  $21,4 \pm 13,6$  Monate. Durchschnittlich handelte es sich bei jedem Patienten um das  $1,2 \pm 0,4$ te Transplantat, wobei in unserem Kollektiv die häufigste angegebene Grunderkrankung, die zur terminalen Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit führte, die Glomerulonephritis (21,4 %) war. Bei 23,6 % der Patienten war die Grunderkrankung unbekannt oder es fehlte die Angabe. Eine IgA-Nephropathie führte bei 12,2 %, eine polyzystische Grunderkrankung bei 11,8 %, eine diabetische Nephropathie bei 5,2 % und eine benigne Nephrosklerose bei 4,4 % der Patienten zur terminalen Niereninsuffizienz (siehe Abbildung 2-1).

In unserem Patientenkollektiv wiesen vor Nierentransplantation 2,6 % einen Typ 1 bzw. 3,5 % einen Typ 2 Diabetes mellitus, nach Nierentransplantation 9,1 % der Patienten einen Diabetes mellitus auf.

Das mittlere Spenderalter betrug  $48,42 \pm 15,50$  Jahre. Die kalte Ischämiezeit (KIZ) lag durchschnittlich bei  $16,58 \pm 10,18$  Stunden, die warme Ischämiezeit (WIZ) bei  $24,75 \pm 12,16$  Minuten. Im Mittel lag der HLA-Mismatch bei  $2,66 \pm 1,6$ . 7,9 % der Patienten wurden im Rahmen des „old for old“-Programms (65-jährige oder ältere Patienten erhalten hierbei schneller als über die allgemeine Warteliste ein Transplantat von über 65-jährigen Spendern) nierentransplantiert. Jeder Patient verbrachte im Durchschnitt  $30,32 \pm 14,81$  Tage nach der Transplantation im Krankenhaus, 26,6 % erlitten nach erfolgter Transplantation ein akutes Nierenversagen und 31 % waren noch mindestens ein Mal vor der Entlassung dialysepflichtig. Während der ersten 6 Monate nach Transplantation bestand bei den Patienten eine 3-fach Immunsuppression, wobei 20 % (aufgerundet) der Patienten statt des Standardregimes mit Cyclosporin A (Sandimmun optoral®) (zusammen mit Prednisolon (Decortin H®) und Mycophenolat Mofetil (Cell Cept®)), FK 506/Tacrolimus (Prograf®) erhielten.

30,1 % der Patienten hatten eine CMV (Cytomegalie-Virus)-Infektion mit relevanter Erhöhung der CMV-DNA.

**Nierengrunderkrankung**

| Nierengrunderkrankung            | Häufigkeit | Prozent |
|----------------------------------|------------|---------|
| fehlende Angabe                  | 6          | 2,6     |
| Unbekannt                        | 48         | 21,0    |
| IgA-Nephropathie                 | 28         | 12,2    |
| Glomerulonephritis               | 49         | 21,4    |
| benigne Nephrosklerose           | 10         | 4,4     |
| maligne Nephrosklerose           | 2          | ,9      |
| Polyzystische Nierendegeneration | 27         | 11,8    |
| Andere                           | 35         | 15,3    |
| Nephritis                        | 9          | 3,9     |
| Alport Syndrom                   | 3          | 1,3     |
| diabetische Nephropathie         | 12         | 5,2     |
| Gesamt                           | 229        | 100,0   |

Abbildung 2-1: Darstellung der Häufigkeiten der unserem Patientenkollektiv zugrunde liegenden Nierengrunderkrankung.

Im gesamten Beobachtungszeitraum kamen für jeden Patienten  $0,9 \pm 1,35$  Rejektionen vor. 95,2 % der Patienten wiesen nach Nierentransplantation (NTX) eine arterielle Hypertonie auf. Von den 229 Patienten, die eingeschlossen wurden, erlitten 10 % ( $n = 23$ ) einen Transplantatverlust während des maximalen Beobachtungszeitraums von 54 Monaten und 0,9 % ( $n = 2$ ) der Patienten verstarben.

Jeder Patient nahm im Mittel  $2,7 \pm 1,1$  antihypertensive Medikamente ein, 51,5 % gehörten zur Gruppe derjenigen, die ACE-Hemmer und/oder AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten einnahmen.

Die untenstehenden Diagramme (Abbildung 2-2, Abbildung 2-3) veranschaulichen die Verteilung der warmen und kalten Ischämiezeit, die Anzahl der HLA-Mismatche und die Dauer des Krankenhausaufenthaltes im Patientenkollektiv. Die Tabellen (Tabelle 2-1 bis Tabelle 2-6) fassen den Anteil der Patienten, die im Rahmen des „old for old“-Programmes transplantiert wurden, den Anteil derjenigen mit dem Vorkommen einer Dialysepflichtigkeit und eines Diabetes mellitus vor und nach NTX, dem Vorkommen einer arteriellen Hypertonie und eines akuten Nierenversagens sowie einer CMV-Infektion nach Nierentransplantation, zusammen.

### Warme und kalte Ischämiezeit (WIZ, KIZ)

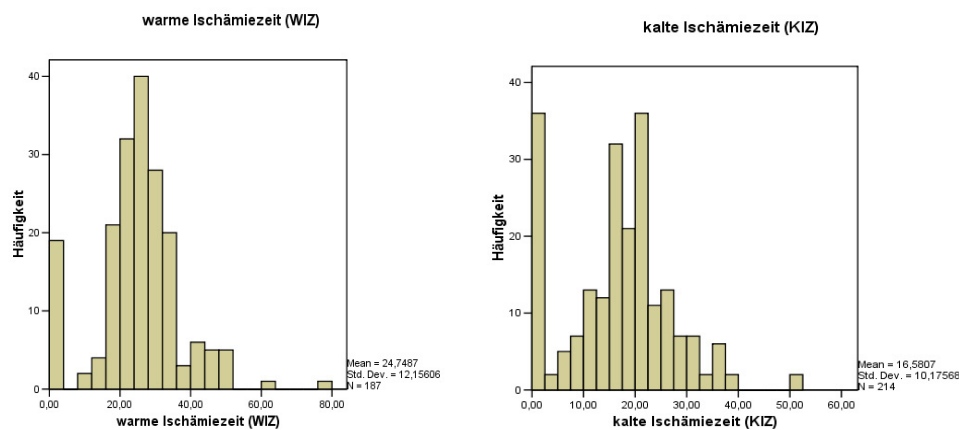


Abbildung 2-2: Verteilung der warmen und kalten Ischämiezeit.

## Anzahl der HLA-mismatches, Dauer des KH-Aufenthaltes

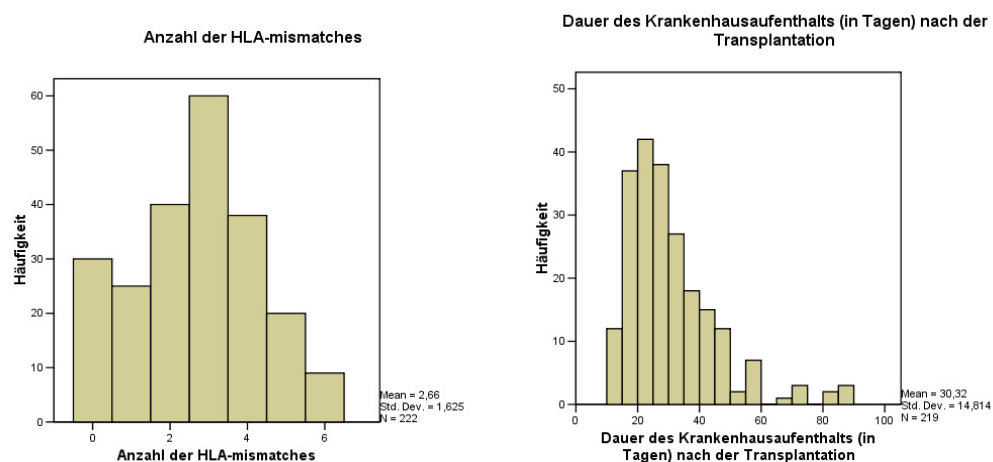


Abbildung 2-3: Verteilung der Anzahl der HLA-Mismatches und der Dauer des Krankenhausaufenthaltes.

| Transplantation im "old for old"- Programm | Häufigkeit | Prozent [ % ] |
|--------------------------------------------|------------|---------------|
| Nein                                       | 207        | 90,4          |
| Ja                                         | 18         | 7,9           |
| Fehlende Werte                             | 4          | 1,7           |
| Gesamt                                     | 229        | 100,0         |

Tabelle 2-1: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der im "old for old"-Programm transplantierten Patienten.

| Dialysepflicht post-NTX       | Häufigkeit | Prozent [ % ] |
|-------------------------------|------------|---------------|
| Fehlende Angabe               | 9          | 3,9           |
| Nein/keine Dialysepflicht     | 149        | 65,1          |
| ja, Dialysepflicht < 3 Monate | 66         | 28,8          |
| dauerhaft an Dialyse gebunden | 5          | 2,2           |
| Gesamt                        | 229        | 100,0         |

Tabelle 2-2: Häufigkeit und Verteilung der Notwendigkeit einer Dialysetherapie nach Nierentransplantation, unterteilt nach Dauer der Behandlung.

| <b>Diabetes mellitus</b>                           | <b>Häufigkeit</b> | <b>Prozent [ % ]</b> |
|----------------------------------------------------|-------------------|----------------------|
| Fehlende Angabe                                    | 6                 | 2,6                  |
| Nein/ kein Diabetes                                | 188               | 82,1                 |
| Typ 1 vor Tpx                                      | 6                 | 2,6                  |
| DM Typ 2 vor Tpx, therapiepflichtig                | 7                 | 3,1                  |
| DM Typ 2 vor Tpx, nicht therapiepflichtig          | 1                 | ,4                   |
| DM Typ 2 nach Tpx, therapiepflichtig               | 20                | 8,7                  |
| DM Typ 2 nach der Dialyse, nicht therapiepflichtig | 1                 | ,4                   |
| Gesamt                                             | 229               | 100,0                |

**Tabelle 2-3: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der an Diabetes mellitus erkrankten Patienten.**

| <b>Arterielle Hypertonie</b> | <b>Häufigkeit</b> | <b>Prozent [ % ]</b> |
|------------------------------|-------------------|----------------------|
| Fehlende Angabe              | 8                 | 3,5                  |
| Nein                         | 3                 | 1,3                  |
| Ja                           | 218               | 95,2                 |
| Gesamt                       | 229               | 100,0                |

**Tabelle 2-4: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der Patienten, die nach der Nierentransplantation eine arterielle Hypertonie aufwiesen.**

| <b>ANV post-NTX</b>  | <b>Häufigkeit</b> | <b>Prozent [ % ]</b> |
|----------------------|-------------------|----------------------|
| Fehlende Angabe      | 7                 | 3,1                  |
| Nein/kein ANV        | 160               | 69,9                 |
| ANV < 3 Mo nach Tpx  | 61                | 26,6                 |
| ANV > 12 Mo nach Tpx | 1                 | ,4                   |
| Gesamt               | 229               | 100,0                |

**Tabelle 2-5: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der Patienten, die nach der Nierentransplantation ein akutes Nierenversagen entwickelten, eingeteilt nach der Dauer des ANV entsprechend unter oder über 3 Monate nach NTX.**

| <b>CMV-Infektion post-NTX</b> | <b>Häufigkeit</b> | <b>Prozent [ % ]</b> |
|-------------------------------|-------------------|----------------------|
| Fehlende Angabe               | 14                | 6,1                  |
| Nein/keine CMV-Infektion      | 146               | 63,8                 |
| Ja/CMV-Infektion              | 69                | 30,1                 |
| Gesamt                        | 229               | 100,0                |

**Tabelle 2-6: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der CMV-Infektionen nach Nierentransplantation.**

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Material

Für die molekularbiologischen Bestimmungen wurde venöses Blut mit ACD (Acid Citrat Dextrose; Acidum citricum purum 2,5%, Dextrose 2,5%, Natrium citricum 2,16%, BD Vacutainer Systems, UK) als Zusatz verwendet.

Es erfolgte die Portionierung der Proben in sterilen Eppendorf-Cups (Eppendorf, Hamburg; 500 µl pro Cup) und Einfrierung bei -20°C.

#### 2.4.1.1 DNA

##### 2.4.1.1.1 *DNA-Extraktion*

Das Prinzip der DNA-Isolierung aus Blutleukozyten ist die Zerstörung der Zell- und Kernmembran durch Detergentien und die anschließende Reinigung der DNA durch Proteinverdau und Phenolextraktion.

Die DNA-Extraktion aus peripheren Leukozyten erfolgte mithilfe des QIAGEN-QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden Deutschland, Januar 1999) nach folgendem Protokoll:

Die Blutproben wurden bei 37°C aufgetaut.

1. Lyse:

Lyse mit der QIAGEN Protease: auf 1,5 ml Eppendorf-Cups, Pipettierung von 20 µl Protease, Hinzufügung von 200 µl Blut und 200 µl Puffer AL. Sofortiges Vermischen durch Vortexen (mind. 15 Sec). Inkubation über 10 Min bei 56°C in einem Wasserbad. Zentrifugation. Hinzugabe von 200 µl Ethanol abs. und erneutes Vortexen über 15 Sec. Zentrifugation.

2. DNA-Bindung an die Säulen Membran:

Pipettierung des Homogenisats auf mitgelieferte Säulen (beschichtet mit der QIAamp Silica-Gel-Membran) und Zentrifugation über 1 Min bei 8000 rpm (6000 x g; Raumtemperatur). Dabei Adsorption der DNA an die Säulen-Membran und Filtration anderer Zellbestandteile. Verwerfen des Eluates.

3. Waschung (zur Optimierung der DNA-Reinheit):

Hinzugabe von 500 µl des Waschpuffers AW1. Zentrifugation über 1 Min bei 8000 rpm (6000 x g), Verwerfen des Eluates. Hinzugabe von 500 µl des Waschpuffers AW2. Zentrifugation über 1 Min bei 8000 rpm (6000 x g), Verwerfen des Eluates. Zentrifugation bei 15000 rpm (20000 x g) zur Entfernung der letzten Flüssigkeitsreste.

#### 4. DNA-Freisetzung:

Umlagerung der DNA-behafteten Säulen in 1,5 ml Eppendorf-Cups. Hinzugabe von 50 µl des Puffers AE. Inkubation über 5 Min bei Raumtemperatur. Zentrifugation über 1 Min bei 8000 rpm (6000 x g) zur Freisetzung der DNA.

##### **2.4.1.1.2 Quantifizierung der DNA (DNA-Konzentration und DNA-Reinheit)**

Für die Quantifizierung der DNA mit dem UV-Spektrophotometer (Gene Quant, Pharmacia Biotech, Cambridge, England) wurde eine Probe der Stammlösung von DNA 1:10 mit Aqua dest (8 µl DNA und 72 µl H<sub>2</sub>O) verdünnt.

Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die Transmission der verdünnten Lösung bestimmt und daraus die DNA-Konzentration berechnet, wobei 2-16 µl DNA aus 200 µl Vollblut gewonnen wurden.

Zur Evaluierung der DNA-Reinheit diente die  $A_{260}/A_{280}$  Ratio, die den Anteil reiner DNA (Absorptionsmaximum bei 260 nm) zu einer Proteinmischung beschreibt (Absorptionsmaximum bei 280 nm). Dabei erreichte gut gereinigte DNA Werte zwischen 1,7 und 1,9.

##### **2.4.1.1.3 DNA-Verdünnung für den ACE-Gen I/D- Polymorphismus**

Für die Bestimmung des ACE-Gen I/D-Polymorphismus erfolgte die Verdünnung eines Teils der extrahierten DNA mit dem Puffer AE auf 0,003 µg DNA/µl.

##### **2.4.1.1.4 DNA-Lagerung**

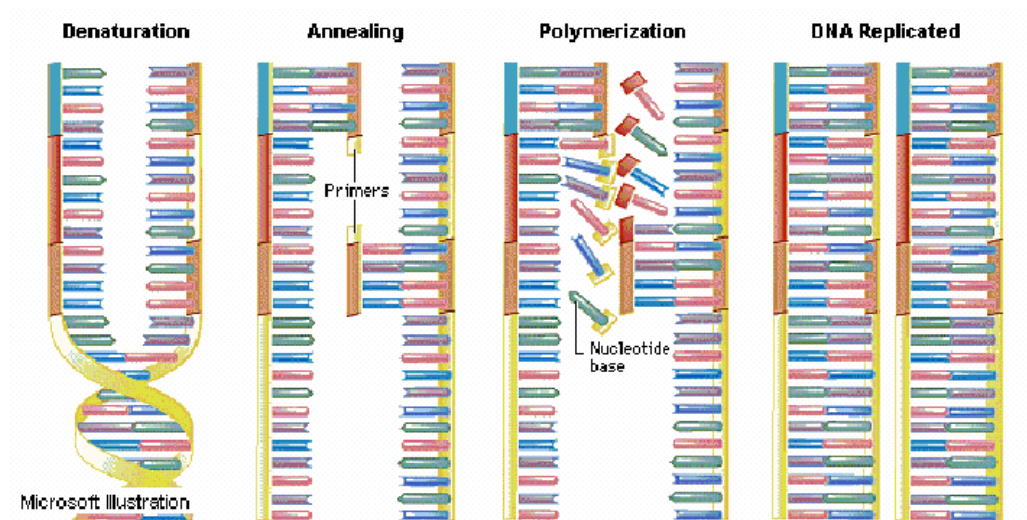
Die kurzfristige DNA-Lagerung erfolgte bei +4°C, langfristig wurde sie bei - 20°C aufbewahrt.

#### **2.4.2 Bestimmung der genetischen Polymorphismen des RAAS mit der PCR**

Die PCR (Polymerasenkettenreaktion) dient der selektiven Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts in vitro.

Im ersten Schritt wird die Ausgangs-DNA, das Template, durch Erhitzen denaturiert (*Denaturierung*). Danach erfolgt bei niedriger Temperatur die Bindung (*Hybridisierung*) ausgewähl-

ter Oligonukleotidprimer mit den Nukleotidsequenzen beidseits des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts (*Annealing*). Eine thermostabile DNA-Polymerase synthetisiert dann komplementäre DNA-Sequenzen, indem sie zugegebene Nukleotide an die 3'OH-Primer-Enden heftet (*Extension/Elongation*). Diese drei Schritte – Denaturierung, Hybridisierung, DNA-Synthese – können beliebig häufig wiederholt werden, in der Regel 20-50 mal.



Aus: MS Encarta 98

**Abbildung 2-4: Schemenhafte Darstellung des Ablaufs einer PCR (Polymerasenkettenreaktion) [aus MS Encarta 1998, Microsoft Illustration]**

#### 2.4.2.1 ACE-Gen I/D-Polymorphismus: PCR-Protokoll

Die Bestimmung des ACE-Gen I/D-Polymorphismus erfolgte mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) und ggf. anschließender I-spezifischer PCR.

Der Reaktionsansatz für die Amplifikation einer Probe setzte sich zusammen aus:

DNA: 0,015 µg, 10 x PCR-Puffer, MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mmol, dNTP-mix (Mischung aus Desoxynukleotidtriphosphaten dTTP, dCTP, dGTP, dATP, Roche Diagnostics Mannheim) 0,2 mmol, ACE-sense Primer: 5' GCC CTG CAG GTG TCT GCA GCA TGT 3' 20 pmol, ACE-antisense Primer: 5' GGA TGG CTC CCG CCT TGT CTC 3' 20 pmol, thermostabile DNA-Polymerase gewonnen aus dem *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase/Thermostabile DNA-Polymerase, Life Technologies, Karlsruhe): 1,2 U.

Die Substanzen wurden auf Eis zur Template-DNA pipettiert, zuletzt wurde das Enzym zugegeben und das Gemisch mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt. Auf dem Thermocycler (Personal Cycler, Biometra, Göttingen) wurde folgendes Standardprogramm gewählt:

- *Schritt 1 (1 x): Initial Denaturation (Vordenaturierung) : 5 min, 94°C*

- *Schritt 2 ( 30 x): Denaturation: 40 sec, 94 °C*
- *Annealing (Primerhybridisierung): 40 sec, 64°C*
- *Elongation (DNA-Synthese): 2 min 10 sec, 70°C*
- *Schritt 3 (1x): Final Extension (Endamplifikation): 7 min, 72°C*

Die fertigen PCR-Produkte wurden bei 4°C aufbewahrt.

#### 2.4.2.2 ACE-Gen I/D-Polymorphismus: Gelelektrophorese

Mit der Gelelektrophorese werden die PCR-Produkte entsprechend ihrer Größe, ihrer Ladung und ihres Molekulargewichtes durch die Wanderung im elektrostatischen Feld aufgetrennt. Hochmolekulare Fragmente wandern dabei mit einer geringeren Geschwindigkeit durch das Agarosegel als kleinere Fragmente, wobei die Auftrennung von der Porengröße des Gels, also der Agarosekonzentration, abhängt. Jede Probe wird mit 2 µl Probenpuffer vermischt und in einer horizontalen Elektrophoresekammer bei 100 V aufgetrennt. Als Laufpuffer dient 1 x TAE. Zur Bestimmung der Größe wird ein DNA-Längenstandard ebenfalls aufgetragen. Nach der Elektrophorese werden die Gele 30 min in einer Ethidiumbromidlösung (1mg/l) angefärbt und die DNA wird unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

Hier erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte im 1,5%-Agarose-Gel (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim), die durch den Zusatz von Ethidiumbromid (0,05 µg/ml pro Gel, Roche Diagnostics, Mannheim), das zwischen der DNA interkaliert, nach erfolgter Wanderung unter 90 Volt über 35 min, im UV-Licht (312 nm) detektiert wurden. Als DNA-Längenstandard diente der DNA-Marker IX (Roche Diagnostics, Mannheim). Das Ladepuffer für die PCR-Produkte bestand aus Xylencyanol, Ficoll 400, Glycerin und TAE-Puffer (Tris-Base 0,04 M, Essigsäure 0,04 M, EDTA 0,05 M, pH 8,0).

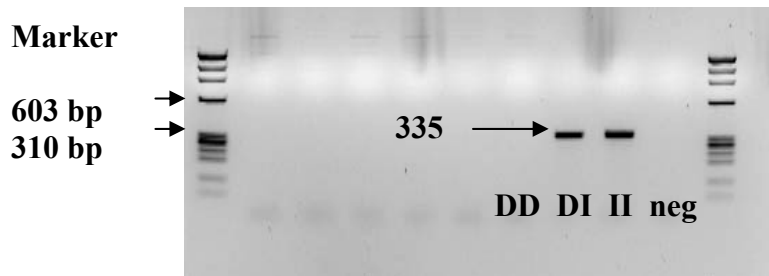
Je nachdem, welcher Genotyp bestand, wurden folgende Banden für den ACE-Gen I/D-Polymorphismus detektiert (siehe auch Abbildung 2-5):

- II: 1 Bande bei 597 bp
- DI: 2 Banden: 597, 310 bp
- DD: 1 Bande: 310 bp
- Proben mit DD-Ergebnis: anschließende insertionsspezifische PCR (ISP) zur Erfassung eventuell durch das D-Allel unterdrückter DI- Heterozygoter.



#### 2.4.2.4 ACE-Gen I/D-Polymorphismus: Gelelektrophorese (ISP)

Die elektrophoretische Auftrennung der Genprodukte erfolgte in 1,5 %-iger Agarose (wie oben beschrieben). Lag der DI-Genotyp vor, war die Bande des I-Allels bei 335 bp sichtbar. Bei den DD-Homozygoten war kein Amplifikationsprodukt nachweisbar.



**Abbildung 2-6: ACE-Gen I/D-Polymorphismus. I-spezifische PCR: Darstellung von 5 Patienten Genotypen (alle weisen den DD-Genotyp auf) und 4 Kontrollproben.**

#### 2.4.2.5 Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus: PCR-Protokoll

Die Bestimmung des Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus erfolgte mittels PCR und anschließendem Restriktionsenzymverdau.

Für die Amplifikation einer Probe wurden benutzt:

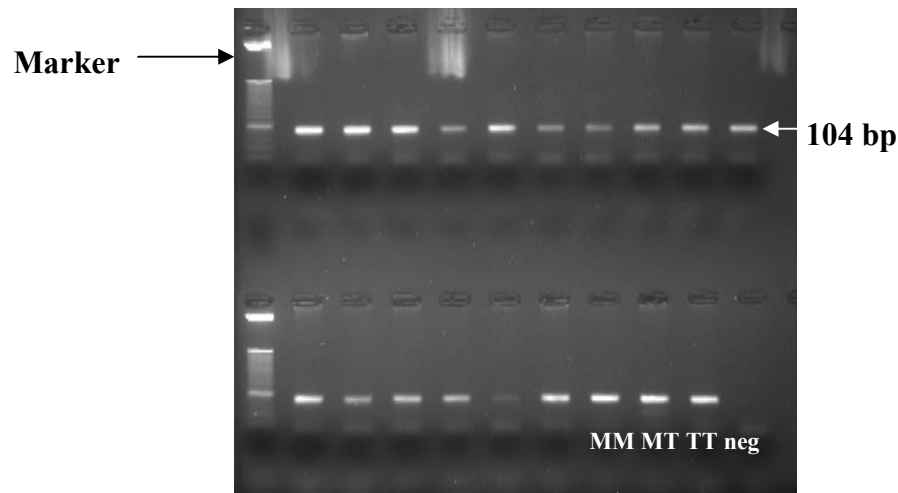
DNA: 0,015 µg, 10 x PCR-Puffer, MgCl<sub>2</sub>: 1,5 mmol, dNTP-mix 0,2 mmol, AGT-sense Primer: 5' TGA CAG GAT GGA AGA CTG GCT GCT CCC TGC 3' 30 pmol, AGT-antisense Primer: 5' AGC AGA GAG GTT TGC CTT ACC TTG 3' 30 pmol, Taq-Polymease 1,2 U.

Auf dem Thermocycler wurde folgendes Standardprogramm für die PCR gewählt:

- *Schritt 1 (1 x): Initial Denaturation (Vordenaturierung) : 5 min, 94°C*
- *Schritt 2 ( 30 x): Denaturation: 40 sec, 94 °C*
- *Annealing (Primerhybridisierung): 40 sec, 66°C*
- *Elongation (DNA-Synthese): 1 min 10 sec, 72°C*
- *Schritt 3 (1x): Final Extension (Endamplifikation): 7 min, 72°C.*

#### 2.4.2.6 Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus: Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der 104 bp langen Sequenz des Angiotensinogen-Gens, die bei obenbeschriebener PCR amplifiziert wurde, erfolgte in 1,5 %-iger Agarose (s.o.). Zum Längenvergleich diente eine 25 bp DNA-Leiter.



**Abbildung 2-7: Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus: Darstellung des primären PCR-Produktes von 104 bp von 16 Patienten und 4 Kontrollen (MM, MT, TT, Negativkontrolle = neg) in der Gelelektrophorese.**

#### **2.4.2.7 Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus: Restriktionsenzymverdau**

Restriktionsenzyme sind aus Bakterien gewonnene Endonukleasen, die bestimmte Nukleotidsequenzen erkennen und so die DNA an definierten Stellen schneiden. Über die Länge der DNA-Fragmente, die beim Schneiden der DNA durch Restriktionsenzyme entstehen, können DNA-Abschnitte im Vergleich mit einer Restriktionskarte identifiziert werden.

Das 104 bp lange PCR-Produkt wurde für 1 Stunde mit der Endonuklease MSPI (Promega, Mannheim, Erkennungssequenz 5' C/ CGG 3'; 3' GGC/ C 5') bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch setzte sich zusammen aus:

PCR-Produkt: 25 µl, 10x Puffer B 4 µl, H<sub>2</sub>O 8,8 µl, BSA 0,4 µl, MSPI 1,8 µl.

#### **2.4.2.8 Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus: Gelelektrophorese**

Da die Größe der Restriktionsprodukte klein war, wurde ein 2 %-iges Metaphor-Agarose-Gel (BMA, Rockland, USA) mit 0,5 %-igem TBE Puffer (89 mM Trisborate pH 8,3, 2 mM Na<sub>2</sub> EDTA) verwendet. Als Längenvergleich diente eine 25 bp DNA-Leiter (Life Technologies, Karlsruhe).

Durch die Punktmutation entstand beim T-Allel eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym, so dass die 104 bp lange Sequenz in zwei Teile gespalten wurde und somit zwei neue Banden entstanden, eine 73 bp, die andere 31 bp lang. Das M-Allel wurde durch das



#### 2.4.2.10 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C-Polymorphismus: Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der 856 bp langen Sequenz des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C Polymorphismus, die bei obenbeschriebener PCR amplifiziert wurde, erfolgte in 1,5 %-iger Agarose (s.o.). Zum Längenvergleich dienten eine 100 bp (Peq-lab-Biotechnologie, Erlangen) und eine IX (Roche Diagnostics, Mannheim) DNA-Leiter (Abbildung 2-9).

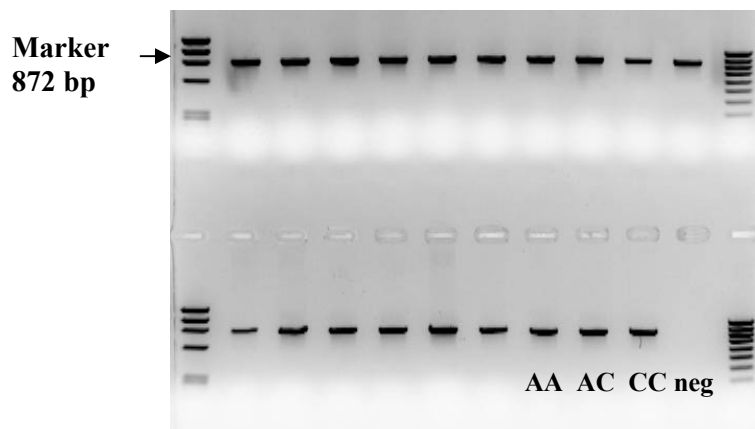


Abbildung 2-9: Angiotensin II-Typ1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R) A1166C-Polymorphismus: Amplifikation eines 856 bp langen Fragments bei 16 Patienten, 4 Kontrollen (AA, AC, CC, Negativkontrolle = neg).

#### 2.4.2.11 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C Polymorphismus: Restriktionsenzymverdau (DdeI)

Das 856 bp lange PCR-Produkt wurde für 1 Stunde mit der Endonuklease DdeI (Promega, Mannheim, Erkennungssequenz 5' C/ TNAG 3'; 3' GANT/ C 5') bei 37°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch setzte sich zusammen aus:

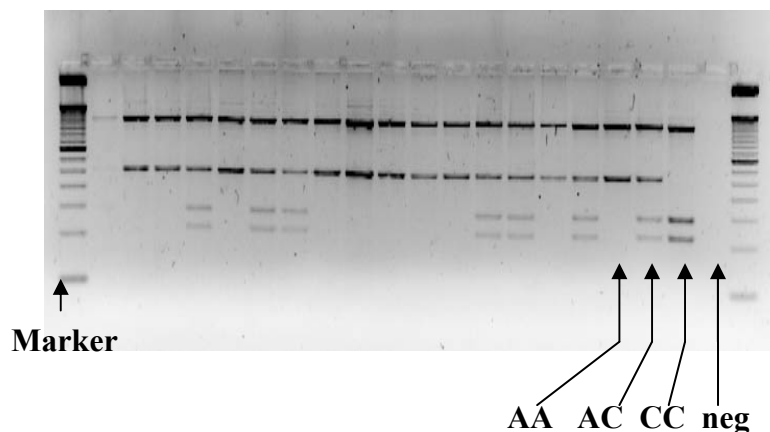
PCR-Produkt: 25 µl, 10x Puffer D 4 µl, H<sub>2</sub>O 9,6 µl, BSA 0,4 µl, Dde I 1 µl.

#### 2.4.2.12 Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C-Polymorphismus: Gelelektrophorese

Wiederum wurde 2 %-iges Metaphor-Agarose-Gel (BMA, Rockland, USA; Ladepuffer: Bromphenolblau, Ficoll 400, Glycerin, TBE-Puffer) mit 0,5 %-igem TBE Puffer (89 mM Trisborate pH 8,3, 2 mM Na<sub>2</sub> EDTA) zur Darstellung der Banden verwendet. Als Längenvergleich diente eine 50 bp DNA-Leiter (Life Technologies, Karlsruhe).

Bei allen Proben existierte für das Restriktionsenzym eine Erkennungssequenz, wodurch das primäre PCR-Produkt in zwei Teile (601 und 255 bp) gespalten wurde. Beim C-Allel entstand zusätzlich durch die Punktmutation eine weitere Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym, so dass die 255 bp lange Sequenz in zwei Teile gespalten wurde und dadurch zwei neue Banden entstanden, eine 143 bp, die andere 112 bp lang. Das A-Allel wurde durch das Enzym nicht weiter gespalten. Somit waren folgende Genotypen für den Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C Polymorphismus in der Gelelektrophorese nachweisbar (Abbildung 2-10):

- AA: 2 Banden bei 601, 255 bp
- AC: 4 Banden bei 601, 255, 143, 112 bp
- CC: 3 Banden bei 601, 143, 112 bp.



**Abbildung 2-10: Angiotensin II-Typ1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C Polymorphismus: Darstellung der Genotypen nach Restriktionsenzymverdau mit DdeI bei 16 Patienten und 4 Kontrollen (AA, AC, CC, Negativkontrolle = neg) in der Gelelektrophorese.**

Die unten aufgeführte Tabelle 2-7 fasst die genetischen Bestimmungsmethoden der RAAS-Polymorphismen zusammen.

| <b>ACE-Gen I/D-Polymorphismus</b>                                                                                                                                                                                      | <b>Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T Polymorphismus</b>                                                                                                                                                                             | <b>Angiotensin II Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen Polymorphismus</b>                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>PCR</b><br>↓<br><b>Gelelektrophorese (1):</b><br><b>Genotypen: DD, DI, II</b><br>↓<br><b>PCR: ISP für den DD-Genotyp</b><br>↓<br><b>Gelelektrophorese (2):</b><br><b>evtl. Identifizierung von DI-Heterozygoten</b> | <b>PCR</b><br>↓<br><b>Gelelektrophorese (1):</b><br><b>primäres PCR-Produkt:</b><br><b>104 bp</b><br>↓<br><b>Restriktionsenzymver-</b><br><b>dau mit Msp</b><br>↓<br><b>Gelelektrophorese (2):</b><br><b>Genotypen TT, MT, MM</b> | <b>PCR</b><br>↓<br><b>Gelelektrophorese (1):</b><br><b>primäres PCR-Produkt:</b><br><b>856 bp</b><br>↓<br><b>Restriktionsenzymver-</b><br><b>dau mit DdeI</b><br>↓<br><b>Gelelektrophorese (2):</b><br><b>Genotypen CC, AC, AA</b> |

Tabelle 2-7: Übersicht über die genetischen Polymorphismen des RAAS.

## 2.5 Qualitätssicherung

Während der Blutentnahme und der gesamten Aufarbeitung herrschte Handschuhpflicht, um eine DNA-Kontamination mit Fremd-DNA zu vermeiden. Die DNA-Extraktion, PCR, Gelelektrophorese, DNA-Messung und DNA-Verdünnung erfolgten an separaten Arbeitsplätzen. Für jeden Bereich standen eigene Pipetten und sterile Pipettenspitzen mit Filter zur Verfügung. In jeder PCR und Restriktion wurden zur Früherkennung potentieller Kontaminationen negative Kontrollen eingesetzt.

## 2.6 Patientenalter und Prävalenz der Genotypen

Die Prävalenz der ermittelten Genotypen wurde mit einer gesunden Kontrollgruppe (n = 120, 51% Männer, 49% Frauen, mittleres Alter  $39 \pm 14$  Jahre) mit normaler Nierenfunktion verglichen.

Die unten aufgeführten Tabellen (Tabelle 2-8 und Tabelle 2-9) bestätigen die Annahme, dass die Verteilung der Genotypen des jeweiligen Polymorphismus im Vergleich zum nieren gesunden Kontrollkollektiv nicht unterschiedlich war. Dies bedeutet, dass sich das untersuchte Patientenkollektiv genetisch von der Normalbevölkerung nicht unterschied. Diese Normalverteilung muss als Voraussetzung zur Durchführung der hier vorliegenden Auswirkung der Genotypen auf den Phänotyp Niere und Blutdruck herangezogen werden.

|                      | <b>Nierentransplantierte<br/>n = 229</b> | <b>nierengesunde Kontrolle<br/>n = 120</b> |
|----------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>Alter (Jahre)</b> | <b>48 ± 13</b>                           | <b>39 ± 14</b>                             |
| <b>Geschlecht</b>    | <b>59 % m<br/>41 % w</b>                 | <b>51 % m<br/>49 % w</b>                   |

Tabelle 2-8: Alters- und Geschlechtsverteilung des Patienten- und des Kontrollkollektivs.

| <b>Gen</b>                  | <b>Genotyp</b> | <b>Nierentransplantierte<br/>n = 229</b> | <b>nierengesunde Kontrolle<br/>n = 120</b> |
|-----------------------------|----------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|
| <b>ACE-Gen</b>              | <b>DD</b>      | <b>28 %</b>                              | <b>30 %</b>                                |
|                             | <b>DI</b>      | <b>47 %</b>                              | <b>51 %</b>                                |
|                             | <b>II</b>      | <b>25 %</b>                              | <b>19 %</b>                                |
|                             |                |                                          |                                            |
| <b>AGT M235T-Gen</b>        | <b>TT</b>      | <b>18 %</b>                              | <b>18 %</b>                                |
|                             | <b>MT</b>      | <b>49 %</b>                              | <b>51 %</b>                                |
|                             | <b>MM</b>      | <b>33 %</b>                              | <b>31 %</b>                                |
|                             |                |                                          |                                            |
| <b>AT<sub>1</sub>R- Gen</b> | <b>CC</b>      | <b>11 %</b>                              | <b>11 %</b>                                |
|                             | <b>AC</b>      | <b>46 %</b>                              | <b>38 %</b>                                |
|                             | <b>AA</b>      | <b>43 %</b>                              | <b>47 %</b>                                |

Tabelle 2-9: Verteilung der Genotypen der RAAS-Polymorphismen in der Patienten- und Kontrollgruppe.

## 2.7 Statistik

Grundsätzlich wurden zwei statistische Ansätze für die Auswertung gewählt.

### 2.7.1 Erster statistischer Ansatz: Einzelfaktoranalyse (Chi-Quadrat-Test, Kruskal-Wallis-Test, ANOVA)

Die Analyse der Basisdaten der untersuchten Patienten erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test. Die untersuchten Parameter wurden als Mittelwerte plus minus ( $\pm$ ) Standardabweichung angegeben. Der Einfluss der Genotypen und der anderen Faktoren auf die Transplantatfunktion, den MAD sowie die SumAH wurde im ersten Schritt durch den verteilungsunabhängigen Kruskal-Wallis-Test punktuell je Zeitpunkt geprüft.

Im zweiten Schritt dieser Analyse wurde mit einer zweifaktoriellen ANOVA der Einfluss verschiedener Faktoren auf den Verlauf dieser Funktionen geprüft. Die Faktoren waren die Zeit und der Genotyp. Da es sich hierbei um einen Versuchsplan mit wiederholten Messungen am selbem Objekt handelte und nicht immer alle Messungen vorlagen, konnte nicht eine klassische ANOVA gerechnet werden, sondern es wurde ein gemischtes Modell gewählt. Als Kovarianzmodell wurde ein zufälliger Patienteneffekt (compound symmetry) und zusätzlich eine Autoregression der Messfehler angenommen. Die Anpassung der theoretischen Kovarianten an die empirischen Werte war gut.

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS GmbH, München, Landeslizenz NRW) und mit dem Programm SAS Version 9.1 ausgeführt. Wahrscheinlichkeitswerte von  $p < 0,05$  wurden als signifikant erachtet.

### 2.7.2 Zweiter statistischer Ansatz: Gruppenanalyse (Chi-Quadrat-Test, Two-sample-proportion-Test, Kaplan Meier Überlebens-Analyse mit Log-rank-Test, „pattern recognition“ nach der KNN-Methode)

Zur Durchführung einer Analyse von Gruppen der drei verschiedenen RAAS-Polymorphismen fanden die Transplantatfunktion und damit auch der Transplantatfunktionsverlust eine neue Definition.

Im Unterschied zum Vergleich der nach Cockcroft errechneten ECC zwischen verschiedenen Genotypträgern in der bisher hier vorgestellten Analyse, wurde die *Transplantatdysfunktion* bzw. der *Transplantatverlust*

- als der Abfall der GFR (glomerulären Filtrationsrate)  $< 15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$
- oder als eine Verschlechterung der Nierenfunktion um zwei Grad nach K/DOQI Kriterien [129] unterhalb des zum Entlassungszeitpunkt vorliegenden Grades

definiert. Die Patienten konnten somit in eine Gruppe mit Transplantatfunktionsverlust und eine Gruppe ohne Transplantatfunktionsverlust über die Zeit eingeteilt werden. Dabei wurden Patienten mit Transplantatverlust als „Fälle“ bezeichnet und von den Kontrollpatienten ohne Transplantatverlust („Kontrollen“) abgegrenzt.

| Stadium | GFR                           |                                       |
|---------|-------------------------------|---------------------------------------|
| 1       | $> 89 \text{ ml/min}$         | normale Nierenfunktion                |
| 2       | $60\text{-}89 \text{ ml/min}$ | milde Nierenfunktionseinschränkung    |
| 3       | $30\text{-}59 \text{ ml/min}$ | moderate Nierenfunktionseinschränkung |
| 4       | $15\text{-}29 \text{ ml/min}$ | schwere Nierenfunktionseinschränkung  |
| 5       | $< 15 \text{ ml/min}$         | chronisches Nierenversagen            |

**Tabelle 2-10: Einteilung der Nierenfunktionseinschränkung nach K/DOQI [129].**

Patienten, die im Untersuchungszeitraum verstarben, wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Alle möglichen Kombinationen der drei Polymorphismen wurden berücksichtigt (s. Tabelle 2-11 und Tabelle 2-12 für die Genotyp-Kombinationen und Tabelle 2-13 für die Allel-Kombinationen).

| ACE I/D | AGT M235T | AT <sub>1</sub> R A1166C |
|---------|-----------|--------------------------|
| -       | MT        | AA                       |
| -       | MT        | AC                       |
| -       | MT        | CC                       |
| -       | TT        | AA                       |
| -       | TT        | AC                       |
| -       | TT        | CC                       |
| II      | -         | -                        |
| ID      | -         | -                        |
| DD      | -         | -                        |
| -       | MM        | -                        |
| -       | MT        | -                        |
| -       | TT        | -                        |
| -       | -         | AA                       |
| -       | -         | AC                       |
| -       | -         | CC                       |

**Tabelle 2-11: Genotypkombinationen, die in der statistischen Analyse verwendet wurden (Fortsetzung folgt).**

| ACE I/D | AGT M235T | AT <sub>1</sub> R A1166C |
|---------|-----------|--------------------------|
| II      | MM        | AA                       |
| II      | MM        | AC                       |
| II      | MM        | CC                       |
| II      | MT        | AA                       |
| II      | MT        | AC                       |
| II      | MT        | CC                       |
| II      | TT        | AA                       |
| II      | TT        | AC                       |
| II      | TT        | CC                       |
| ID      | MM        | AA                       |
| ID      | MM        | AC                       |
| ID      | MM        | CC                       |
| ID      | MT        | AA                       |
| ID      | MT        | AC                       |
| ID      | MT        | CC                       |
| ID      | TT        | AA                       |
| ID      | TT        | AC                       |
| ID      | TT        | CC                       |
| DD      | MM        | AA                       |
| DD      | MM        | AC                       |
| DD      | MM        | CC                       |
| DD      | MT        | AA                       |
| DD      | MT        | AC                       |
| DD      | MT        | CC                       |
| DD      | TT        | AA                       |
| DD      | TT        | AC                       |
| DD      | TT        | CC                       |
| II      | MM        | -                        |
| II      | MT        | -                        |
| II      | TT        | -                        |
| ID      | MM        | -                        |
| ID      | MT        | -                        |
| ID      | TT        | -                        |
| DD      | MM        | -                        |
| DD      | MT        | -                        |
| DD      | TT        | -                        |
| II      | -         | AA                       |
| II      | -         | AC                       |
| II      | -         | CC                       |
| ID      | -         | AA                       |
| ID      | -         | AC                       |
| ID      | -         | CC                       |
| DD      | -         | AA                       |
| DD      | -         | AC                       |
| DD      | -         | CC                       |
| -       | MM        | AA                       |
| -       | MM        | AC                       |
| -       | MM        | CC                       |

Tabelle 2-12: Genotypkombinationen, die in der statistischen Analyse verwendet wurden (Fortsetzung).

| ACE I/D | AGT M235T | AT <sub>1</sub> R A1166C |
|---------|-----------|--------------------------|
| I       | M         | A                        |
| I       | M         | C                        |
| I       | T         | A                        |
| I       | T         | C                        |
| D       | M         | A                        |
| D       | M         | C                        |
| D       | T         | A                        |
| D       | T         | C                        |
| I       | M         | -                        |
| I       | T         | -                        |
| D       | M         | -                        |
| D       | T         | -                        |
| I       | -         | A                        |
| I       | -         | C                        |
| D       | -         | A                        |
| D       | -         | C                        |
| -       | M         | A                        |
| -       | M         | C                        |
| -       | T         | A                        |
| -       | T         | C                        |
| I       | -         | -                        |
| D       | -         | -                        |
| -       | M         | -                        |
| -       | T         | -                        |
| -       | -         | A                        |
| -       | -         | C                        |

**Tabelle 2-13: Allelkombinationen, die in der statistischen Analyse verwendet wurden.**

Der Chi-Quadrat-Test wurde dann angewandt, um die unterschiedliche Distributionen der Genotypen bzw. deren Kombinationen zu untersuchen. Anschließend wurde ein Two-sample-proportion-Test durchgeführt, um Unterschiede in der Prävalenz (als Proportionen) der individuellen Genotypen (oder deren Kombinationen) zwischen Fällen und Kontrollen aufzudecken. Hierbei ist keine Korrektur für mehrfache Testung notwendig, weil jeder Test unabhängig vom nächsten ist.

Die Formel für den Two-sample-proportion-Test ist wie folgt:

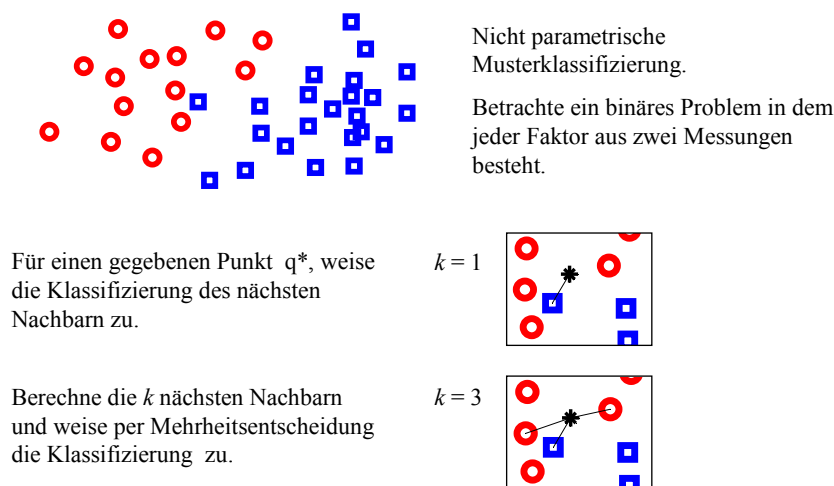
$$Z = \frac{\hat{p}_1 - \hat{p}_2}{\sqrt{\frac{\hat{p}_1(1-\hat{p}_1)}{n_1} + \frac{\hat{p}_2(1-\hat{p}_2)}{n_2}}}$$

Für diejenigen Genotypen (oder deren Kombinationen), die signifikante Unterschiede in der Prävalenz zwischen Fällen und Kontrollen zeigten, wurden in einem nächsten Schritt die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse und der Log-rank-Test verwendet, um auf Unterschiede in der Verteilung des Transplantatverlustes zwischen Transplantierten mit diesen zuvor aufgedeckten Genotypen (oder deren Kombinationen) zu testen.

Es erfolgte schließlich eine Analyse der klinischen Daten mittels Mustererkennungsalgorithmen („pattern recognition“), um mögliche Einflüsse der genetischen Polymorphismen, aber auch anderer metabolischer und externer Faktoren, auf die Funktion der Nierentransplantate zu finden. Diese Faktoren in ihrer binären Form sind unter Punkt 2.1.1 vorgestellt worden.

Die Mustererkennungsanalyse bediente sich dabei der „k-nearest neighbour“ (KNN)-Regel. Für diesen statistischen Ansatz konnte ein kompletter Datensatz mit einer Beobachtungszeit über 9 Monate von 127 Patienten erzeugt werden, 102 inkomplette Datensätze mussten von der Analyse ausgeschlossen bleiben. Um die Genauigkeit der Methode zu erhöhen, wurden zuerst mehrere cutoffs für die Anzahl der Marker/Faktoren getestet (siehe dazu auch Abbildung 2-11).

## K-Nearest Neighbour Regel



**Abbildung 2-11: Veranschaulichung der KNN-Methode [überarbeitet nach D. Claus, Computer Vision Reading Group, Oxford 2004]**

Damit konnte dann die Kombination von Markern/Faktoren ermittelt werden, die die höchste Genauigkeit aufwiesen. Die Genauigkeit wurde dabei aus dem Prozentsatz korrekt klassifizierter Fälle (d.h. dem Prozentsatz der durch den Algorithmus vorhergesagten Fälle -i.e. Transplantatverluste- welche auch klinisch als Fälle -i.e. Transplantatverluste- definiert wurden) berechnet. Zum Erfassen der zugrundeliegenden Distribution wurden 30% der Werte als Trainingsdatensatz getestet, die verbleibenden 70% der Werte standen für die eigentliche Analyse zur Verfügung.

Für diese so ausgewählten vorher binär definierten Faktoren (siehe Punkt 2.1.1), wurde für die Berechnung der Stärke des Zusammenhangs mit dem Transplantatfunktionsverlust dann die Odds Ratio (Verhältnis von Chancen) berechnet.

Eine Odds Ratio von

- genau eins bedeutet, dass es keinen Unterschied in den Odds (Chancen) gibt.
- Ist die Odds Ratio größer als eins, sind die Odds der ersten Gruppe größer,
- ist sie kleiner als eins, sind sie kleiner als die der zweiten Gruppe.

## **2.8 Datenschutz und ethische Aspekte**

Die vorliegende Untersuchung wurde in Übereinstimmung mit der 1990 in Hongkong revidierten Fassung der Deklaration von Helsinki durchgeführt und erhielt von der lokalen Ethikkommission ihre Genehmigung (Studien-Nr. 2609; 08.11.2005). Die Studienteilnahme erfolgte nach Aufklärung und Einwilligung der Patienten. Die Patienten konnten auf eigenen Wunsch in jedem Stadium der Untersuchung die Teilnahme an der Studie beenden ohne ein Ausscheiden rechtfertigen zu müssen. Die erhobenen klinischen Daten und die Befunde der Laboruntersuchungen wurden in anonymisierter Form elektronisch gespeichert und ausgewertet. Die Identität der Probanden konnte hieraus nicht abgeleitet werden. Nach Abschluss der Studie wurden die patientenbezogenen Daten eliminiert.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Patienten und gesundes Kontrollkollektiv

Das Kollektiv der Patienten und der gesunden Kontrollgruppe wurden ausführlich im Methodenteil unter dem Punkt 2.1.3 und 2.2 beschrieben.

#### 3.2 Erster statistischer Ansatz: Auswirkung der Polymorphismen auf die Prüfgrößen: ECC, MAD, SumAH: allgemeine Bemerkungen

Um den Einfluss der Polymorphismen auf die endogene Kreatinin-Clearance (ECC), die Summe der eingenommenen Antihypertensiva (SumAH) und den mittleren arteriellen Blutdruck (MAD) zu untersuchen, wurden die Patienten für jeden Polymorphismus in drei, den jeweiligen Genotypen entsprechende Gruppen, getrennt. Zu jedem gewählten Untersuchungszeitpunkt wurde dann der Einfluss des gegebenen Genotyps auf die untersuchte Größe bzw. den untersuchten Parameter getestet. Die untenstehende Abbildung 3-1 veranschaulicht graphisch das Prinzip der gewählten statistischen Analyse: jede Kurve/jeder farblich abgegrenzte Box-plot spiegelt den Verlauf zum jeweiligen Zeitpunkt der geprüften Größe (ECC, MAD, SumAH) entsprechend des untersuchten Genotyps (hier als XX, XY, YY) wider.

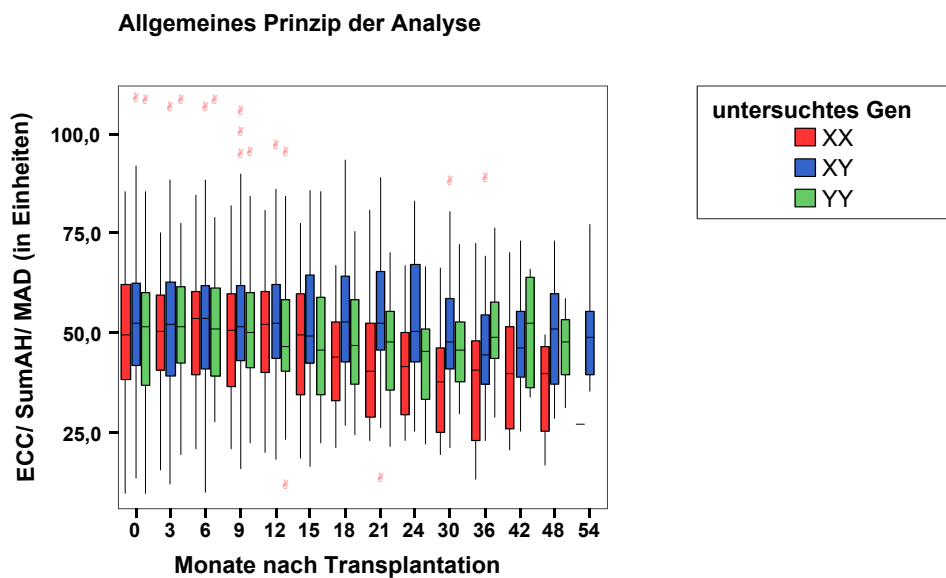


Abbildung 3-1: Darstellung des Prinzips der Auswertung.

### 3.2.1 ECC (endogene Kreatinin-Clearance)

Mithilfe der endogenen Kreatinin-Clearance (ECC) wurde die Transplantatfunktion quantifiziert und nach der Cockcroft Formel berechnet:

Männer:  $ECC = [(140 - \text{Alter}) \times \text{Körpergewicht (kg)}] / [72 \times \text{Kreatinin (mg/dl)}]$

Frauen:  $ECC = [(140 - \text{Alter}) \times \text{Körpergewicht (kg)}] / [85 \times \text{Kreatinin (mg/dl)}]$ .

Dazu wurde zu mehreren Zeitpunkten nach Nierentransplantation (3-Monats Abstände in den ersten 2 Jahren, danach 6-Monats Abstände bis zum festgesetzten Endpunkt der Studie) retrospektiv über das Alter, das Gewicht und das Serumkreatinin die ECC bestimmt.

|                       | Mittlere ECC | ECC Entl. | ECC Mo3 | ECC Mo6 | ECC Mo9 | ECC Mo12 | ECC Mo15 | ECC Mo18 | ECC Mo21 | ECC Mo24 | ECC Mo30 | ECC Mo36 | ECC Mo42 | ECC Mo48 | ECC Mo54 |
|-----------------------|--------------|-----------|---------|---------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Mittlere ECC (ml/min) | <b>48,1</b>  | 51,2      | 50,5    | 50,3    | 49,2    | 47,6     | 48,3     | 47,4     | 45,8     | 44,6     | 44,5     | 45,8     | 44,5     | 46,9     | N/A      |
| Stdr. Abw.            | <b>15,2</b>  | 17,3      | 20,0    | 20,9    | 18,4    | 20,5     | 14,8     | 15,5     | 14,8     | 15,0     | 15,0     | 13,6     | 15,2     | 17,2     | N/A      |
| N = Patienten         | <b>218</b>   | 218       | 196     | 188     | 152     | 133      | 113      | 92       | 83       | 72       | 57       | 34       | 20       | 6        | 0        |

**Tabelle 3-1: Darstellung der mittleren Werte der ECC über das gesamte Patientenkollektiv zu den erhobenen Zeitpunkten.**

Es wurde daraufhin der Einfluss des ACE I/D-Polymorphismus, des AGT M235T-Polymorphismus und des AT<sub>1</sub>R-A1166C-Polymorphismus auf die so quantifizierte Transplantatfunktion untersucht. Dabei wurden für jeden untersuchten Zeitpunkt die drei Genotypen (II, DI, DD für den ACE-Gen I/D-Polymorphismus, MM, MT, TT für den Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus, AA, AC, CC für den AT<sub>1</sub>R-A1166C-Polymorphismus) gegeneinander bezüglich des untersuchten Parameters, hier der ECC, verglichen und auf signifikante Unterschiede getestet. Die oben aufgeführte Tabelle 3-1 gibt die mittleren ECC-Werte für das gesamte Patientenkollektiv zu den definierten Untersuchungszeitpunkten wieder.

### 3.2.1.1 Ergebnisse (ECC): ACE-Gen I/D-Polymorphismus

Der Vergleich der endogenen Kreatinin-Clearance der drei Genotypen DD, DI und II des ACE-Gen I/D-Polymorphismus zu den vorgegebenen Zeitpunkten – 3-Monats-Abstände in den ersten 2 Jahren, 6-Monats-Abstände nach dem 2. Jahr nach Transplantation bis zum Endpunkt der Studie (Monat 54)- erbrachte für den DD-Genotyp, im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen II und DI, für die Monate 18 bis 30 nach Transplantation eine signifikant geringere ECC (siehe Abbildung 3-2).

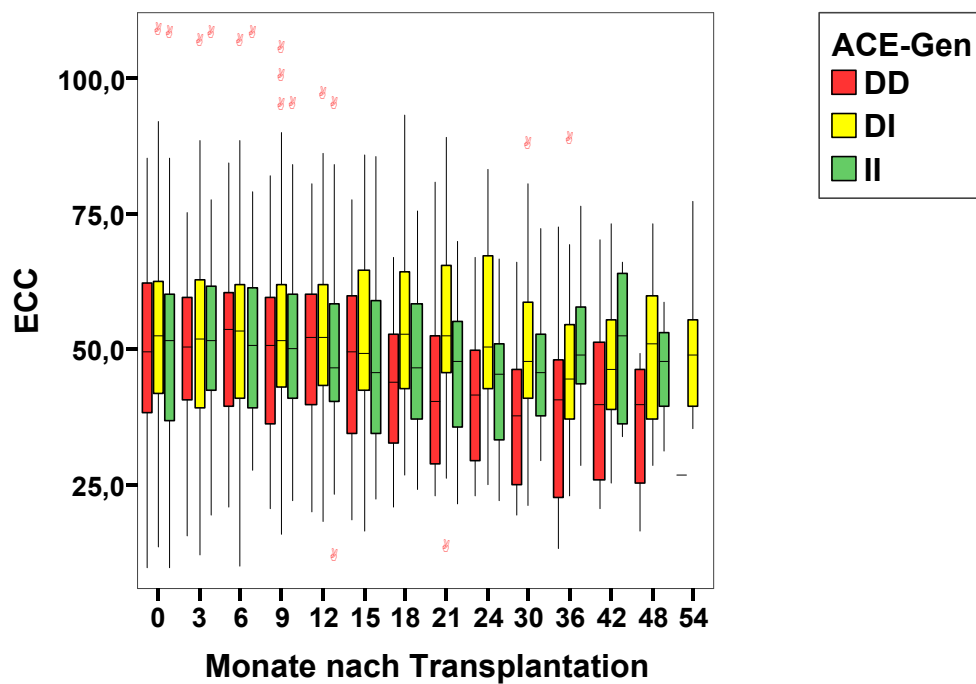


Abbildung 3-2: Zeitlicher Verlauf der Transplantatfunktion (ECC, ermittelt nach der Cockcroft-Formel) für die Genotypen des ACE-Gen I/D-Polymorphismus.

### 3.2.1.2 Ergebnisse (ECC): Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus

Der Vergleich der endogenen Kreatinin-Clearance der drei Genotypen TT, MT und MM des Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus zu den definierten Zeitpunkten der Untersuchung bis zum Endpunkt der Studie (Monat 54), erbrachte für keinen der Genotypen einen signifikant unterschiedlichen Verlauf (siehe Abbildung 3-3).

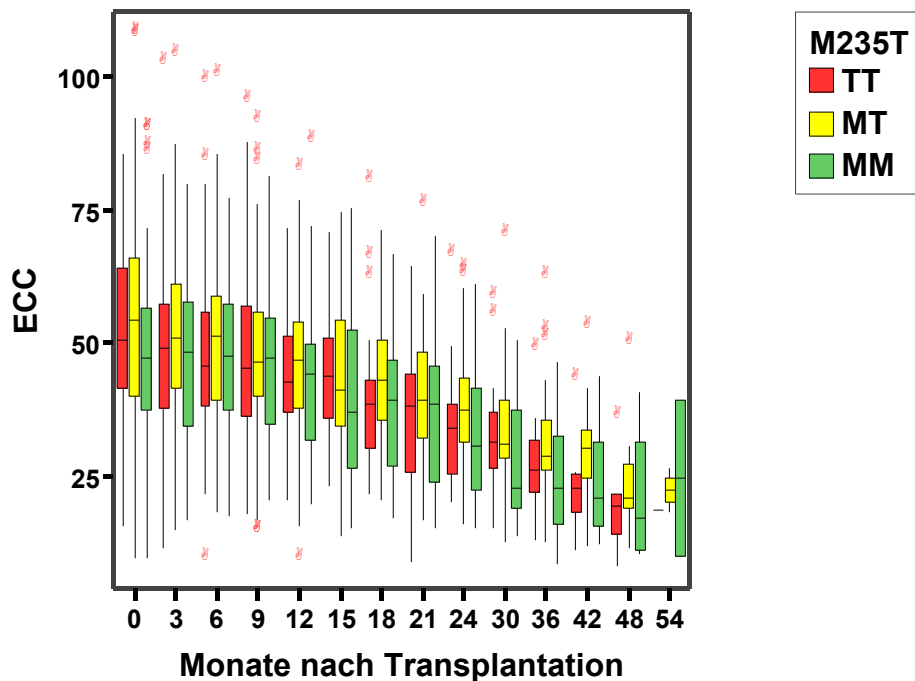


Abbildung 3-3: Zeitlicher Verlauf der Transplantatfunktion (ECC, ermittelt nach der Cockcroft-Formel) für die Genotypen des AGT M235T-Polymorphismus.

### 3.2.1.3 Ergebnisse (ECC): Angiotensin II-Typ1 Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus

Der Vergleich der endogenen Kreatinin-Clearance der drei Genotypen CC, AC und AA des AT<sub>1</sub>R A1166C-Polymorphismus zu den angegebenen Zeitpunkten – 3-Monats-Abstände in den ersten 2 Jahren, 6-Monats-Abstände nach dem 2. Jahr nach Transplantation bis zum Endpunkt der Studie (Monat 54) – erbrachte für keinen der Genotypen signifikant unterschiedlichen Werte (siehe Abbildung 3-4).

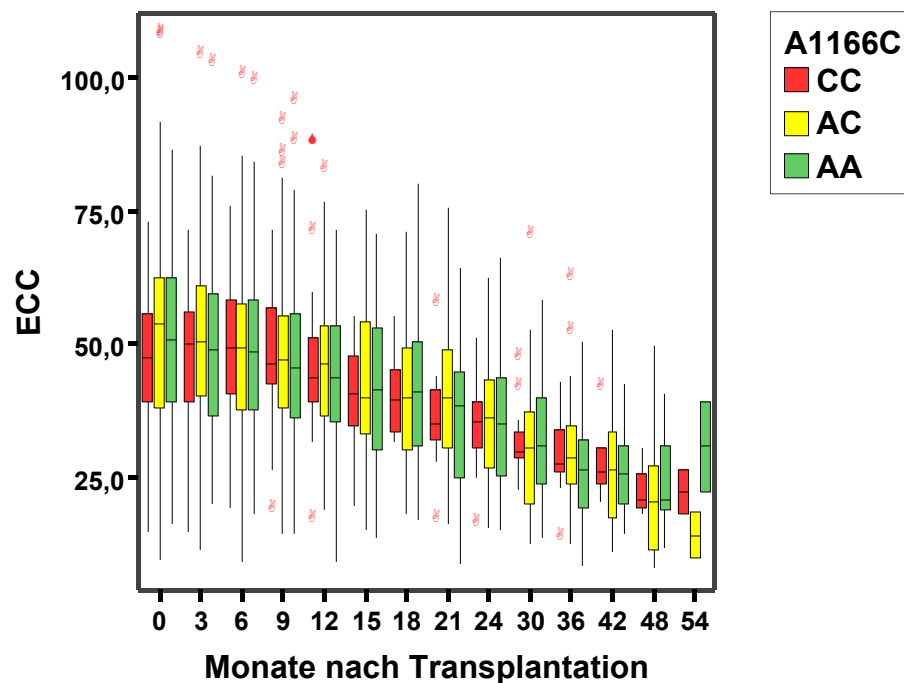


Abbildung 3-4: Zeitlicher Verlauf der Transplantatfunktion (ECC, ermittelt nach der Cockcroft-Formel) für die Genotypen des AT<sub>1</sub>R A1166C-Polymorphismus.

### 3.2.2 MAD (mittlerer arterieller Blutdruck)

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) wurde nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{MAD} = (\text{RR}_{\text{sys}} - \text{RR}_{\text{dia}}) / 3 + \text{RR}_{\text{dia}} \text{ (mmHg)}.$$

Danach wurden die errechneten MAD-Werte für jeden untersuchten Zeitpunkt für die drei Genotypen des jeweiligen Polymorphismus (II, DI, DD für den ACE-Gen I/D-Polymorphismus, MM, MT, TT für den Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus, AA, AC, CC für den AT<sub>1</sub>R-A1166C-Polymorphismus) gegeneinander verglichen und auf signifikante Unterschiede getestet. Tabelle 3-2 gibt den mittleren MAD für das gesamte Patientenkollektiv zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten wieder.

|                            | Mitt-<br>lerer<br>MAD | MAD<br>Entl. | MAD<br>Mo3 | MAD<br>Mo6 | MAD<br>Mo9 | MAD<br>Mo12 | MAD<br>Mo15 | MAD<br>Mo18 | MAD<br>Mo21 | MAD<br>Mo24 | ECC<br>Mo30 | MAD<br>Mo36 | MAD<br>Mo42 | MAD<br>Mo48 | MAD<br>Mo54 |
|----------------------------|-----------------------|--------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Mittlerer<br>MAD<br>(mmHg) | 108,5                 | 102,6        | 101,2      | 100,6      | 101,3      | 100,5       | 100,6       | 99,6        | 100,5       | 101,0       | 100,3       | 100,5       | 98,7        | 100,2       | 98,9        |
| Stdr. Abw.                 | 7,9                   | 11,4         | 11,1       | 9,9        | 10,9       | 10,9        | 10,1        | 11,6        | 11,3        | 12,5        | 10,1        | 10,5        | 7,5         | 9,8         | 11,1        |
| N =<br>Patienten           | 223                   | 199          | 204        | 191        | 180        | 148         | 128         | 108         | 89          | 81          | 69          | 57          | 30          | 20          | 5           |

Tabelle 3-2: Mittlerer MAD für das gesamte Patientenkollektiv zu den jeweiligen Zeitpunkten der Analyse.

### 3.2.2.1 Ergebnisse (MAD): ACE-Gen I/D-Polymorphismus

Der Vergleich des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD in mmHg) der drei Genotypen DD, DI und II des ACE-Gen I/D-Polymorphismus zu den vorgegebenen Zeitpunkten – 3-Monats-Abstände in den ersten 2 Jahren, 6-Monats-Abstände nach dem 2. Jahr nach Transplantation bis zum Endpunkt der Studie (Monat 54) – erbrachte für keinen der drei Genotypen statistisch signifikant unterschiedliche Werte, obwohl für den DD- und den DI- Genotyp für einige Monate tendenziell leicht erhöhte Blutdruckwerte vorlagen (siehe Abbildung 3-5).

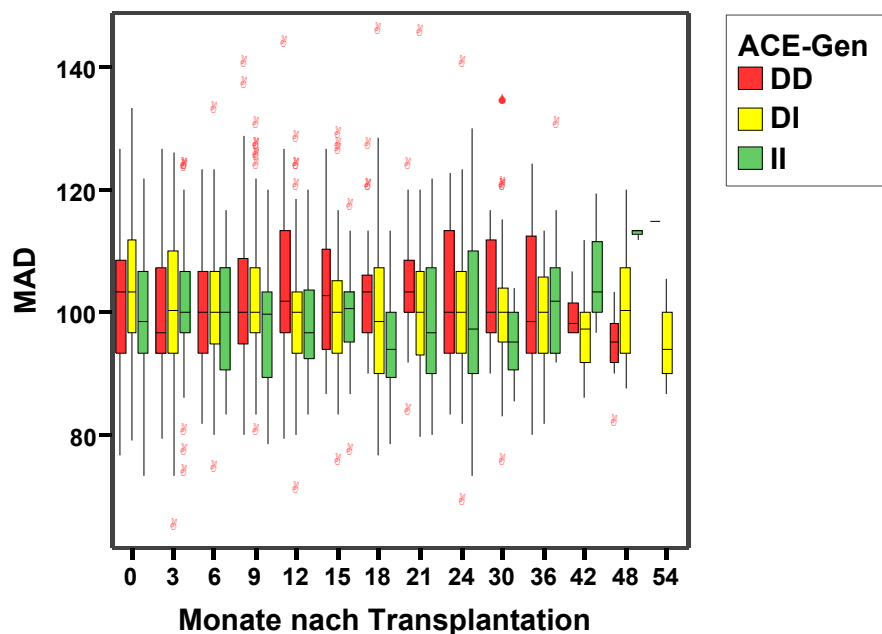


Abbildung 3-5: Zeitlicher Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD in mmHg) bei den Genotypen DD, DI, DI nach Nierentransplantation.

### 3.2.2.2 Ergebnisse (MAD): Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus

Auch der Vergleich des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD in mmHg) der drei Genotypen TT, MT und MM des Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus zu den definierten Untersuchungszeitpunkten, stellte für keinen der drei Genotypen statistisch signifikant unterschiedliche Werte (siehe Abbildung 3-6) über den gesamten Beobachtungszeitraum von 54 Monaten heraus.

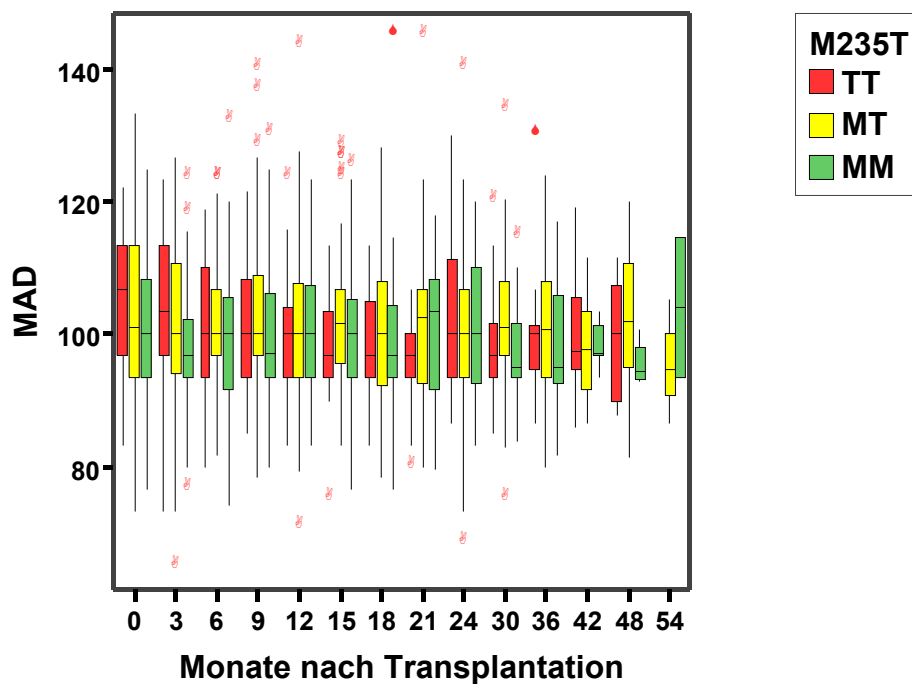


Abbildung 3-6: Zeitlicher Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD in mmHg) bei den Genotypen TT, MT, MM nach Nierentransplantation.

### 3.2.2.3 Ergebnisse (MAD): Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus

Der Vergleich des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD in mmHg) der drei Genotypen CC, AC und AA des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus zu den vorgegebenen Zeitpunkten, zeigte für keinen der drei Genotypen statistisch signifikant unterschiedliche Werte im Verlauf des MAD (siehe Abbildung 3-7) über den gesamten Beobachtungszeitraum von 54 Monaten.

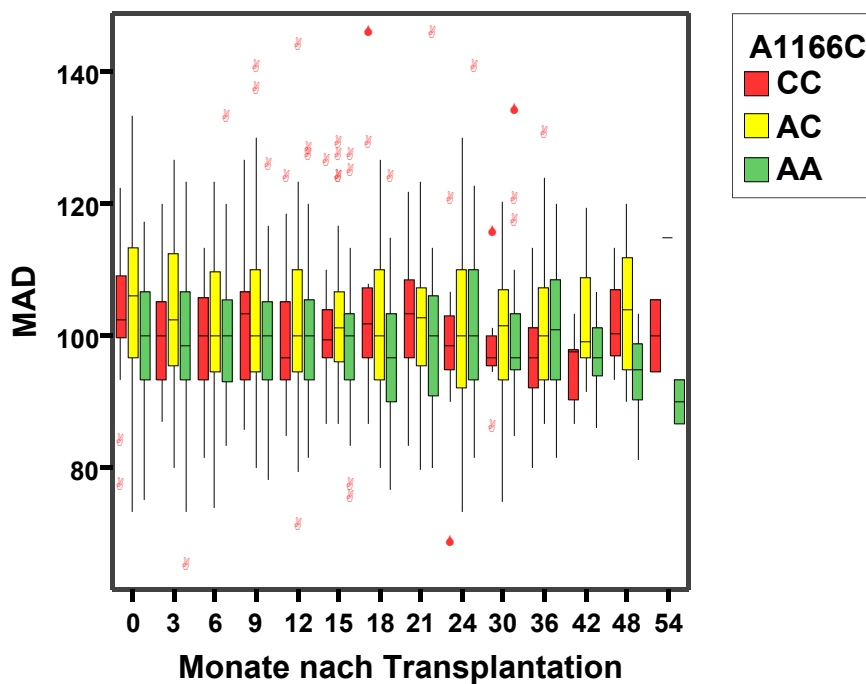


Abbildung 3-7: Zeitlicher Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD in mmHg) bei den Genotypen CC, AC, AA nach Nierentransplantation.

### 3.2.3 SumAH (Summe der eingenommenen antihypertensiven Medikamente)

Die Summe der eingenommenen antihypertensiven Medikamente wurde zu jedem untersuchten Zeitpunkt für jeden einzelnen Patienten als einfache Summe über alle von ihm eingenommenen Antihypertensiva gebildet. Daraufhin wurde der Einfluss des ACE I/D-Polymorphismus, des AGT M235T-Polymorphismus und des AT<sub>1</sub>R-A1166C-Polymorphismus auf die so quantifizierte Summe der Antihypertensiva untersucht. Dabei wurden für jeden untersuchten Zeitpunkt die drei Genotypen der jeweiligen Polymorphismen (II, DI, DD für den ACE-Gen I/D-Polymorphismus, MM, MT, TT für den Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus, AA, AC, CC für den AT<sub>1</sub>R-A1166C-Polymorphismus) gegeneinander verglichen und auf signifikante Unterschiede getestet. Tabelle 3-3 gibt Aufschluß über die Summe der eingenommenen Antihypertensiva im Mittel für alle Patienten insgesamt zu den definierten Zeitpunkten der Analyse.

|                | Mittlere SumAH | SumAH Entl. | SumAH Mo3 | SumAH Mo6 | SumAH Mo9 | SumAH Mo12 | SumAH Mo15 | SumAH Mo18 | SumAH Mo21 | SumAH Mo24 | SumAH Mo30 | SumAH Mo36 | SumAH Mo42 | SumAH Mo48 | SumAH Mo54 |
|----------------|----------------|-------------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Mittlere SumAH | 2,7            | 2,2         | 2,5       | 2,8       | 2,8       | 2,8        | 2,9        | 2,7        | 2,7        | 2,8        | 2,8        | 2,7        | 2,7        | 2,8        | 2,3        |
| Stdr. Abw.     | 1,1            | 1,3         | 1,2       | 1,6       | 1,3       | 1,3        | 1,3        | 1,3        | 1,3        | 1,4        | 1,3        | 1,2        | 1,3        | 1,4        | 1,5        |
| N = Patienten  | 221            | 221         | 210       | 197       | 193       | 158        | 138        | 115        | 98         | 85         | 72         | 57         | 34         | 20         | 6          |

**Tabelle 3-3: Mittlere Summe der eingenommenen Antihypertensiva für das gesamte Patientenkollektiv zu den jeweils erhobenen Zeitpunkten.**

### 3.2.3.1 Ergebnisse (SumAH): ACE-Gen I/D-Polymorphismus

Im vorgegebenen Zeitraum von 54 Monaten nach Nierentransplantation, zeigte der Vergleich der Anzahl der eingenommenen antihypertensiven Medikamente (SumAH), aufgeteilt nach den drei Genotypen DD, DI und II des ACE-Gen I/D-Polymorphismus, für keinen von ihnen statistisch signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 3-8).

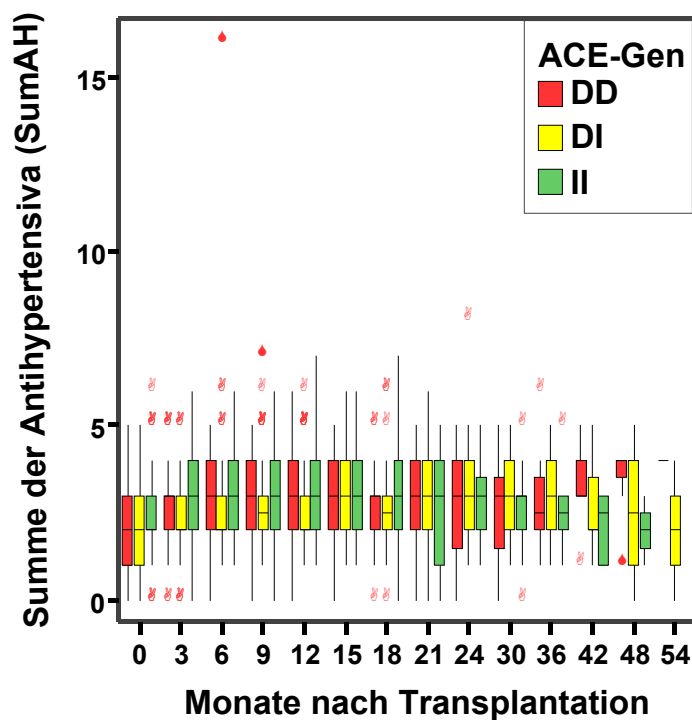


Abbildung 3-8: Summe der Antihypertensiva im Beobachtungszeitraum von 54 Monaten nach Nierentransplantation der drei Genotypen des ACE-Gen I/D- Polymorphismus.

### 3.2.3.2 Ergebnisse (SumAH): Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus

Der Vergleich der Summe der eingenommenen antihypertensiven Medikamente (SumAH) der drei Genotypen TT, MT und MM des Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus zu den definierten Zeitpunkten, erbrachte für keinen der drei Genotypen statistisch signifikante Unterschiede im Verlauf der SumAH (siehe Abbildung 3-9) über den gesamten Beobachtungszeitraum von 54 Monaten.

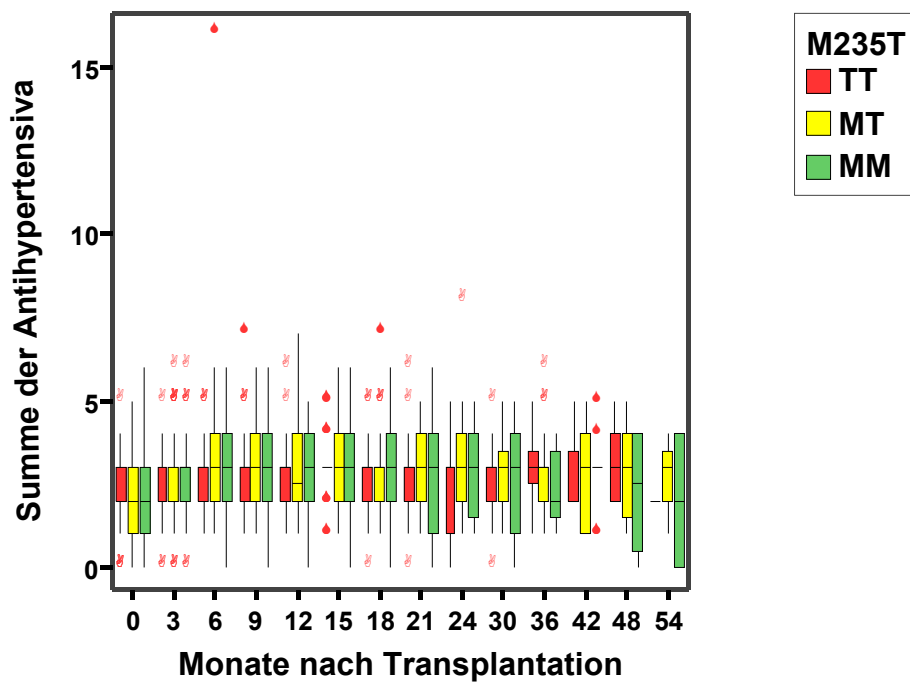


Abbildung 3-9: Summe der Antihypertensiva im Beobachtungszeitraum von 54 Monaten nach Nierentransplantation der drei Genotypen des Angiotensinogen M235T-Polymorphismus.

### 3.2.3.3 Ergebnisse (SumAH): Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus

Der Vergleich der Anzahl der eingenommenen antihypertensiven Medikamente (SumAH) der drei Genotypen CC, AC und AA des Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus zu den vorgegebenen Zeitpunkten im gesamten Beobachtungszeitraum von 54 Monaten nach Nierentransplantation, zeigte für keinen der drei Genotypen statistisch signifikante Unterschiede (siehe Abbildung 3-10).

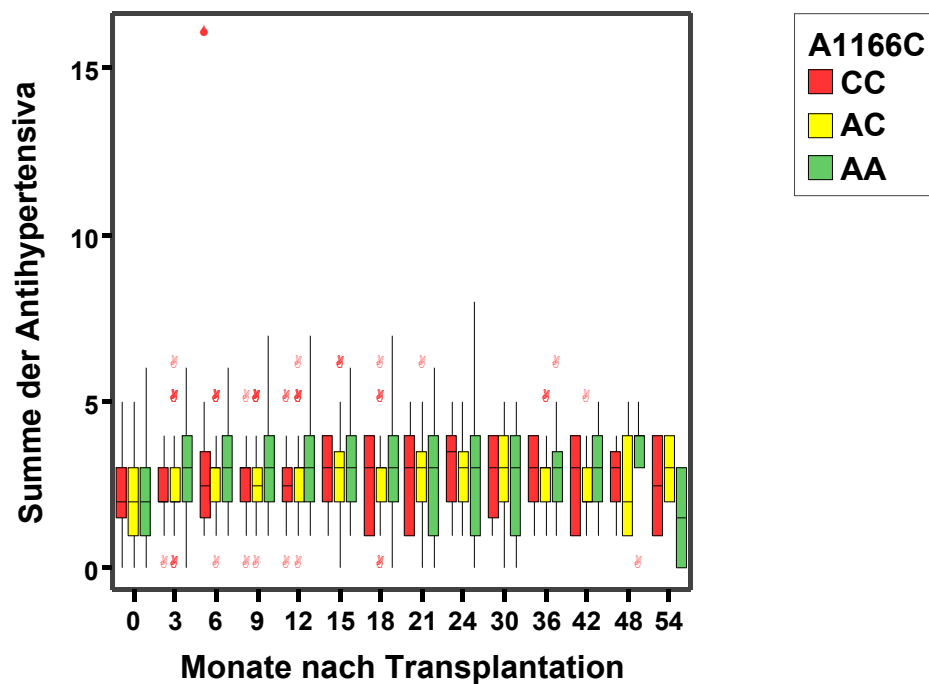


Abbildung 3-10: Summe der Antihypertensiva im Beobachtungszeitraum von 54 Monaten nach Nierentransplantation bei den drei Genotypen des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-A1166C Polymorphismus.

### 3.2.4 Zusammenfassung: Auswirkung der Polymorphismen auf die Prüfgrößen: ECC, MAD, SumAH

In der Tabelle 3-4 sind die Ergebnisse aus dem ersten Schritt des ersten statistischen Ansatzes zusammengefasst. Nur für den ACE-Gen I/D-Polymorphismus ergeben sich signifikant unterschiedliche Werte bezüglich der Transplantatfunktion zu mehreren Zeitpunkten der Untersuchung. Für den MAD zeigen sich für die DD und ID-Genotypen zwar tendenziell höhere Werte, sie erreichen jedoch keine statistische Signifikanz. Die Genotypen des Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus und des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus weisen keine statistisch signifikanten Ergebnisse auf.

| Geprüfter<br>Parameter | I/D<br>sig. | I/D<br>n.sig. |  | M235T<br>sig. | M235T<br>n.sig. |  | A1166C<br>sig. | A1166C<br>n.sig. |
|------------------------|-------------|---------------|--|---------------|-----------------|--|----------------|------------------|
| ECC                    | (+)         |               |  |               | +               |  |                | +                |
| MAD                    |             | +             |  |               | +               |  |                | +                |
| SumAH                  |             | +             |  |               | +               |  |                | +                |

Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Ergebnisse.

### 3.3 Erster statistischer Ansatz, zweiter Schritt: Varianzanalyse (ANOVA, gemischtes Modell)

Da sich im Kruskal-Wallis-Test der univariaten Analyse der Einfluss des ACE-Gen I/D-Polymorphismus auf die ECC zeigte, wurde dies als erstes in der ANOVA für die RAAS-Polymorphismen nochmals überprüft.

#### 3.3.1 ANOVA: Überprüfung des Einflusses der genetischen Polymorphismen des RAAS auf den Verlauf der ECC

In der Varianzanalyse (ANOVA, gemischtes Modell) wurde zuerst der Einfluss der genetischen Polymorphismen auf die ECC im Verlauf der Zeit geprüft.

### 3.3.1.1 ANOVA: ECC: ACE-Gen I/D-Polymorphismus

Gegenüber dem DI- und II- Genotyp zeigte die ECC bei den DD-Genotypträgern einen rascheren Abfall im Verlauf der Zeit (siehe Abbildung 3-11), jedoch wurde bei der statistischen Auswertung keine Signifikanz erreicht (siehe Tabelle 3-5).

| Variable | untersuchter Polymorphismus | statistische Signifikanz (sig. * wenn $p < 0,05$ ) |
|----------|-----------------------------|----------------------------------------------------|
| ECC      | ACE-Gen I/D-Polymorphismus  | $p = 0,78$                                         |

Tabelle 3-5: ANOVA: kein statistisch signifikanter Einfluss des ACE-Gen I/D-Polymorphismus auf den Verlauf der ECC.

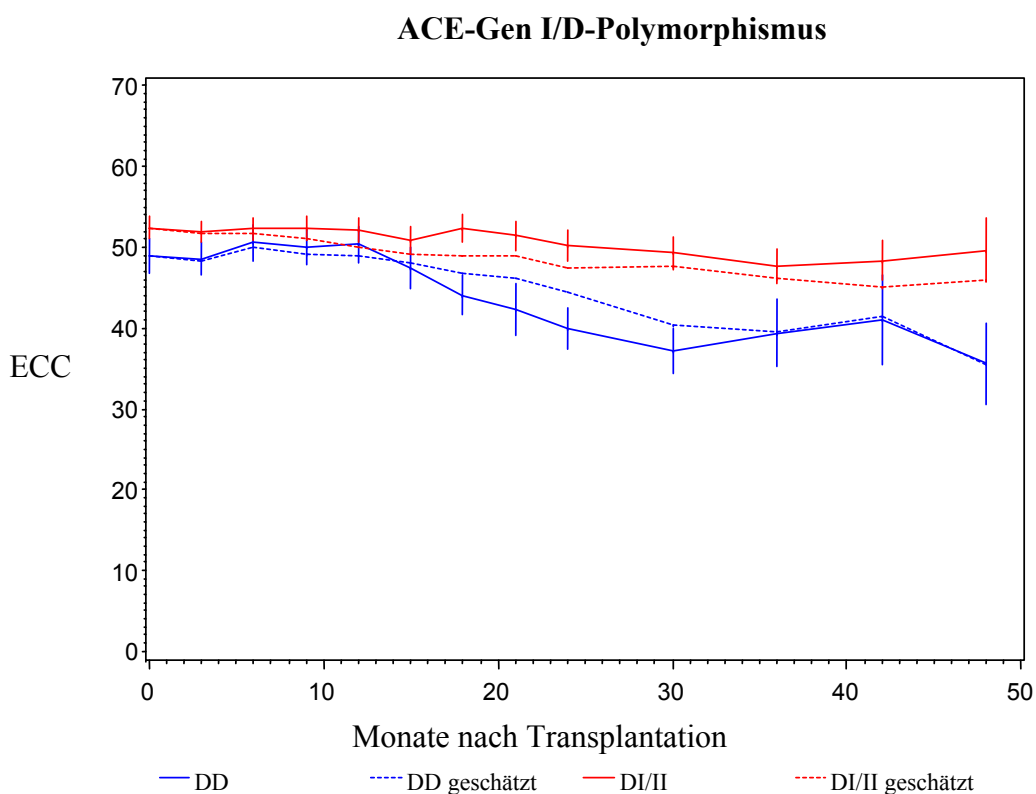


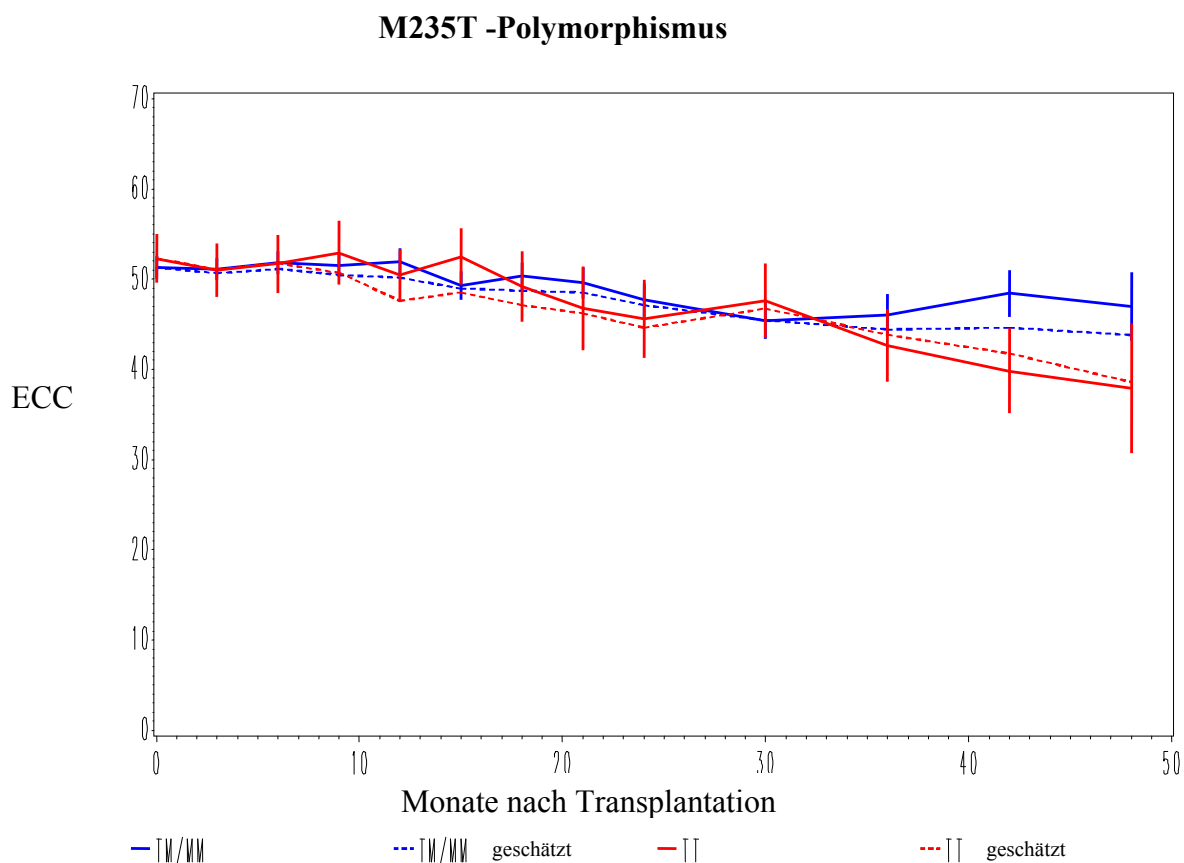
Abbildung 3-11: ACE-Gen I/D-Polymorphismus: Varianzanalyse (ANOVA) für den Verlauf der ECC aufgeteilt nach den Genotypen DD versus DI/II.

### 3.3.1.2 ANOVA: ECC: Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus:

Für den Angiotensinogen-Gen-M235T-Polymorphismus stellte sich auch in der ANOVA kein Unterschied im Verlauf der ECC über 48 Monate nach NTX für die einzelnen Genotypen (siehe Tabelle 3-6 und Abbildung 3-12) heraus.

| Variable | untersuchter Poly-morphismus              | statistische Signifikanz (sig. * wenn $p < 0,05$ ) |
|----------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| ECC      | Angiotensinogen-Gen M235T -Polymorphismus | $p = 0,84$                                         |

**Tabelle 3-6: ANOVA: kein statistisch signifikanter Einfluss des Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus auf den Verlauf der ECC.**



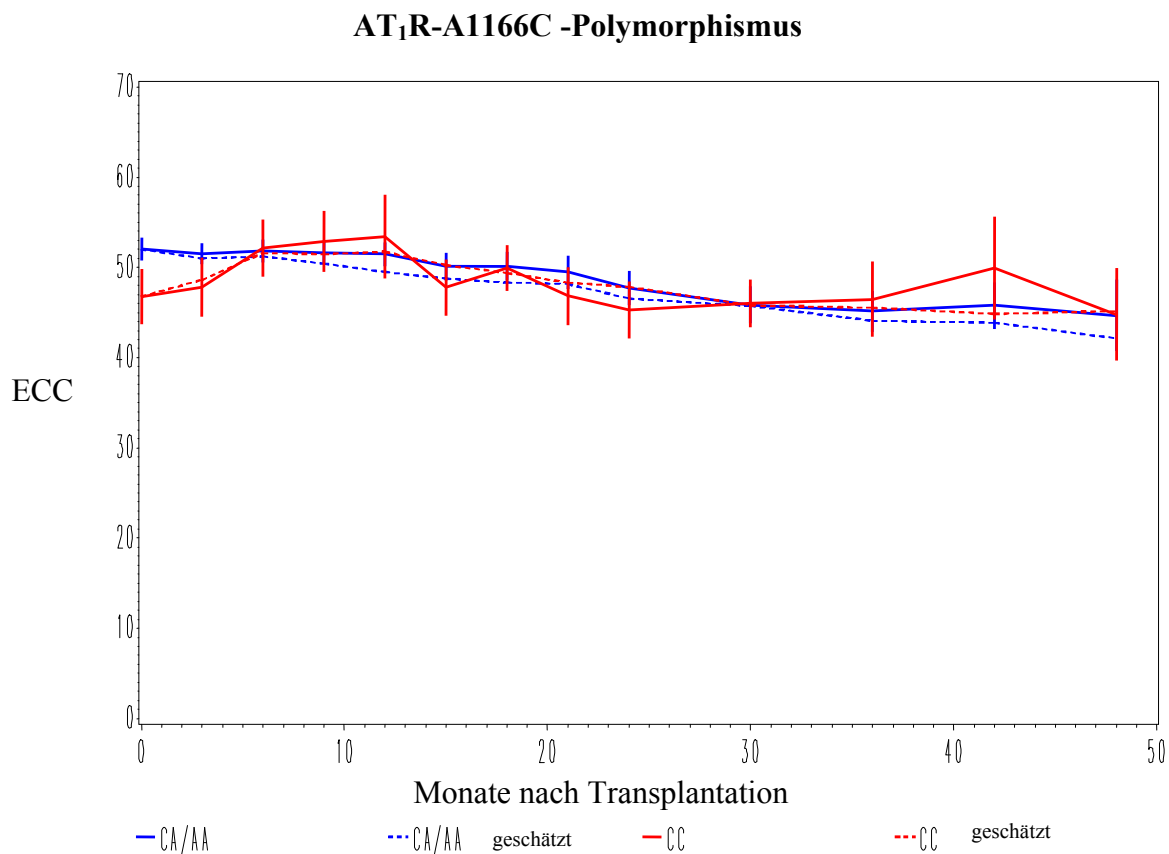
**Abbildung 3-12: Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus: Varianzanalyse (ANOVA) für den Verlauf der ECC aufgeteilt nach den Genotypen TT versus MM/MT.**

### 3.3.1.3 ANOVA: ECC: Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus

Ebenfalls zeigte die ANOVA für den AT<sub>1</sub>R-A1166C-Polymorphismus keinen Unterschied im Verlauf der ECC über 48 Monate nach NTX für die einzelnen Genotypen (siehe Tabelle 3-7 und Abbildung 3-13) auf.

| Variable | untersuchter Polymorphismus             | statistische Signifikanz (sig. * wenn $p < 0,05$ ) |
|----------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|
| ECC      | AT <sub>1</sub> R-A1166C-Polymorphismus | $p = 0,85$                                         |

**Tabelle 3-7: ANOVA: kein statistisch signifikanter Einfluss des AT<sub>1</sub>R-A1166C-Polymorphismus.**



**Abbildung 3-13: AT<sub>1</sub>R-A1166C-Polymorphismus: Varianzanalyse (ANOVA) für den Verlauf der ECC aufgeteilt nach den Genotypen CC versus AA/AC.**

### 3.3.2 ANOVA für den Einfluss anderer Variablen auf den Verlauf der ECC/die Transplantatfunktion

#### 3.3.2.1 ANOVA: Einfluss von metabolischen Faktoren auf die ECC

In der Varianzanalyse wurden zusätzlich das Vorliegen eines Diabetes mellitus, die Gesamtcholesterinkonzentration ( $\geq 200$  mg/dl versus  $< 200$  mg/dl), die LDL ( $\geq 100$  mg/dl,  $< 100$  mg/dl)-Konzentration, die Triglyceridkonzentration ( $\geq 200$  mg/dl,  $< 200$  mg/dl) und die Proteinurie ( $\geq 1$ g/24h versus  $< 1$ g/24h) auf den Verlauf der ECC geprüft.

Es zeigte sich für keinen der geprüften Parameter ein signifikant unterschiedlicher Verlauf der ECC im gesamten Beobachtungszeitraum (Tabelle 3-8).

| Variable | untersuchter metabolischer Faktor                              | statistische Signifikanz (sig. * wenn $p < 0,05$ ) |
|----------|----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| ECC      | Vorliegen eines Diabetes mellitus                              | $p = 0,96$                                         |
| ECC      | Höhe des Gesamtcholesterins ( $\geq 200$ mg/dl, $< 200$ mg/dl) | $p = 0,96$                                         |
| ECC      | Höhe des LDL-Cholesterins ( $\geq 100$ mg/dl, $< 100$ mg/dl)   | $p = 0,83$                                         |
| ECC      | Höhe der Triglyceride ( $\geq 200$ mg/dl, $< 200$ mg/dl)       | $p = 0,11$                                         |
| ECC      | Vorliegen einer Proteinurie ( $\geq 1$ g/24h, $< 1$ g/24h)     | $p = 0,31$                                         |

**Tabelle 3-8: ANOVA: Einfluss metabolischer Faktoren auf den Verlauf der ECC.**

Tendenziell war jedoch bei dem Vorliegen einer Proteinurie von  $> 1$ g/24h, bei einer Gesamtcholesterinkonzentration  $> 200$  mg/dl und bei Triglyceriden  $> 200$  mg/dl, ein deutlicherer Abfall der ECC im Zeitverlauf von 48 Monaten nach Transplantation zu beobachten, was der Kurvenverlauf der folgenden Abbildungen (Abbildung 3-14, Abbildung 3-15, Abbildung 3-16) veranschaulicht.

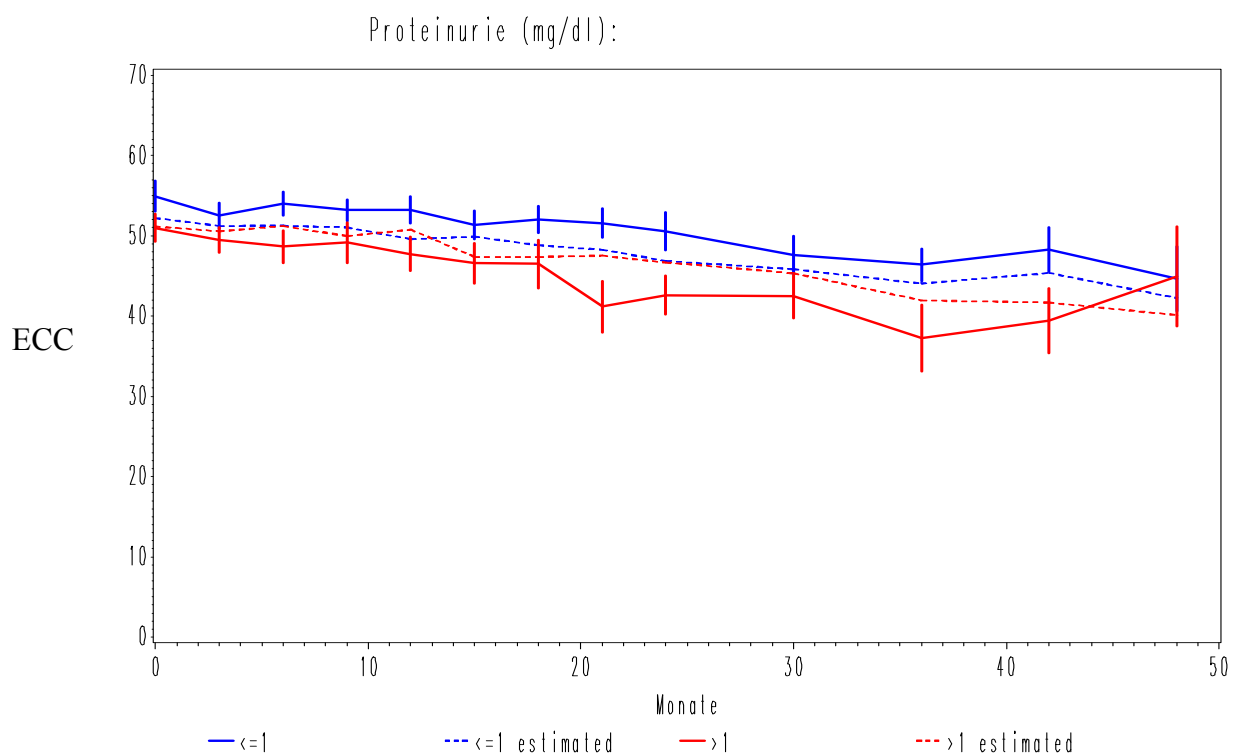


Abbildung 3-14: ANOVA: Verlauf der Proteinurie.

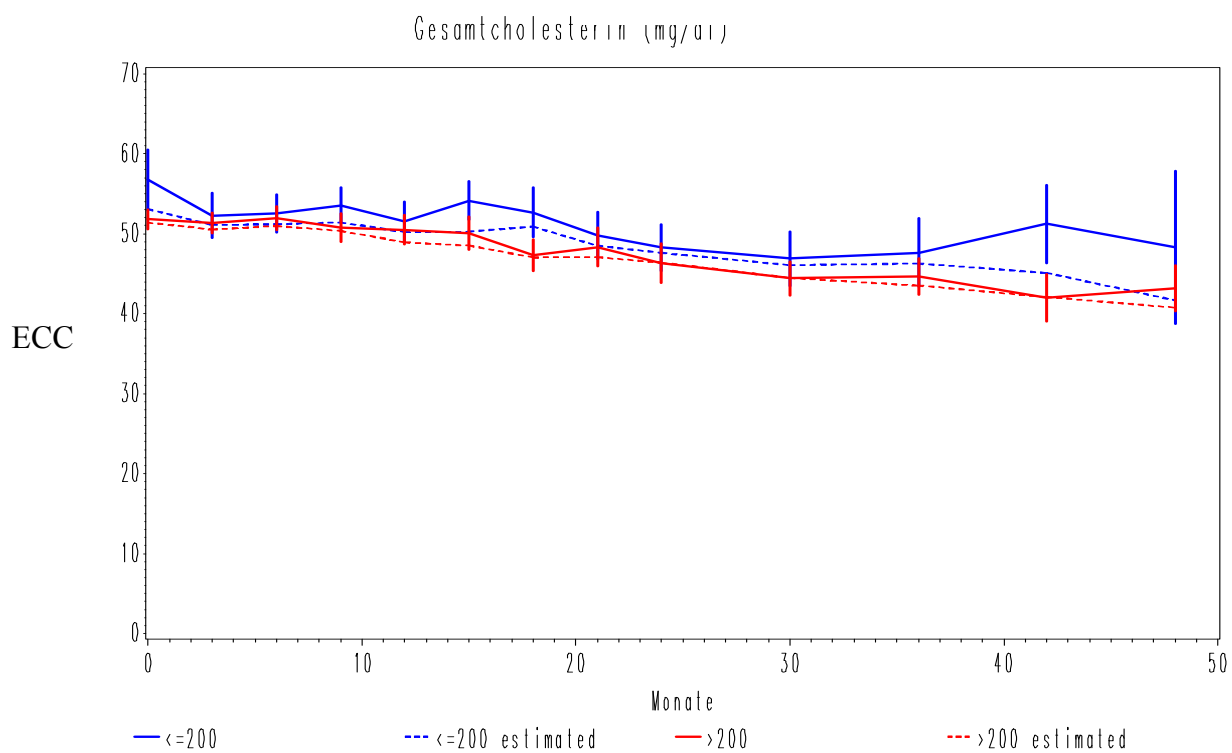


Abbildung 3-15: ANOVA: Verlauf der Gesamtcholesterinkonzentration.

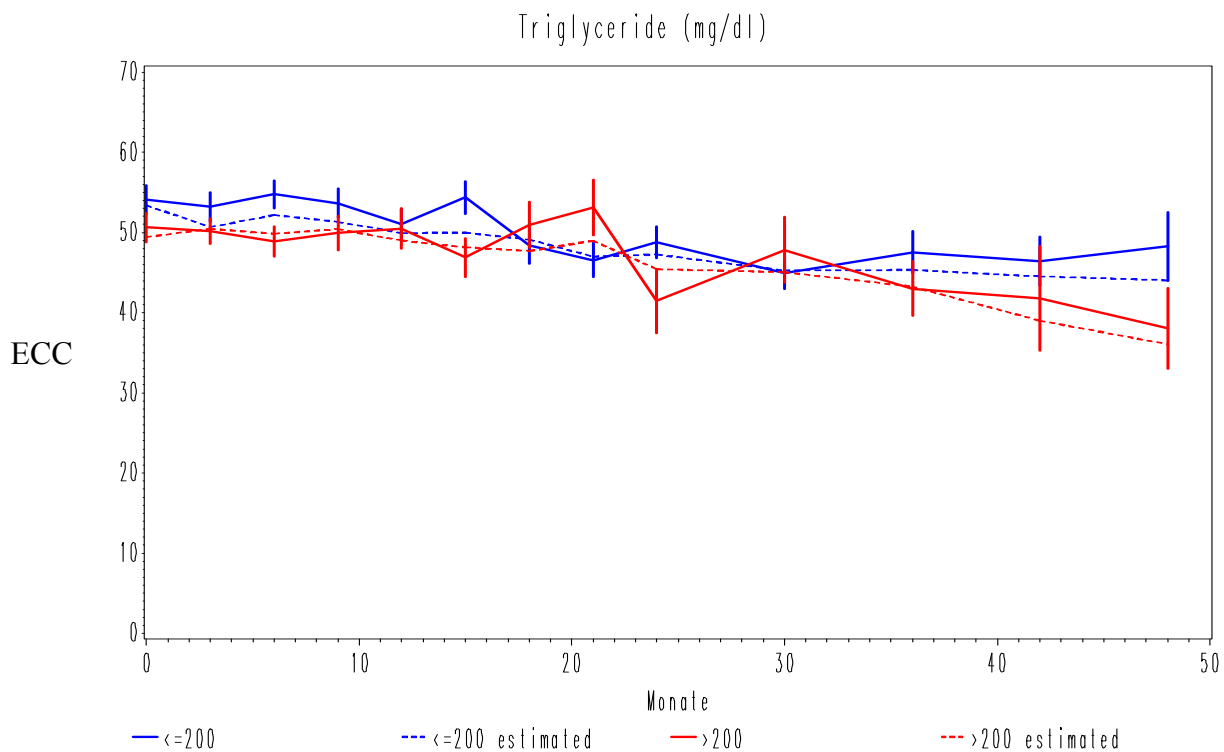


Abbildung 3-16: ANOVA: Verlauf der TG-Konzentration.

### 3.3.2.2 ANOVA: Einfluss externer Faktoren auf den Verlauf der ECC

In der ANOVA wurde dann der Einfluss von externen Faktoren wie Spenderalter ( $\geq 65$  Jahre,  $< 65$  Jahre), Spendergeschlecht, kalte ( $\geq 12$  Stunden,  $< 12$  Stunden) und warme ( $\geq 30$  Minuten,  $< 30$  Minuten) Ischämiezeit, Anzahl der HLA-Mismatche ( $\geq 2$ ,  $< 2$ ), Anzahl der Transplantationen ( $\geq 1$ ,  $< 1$ ), Dauer des Krankenhausaufenthaltes ( $\geq 30$  Tage,  $< 30$  Tage), Dialysepflichtigkeit post transplantationem, CMV-Infektion post transplantationem, akutes Nierenversagen post transplantationem, Anzahl der Rejektionen ( $\geq 2$ ,  $< 2$ ) auf den Verlauf der ECC über die Zeit geprüft.

Exogene Faktoren wie Spenderalter, Spendergeschlecht, kalte und warme Ischämiezeit, Anzahl der HLA-Mismatche, Anzahl der Transplantationen und CMV-Infektionen nach Nierentransplantation, stellten keinen signifikant unterschiedlichen Einfluss auf den Verlauf der ECC im geprüften Zeitraum von 48 Monaten nach NTX heraus.

Dagegen zeigte sich, dass der Verlauf der ECC nach NTX einen signifikant unterschiedlichen Verlauf unter dem Einfluss der Dauer des Krankenhausaufenthaltes, des Auftretens eines akuten Nierenversagens, einer Dialysepflicht und der Anzahl der Rejektionen nahm (siehe untenstehende Tabelle 3-9).

| Variable | untersuchter externer Faktor                                                                        | statistische Signifikanz<br>(sig. * wenn $p < 0,05$ ) |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| ECC      | Spenderalter ( $\geq 65$ Jahre, $< 65$ Jahre)                                                       | $p = 0,99$                                            |
| ECC      | Spendergeschlecht                                                                                   | $p = 0,17$                                            |
| ECC      | kalte Ischämiezeit<br>( $\geq 12$ Stunden, $< 12$ Stunden)                                          | $p = 0,83$                                            |
| ECC      | warme Ischämiezeit<br>( $\geq 30$ Minuten, $< 30$ Minuten)                                          | $p = 0,36$                                            |
| ECC      | Anzahl der HLA-Mismatches<br>( $\geq 2$ , $< 2$ )                                                   | $p = 0,89$                                            |
| ECC      | Anzahl der Transplantationen<br>( $\geq 1$ , $< 1$ )                                                | $p = 0,33$                                            |
| ECC      | CMV-Infektion                                                                                       | $p = 0,076$                                           |
| ECC      | <b>Dauer des Krankenhausaufenthaltes<br/>(<math>\geq 30</math> Tage, <math>&lt; 30</math> Tage)</b> | <b>*<math>p = 0,0012</math></b>                       |
| ECC      | <b>Anzahl der Rejektionen<br/>(<math>\geq 2</math>, <math>&lt; 2</math>)</b>                        | <b>*<math>p = 0,02</math></b>                         |
| ECC      | <b>Akutes Nierenversagen</b>                                                                        | <b>*<math>p = 0,0004</math></b>                       |
| ECC      | <b>Dialyse nach NTX</b>                                                                             | <b>*<math>p &lt; 0,0001</math></b>                    |

Tabelle 3-9: Ergebnisse der ANOVA für den Einfluss von externen Faktoren auf den Verlauf der ECC.

### 3.3.2.2.1 ANOVA: Einfluss von ACE-Hemmern/AT<sub>1</sub>R-Antagonisten

Schließlich wurde der Einfluss der Einnahme von ACE-Hemmern und oder AT<sub>1</sub>R-Antagonisten auf den Verlauf der ECC getestet. Auch hier war über die Zeit kein günstigerer Verlauf der ECC in der Gruppe derjenigen, die diese Klasse der Anthypertensiva einnahmen, gegenüber derer, die sie nicht bekamen (Tabelle 3-10), festzustellen.

| Variable | Einnahme von ACE-Hemmern/AT <sub>1</sub> R-Antagonisten | statistische Signifikanz<br>(sig. * wenn $p < 0,05$ ) |
|----------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| ECC      | Einnahme von ACE-Hemmern/AT <sub>1</sub> R-Antagonisten | $p = 0,70$                                            |

Tabelle 3-10: ANOVA: Einfluss von ACE-Hemmern/AT<sub>1</sub>R-Antagonisten auf die ECC.

### 3.4 Zweiter statistischer Ansatz: Chi-Quadrat-Test und Two-sample-proportion-Test

Aufgrund des sehr großen und für die statistische Auswertung teilweise komplexen Datensatzes, wurde ein zweiter statistischer Ansatz in Zusammenarbeit mit Herrn Assistant Professor Dr. med. A. Mondry, damals Institut für Bioinformatik, Universität Singapur, jetzt Horton Hospital, Oxford Radcliffe Hospitals NHS Trust, England, unternommen. Es ergaben sich einige interessante neue Aspekte, die hier kurz vorgestellt werden. Es wurden zwei Patientengruppen gebildet, die gemäß der im Methodenteil unter Punkt 2.1.1 geschilderten Definition einen Transplantatfunktionsverlust erlitten („Fälle“) oder nicht („Kontrollen“), sowie ein bestimmter Satz an nicht genetischen Faktoren binär definiert (Punkt 2.1.1 und 2.7.2).

Die kombinierte Genotyp-Distribution vom ACE I/D- und AT<sub>1</sub>R A1166C-Polymorphismus erbrachte in dieser Analyse grenzwertig signifikante Unterschiede zwischen Fällen und Kontrollen im Chi-Quadrat-Test (p- Wert:  $p = 0,049$ ).

Im nachfolgend durchgeführten Two-sample-proportion-Test zeigten sich jeweils signifikante Unterschiede in der Prävalenz je Gruppe (Fälle/Kontrollen) für ID-TM-CC ( $p = 0,022$ ), ID-MM-CC ( $p = 0,042$ ), DD-AA ( $p = 0,034$ ), ID-CC ( $p = 0,001$ ) und MM-CC ( $p = 0,046$ ). Diese Genotyp-Kombinationen waren jeweils mit einem besseren Transplantatüberleben assoziiert. Dem gegenüber stand ein schlechteres Transplantatüberleben für den MM-Genotyp des M235T AGT Polymorphismus ( $p\text{-Wert} < 0,001$ ) (siehe Tabelle 3-11).

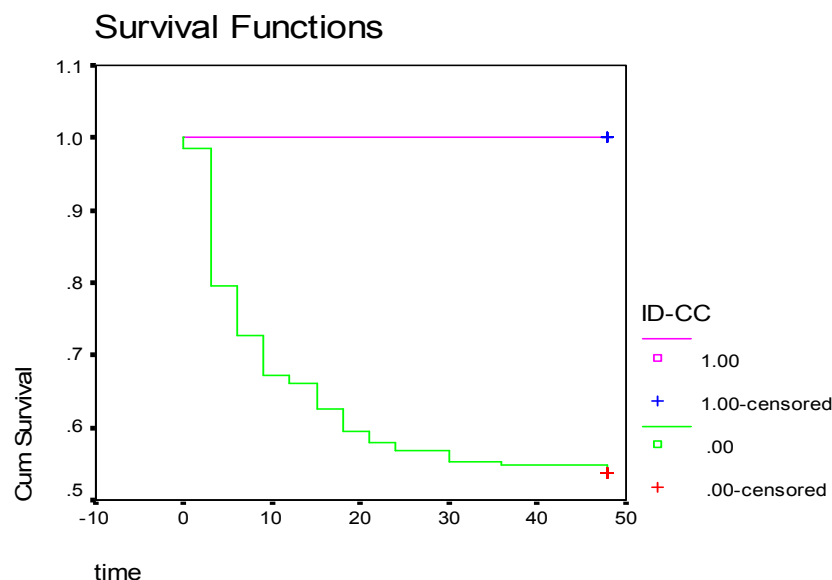
| Gen-Kombination   | ACE, AGT und AT <sub>1</sub> R |          | ACE, AT <sub>1</sub> R |       | AGT, AT <sub>1</sub> R | AGT   |
|-------------------|--------------------------------|----------|------------------------|-------|------------------------|-------|
| Allel-Kombination | ID-TM-CC                       | ID-MM-CC | DD-AA                  | ID-CC | MM-CC                  | M     |
| P- Wert           | 0.022                          | 0.042    | 0.034                  | 0.001 | 0.046                  | 0.001 |

**Tabelle 3-11: Darstellung der 6 Genotyp oder Allelkombinationen, die im Two-sample-proportion-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit oder ohne Transplantatdysfunktion zeigten.**

### 3.5 Zweiter statistischer Ansatz: Log-rank-Test und Kaplan-Meier Überlebensanalyse

Für die so ermittelten Genotyp- Kombinationen im Two-sample-proportion-Test wurden dann der Log-rank-Test sowie eine Kaplan-Meier-Überlebensanalyse durchgeführt. Bis zum 48. Monat wiesen insgesamt 71 Patienten ein Transplantatfunktionsverlust nach der in diesem Ansatz festgelegten Definition auf. Im Vergleich mit dem gesamten Restkollektiv der Patienten, erbrachte aber nur die Kombination ID-CC (10 Patienten) einen signifikanten Unterschied für das Transplantat-Überleben ( $p = 0,011$ ; siehe Abbildung 3-17). Hier ging im Beobachtungszeitraum von 48 Monaten nach NTX kein Transplantat verloren.

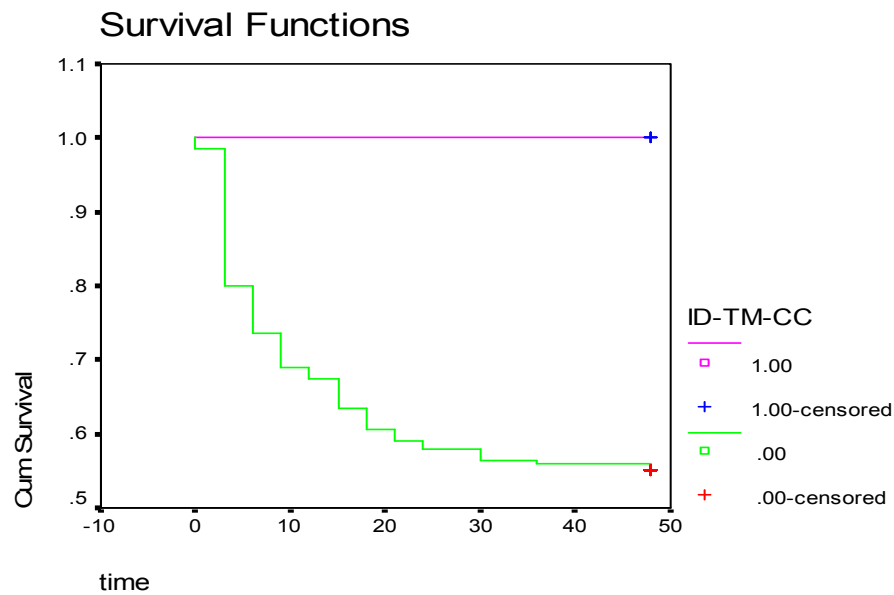
**Kombination: ID-CC (p-Wert= 0.01)**



**Abbildung 3-17: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster für die Allelkombination ID-CC.**

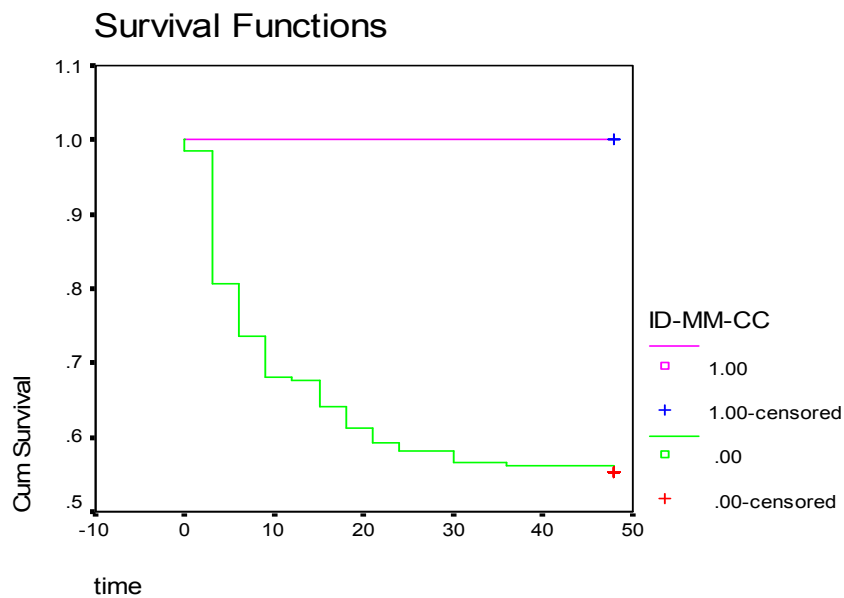
Für die anderen Allelkombinationen ID-TM-CC, ID-MM-CC, DD-AA, MM-CC, MM, konnten statistisch keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden (siehe die nachfolgenden Abbildung 3-18 bis Abbildung 3-22).

**Kombination. ID-TM-CC (p-Wert = 0.0778)**



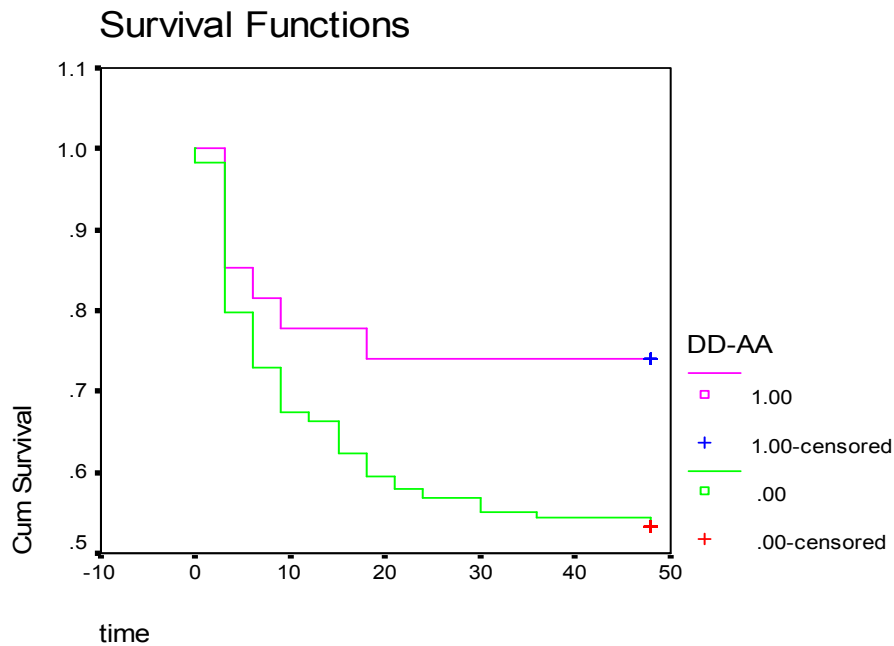
**Abbildung 3-18: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster. Die Allelkombination ID-TM-CC findet sich bei 5 Patienten. Hier ging im Beobachtungszeitraum von 48 Monaten kein Transplantat verloren (statistisch nicht signifikant).**

**Kombination: ID-MM-CC (p-Wert = 0.1158)**



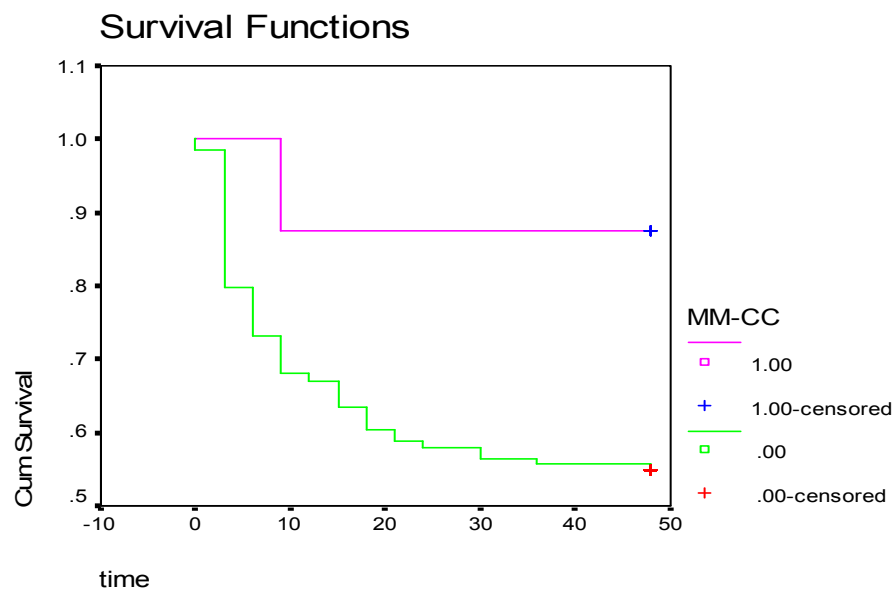
**Abbildung 3-19: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster. Die Allelkombination ID-MM-CC findet sich bei 4 Patienten. Hier ging im Beobachtungszeitraum von 48 Monaten kein Transplantat verloren (statistisch nicht signifikant).**

**Kombination: DD-AA (p-Wert = 0.0630)**



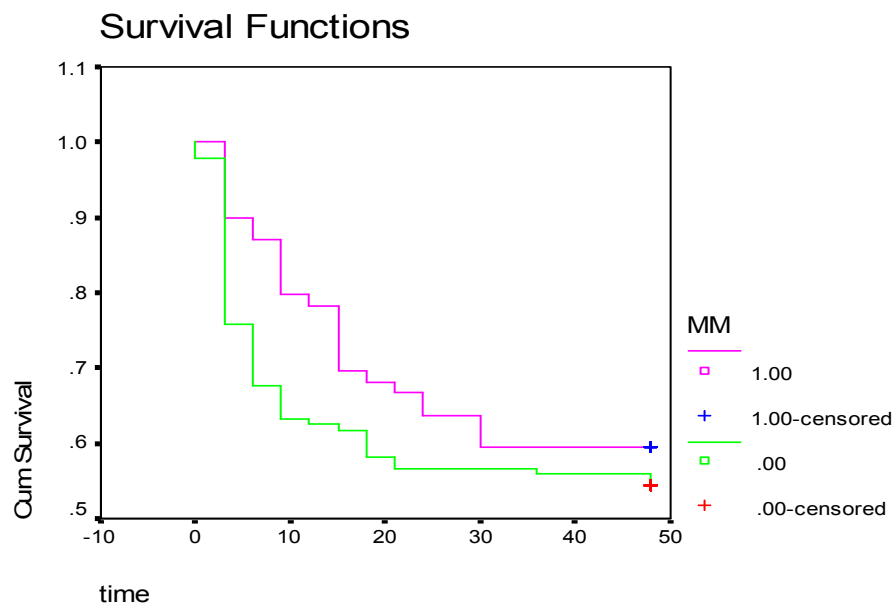
**Abbildung 3-20: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster. Die Allelkombination DD-AA findet sich bei 27 Patienten. Hier gingen im Beobachtungszeitraum von 48 Monaten 7 Transplantate verloren (statistisch nicht signifikant).**

**Kombination: MM-CC (p-Wert = 0.0935)**



**Abbildung 3-21: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster. Die Allelkombination MM-CC findet sich bei 8 Patienten. Hier ging im Beobachtungszeitraum von 48 Monaten ein Transplantat verloren.**

**Kombination: MM (p-Wert = 0.2912)**



**Abbildung 3-22: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster. Die Allelkombination MM findet sich bei 69 Patienten. Hier gingen im Beobachtungszeitraum von 48 Monaten 17 Transplantate verloren (statistisch nicht signifikant).**

### 3.6 Zweiter statistischer Ansatz: Mustererkennungsanalyse („pattern recognition“) mittels K-nearest-neighbour (KNN) Methode, Berechnung der Odds Ratio (OR)

Es erfolgte anschließend eine Analyse der anderen Faktoren/klinischen Daten mittels Mustererkennungsalgorithmen („pattern recognition“), um Einflüsse definierter, nicht genetischer Parameter (siehe Methodenteil Punkt 2.1.1) auf die Funktion der Nierentransplantate zu finden. Um eine hohe Aussagekraft zu erreichen, sind für die Berechnungen der Mustererkennungsanalyse möglichst vollständige Datensätze nötig, so dass nur 127 Patienten über einen Zeitraum von 9 Monaten betrachtet werden konnten. Mittels dieses Verfahrens wurden 4 binäre Variablen unter 20 ausgewählten klinischen Faktoren mit einem signifikant erhöhten Transplantatverlust, und ein Faktor mit einem signifikant niedrigeren Transplantatverlust nach der festgelegten Definition in einem Zeitraum bis zu 9 Monaten assoziiert.

Für die vier Faktoren, die signifikant mit einem Transplantatverlust assoziiert waren, betrug die Odds-Ratio Werte größer eins. Diese klinischen Faktoren waren der Wechsel des Immunsuppressivums, die Anwendung von Cyclosporin A bei Entlassung aus dem Krankenhaus nach der Nierentransplantation, sowie die Einnahme eines AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten bei

Entlassung nach Nierentransplantation. Dagegen war ein besseres Transplantatüberleben mit der Einnahme von Tacrolimus zum Zeitpunkt der Entlassung nach Nierentransplantation assoziiert (siehe Tabelle 3-12). Hier betrug der Wert der Odds-Ratio entsprechend kleiner eins.

| <b>Faktor</b>                                        | <b>OR</b> | <b>CI 95 %</b> |
|------------------------------------------------------|-----------|----------------|
| Wechsel der Immunsuppression (3. Monat)              | 2,93      | (1.68, 4.18)   |
| Wechsel der Immunsuppression (9. Monat)              | 6,71      | (4.28, 9.14)   |
| Einnahme von CSA (Entlassung)                        | 4,25      | (2.75, 5.75)   |
| Einnahme von AT <sub>1</sub> R-Blockern (Entlassung) | 3,26      | (0.46, 6.05)   |
| Einnahme von Tacrolimus (Entlassung)                 | 0,25      | (-1.25, 1.75)  |

**Tabelle 3-12: Darstellung derjenigen Faktoren, die einen signifikanten Einfluss auf die Transplantatfunktion hatten.**

## 4 DISKUSSION

In der hier vorgestellten Untersuchung wurden der Einfluss genetischer Polymorphismen des RAAS sowie anderer konkurrierender Faktoren auf die Nierentransplantatfunktion und den Bluthochdruck betrachtet. Da diese genetischen Polymorphismen über die Beeinflussung eines blutdruckregulierenden Systems und damit der arteriellen Hypertonie ebenfalls potentiell als Risikofaktor für die Entwicklung einer chronischen Transplantatdysfunktion eintreten, wurden bereits in der Einleitung in einer größeren Perspektive diejenigen Faktoren, die auch auf den Verlauf der Nierentransplantatfunktion einen Einfluss haben, erörtert. Alle Faktoren insgesamt definieren die so genannte chronische Transplantatdysfunktion oder chronische Rejektion. Die chronische Transplantatdysfunktion bedingt – bei Ausschluss von verstorbenen Patienten mit einem funktionierenden Transplantat – bei 50-80 % der Transplantate eine erneute Dialysepflichtigkeit [130]. Somit wären die Ausschaltung oder zumindest die Reduktion der Faktoren, durch die sie unterhalten wird, ein wichtiges Ziel für den Langzeitverlauf nach Nierentransplantation.

### 4.1 Die chronische Transplantatdysfunktion

Die chronische Transplantatdysfunktion ist ein multifaktorielles Geschehen [1], [2], [3], [4], [5], [6] welches auf vielen verschiedenen schädigenden Faktoren beruht.

Die untenstehenden Tabelle 4-1 nach C. Blume et al. [131] gibt zusammengefasst einen Überblick über die möglichen Ursachen der chronischen Transplantatdysfunktion wieder. Bereits in der Einleitung wurden diejenigen Faktoren, die auch für die oben vorgestellte Analyse von Bedeutung waren, ausführlich beschrieben (Punkte 1.1.1 bis 1.1.1.4).

Diese Auflistung veranschaulicht die Vielschichtigkeit der Gründe der Entstehung einer chronischen Transplantatdysfunktion. Gleichzeitig legt sie nahe, dass der dominante Einfluss eines Faktors für ihre Entstehung nicht wahrscheinlich ist. Ein wesentlicher und therapeutisch genau zu kontrollierender Faktor für die Progression der chronischen Transplantation ist der Post-Transplantationbluthochdruck. Deshalb befasst sich die hier vorgestellte Analyse im engeren Sinne mit endogenen Ursachen der posttransplant-Hypertonie und versucht eine Gewichtung der Polymorphismen des RAAS gegenüber anderen schädigenden Faktoren.

| <b>Chronische Transplantatdysfunktion: mögliche Ursachen</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Vor und während der Transplantation</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| Hohes Spenderalter, schlechte Nierenqualität<br>Lange kalte Ischämiezeit, lange warme Ischämiezeit bei komplizierter Anatomie<br>Schlechte HLA-Übereinstimmung, donorspezifische Antikörper<br>Operative Komplikationen<br>Akutes ischämisches Nierenversagen<br>Transplantatarterienstenose, Stenose der proximalen Iliakalarterie<br>Transplantatureterobstruktion                                                                                                        |
| <b>Im Verlauf</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Spätfolgen akuter Rejektionen (vaskulär oder interstitiell)<br>Subklinische Rejektion (akut interstitiell)<br>Späte akute oder rezidivierende Rejektion bei nicht optimaler Immunsuppression, Non-Compliance<br>Chronische Rejektion, Transplantatglomerulopathie, Calcineurininhibitor (CNI)-Toxizität<br>Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus<br>Infektionen (Bakterien, Viren)<br>De-novo-Glomerulonephritis<br>Rekurrierende Glomerulonephritis |

**Tabelle 4-1: Darstellung der möglichen Ursachen der chronischen Transplantatdysfunktion nach C. Blume et al. [131].**

## **4.2 Auswirkung der RAAS-Polymorphismen auf die arterielle Hypertonie nach Nierentransplantation**

Inwieweit genetische Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems einen Einfluss auf die arterielle Hypertonie bei nierentransplantierten Patienten ausüben, wurde in der hiesigen Untersuchung überprüft. Die Rolle der arteriellen Hypertonie in der Entstehung der chronischen Transplantatdysfunktion wurde in der Einleitung ausführlich erläutert (siehe auch Punkte 1.1.1.2, 1.2).

#### **4.2.1 Auswirkung der RAAS-Polymorphismen auf den MAD und die SumAH**

In unserer Studie wurde der Einfluss der Polymorphismen der Gene des RAAS auf den Bluthochdruck mittels der Berechnung des MAD (mittleren arteriellen Blutdruck) und der Summe der eingenommenen antihypertensiven Medikamente (SumAH) zu definierten Zeitpunkten nach Nierentransplantation untersucht. Der zeitliche Verlauf der arteriellen Hypertonie zwischen den verschiedenen Genotypträgern jedes einzelnen Polymorphismus wurde gegeneinander verglichen und auf Unterschiede getestet.

Weder für den Angiotensin Converting Enzym (ACE) Gen I/D-Polymorphismus, noch für den Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T Polymorphismus oder den Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C-Polymorphismus, konnte ein statistisch nachweisbarer Einfluss auf den Verlauf des MAD oder die Summe der eingenommenen Antihypertensiva nachgewiesen werden.

Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit einer Untersuchung von Basset et al. von 2002 [132]: in einem Kollektiv von 294 Patienten untersuchten sie den Einfluss der auch von uns analysierten RAAS-Polymorphismen und der konstitutiven endothelialen Nitritoxid-Synthase (ecNOS) auf die Hypertonie nach erfolgter Nierentransplantation. Nur für den ecNOS-Polymorphismus konnte eine statistisch signifikante Beeinflussung der posttransplant-Hypertonie gezeigt werden.

Wenige andere Studien untersuchten ebenfalls diesen Aspekt. Beige et al. 1996 und 1998 konnten keinen Unterschied in der Ausprägung des Hypertonus unter den verschiedenen Genotypen des ACE-Gen I/D-Polymorphismus [99] oder des Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus [114] feststellen. Auch Nicod et al. 2002 [133], Basset et al. 2002 [132], Akcay et al. 2004 [134], Slowinski et al. 2004 [102], fanden keinen Effekt der RAAS-Polymorphismen auf die posttransplant-Hypertonie. Abdi et al. 2001 [98] fanden nur für den Angiotensin II-Typ 1 Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C-Polymorphismus signifikant höhere Blutdrücke nach Nierentransplantation und assoziierten dies mit einer möglichen höheren Sensitivität des Rezeptors für Angiotensin II.

Somit stimmen unsere Ergebnisse mit anderen durchgeführten Studien überein.

#### **4.2.2 Bewertung der Ergebnisse zum Einfluss der RAAS-Polymorphismen auf die posttransplant-Hypertonie**

Obleich die arterielle Hypertonie nach Nierentransplantation per se ein multifaktorielles Geschehen darstellt, ist ein dominanter Einfluss eines Faktors, wie hier für die genetischen

RAAS-Polymorphismen angenommen, für ihre Entstehung denkbar. Es ist deshalb zu diskutieren, ob nicht das hier gewählte Studiendesign für das fehlende Aufzeigen einer Assoziation zwischen einer Hypertonie nach Nierentransplantation und den RAAS-Polymorphismen verantwortlich ist. Mehrere Aspekte könnten hier als eine mögliche Erklärung in Frage kommen. Als erstes muss das gerade zu längeren Beobachtungszeiträumen hin immer kleiner werdende Patientenkollektiv, welches insgesamt zur Abnahme der statistischen Aussagekraft führte, beachtet werden. So ist zu bedenken, dass für kurze Zeitintervalle nach Nierentransplantation das Kollektiv der Patienten noch relativ groß war. Je mehr Zeitpunkte in Betracht gezogen wurden, umso geringer war die Anzahl der beobachteten Patienten, da nicht nur der entfernte Transplantationszeitpunkt, sondern auch das in der Frequenz deutlich abnehmende Erscheinen der Transplantierten zu klinischen Kontrollvisiten in unserer Klinik entscheidend waren.

Ein zweiter Aspekt ist der retrospektive Charakter der Untersuchung, der bedingt, dass es keinerlei Eingreifen der Studienleitung in die antihypertensive Medikation der Patienten gab. Diese wurde nur nach klinischen Kriterien angepasst, gleichzeitig wählte der Kliniker eine umfassende Medikation zur Behandlung einer bestehenden arteriellen Hypertonie nach Zielblutdruckwert, wobei auch die Klasse des Antihypertensivums nach klinischen Erfordernissen und ggf. anderen äußeren Umständen (nicht immer rationales subjektives Empfinden des Patienten für eine bestimmte Medikamentenklasse, Unverträglichkeit, Nebenwirkungspotential, Auflagen bezüglich der Zuzahlungsmodalitäten bei der Einlösung eines Rezeptes, Non-Compliance etc.) erfolgte. Insgesamt muss festgestellt werden, dass wenn es einen Einfluss der RAAS-Polymorphismen auf die Post-Transplantations-Hypertonie gäbe, dieser möglicherweise bei dem vorliegenden Studiendesign von einer medikamentösen Therapie verdeckt sein könnte.

Drittens, und dies bezieht sich wiederum auf die Ergebnisse anderer Untersucher und die Darstellungen in der Einleitung, ist ein alleiniger Einfluss eines oder mehrerer Polymorphismen in der vielschichtigen Pathogenese der arteriellen Hypertonie nach Nierentransplantation unwahrscheinlich (siehe auch Einleitung Punkt 1.2), so dass eine mögliche Verzerrung des Effektes eines Faktors oder die Unterdrückung durch einen anderen Faktor sehr nahe liegend sind und die Interpretation der Ergebnisse erschweren.

So ist diesbezüglich zu bedenken, dass zwar ein höherer Blutdruck nach Nierentransplantation durch ein aktiviertes RAAS teilweise zu erklären und deshalb die Untersuchung der Wirkung von RAAS-Polymorphismen pathophysiologisch sinnvoll ist. Andererseits mag beispielsweise die CSA-induzierte Hypertonie, die primär einen anderen Pathomechanismus aufweist, den Effekt des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems überlagern. Diesen Aspekt spiegeln eben-

falls indirekt unsere eigenen Ergebnisse aus der Mustererkennungsanalyse wider (siehe auch Punkt 3.6): hier wirkte sich die Einnahme von CSA zum Zeitpunkt der Entlassung positiv auf einen Transplantatfunktionsverlust aus, dagegen war der Verlust des Transplantatfunktion mit der Einnahme von Tacrolimus zum Zeitpunkt der Entlassung signifikant seltener.

### **4.3 Auswirkung der RAAS-Polymorphismen auf die Nierentransplantatfunktion**

In der Pathogenese der chronischen Transplantatdysfunktion scheint das aktivierte RAAS eine Rolle zu spielen. Ein häufiges histologisches Korrelat der chronischen Rejektion ist die Hypertrophie des juxtaglomerulären Apparates, die vermutlich einer erhöhten Reninsekretion entspricht [135]. Eine erhöhte Plasma-Reninaktivität wurde bei Patienten mit abnehmender Transplantatfunktion berichtet [136] und wurde ebenfalls in Zusammenhang mit einem erhöhten Blutdruck nach Nierentransplantation in Verbindung gebracht [68], einem entscheidenden Faktor der Transplantatschädigung [1]. Zusätzlich spielte das aktivierte RAAS eine Rolle bei der verzögerten Transplantatfunktion [137], einem anderen wichtigen Risikofaktor bei der Entstehung der chronischen Transplantatdysfunktion [1], [4], [3].

Die Wirkung entfaltet sich dabei über das effektive Peptid Angiotensin II, welches ebenso die renale Hämodynamik und den tubulären Transport, als auch die Stimulation der Zytokin-Bildung und -Freisetzung betrifft. Angiotensin II bewirkt zudem die erhöhte Synthese von PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF (Transforming Growth Factor)-beta 1, des basalen fibroblastären Wachstumsfaktors und verschiedener Kollagen-Subtypen. Es unterstützt die Proliferation von endothelialen und mesangialen Zellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten [138]. Experimentelle Studien zeigten, dass CSA (Cyclosporin A) das RAAS über die Mehrproduktion von Angiotensin II anregt. Diese Veränderungen könnten zum glomerulären Hochdruck und zur Glomerulosklerose führen, einem Prozess, der schließlich in der Abnahme der Nierenfunktion mündet.

In tierexperimentellen Modellen und einigen klinischen Studien erwies sich die medikamentöse Blockade des RAAS ebenfalls positiv auf die Nierenfunktion [139], [140], [141], [142]. Gleichzeitig ist die RAAS-Expression, wie schon erwähnt, zumindest teilweise durch genetische Polymorphismen beeinflusst [72], [104].

Wie in der Einleitung beschrieben, wurden die genetischen Polymorphismen des RAAS bei chronischen Nierenerkrankungen als Risikofaktor für die Progression der Nierenerkrankung als auch des verminderten renalen Überlebens in Verbindung gebracht. In der Nierentrans-

plantationsmedizin ist die unmittelbare Auswirkung der RAAS-Polymorphismen auf die Nierentransplantatfunktion bisher umstritten.

In der ersten statistischen Auswertung unserer Datenbank konnte nur das D-Allel des ACE-Gen I/D-Polymorphismus mit einer schlechteren Transplantatfunktion, berechnet über die ECC nach der Cockcroft-Formel, assoziiert werden. Dies konnte zu mehreren Zeitpunkten in der univariaten Analyse gezeigt werden. In der ANOVA ließ sich dieser Effekt jedoch nur als Tendenz verifizieren.

Broekroelofs et al. 1998 [97] identifizierten das D-Allel als unabhängigen Risikofaktor des renalen Funktionsverlustes in einer Untergruppe ihres Patientenkollektivs mit einer Kreatinin-Clearance kleiner als 50 ml/min oder einer Proteinurie größer oder gleich 0,5 g/Tag. Sie folgerten daraus, dass die Rolle des D-Alleles als krankheitsmodifizierend bei dem Vorliegen einer schon per se ungünstigen Ausgangssituation zu betrachten ist. Barocci et al. 1999 [103] fanden bei pädiatrischen Patienten die Assoziation des DD-Genotyps mit einem kürzeren Transplantatüberleben, so wie es Abdi et al. 2001 [98] und kürzlich Akcay et al. 2004 [134] in der Erwachsenenpopulation nochmals bestätigten.

Demgegenüber stehen Ergebnisse anderer Autoren, die den hier untersuchten RAAS-Polymorphismen keine beeinflussende Rolle auf die Nierenfunktion nach Transplantation zuschreiben. Obwohl Prasad et al. 2003 [115], Ayed et al. 2006 [143] dem AGT M235T-Polymorphismus und Nicod et al. 2002 [133] dem AT<sub>1</sub>R A1166C-Polymorphismus eine Rolle für die Langzeitfunktion des Transplantates zuschreiben, konnten wir dies in unserer Untersuchung in der Einzelanalyse des ersten statistischen Ansatzes weder für den Angiotensinogen M235T- noch für den Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus bestätigen. Auch Beige et al. 1997 und 1998 [100], [99], Yildiz et al. 2002 [101] für ein türkisches Patientenkollektiv, sowie kürzlich Slowinski et al. 2004 [102], konnten keine Assoziation der RAAS-Polymorphismen mit der Nierentransplantatfunktion finden.

In dem hier vorgestellten zweiten statistischen Ansatz wurden die genetischen Polymorphismen zusätzlich in Gruppen zusammengefasst und analysiert. Die kombinierte Genotyp-Distribution der Polymorphismen ACE I/D und AT<sub>1</sub>R A1166C zeigte grenzwertig signifikante Unterschiede zwischen Fällen (Gruppe derjenigen mit einem Transplantatfunktionsverlust) und Kontrollen (diejenigen Patienten ohne definierten Transplantatfunktionsverlust) im Chi-Quadrat-Test. Im nachfolgend durchgeführten Two-sample-proportion-Test zeigten sich jeweils signifikante Unterschiede in der Prävalenz je Gruppe (Fälle/Kontrollen) für ID-TM-CC, ID-MM-CC, DD-AA, ID-CC und MM-CC. Diese Genotyp-Kombinationen waren jeweils mit

einem besseren Transplantatüberleben assoziiert. Dem gegenüber stand ein schlechteres Transplantatüberleben für den MM-Genotyp des AGT M235T Polymorphismus.

Für die so ermittelten Genotyp-Kombinationen wurden dann die Kaplan-Meier-Analyse und der Log-rank Test durchgeführt. Nur die Kombination ID-CC zeigte signifikante Unterschiede in der Distribution des Transplantat-Überlebens (siehe auch 3.4 und 3.5).

Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den im ersten statistischen Ansatz durchgeführten Analysen. Der Einfluss des I-Allels des ACE-Gen I/D-Polymorphismus als des „günstigeren Allels“, ist hier nur in der heterozygoten Kombination sichtbar. Als mögliche Erklärung müssen die deutlich kürzere Beobachtungsdauer von nur 9 Monaten und die durch die Bildung von Gruppen nochmals deutlich dezimierte Anzahl von Datensätzen dienen, die die Aussage verzerren. Die Rolle des AT<sub>1</sub>R A1166C-Polymorphismus würde in dieser Betrachtung dann die Daten von Nicod et al. [133] bekräftigen.

#### **4.3.1 Bewertung der Ergebnisse zum Einfluss der RAAS-Polymorphismen auf die Nierentransplantatfunktion**

Obwohl für jeden der drei hier untersuchten RAAS-Polymorphismen pathophysiologisch ein sinnvoller Zusammenhang in der Entwicklung der chronischen Transplantatdysfunktion zugeschrieben werden kann, zeigt nur das D-Allel in der Einzelbetrachtung und nur die Kombination ID-CC in der Gruppenbetrachtung, einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Nierentransplantatfunktion. Die anderen Kombinationen verschiedener Genpolymorphismen zusammen und gegeneinander geben für unseren Datensatz keine möglichen protektiven oder schädigenden Einflüsse bestimmter Merkmalskombinationen wieder, so dass ihnen daher insgesamt hieraus keine entscheidende oder herausragende Bedeutung beigemessen werden kann.

Diese Beobachtung unterstreicht die Bewertung, dass die Gesamtheit der RAAS-Polymorphismen im Gesamtfeld aller die Transplantatdysfunktion beeinflussenden Faktoren keine wesentliche Rolle spielt. So kann aus unseren Daten heraus dem Kliniker keine vorherige Genotypisierung zur Erfassung von Risikopatienten empfohlen werden.

Zum einen spielt hier wiederum die Größe des untersuchten Patientenkollektivs eine wichtige und gleichzeitig für die Verallgemeinerung von Ergebnissen entscheidende Rolle. Auch wenn unser eigenes hier untersuchtes Patientenkollektiv schon eine beträchtliche Größe aufwies, so ist es gerade für die Betrachtung von genetischen Einflüssen immer noch nicht groß genug.

Zum anderen kann die ethnische Zusammensetzung des gewählten Kollektivs gerade bei der Betrachtung genetischer Polymorphismen mögliche Zusammenhänge verdecken, die in bestimmten Populationen im Gegensatz zu anderen zum Ausdruck kommen. Das von uns untersuchte Patientenkollektiv kann jedoch als weitgehend homogen betrachtet werden, so dass der Einfluss eines bestimmten Phänotyps zumindest von diesem Aspekt her sich abzeichnen konnte.

Weiterhin muss auch für die Betrachtung des Einflusses der RAAS Polymorphismen auf die Nierentransplantatfunktion das Studiendesign ebenfalls kritisch auf die Vollständigkeit der Daten und das Vorliegen von Störgrößen, die den eigentlich gesuchten Effekt verschleiern könnten, kritisch hinterfragt werden. In unserer Untersuchung ist der retrospektive Charakter des Studiendesigns mit den sich daraus ergebenden zum Ende des Beobachtungszeitraums hin sehr kleinen Fallzahlen und zusätzlichen „missing values“ limitierend.

#### **4.4 Einfluss konkurrierender Faktoren auf die Transplantatfunktion**

##### **4.4.1 Einfluss von metabolischen Faktoren auf die ECC**

In der Varianzanalyse des ersten statistischen Ansatzes wurden das Vorliegen eines Diabetes mellitus, das Gesamtcholesterin ( $\geq 200$  mg/dl vs.  $< 200$  mg/dl), die LDL-Konzentration ( $\geq 100$  mg/dl,  $< 100$  mg/dl), die Triglyceridkonzentration ( $\geq 200$  mg/dl,  $< 200$  mg/dl) und die Proteinurie ( $\geq 1$ g/24h versus  $< 1$ g/24h) auf den Verlauf der ECC geprüft. Diese Faktoren entsprechen einem sklerogenen Risiko, so dass die Überprüfung ihres Einflusses auf die Transplantatfunktion und die mögliche Entwicklung einer Transplantatdysfunktion pathophysiologisch sinnvoll ist.

Es zeigte sich für keinen der geprüften Parameter ein signifikant unterschiedlicher Verlauf der ECC über die Zeit, wenngleich tendenziell bei dem Vorliegen einer Proteinurie von  $> 1$ g/24h, bei einer Gesamtcholesterinkonzentration  $> 200$  mg/dl und bei Triglyceriden  $> 200$  mg/dl, ein deutlicherer Abfall der ECC im Zeitverlauf von 48 Monaten nach Transplantation zu beobachten war.

Die Mustererkennungsanalyse des zweiten statistischen Ansatzes liefert zu diesen metabolischen Faktoren keine signifikanten Ergebnisse.

Obwohl aus unseren Daten keine statistisch signifikanten Resultate zu erzielen sind, so stimmen sie in der Tendenz mit den Resultaten anderer Untersucher überein [23], [24], [25], [26], [38], [47], [144], [145], [146].

#### 4.4.2 Einfluss externer Faktoren auf die ECC

Externe Faktoren wie Spenderalter, Spendergeschlecht, kalte und warme Ischämiezeit, Anzahl der HLA-Mismatche, Anzahl der Transplantationen und CMV-Infektionen nach Nierentransplantation, zeigten keinen signifikant unterschiedlichen Einfluss auf den Verlauf der ECC im geprüften Zeitraum von 48 Monaten nach NTX.

Den spenderbezogenen Einfluss betreffend (i.e. Spenderalter, Spendergeschlecht, Anzahl der HLA-Mismatche), konnten deutlich größere Untersuchungen von Chertow et al. 1995 [147] an 31000 Patienten, Opelz et al. 1991 [148] und 1999 [149] und Humar et al. 2002 [150] die Relevanz dieser Parameter auf das Transplantatlangzeitüberleben sichern. Demnach waren ein extremes Spenderalter, das weibliche Spendergeschlecht und eine hohe Anzahl von HLA-Mismatches mit einem schlechteren Transplantatüberleben assoziiert. Auch konnten andere Autoren die Relevanz durchlaufener CMV-Infektionen für ein schlechteres Transplantatüberleben aufzeigen [151], [152], [153], [154]. Die Relevanz der kalten und warmen Ischämiezeit konnte nicht in allen Untersuchungen belegt werden [155]. Die Diskordanz zu unseren Daten liegt am ehesten in der zu kurzen Beobachtungsdauer und geringeren Anzahl an Patienten begründet.

Unsere Daten zeigen hingegen, dass die ECC nach NTX einen signifikant unterschiedlichen Verlauf unter dem Einfluss der Dauer des Krankenhausaufenthaltes nach NTX, des Auftretens eines akuten Nierenversagens, einer Dialysepflicht und der Anzahl der Rejektionen nahm (siehe auch 3.3.2.2). Diese Ergebnisse ließen sich damit erklären, dass komplizierte klinische Verläufe, charakterisiert durch eine verzögerte Transplantatfunktion, einen längeren stationären Aufenthalt und klinisch häufig ein ANV und damit eine Dialysepflicht, auch nachhaltig eine Auswirkung auf die Nierentransplantatfunktion haben. Durchlaufene Rejektionen spielten dabei für den Langzeitverlauf genauso eine wichtige Rolle. Dies spiegelt sich in unseren Ergebnissen aus der Mustererkennungsanalyse wider (siehe auch 3.6): Der Wechsel der Immunsuppression innerhalb des ersten Jahres nach NTX geht klinisch meist mit dem Ereignis einer Abstoßungsreaktion einher und wirkt sich im Langzeitverlauf negativ auf die Transplantatfunktion aus. Somit stimmen diese Ergebnisse größtenteils mit denen anderer Untersucher überein [156], [157], [158], [159], [160], [161].

Einen interessanten anderen Aspekt liefert die Mustererkennungsanalyse auch zur Immunsuppression: unsere Untersuchung zeigt, dass der Einsatz von Tacrolimus im Vergleich zu CSA für die Nierentransplantatfunktion einen günstigeren Effekt zu haben scheint, was wiederum zahlreiche Beispiele anderer Autoren belegen [162], [163], [164], [165], [166], [167], [168]. Auch hierzu ist jedoch die Meinung in der Literatur kontrovers [169], [170], [171], [172],

[173], bzw. sind weniger nephrotoxische Substanzen Gegenstand gegenwärtiger Studien [174], [175], [176], [177], [178], [179], [180].

#### **4.4.3 Einfluss von ACE-Hemmern/AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten auf die ECC**

Renoprotektion durch die Einnahme von ACE-Hemmern und oder AT<sub>1</sub>R-Antagonisten konnte zuvor u.a. für die IgA-Nephropathie [87] und verschiedene andere Nierenerkrankungen [181], [182], [183], [184], [185], [12], [186], [187], [188], [189] gezeigt werden, wobei v.a. die ACE-Gen-I/D-Polymorphismus DD-Genotypträger von einer ACE-Blockade profitierten. Die Einnahme von ACE-Hemmern und oder AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten nach Nierentransplantation ist sicher und effektiv [190], [191]. In unserer Untersuchung hatte sie jedoch keinen Einfluss auf den Verlauf der ECC unter den verschiedenen Genotypträgern der RAAS-Polymorphismen (siehe auch Tabelle 3-10). Andere Untersucher berichten von uneinheitlichen Ergebnissen, wobei insbesondere die kürzlich veröffentlichte Datenlage für eine positive Auswirkung der RAAS-Blockade durch ACE-Hemmer und oder AT<sub>1</sub>R-Antagonisten auf die Transplantatfunktion oder den Verlauf der chronischen Rejektion spricht. So fanden Suwelack et al. 2002 [192] eine bessere Blutdrucksenkung unter ACE-Blockade überraschend unter den II-Genotypträgern, die Proteinurie besserte sich deutlicher unter den DD-Genotypträgern, da diese auch eine größere primäre Endorganschädigung vermuten ließen. Lorenz et al. 2004 [193], Tutone et al. 2005 [194] zeigten, dass der Einsatz von ACE-Hemmern und oder AT<sub>1</sub>R-Antagonisten in der frühen posttransplant-Periode nicht nur sicher und effektiv ist, sondern sich auch positiv auf eine verzögerte Transplantatfunktion auswirkt. Kürzlich veröffentlichte Daten von Heinze et al. 2006 [195], Zaltzman et al. 2004 [196], Premasathian et al. 2004 [197], Lin et al. 2002 [198], legen nahe, dass die Blockade des RAAS ein signifikant besseres Transplantatüberleben sichert. Dies zeigten Requiao-Moura et al. 2007 ebenfalls für das Auftreten einer posttransplant-Glomerulonephritis [199], einem der verantwortlichen Faktoren für die Entwicklung einer chronischen Transplantatdysfunktion. In den Analysen der großen CTS (Collaborative Transplant Study, Kidney Transplants) Untersuchung vom November 2006 konnten diese ermutigenden Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden [200].

In den hier vorgestellten Ergebnissen aus der Mustererkennungsanalyse, der ein Beobachtungszeitraum von 9 Monaten zugrunde gelegt wurde, wirkte sich der Einsatz von AT<sub>1</sub>R-Antagonisten zum Zeitpunkt der Entlassung positiv auf einen Transplantatverlust aus. Zunächst scheint diese Erkenntnis im Widerspruch zu den oben zitierten Beobachtungen zu stehen. Dass der Einsatz dieser Klasse der Antihypertensiva auch im Langzeitverlauf eine negative Auswirkung auf die Transplantatfunktion haben sollte, kann aus unseren Daten nicht ab-

geleitet und muss auch kritisch diskutiert werden. Aus der klinischen Vorgehensweise unseres Zentrums muss einschränkend hierzu aufgeführt werden, dass der frühe Einsatz dieser Medikamentenklasse meist mit einem komplizierten klinischen Verlauf nach Nierentransplantation, mit nicht beherrschbarer Hypertonie und eingeschränkter Transplantatfunktion, einhergeht. Diese stellen klinische Ereignisse dar, die aus der klinischen Beobachtung heraus auch im Verlauf mit der Entwicklung einer chronischen Transplantatdysfunktion vergesellschaftet sind. Somit gibt die Verwendung von AT<sub>1</sub>R-Blockern zum Zeitpunkt der Entlassung eher eine schlechtere klinische Ausgangslage für den Langzeitverlauf wieder, als dass aus unseren Ergebnissen schlussgefolgert werden könnte, sie führe per se zur Entwicklung einer chronischen Rejektion.

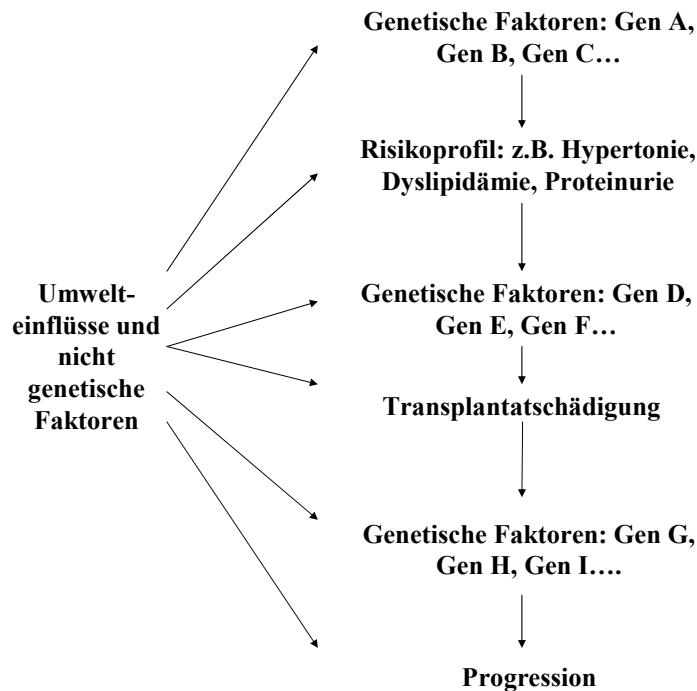
#### **4.5 Schlussfolgerung**

Die hier vorgestellte Analyse untersuchte den Einfluss von genetischen Polymorphismen auf die Nierentransplantatfunktion und den Bluthochdruck. Zusätzlicher Gegenstand der Betrachtung war der Einfluss anderer konkurrierender Faktoren auf die Nierentransplantatfunktion.

Sowohl die genetischen Polymorphismen als auch die anderen untersuchten Faktoren wurden in ihrem komplexen Zusammenspiel bei ihrer Wirkungsentfaltung vorgestellt. Ebenso wurde der multidimensionale Charakter der beiden Zielgrößen Nierentransplantatfunktion und posttransplant-Hypertonie aufgezeigt.

Es war a priori zu vermuten, dass eine solch mehrschichtige Problematik, wie sie die hier untersuchten Faktoren selbst und die Zielgrößen darstellen, keine einfache Lösung hinsichtlich ihrer Beeinflussung zulassen würde. Zumindest hypothetisch hätte aber vor allen Dingen die genetische Komponente einen dominanten Einfluss ausüben können, so wie das für andere klinische Fragestellungen trotz ihres komplexen Charakters zutrifft.

Die folgende Abbildung 4-1 veranschaulicht hierzu vereinfacht den komplexen Weg bei der Betrachtung eines Zielphänomens (hier als „Progression“ bezeichnet), auf dem immer wieder interne und externe, alte und neue Faktoren aufeinander treffen.



**Abbildung 4-1: Relation zwischen genetischen Faktoren und Determinanten der chronischen Transplantatdysfunktion. Überarbeitet nach: Arya M.Sharma, Joachim Beige and Armin Distler.**

Basierend auf der hier vorgestellten Analyse findet die initiale Fragestellung folgende Antworten:

Ein Einfluss des ACE-Gen I/D-Polymorphismus, des Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus und des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Gen A1166C-Polymorphismus auf den Bluthochdruck nach Nierentransplantation konnte hier nicht gezeigt werden. Die arterielle Hypertonie hat ihren eindeutigen Stellenwert in der Entwicklung der Transplantatdysfunktion. Unsere Daten lassen aber nicht den Schluss zu, dem Kliniker eine vorherige Bestimmung dieser Polymorphismen für das klinische Patientenmanagement zur weiteren Risikostratifizierung zu empfehlen.

Hinsichtlich der Nierentransplantatfunktion zeigte eine unserer statistischen Analysen (Kruskall-Wallis Test) eine schlechtere endogene Kreatininclerance über die Zeit für Träger des D-Allels des ACE-Gen I/D-Polymorphismus. In den anderen hier durchgeführten Analysen konnte dieser Effekt nicht statistisch signifikant bestätigt werden. Die Mustererkennungsanalyse nach der KNN-Methode zeigte für die Kombination des ACE-Gen I/D-Polymorphismus und des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-Polymorphismus einen Einfluss auf die Transplantatfunktion. Der Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus beeinflusste die Nierentransplantatfunktion nicht. Insgesamt scheint sich zwar aufgrund unserer Daten ein Effekt hinsichtlich des ACE-Gen I/D-Polymorphismus abzuzeichnen, er konnte aber nicht

vollständig statistisch signifikant untermauert werden. Wie in der Diskussion methodisch kritisiert, würde eine größer (mehr Patienten, Zusammenarbeit mehrerer Zentren) und länger angelegte Untersuchung eindeutigere Aussagen liefern. Aus den hier vorgestellten Ergebnissen können weitere Empfehlungen zur früheren Erkennung von Risikopatienten im klinischen Alltag jedoch nicht ausgesprochen werden.

Die chronische Transplantatdysfunktion wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. In unserem Patientenkollektiv bestätigte sich für eine schlechtere Transplantatfunktion, im Einklang mit der gegenwärtigen Literatur, eindeutig zum einen der Einfluss von einigen externen Faktoren, die auf eine komplexe klinische Situation hindeuten, zum anderen trendweise von einigen metabolischen Faktoren, die hier den Progress einer chronischen Transplantatdysfunktion vorantreiben. Neue Aspekte für die klinische Praxis ergeben sich aber hieraus nicht. Die anti-hypertensive Medikation betreffend, haben wir aus pathophysiologischen Überlegungen heraus im Speziellen den Einfluss der Medikamentenklasse der ACE-Hemmer und oder der Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-Antagonisten auf die Nierentransplantatfunktion in unserem Patientenkollektiv untersucht. Ihr günstiger Einfluss auf den Verlauf nach Nierentransplantation wird mit unseren Daten nicht gezeigt. Dem Kliniker kann mithilfe unserer Daten der bevorzugte Einsatz dieser Medikamentenklasse daher nicht empfohlen werden.

Bezüglich der Immunsuppression zeichnete sich in unseren Daten ein günstigerer Verlauf der Transplantatfunktion unter dem Einsatz von Tacrolimus ab. Ob dies sich auch für den Langzeitverlauf bestätigen lässt, müsste in einer größer und länger angelegten multizentrischen Untersuchung überprüft werden.

Mit besonderem Augenmerk bezüglich der genetischen Polymorphismen des RAAS, stellte auch die multivariate Betrachtung aller hier untersuchten Faktoren keinen Einfluss der genetischen Polymorphismen auf die Nierentransplantatfunktion oder die arterielle Hypertonie nach Nierentransplantation heraus. Insofern muss ihr Stellenwert in der Mehrdimensionalität der hier gestellten Problematik anhand unserer Ergebnisse von untergeordneter Bedeutung bleiben.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Polymorphismen der Gene des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron-System), insbesondere der Angiotensin-Conversions-Enzym (ACE)-Gen I/D-, der Angiotensinogen (AGT)-Gen-M235T-, und der Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor (AT<sub>1</sub>R)-Gen A1166C-Polymorphismus wurden mit der Progression der renalen Dysfunktion und der arteriellen Hypertonie in Verbindung gebracht. Inwieweit diese einen Einfluss auf die Nierentransplantatfunktion und den Bluthochdruck nach Nierentransplantation ausüben und welchen Einfluss konkurrierende klinische Parameter haben, wurde hier analysiert.

In einem ersten statistischen Ansatz untersuchten wir die Assoziation von RAAS-Genotypen und anderen Faktoren mit der Nierentransplantatfunktion und dem Bluthochdruck bei 229 Patienten (59% Männer, 41% Frauen, mittleres Alter  $48 \pm 13$ ), die von 1998-2001 in unserem Zentrum transplantiert wurden. Die Nierentransplantatfunktion wurde als ECC über die Cockcroft-Formel berechnet. Der maximale Beobachtungszeitraum betrug 54 Monate. In einem zweiten statistischen Ansatz wurden RAAS-Genotypmuster und konkurrierende Faktoren auf den Nierentransplantatfunktionsverlust, definiert als eine GFR  $< 15$  ml/min oder als eine Verschlechterung der Nierenfunktion um zwei Grad nach K/DOQI Kriterien, in einem reduzierten Datensatz von 127 Patienten über einen Zeitraum von 9 Monaten, analysiert. Die Prävalenz der verschiedenen Genotypen wurde mit einer gesunden Kontrollgruppe mit normaler Nierenfunktion verglichen. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR, ggf. mit anschließender Restriktionsfragment Längen-Polymorphismus-Analyse.

Die Genotypfrequenzen entsprachen denjenigen der gesunden Kontrollgruppe. Im ersten statistischen Ansatz war nur der ACE-Gen DD Genotyp mit einer schlechteren Transplantatfunktion assoziiert. Ein Einfluss der Polymorphismen auf den Bluthochdruck wurde nicht ermittelt. Die kombinierte Analyse der RAAS-Genotypmuster im zweiten statistischen Ansatz, wies der Genotyp-Kombination ID-CC eine protektive Wirkung zu. In beiden statistischen Ansätzen zeigte sich ebenfalls ein Einfluss anderer geprüfter klinischer Parameter auf die Nierentransplantatfunktion.

Insgesamt muss der Einfluss der RAAS-Polymorphismen auf die Nierentransplantatfunktion dem der konkurrierenden Faktoren eher untergeordnet werden. Es fand sich ein nachteiliger Einfluss des D-Allels, welches mit erhöhten ACE-Serumspiegeln assoziiert ist, auf die Nierentransplantatfunktion, nicht aber auf den Bluthochdruck. Eine Therapie mit ACE-Hemmern und/oder AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonisten wirkte sich im Gesamtkollektiv unserer Patienten jedoch nicht positiv auf die Transplantatfunktion aus. Ein Screening der RAAS-Polymorphismen vor NTX hat hiernach keine klinische Konsequenz.

---

## 6 DANKSAGUNG

An dieser Stelle danke ich all denjenigen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. med. B. Grabensee, Frau Professor Dr. med. K. Ivens und Frau PD Dr. med. C. Blume für die Überlassung eines spannenden, anspruchsvollen und zeitgemäßen Dissertationsthemas. Frau PD Dr. med. C. Blume danke ich besonders für die hervorragende Unterstützung und für die interessanten Gespräche, Diskussionen und Beratung in den Detailspekten der Arbeit.

An dieser Stelle danke ich besonders auch Frau N. Kuhr für die hervorragende Einweisung und Zusammenarbeit im Labor. Herrn Dr. rer. nat. R. Willers und Herrn Ass. Professor Dr. med. A. Mondry gilt mein besonderer Dank für die sehr kompetente Unterstützung in der statistischen Auswertung der Arbeit.

Mein ganz herzlicher Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden. Ich danke ganz besonders meinem Mann Holger für die Unterstützung, Hilfe, Motivation und meinen Kindern Mikolaj und Christof und Anna für ihre Geduld, ihr Lachen und Motivation; Mamusi i Tatusiowi, Natalia und Janine, Biba für ihre Unterstützung und allen dafür, dass sie da waren für mich. Für alles hier nicht Ausgesprochene danke ich auch.

---

## 7 CURRICULUM VITAE

Magdalena M. Siekierka-Harreis

Adresse: Himmelgeister Landstraße 178  
40589 Düsseldorf  
Email: [siekierk@uni-duesseldorf.de](mailto:siekierk@uni-duesseldorf.de)

Geburtsdatum: 07.06.1974

Geburtsort: Kraków, Polen

Familienstand: verheiratet

Kinder: Mikolaj und Christof und Anna

### **Schulbildung:**

1981-1983 Grundschule in Kraków, Polen

1983-1984 Grundschule in Düsseldorf

1984-1993 St. Ursula-Gymnasium in Düsseldorf

„Medizin-Test“ 88,5 %

1993 bestes Abitur (Note 1,2) 1993 St. Ursula-Gymnasium  
Vorschlag seitens der Schule für Stipendium der  
„Studienstiftung des Deutschen Volkes“

### **Universitätsausbildung:**

WS 93/94- SoSe 1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Universität René Descartes, CHU Cochin Paris V,  
Paris, Frankreich

WS 95/96 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-  
Universität Düsseldorf

09/97 Physikum

09/98 I Staatsexamen

09/01 II Staatsexamen

11/03 III Staatsexamen

### **Berufliche Laufbahn:**

Seit 12.01.2004 Assistenzärztin an der Klinik für Nephrologie,  
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

01.10.2004 Erteilung der Approbation als Ärztin

Düsseldorf, den

---

## 8 ANHANG

### 8.1 K/DOQI-Stadien der Nierenfunktion [GFR in ml/min] [129]:

| Stadium | GFR          |                                       |
|---------|--------------|---------------------------------------|
| 1       | >89 ml/min   | Normale Nierenfunktion                |
| 2       | 60-89 ml/min | Milde Nierenfunktionseinschränkung    |
| 3       | 30-59 ml/min | Moderate Nierenfunktionseinschränkung |
| 4       | 15-29 ml/min | Schwere Nierenfunktionseinschränkung  |
| 5       | < 15 ml/min  | Chronisches Nierenversagen            |

## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1-1: Schaubild zur Veranschaulichung der Fragestellung. ....                                                                                                                                                                                            | 11 |
| Abbildung 2-1: Darstellung der Häufigkeiten der unserem Patientenkollektiv zugrunde liegenden Nierengrunderkrankung. ....                                                                                                                                         | 17 |
| Abbildung 2-2: Verteilung der warmen und kalten Ischämiezeit. ....                                                                                                                                                                                                | 18 |
| Abbildung 2-3: Verteilung der Anzahl der HLA-Mismatches und der Dauer des Krankenhausaufenthaltes. ....                                                                                                                                                           | 19 |
| Abbildung 2-4: Schemenhafte Darstellung des Ablaufs einer PCR (Polymerasenkettenreaktion) [aus MS Encarta 1998, Microsoft Illustration]....                                                                                                                       | 23 |
| Abbildung 2-5: ACE-Gen I/D-Polymorphismus. Darstellung der PCR-Produkte von 16 Patienten und 4 Kontrollen (II, DI, DD, Negativkontrolle = neg) in der Gelelektrophorese; I-Allel bei 597 bp, D-Allel bei 310 bp. ....                                             | 25 |
| Abbildung 2-6: ACE-Gen I/D-Polymorphismus. I-spezifische PCR: Darstellung von 5 Patienten Genotypen (alle weisen den DD-Genotyp auf) und 4 Kontrollproben. ....                                                                                                   | 26 |
| Abbildung 2-7: Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus: Darstellung des primären PCR-Produktes von 104 bp von 16 Patienten und 4 Kontrollen (MM, MT, TT, Negativkontrolle = neg) in der Gelelektrophorese. ....                                            | 27 |
| Abbildung 2-8: Angiotensinogen (AGT)-Gen M235T-Polymorphismus: Darstellung der Genotypen nach Restriktionsenzymverdau mit MSPI bei 16 Patienten und 4 Kontrollen (MM, MT, TT, Negativkontrolle = neg) in der Gelelektrophorese. .                                 | 28 |
| Abbildung 2-9: Angiotensin II-Typ1 Rezeptor (AT <sub>1</sub> R) A1166C-Polymorphismus: Amplifikation eines 856 bp langen Fragments bei 16 Patienten, 4 Kontrollen (AA, AC, CC, Negativkontrolle = neg).....                                                       | 29 |
| Abbildung 2-10: Angiotensin II-Typ1 Rezeptor (AT <sub>1</sub> R)-Gen A1166C Polymorphismus: Darstellung der Genotypen nach Restriktionsenzymverdau mit DdeI bei 16 Patienten und 4 Kontrollen (AA, AC, CC, Negativkontrolle = neg) in der Gelelektrophorese. .... | 30 |
| Abbildung 2-11: Veranschaulichung der KNN-Methode [überarbeitet nach D. Claus, Computer Vision Reading Group, Oxford 2004] .....                                                                                                                                  | 37 |
| Abbildung 3-1: Darstellung des Prinzips der Auswertung.....                                                                                                                                                                                                       | 39 |
| Abbildung 3-2: Zeitlicher Verlauf der Transplantatfunktion (ECC, ermittelt nach der Cockcroft-Formel) für die Genotypen des ACE-Gen I/D-Polymorphismus.....                                                                                                       | 41 |
| Abbildung 3-3: Zeitlicher Verlauf der Transplantatfunktion (ECC, ermittelt nach der Cockcroft-Formel) für die Genotypen des AGT M235T-Polymorphismus.....                                                                                                         | 42 |
| Abbildung 3-4: Zeitlicher Verlauf der Transplantatfunktion (ECC, ermittelt nach der Cockcroft-Formel) für die Genotypen des AT <sub>1</sub> R A1166C-Polymorphismus. ....                                                                                         | 43 |
| Abbildung 3-5: Zeitlicher Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD in mmHg) bei den Genotypen DD, DI, DI nach Nierentransplantation. ....                                                                                                                | 45 |
| Abbildung 3-6: Zeitlicher Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD in mmHg) bei den Genotypen TT, MT, MM nach Nierentransplantation.....                                                                                                                 | 46 |
| Abbildung 3-7: Zeitlicher Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD in mmHg) bei den Genotypen CC, AC, AA nach Nierentransplantation. ....                                                                                                                | 47 |
| Abbildung 3-8: Summe der Antihypertensiva im Beobachtungszeitraum von 54 Monaten nach Nierentransplantation der drei Genotypen des ACE-Gen I/D-Polymorphismus. ....                                                                                               | 49 |
| Abbildung 3-9: Summe der Antihypertensiva im Beobachtungszeitraum von 54 Monaten nach Nierentransplantation der drei Genotypen des Angiotensinogen M235T-Polymorphismus. ....                                                                                     | 50 |

|                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 3-10: Summe der Antihypertensiva im Beobachtungszeitraum von 54 Monaten nach Nierentransplantation bei den drei Genotypen des Angiotensin II-Typ 1-Rezeptor-A1166C Polymorphismus.....                                                      | 51 |
| Abbildung 3-11: ACE-Gen I/D-Polymorphismus: Varianzanalyse (ANOVA) für den Verlauf der ECC aufgeteilt nach den Genotypen DD versus DI/II. ....                                                                                                        | 53 |
| Abbildung 3-12: Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus: Varianzanalyse (ANOVA) für den Verlauf der ECC aufgeteilt nach den Genotypen TT versus MM/MT. ....                                                                                          | 54 |
| Abbildung 3-13: AT <sub>1</sub> R-A1166C-Polymorphismus: Varianzanalyse (ANOVA) für den Verlauf der ECC aufgeteilt nach den Genotypen CC versus AA/AC. ....                                                                                           | 55 |
| Abbildung 3-14: ANOVA: Verlauf der Proteinurie.....                                                                                                                                                                                                   | 57 |
| Abbildung 3-15: ANOVA: Verlauf der Gesamtcholesterinkonzentration.....                                                                                                                                                                                | 57 |
| Abbildung 3-16: ANOVA: Verlauf der TG-Konzentration.....                                                                                                                                                                                              | 58 |
| Abbildung 3-17: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster für die Allelkombination ID-CC.....                                                                                                                                          | 61 |
| Abbildung 3-18: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster. Die Allelkombination ID-TM-CC findet sich bei 5 Patienten. Hier ging im Beobachtungszeitraum von 48 Monaten kein Transplantat verloren (statistisch nicht signifikant)..... | 62 |
| Abbildung 3-19: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster. Die Allelkombination ID-MM-CC findet sich bei 4 Patienten. Hier ging im Beobachtungszeitraum von 48 Monaten kein Transplantat verloren (statistisch nicht signifikant)..... | 62 |
| Abbildung 3-20: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster. Die Allelkombination DD-AA findet sich bei 27 Patienten. Hier gingen im Beobachtungszeitraum von 48 Monaten 7 Transplantate verloren (statistisch nicht signifikant).....   | 63 |
| Abbildung 3-21: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster. Die Allelkombination MM-CC findet sich bei 8 Patienten. Hier ging im Beobachtungszeitraum von 48 Monaten ein Transplantat verloren.....                                     | 63 |
| Abbildung 3-22: Kaplan-Meier-Analyse der kombinierten RAAS-Genotypmuster. Die Allelkombination MM findet sich bei 69 Patienten. Hier gingen im Beobachtungszeitraum von 48 Monaten 17 Transplantate verloren (statistisch nicht signifikant).....     | 64 |
| Abbildung 4-1: Relation zwischen genetischen Faktoren und Determinanten der chronischen Transplantatdysfunktion. Überarbeitet nach: Arya M.Sharma, Joachim Beige and Armin Distler. ....                                                              | 77 |

## 10 TABELLENVERZEICHNIS

|                                                                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1-1: Gründe einer arteriellen Hypertonie nach Nierentransplantation. Überarbeitet nach [55], [71].                                                                                                                     | 6  |
| Tabelle 2-1: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der im "old for old"-Programm transplantierten Patienten.                                                                                                                   | 19 |
| Tabelle 2-2: Häufigkeit und Verteilung der Notwendigkeit einer Dialysetherapie nach Nierentransplantation, unterteilt nach Dauer der Behandlung.                                                                               | 19 |
| Tabelle 2-3: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der an Diabetes mellitus erkrankten Patienten.                                                                                                                              | 20 |
| Tabelle 2-4: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der Patienten, die nach der Nierentransplantation eine arterielle Hypertonie aufwiesen.                                                                                     | 20 |
| Tabelle 2-5: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der Patienten, die nach der Nierentransplantation ein akutes Nierenversagen entwickelten, eingeteilt nach der Dauer des ANV entsprechend unter oder über 3 Monate nach NTX. | 20 |
| Tabelle 2-6: Häufigkeit und prozentuale Verteilung der CMV-Infektionen nach Nierentransplantation.                                                                                                                             | 20 |
| Tabelle 2-7: Übersicht über die genetischen Polymorphismen des RAAS.                                                                                                                                                           | 31 |
| Tabelle 2-8: Alters- und Geschlechtsverteilung des Patienten- und des Kontrollkollektivs.                                                                                                                                      | 32 |
| Tabelle 2-9: Verteilung der Genotypen der RAAS-Polymorphismen in der Patienten- und Kontrollgruppe.                                                                                                                            | 32 |
| Tabelle 2-10: Einteilung der Nierenfunktionseinschränkung nach K/DOQI [129].                                                                                                                                                   | 34 |
| Tabelle 2-11: Genotypkombinationen, die in der statistischen Analyse verwendet wurden (Fortsetzung folgt).                                                                                                                     | 34 |
| Tabelle 2-12: Genotypkombinationen, die in der statistischen Analyse verwendet wurden (Fortsetzung).                                                                                                                           | 35 |
| Tabelle 2-13: Allelkombinationen, die in der statistischen Analyse verwendet wurden.                                                                                                                                           | 36 |
| Tabelle 3-1: Darstellung der mittleren Werte der ECC über das gesamte Patientenkollektiv zu den erhobenen Zeitpunkten.                                                                                                         | 40 |
| Tabelle 3-2: Mittlerer MAD für das gesamte Patientenkollektiv zu den jeweiligen Zeitpunkten der Analyse.                                                                                                                       | 44 |
| Tabelle 3-3: Mittlere Summe der eingenommenen Antihypertensiva für das gesamte Patientenkollektiv zu den jeweils erhobenen Zeitpunkten.                                                                                        | 48 |
| Tabelle 3-4: Zusammenfassung der Ergebnisse.                                                                                                                                                                                   | 52 |
| Tabelle 3-5: ANOVA: kein statistisch signifikanter Einfluss des ACE-Gen I/D-Polymorphismus auf den Verlauf der ECC.                                                                                                            | 53 |
| Tabelle 3-6: ANOVA: kein statistisch signifikanter Einfluss des Angiotensinogen-Gen M235T-Polymorphismus auf den Verlauf der ECC.                                                                                              | 54 |
| Tabelle 3-7: ANOVA: kein statistisch signifikanter Einfluss des AT <sub>1</sub> R-A1166C-Polymorphismus.                                                                                                                       | 55 |
| Tabelle 3-8: ANOVA: Einfluss metabolischer Faktoren auf den Verlauf der ECC.                                                                                                                                                   | 56 |
| Tabelle 3-9: Ergebnisse der ANOVA für den Einfluss von externen Faktoren auf den Verlauf der ECC.                                                                                                                              | 59 |
| Tabelle 3-10: ANOVA: Einfluss von ACE-Hemmern/AT <sub>1</sub> R-Antagonisten auf die ECC.                                                                                                                                      | 59 |
| Tabelle 3-11: Darstellung der 6 Genotyp oder Allelkombinationen, die im Two-sample-proportion-Test einen signifikanten Unterschied zwischen den Patienten mit oder ohne Transplantatdysfunktion zeigten.                       | 60 |
| Tabelle 3-12: Darstellung derjenigen Faktoren, die einen signifikanten Einfluss auf die Transplantatfunktion hatten.                                                                                                           | 65 |

---

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 4-1: Darstellung der möglichen Ursachen der chronischen Transplantatdysfunktion<br>nach C. Blume et al. [131]..... | 67 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

---

## 11 BIBLIOGRAPHIE

1. Hostetter TH: **Chronic transplant rejection.** *Kidney Int* 1994, **46**(1):266-279.
2. Pirsch JD, Ploeg RJ, Gange S, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Sollinger HW, Kalayoglu M, Belzer FO: **Determinants of graft survival after renal transplantation.** *Transplantation* 1996, **61**(11):1581-1586.
3. Paul LC: **Chronic allograft nephropathy: An update.** *Kidney Int* 1999, **56**(3):783-793.
4. Halloran PF, Melk A, Barth C: **Rethinking chronic allograft nephropathy: the concept of accelerated senescence.** *J Am Soc Nephrol* 1999, **10**(1):167-181.
5. Allan JS, Madsen JC: **Recent advances in the immunology of chronic rejection.** *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002, **11**(3):315-321.
6. Kreis HA, Ponticelli C: **Causes of late renal allograft loss: chronic allograft dysfunction, death, and other factors.** *Transplantation* 2001, **71**(11 Suppl):SS5-9.
7. Brenner BM, Meyer TW, Hostetter TH: **Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease.** *N Engl J Med* 1982, **307**(11):652-659.
8. Chiurciu C, Remuzzi G, Ruggenenti P: **Angiotensin-converting enzyme inhibition and renal protection in nondiabetic patients: the data of the meta-analyses.** *J Am Soc Nephrol* 2005, **16** Suppl 1:S58-63.
9. Campbell RC, Ruggenenti P, Remuzzi G: **Halting the progression of chronic nephropathy.** *J Am Soc Nephrol* 2002, **13** Suppl 3:S190-195.
10. Remuzzi G, Ruggenenti P, Perico N: **Chronic renal diseases: renoprotective benefits of renin-angiotensin system inhibition.** *Ann Intern Med* 2002, **136**(8):604-615.
11. Pisoni R, Ruggenenti P, Remuzzi G: **Renoprotective therapy in patients with nondiabetic nephropathies.** *Drugs* 2001, **61**(6):733-745.
12. Remuzzi G, Bertani T: **Pathophysiology of progressive nephropathies.** *N Engl J Med* 1998, **339**(20):1448-1456.
13. Bertani T, Cuttillo F, Zoja C, Broggin M, Remuzzi G: **Tubulo-interstitial lesions mediate renal damage in adriamycin glomerulopathy.** *Kidney Int* 1986, **30**(4):488-496.
14. Bertani T, Zoja C, Abbate M, Rossini M, Remuzzi G: **Age-related nephropathy and proteinuria in rats with intact kidneys exposed to diets with different protein content.** *Lab Invest* 1989, **60**(2):196-204.
15. Abbate M, Benigni A, Bertani T, Remuzzi G: **Nephrotoxicity of increased glomerular protein traffic.** *Nephrol Dial Transplant* 1999, **14**(2):304-312.
16. Abbate M, Zoja C, Morigi M, Rottoli D, Angioletti S, Tomasoni S, Zanchi C, Longaretti L, Donadelli R, Remuzzi G: **Transforming growth factor-beta1 is up-regulated by podocytes in response to excess intraglomerular passage of proteins: a central pathway in progressive glomerulosclerosis.** *Am J Pathol* 2002, **161**(6):2179-2193.
17. Ruggenenti P, Perna A, Remuzzi G: **Retarding progression of chronic renal disease: the neglected issue of residual proteinuria.** *Kidney Int* 2003, **63**(6):2254-2261.
18. Rossing P, Hommel E, Smidt UM, Parving HH: **Impact of arterial blood pressure and albuminuria on the progression of diabetic nephropathy in IDDM patients.** *Diabetes* 1993, **42**(5):715-719.
19. Ruggenenti P, Perna A, Mosconi L, Pisoni R, Remuzzi G: **Urinary protein excretion rate is the best independent predictor of ESRF in non-diabetic proteinuric chronic nephropathies. "Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia" (GISEN).** *Kidney Int* 1998, **53**(5):1209-1216.

20. Boulware LE, Jaar BG, Tarver-Carr ME, Brancati FL, Powe NR: **Screening for proteinuria in US adults: a cost-effectiveness analysis.** *Jama* 2003, **290**(23):3101-3114.
21. Klahr S, Levey AS, Beck GJ, Caggiula AW, Hunsicker L, Kusek JW, Striker G: **The effects of dietary protein restriction and blood-pressure control on the progression of chronic renal disease. Modification of Diet in Renal Disease Study Group.** *N Engl J Med* 1994, **330**(13):877-884.
22. **Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. The GISEN Group (Gruppo Italiano di Studi Epidemiologici in Nefrologia).** *Lancet* 1997, **349**(9069):1857-1863.
23. First MR, Vaidya PN, Maryniak RK, Weiss MA, Munda R, Fidler JP, Penn I, Alexander JW: **Proteinuria following transplantation. Correlation with histopathology and outcome.** *Transplantation* 1984, **38**(6):607-612.
24. Kasiske BL, Kalil RS, Lee HS, Rao KV: **Histopathologic findings associated with a chronic, progressive decline in renal allograft function.** *Kidney Int* 1991, **40**(3):514-524.
25. Kasiske BL, Heim-Duthoy KL, Tortorice KL, Rao KV: **The variable nature of chronic declines in renal allograft function.** *Transplantation* 1991, **51**(2):330-334.
26. Salahudeen AK, Hostetter TH, Raatz SK, Rosenberg ME: **Effects of dietary protein in patients with chronic renal transplant rejection.** *Kidney Int* 1992, **41**(1):183-190.
27. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, Shulman NB, Stamler J: **Blood pressure and end-stage renal disease in men.** *N Engl J Med* 1996, **334**(1):13-18.
28. Kasiske BL, Kalil RS, Ma JZ, Liao M, Keane WF: **Effect of antihypertensive therapy on the kidney in patients with diabetes: a meta-regression analysis.** *Ann Intern Med* 1993, **118**(2):129-138.
29. Ruggenenti P, Perna A, Lesti M, Pisoni R, Mosconi L, Arnoldi F, Ciocca I, Gaspari F, Remuzzi G: **Pretreatment blood pressure reliably predicts progression of chronic nephropathies. GISEN Group.** *Kidney Int* 2000, **58**(5):2093-2101.
30. Klahr S, Schreiner G, Ichikawa I: **The progression of renal disease.** *N Engl J Med* 1988, **318**(25):1657-1666.
31. Moorhead JF, Chan MK, El-Nahas M, Varghese Z: **Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease.** *Lancet* 1982, **2**(8311):1309-1311.
32. Alderson LM, Endemann G, Lindsey S, Pronczuk A, Hoover RL, Hayes KC: **LDL enhances monocyte adhesion to endothelial cells in vitro.** *Am J Pathol* 1986, **123**(2):334-342.
33. Keane WF, Kasiske BL, O'Donnell MP: **Hyperlipidemia and the progression of renal disease.** *Am J Clin Nutr* 1988, **47**(1):157-160.
34. Heifets M, Davis TA, Tegtmeyer E, Klahr S: **Exercise training ameliorates progressive renal disease in rats with subtotal nephrectomy.** *Kidney Int* 1987, **32**(6):815-820.
35. Wanner C, Bartens W, Galle J: **Clinical utility of antilipidemic therapies in chronic renal allograft failure.** *Kidney Int Suppl* 1995, **52**:S60-62.
36. Wanner C, Quaschnig T, Weingarnter K: **Impact of dyslipidaemia in renal transplant recipients.** *Curr Opin Urol* 2000, **10**(2):77-80.
37. Katznelson S: **Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on chronic allograft rejection.** *Kidney Int Suppl* 1999, **71**:S117-121.
38. Kasiske BL, Heim-Duthoy KL, Singer GG, Watschinger B, Germain MJ, Bastani B: **The effects of lipid-lowering agents on acute renal allograft rejection.** *Transplantation* 2001, **72**(2):223-227.

39. Almond PS, Matas A, Gillingham K, Dunn DL, Payne WD, Gores P, Gruessner R, Najarian JS: **Risk factors for chronic rejection in renal allograft recipients.** *Transplantation* 1993, **55**(4):752-756; discussion 756-757.
40. Paul LC, Fellstrom B: **Chronic vascular rejection of the heart and the kidney--have rational treatment options emerged?** *Transplantation* 1992, **53**(6):1169-1179.
41. Tilney NL, Whitley WD, Diamond JR, Kupiec-Weglinski JW, Adams DH: **Chronic rejection--an undefined conundrum.** *Transplantation* 1991, **52**(3):389-398.
42. Takemoto S, Terasaki PI, Cecka JM, Cho YW, Gjertson DW: **Survival of nationally shared, HLA-matched kidney transplants from cadaveric donors. The UNOS Scientific Renal Transplant Registry.** *N Engl J Med* 1992, **327**(12):834-839.
43. Ramos EL, Tisher CC: **Recurrent diseases in the kidney transplant.** *Am J Kidney Dis* 1994, **24**(1):142-154.
44. Myers BD, Newton L: **Cyclosporine-induced chronic nephropathy: an obliterative microvascular renal injury.** *J Am Soc Nephrol* 1991, **2**(2 Suppl 1):S45-52.
45. Snider JF, Hunter DW, Moradian GP, Castaneda-Zuniga WR, Letourneau JG: **Transplant renal artery stenosis: evaluation with duplex sonography.** *Radiology* 1989, **172**(3 Pt 2):1027-1030.
46. Zeier M, Mandelbaum A, Ritz E: **Hypertension in the transplanted patient.** *Nephron* 1998, **80**(3):257-268.
47. Kasiske BL, Vazquez MA, Harmon WE, Brown RS, Danovitch GM, Gaston RS, Roth D, Scandling JD, Singer GG: **Recommendations for the outpatient surveillance of renal transplant recipients. American Society of Transplantation.** *J Am Soc Nephrol* 2000, **11** Suppl 15:S1-86.
48. **1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension. Guidelines Subcommittee.** *J Hypertens* 1999, **17**(2):151-183.
49. Bachy C, Alexandre GP, van Ypersele de Strihou C: **Hypertension after renal transplantation.** *Br Med J* 1976, **2**(6047):1287-1289.
50. Curtis J: **Cyclosporin-induced hypertension.** New York: Raven Press Ltd.; 1990
51. Jarowenko MV, Flechner SM, Van Buren CT, Lorber MI, Kahan BD: **Influence of cyclosporine on posttransplant blood pressure response.** *Am J Kidney Dis* 1987, **10**(2):98-103.
52. Hamilton DV, Carmichael DJ, Evans DB, Calne RY: **Hypertension in renal transplant recipients on cyclosporin A and corticosteroids and azathioprine.** *Transplant Proc* 1982, **14**(3):597-600.
53. van der Schaaf MR, Hene RJ, Floor M, Blankestijn PJ, Koomans HA: **Hypertension after renal transplantation. Calcium channel or converting enzyme blockade?** *Hypertension* 1995, **25**(1):77-81.
54. Ponticelli C, Montagnino G: **Causes of arterial hypertension in kidney transplantation.** *Contrib Nephrol* 1987, **54**:226-230.
55. First MR, Neylan JF, Rocher LL, Tejani A: **Hypertension after renal transplantation.** *J Am Soc Nephrol* 1994, **4**(8 Suppl):S30-36.
56. Martinez-Castelao A, Hueso M, Sanz V, Rejas J, Alsina J, Grinyo JM: **Treatment of hypertension after renal transplantation: long-term efficacy of verapamil, enalapril, and doxazosin.** *Kidney Int Suppl* 1998, **68**:S130-134.
57. Veenstra DL, Best JH, Hornberger J, Sullivan SD, Hricik DE: **Incidence and long-term cost of steroid-related side effects after renal transplantation.** *Am J Kidney Dis* 1999, **33**(5):829-839.
58. Curtis JJ: **Treatment of hypertension in renal allograft patients: does drug selection make a difference?** *Kidney Int Suppl* 1997, **63**:S75-77.

59. Hariharan S, Schroeder TJ, Weiskittel P, Alexander JW, First MR: **Prednisone withdrawal in HLA identical and one haplotype-matched live-related donor and cadaver renal transplant recipients.** *Kidney Int Suppl* 1993, **43**:S30-35.
60. Morales JM, Andres A, Rodriguez Paternina E, Alcazar JM, Montoyo C, Rodicio JL: **Calcium antagonist therapy prevents chronic cyclosporine nephrotoxicity after renal transplantation: a prospective study.** *Transplant Proc* 1992, **24**(1):89-91.
61. Laskow DA, Vincenti F, Neylan JF, Mendez R, Matas AJ: **An open-label, concentration-ranging trial of FK506 in primary kidney transplantation: a report of the United States Multicenter FK506 Kidney Transplant Group.** *Transplantation* 1996, **62**(7):900-905.
62. Moreso F, Seron D, Anunciada AI, Hueso M, Ramon JM, Fulladosa X, Gil-Vernet S, Alsina J, Grinyo JM: **Recipient body surface area as a predictor of posttransplant renal allograft evolution.** *Transplantation* 1998, **65**(5):671-676.
63. Sankari BR, Geisinger M, Zelch M, Brouhard B, Cunningham R, Novick AC: **Post-transplant renal artery stenosis: impact of therapy on long-term kidney function and blood pressure control.** *J Urol* 1996, **155**(6):1860-1864.
64. Rengel M, Gomes-Da-Silva G, Inchaustegui L, Lampreave JL, Robledo R, Echenagusia A, Vallejo JL, Valderrabano F: **Renal artery stenosis after kidney transplantation: diagnostic and therapeutic approach.** *Kidney Int Suppl* 1998, **68**:S99-106.
65. McHugh MI, Tanboga H, Marcen R, Liano F, Robson V, Wilkinson R: **Hypertension following renal transplantation: the role of the host's kidney.** *Q J Med* 1980, **49**(196):395-403.
66. Guidi E, Bianchi G, Dallosta V, Cantaluppi A, Mandelli V, Vallino F, Polli E: **Influence of familial hypertension of the donor on the blood pressure and antihypertensive therapy of kidney graft recipients.** *Nephron* 1982, **30**(4):318-323.
67. Luke RG: **Hypertension in renal transplant recipients.** *Kidney Int* 1987, **31**(4):1024-1037.
68. Luke RG: **Pathophysiology and treatment of posttransplant hypertension.** *J Am Soc Nephrol* 1991, **2**(2 Suppl 1):S37-44.
69. Opelz G, Wujciak T, Ritz E: **Association of chronic kidney graft failure with recipient blood pressure. Collaborative Transplant Study.** *Kidney Int* 1998, **53**(1):217-222.
70. Mange KC, Cizman B, Joffe M, Feldman HI: **Arterial hypertension and renal allograft survival.** *Jama* 2000, **283**(5):633-638.
71. Midtvedt K, Hartmann A: **Hypertension after kidney transplantation: are treatment guidelines emerging?** *Nephrol Dial Transplant* 2002, **17**(7):1166-1169.
72. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: **An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels.** *J Clin Invest* 1990, **86**(4):1343-1346.
73. Mizuiri S, Yoshikawa H, Tanegashima M, Miyagi M, Kobayashi M, Sakai K, Hayashi I, Aikawa A, Ohara T, Hasegawa A: **Renal ACE immunohistochemical localization in NIDDM patients with nephropathy.** *Am J Kidney Dis* 1998, **31**(2):301-307.
74. Danser AH, Schalekamp MA, Bax WA, van den Brink AM, Saxena PR, Riegger GA, Schunkert H: **Angiotensin-converting enzyme in the human heart. Effect of the deletion/insertion polymorphism.** *Circulation* 1995, **92**(6):1387-1388.
75. Costerousse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F: **Angiotensin I-converting enzyme in human circulating mononuclear cells: genetic polymorphism of expression in T-lymphocytes.** *Biochem J* 1993, **290** ( Pt 1):33-40.
76. Nakai K, Itoh C, Miura Y, Nakai K, Syo T, Musya T, Hiramori K: **[Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene associates with increased**

- risk for ischemic heart diseases in the Japanese].** *Rinsho Byori* 1995, **43**(4):347-352.
77. Beohar N, Damaraju S, Prather A, Yu QT, Raizner A, Kleiman NS, Roberts R, Marian AJ: **Angiotensin-I converting enzyme genotype DD is a risk factor for coronary artery disease.** *J Investig Med* 1995, **43**(3):275-280.
78. Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F, Vlietinck R, Fagard R: **The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and cardiovascular-renal risk.** *J Hypertens* 1997, **15**(12 Pt 2):1579-1592.
79. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S *et al*: **Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction.** *Nature* 1992, **359**(6396):641-644.
80. Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL: **A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting enzyme gene with myocardial infarction.** *Circulation* 1996, **94**(4):708-712.
81. Markus HS, Barley J, Lunt R, Bland JM, Jeffery S, Carter ND, Brown MM: **Angiotensin-converting enzyme gene deletion polymorphism. A new risk factor for lacunar stroke but not carotid atheroma.** *Stroke* 1995, **26**(8):1329-1333.
82. Kario K, Kanai N, Saito K, Nago N, Matsuo T, Shimada K: **Ischemic stroke and the gene for angiotensin-converting enzyme in Japanese hypertensives.** *Circulation* 1996, **93**(9):1630-1633.
83. Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GA: **Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy.** *N Engl J Med* 1994, **330**(23):1634-1638.
84. Iwai N, Ohmichi N, Nakamura Y, Kinoshita M: **DD genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy.** *Circulation* 1994, **90**(6):2622-2628.
85. Gharavi AG, Lipkowitz MS, Diamond JA, Jhang JS, Phillips RA: **Deletion polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene is independently associated with left ventricular mass and geometric remodeling in systemic hypertension.** *Am J Cardiol* 1996, **77**(15):1315-1319.
86. Raynolds MV, Bristow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, Taft CS, Perryman MB: **Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy.** *Lancet* 1993, **342**(8879):1073-1075.
87. Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T, Kitajima T, Miyazaki Y, Nagasawa R, Kawaguchi Y, Kubo H, Ichikawa I, Sakai O: **Role of the deletion of polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in the progression and therapeutic responsiveness of IgA nephropathy.** *J Clin Invest* 1995, **96**(5):2162-2169.
88. Harden PN, Geddes C, Rowe PA, McIlroy JH, Boulton-Jones M, Rodger RS, Junor BJ, Briggs JD, Connell JM, Jardine AG: **Polymorphisms in angiotensin-converting-enzyme gene and progression of IgA nephropathy.** *Lancet* 1995, **345**(8964):1540-1542.
89. Bantis C, Ivens K, Kreusser W, Koch M, Klein-Vehne N, Grabensee B, Heering P: **Influence of genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system on IgA nephropathy.** *Am J Nephrol* 2004, **24**(2):258-267.
90. Navis G, de Jong PE, de Zeeuw D: **I/D polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene: a clue to the heterogeneity in the progression of renal disease and in the renal response to therapy?** *Nephrol Dial Transplant* 1997, **12**(6):1097-1100.

91. Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, Dusselier L, Kahl Z, Chaillous L, Halimi S *et al*: **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* 1997, **99**(7):1585-1595.
92. Baboolal K, Ravine D, Daniels J, Williams N, Holmans P, Coles GA, Williams JD: **Association of the angiotensin I converting enzyme gene deletion polymorphism with early onset of ESRF in PKD1 adult polycystic kidney disease.** *Kidney Int* 1997, **52**(3):607-613.
93. van Dijk MA, Peters DJ, Breuning MH, Chang PC: **The angiotensin-converting enzyme genotype and microalbuminuria in autosomal dominant polycystic kidney disease.** *J Am Soc Nephrol* 1999, **10**(9):1916-1920.
94. Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM: **Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension.** *Nat Genet* 1992, **1**(1):72-75.
95. Harrap SB, Davidson HR, Connor JM, Soubrier F, Corvol P, Fraser R, Foy CJ, Watt GC: **The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure.** *Hypertension* 1993, **21**(4):455-460.
96. Higashimori K, Zhao Y, Higaki J, Kamitani A, Katsuya T, Nakura J, Miki T, Mikami H, Ogihara T: **Association analysis of a polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene with essential hypertension in the Japanese population.** *Biochem Biophys Res Commun* 1993, **191**(2):399-404.
97. Broekroelofs J, Stegeman CA, Navis G, Tegzess AM, De Zeeuw D, De Jong PE: **Risk factors for long-term renal survival after renal transplantation: a role for angiotensin-converting enzyme (insertion/deletion) polymorphism?** *J Am Soc Nephrol* 1998, **9**(11):2075-2081.
98. Abdi R, Tran TB, Zee R, Brenner BM, Milford EL: **Angiotensin gene polymorphism as a determinant of posttransplantation renal dysfunction and hypertension.** *Transplantation* 2001, **72**(4):726-729.
99. Beige J, Offermann G, Distler A, Sharma AM: **Angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion genotype and long-term renal allograft survival.** *Nephrol Dial Transplant* 1998, **13**(3):735-738.
100. Beige J, Scherer S, Weber A, Engeli S, Offermann G, Opelz G, Distler A, Sharma AM: **Angiotensin-converting enzyme genotype and renal allograft survival.** *J Am Soc Nephrol* 1997, **8**(8):1319-1323.
101. Yildiz A, Yazici H, Cine N, Akkaya V, Kayacan SM, Sever MS, Erginel-Unaltuna N: **The effect of angiotensin converting enzyme gene polymorphism on chronic allograft dysfunction in living donor renal transplant recipients.** *Clin Transplant* 2002, **16**(3):173-179.
102. Slowinski T, Diehr P, Kleemann P, Fritsche L, Renders L, Budde K, Hauser IA, Neumayer HH, Hoher B: **No association between renin-angiotensin system gene polymorphisms and early and long-term allograft dysfunction in kidney transplant recipients.** *Nephrol Dial Transplant* 2004, **19**(11):2846-2851.
103. Barocci S, Ginevri F, Valente U, Torre F, Gusmano R, Nocera A: **Correlation between angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism and kidney graft long-term outcome in pediatric recipients: a single-center analysis.** *Transplantation* 1999, **67**(4):534-538.
104. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM *et al*: **Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen.** *Cell* 1992, **71**(1):169-180.

105. Isa MN, Boyd E, Morrison N, Harrap S, Clauser E, Connor JM: **Assignment of the human angiotensinogen gene to chromosome 1q42-q43 by nonisotopic in situ hybridization [corrected]**. *Genomics* 1990, **8**(3):598-600.
106. Gaillard-Sanchez I, Mattei MG, Clauser E, Corvol P: **Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene**. *Hum Genet* 1990, **84**(4):341-343.
107. Gaillard I, Clauser E, Corvol P: **Structure of human angiotensinogen gene**. *DNA* 1989, **8**(2):87-99.
108. Fukamizu A, Takahashi S, Seo MS, Tada M, Tanimoto K, Uehara S, Murakami K: **Structure and expression of the human angiotensinogen gene. Identification of a unique and highly active promoter**. *J Biol Chem* 1990, **265**(13):7576-7582.
109. Sealey JE, Gerten-Banes J, Laragh JH: **The renin system: Variations in man measured by radioimmunoassay or bioassay**. *Kidney Int* 1972, **1**(4):240-253.
110. Kamitani A, Rakugi H, Higaki J, Ohishi M, Shi SJ, Takami S, Nakata Y, Higashino Y, Fujii K, Mikami H *et al*: **Enhanced predictability of myocardial infarction in Japanese by combined genotype analysis**. *Hypertension* 1995, **25**(5):950-953.
111. Katsuya T, Koike G, Yee TW, Sharpe N, Jackson R, Norton R, Horiuchi M, Pratt RE, Dzau VJ, MacMahon S: **Association of angiotensinogen gene T235 variant with increased risk of coronary heart disease**. *Lancet* 1995, **345**(8965):1600-1603.
112. Ishigami T, Umemura S, Iwamoto T, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nyuui N, Kimura K, Miyazaki N, Ishii M: **Molecular variant of angiotensinogen gene is associated with coronary atherosclerosis**. *Circulation* 1995, **91**(4):951-954.
113. Winkelmann BR, Russ AP, Nauck M, Klein B, Bohm BO, Maier V, Zotz R, Matheis G, Wolf A, Wieland H *et al*: **Angiotensinogen M235T polymorphism is associated with plasma angiotensinogen and cardiovascular disease**. *Am Heart J* 1999, **137**(4 Pt 1):698-705.
114. Beige J, Weber A, Engeli S, Offermann G, Distler A, Sharma AM: **Angiotensinogen-M235T genotype and post-transplant hypertension**. *Nephrol Dial Transplant* 1996, **11**(8):1538-1541.
115. Prasad GV, Pinnaduwage D, Parkes RK, Midgley J, Balfe JW, Hegele RA, Bull SB, Cole EH, Logan AG: **Angiotensinogen M235T genotype predicts progression in chronic renal allograft dysfunction**. *Transplantation* 2003, **75**(2):209-216.
116. Curnow KM, Pascoe L, White PC: **Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor**. *Mol Endocrinol* 1992, **6**(7):1113-1118.
117. Szpirer C, Riviere M, Szpirer J, Levan G, Guo DF, Iwai N, Inagami T: **Chromosomal assignment of human and rat hypertension candidate genes: type 1 angiotensin II receptor genes and the SA gene**. *J Hypertens* 1993, **11**(9):919-925.
118. Furuta H, Guo DF, Inagami T: **Molecular cloning and sequencing of the gene encoding human angiotensin II type 1 receptor**. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **183**(1):8-13.
119. Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Nakao R, Yanase T, Haji M, Inagami T, Furuta H, Gou DF, Nakamura M *et al*: **Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor**. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, **183**(2):910-916.
120. Guo DF, Furuta H, Mizukoshi M, Inagami T: **The genomic organization of human angiotensin II type 1 receptor**. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, **200**(1):313-319.
121. van Geel PP, Pinto YM, Voors AA, Buikema H, Oosterga M, Crijns HJ, van Gilst WH: **Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism is associated with an increased response to angiotensin II in human arteries**. *Hypertension* 2000, **35**(3):717-721.

122. Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tired L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F: **Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension.** *Hypertension* 1994, **24**(1):63-69.
123. Fatini C, Abbate R, Pepe G, Battaglini B, Gensini F, Ruggiano G, Gensini GF, Guazzelli R: **Searching for a better assessment of the individual coronary risk profile. The role of angiotensin-converting enzyme, angiotensin II type 1 receptor and angiotensinogen gene polymorphisms.** *Eur Heart J* 2000, **21**(8):633-638.
124. Alvarez R, Reguero JR, Batalla A, Iglesias-Cubero G, Cortina A, Alvarez V, Coto E: **Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease.** *Cardiovasc Res* 1998, **40**(2):375-379.
125. Nakauchi Y, Suehiro T, Yamamoto M, Yasuoka N, Arii K, Kumon Y, Hamashige N, Hashimoto K: **Significance of angiotensin I-converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms as risk factors for coronary heart disease.** *Atherosclerosis* 1996, **125**(2):161-169.
126. Gardemann A, Nguyen QD, Humme J, Stricker J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Rau M, Haberbosch W: **Angiotensin II type 1 receptor A1166C gene polymorphism. Absence of an association with the risk of coronary artery disease and myocardial infarction and of a synergistic effect with angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on the risk of these diseases.** *Eur Heart J* 1998, **19**(11):1657-1665.
127. Hamon M, Amant C, Bauters C, Richard F, Helbecque N, McFadden E, Lablanche JM, Bertrand M, Amouyel P: **Association of angiotensin converting enzyme and angiotensin II type 1 receptor genotypes with left ventricular function and mass in patients with angiographically normal coronary arteries.** *Heart* 1997, **77**(6):502-505.
128. Sasaki K, Murohara T, Ikeda H, Sugaya T, Shimada T, Shintani S, Imaizumi T: **Evidence for the importance of angiotensin II type 1 receptor in ischemia-induced angiogenesis.** *J Clin Invest* 2002, **109**(5):603-611.
129. Foundation. NK: **K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification.** *Am J Kidney Dis* 2002, **39**:S1-S246.
130. Schweitzer EJ, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Gores PF, Dunn DL, Sutherland DE, Najarian JS: **Causes of renal allograft loss. Progress in the 1980s, challenges for the 1990s.** *Ann Surg* 1991, **214**(6):679-688.
131. C. Blume CEK, U. Helmchen, B. Grabensee: **Chronische Transplantatdysfunktion.** *Der Nephrologe* 2006, **1**(4/November):241-254.
132. Basset el EA, Berthoux P, Cecillon S, Deprle C, Thibaudin D, De Filippis JP, Alamar-tin E, Berthou F: **Hypertension after renal transplantation and polymorphism of genes involved in essential hypertension: ACE, AGT, AT1 R and ecNOS.** *Clin Nephrol* 2002, **57**(3):192-200.
133. Nicod J, Richard A, Frey FJ, Ferrari P: **Recipient RAS gene variants and renal allograft function.** *Transplantation* 2002, **73**(6):960-965.
134. Akcay A, Sezer S, Ozdemir FN, Arat Z, Atac FB, Verdi H, Colak T, Haberal M: **Association of the genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system and endothelial nitric oxide synthase with chronic renal transplant dysfunction.** *Transplantation* 2004, **78**(6):892-898.
135. B C: **Pathology of the renal allograft.** Philadelphia: Lippincott; 1989.
136. Bresticker M, Nelson J, Huang C, Wolf J, Anderson B: **Plasma renin activity in renal transplant patients with hypertension.** *Am J Hypertens* 1991, **4**(7 Pt 1):623-626.

137. Blumenfeld JD, Catanzaro DF, Kinkhabwala M, Cheigh J, Hartono C, Serur D, Kapur S, Stubenbord WT, Haschemeyer R, Riggio R: **Renin system activation and delayed function of the renal transplant.** *Am J Hypertens* 2001, **14**(12):1270-1272.
138. Wolf G, Neilson EG: **Angiotensin II as a renal growth factor.** *J Am Soc Nephrol* 1993, **3**(9):1531-1540.
139. Benediktsson H, Chea R, Davidoff A, Paul LC: **Antihypertensive drug treatment in chronic renal allograft rejection in the rat. Effect on structure and function.** *Transplantation* 1996, **62**(11):1634-1642.
140. Amuchastegui SC, Azzollini N, Mister M, Pezzotta A, Perico N, Remuzzi G: **Chronic allograft nephropathy in the rat is improved by angiotensin II receptor blockade but not by calcium channel antagonism.** *J Am Soc Nephrol* 1998, **9**(10):1948-1955.
141. Szabo A, Lutz J, Schleimer K, Antus B, Hamar P, Philipp T, Heemann U: **Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on growth factor mRNA in chronic renal allograft rejection in the rat.** *Kidney Int* 2000, **57**(3):982-991.
142. Barnas U, Schmidt A, Haas M, Oberbauer R, Mayer G: **The effects of prolonged angiotensin-converting enzyme inhibition on excretory kidney function and proteinuria in renal allograft recipients with chronic progressive transplant failure.** *Nephrol Dial Transplant* 1996, **11**(9):1822-1824.
143. Ayed K, Ayed-Jendoubi S, Ben Abdallah T, Bardi R, Gorgi Y, Sfar I, Dhrif B, Abderahim E, Kheder A: **Polymorphism of the renin-angiotensin-aldosterone system in patients with chronic allograft dysfunction.** *Transpl Immunol* 2006, **15**(4):303-309.
144. Gray JR, Kasiske BL: **Patient and renal allograft survival in the late posttransplant period.** *Semin Nephrol* 1992, **12**(4):343-352.
145. Moore R, Thomas D, Morgan E, Wheeler D, Griffin P, Salaman J, Rees A: **Abnormal lipid and lipoprotein profiles following renal transplantation.** *Transplant Proc* 1993, **25**(1 Pt 2):1060-1061.
146. Matas AJ, Gillingham KJ, Elick BA, Dunn DL, Gruessner RW, Payne WD, Sutherland DE, Najarian JS: **Risk factors for prolonged hospitalization after kidney transplants.** *Clin Transplant* 1997, **11**(4):259-264.
147. Chertow GM, Brenner BM, Mackenzie HS, Milford EL: **Non-immunologic predictors of chronic renal allograft failure: data from the United Network of Organ Sharing.** *Kidney Int Suppl* 1995, **52**:S48-51.
148. Opelz G, Mytilineos J, Wujciak T, Schwarz V, Back D: **Current status of HLA matching in renal transplantation. The Collaborative Transplant Study.** *Clin Invest* 1992, **70**(9):767-772.
149. Opelz G, Wujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J: **HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study.** *Rev Immunogenet* 1999, **1**(3):334-342.
150. Humar A, Ramcharan T, Kandaswamy R, Gillingham K, Payne WD, Matas AJ: **Risk factors for slow graft function after kidney transplants: a multivariate analysis.** *Clin Transplant* 2002, **16**(6):425-429.
151. Reischig T, Jindra P, Svecova M, Kormunda S, Opatrny K, Jr., Treska V: **The impact of cytomegalovirus disease and asymptomatic infection on acute renal allograft rejection.** *J Clin Virol* 2006, **36**(2):146-151.
152. Becker BN, Becker YT, Levenson GE, Simmons WD, Sollinger HW, Pirsch JD: **Reassessing the impact of cytomegalovirus infection in kidney and kidney-pancreas transplantation.** *Am J Kidney Dis* 2002, **39**(5):1088-1095.
153. Ricart MJ, Malaise J, Moreno A, Crespo M, Fernandez-Cruz L: **Cytomegalovirus: occurrence, severity, and effect on graft survival in simultaneous pancreas-kidney transplantation.** *Nephrol Dial Transplant* 2005, **20** Suppl 2:ii25-ii32, ii62.

- 
154. Abbott KC, Hypolite IO, Viola R, Poropatich RK, Hsieh P, Cruess D, Hawkes CA, Agodoa LY: **Hospitalizations for cytomegalovirus disease after renal transplantation in the United States.** *Ann Epidemiol* 2002, **12**(6):402-409.
  155. Parzanese I, Maccarone D, Caniglia L, Pisani F, Mazzotta C, Rizza V, Famulari A: **Risk factors that can influence kidney transplant outcome.** *Transplant Proc* 2006, **38**(4):1022-1023.
  156. Matas AJ, Gillingham KJ, Humar A, Dunn DL, Sutherland DE, Najarian JS: **Immunologic and nonimmunologic factors: different risks for cadaver and living donor transplantation.** *Transplantation* 2000, **69**(1):54-58.
  157. McLaren AJ, Jassem W, Gray DW, Fuggle SV, Welsh KI, Morris PJ: **Delayed graft function: risk factors and the relative effects of early function and acute rejection on long-term survival in cadaveric renal transplantation.** *Clin Transplant* 1999, **13**(3):266-272.
  158. Shoskes DA, Cecka JM: **Effect of delayed graft function on short- and long-term kidney graft survival.** *Clin Transpl* 1997:297-303.
  159. Shoskes DA, Cecka JM: **Deleterious effects of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection.** *Transplantation* 1998, **66**(12):1697-1701.
  160. Gjertson DW: **Impact of delayed graft function and acute rejection on kidney graft survival.** *Clin Transpl* 2000:467-480.
  161. Pfaff WW, Howard RJ, Patton PR, Adams VR, Rosen CB, Reed AI: **Delayed graft function after renal transplantation.** *Transplantation* 1998, **65**(2):219-223.
  162. Kim SJ, Prasad GV, Huang M, Nash MM, Famure O, Park J, Thenganatt MA, Chowdhury N, Cole EH, Fenton SS *et al*: **A comparison of the effects of C2-cyclosporine and C0-tacrolimus on renal function and cardiovascular risk factors in kidney transplant recipients.** *Transplantation* 2006, **82**(7):924-930.
  163. Peng LK, Xie XB, Peng FH, Wang Y, Jiang Y, Lan GB, Fang CH, Nie MH: **[Slowing progression of chronic allograft nephropathy by conversion from cyclosporin A to tacrolimus].** *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2007, **32**(1):59-62.
  164. Johnson C, Ahsan N, Gonwa T, Halloran P, Stegall M, Hardy M, Metzger R, Shield C, 3rd, Rocher L, Scandling J *et al*: **Randomized trial of tacrolimus (Prograf) in combination with azathioprine or mycophenolate mofetil versus cyclosporine (Neoral) with mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation.** *Transplantation* 2000, **69**(5):834-841.
  165. Miller J, Mendez R, Pirsch JD, Jensik SC: **Safety and efficacy of tacrolimus in combination with mycophenolate mofetil (MMF) in cadaveric renal transplant recipients. FK506/MMF Dose-Ranging Kidney Transplant Study Group.** *Transplantation* 2000, **69**(5):875-880.
  166. Ahsan N, Johnson C, Gonwa T, Halloran P, Stegall M, Hardy M, Metzger R, Shield C, 3rd, Rocher L, Scandling J *et al*: **Randomized trial of tacrolimus plus mycophenolate mofetil or azathioprine versus cyclosporine oral solution (modified) plus mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation: results at 2 years.** *Transplantation* 2001, **72**(2):245-250.
  167. Gonwa T, Johnson C, Ahsan N, Alfrey EJ, Halloran P, Stegall M, Hardy M, Metzger R, Shield C, 3rd, Rocher L *et al*: **Randomized trial of tacrolimus + mycophenolate mofetil or azathioprine versus cyclosporine + mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation: results at three years.** *Transplantation* 2003, **75**(12):2048-2053.
  168. Filler G: **Calcineurin inhibitors in pediatric renal transplant recipients.** *Paediatr Drugs* 2007, **9**(3):165-174.

- 
169. Spencer CM, Goa KL, Gillis JC: **Tacrolimus. An update of its pharmacology and clinical efficacy in the management of organ transplantation.** *Drugs* 1997, **54**(6):925-975.
  170. Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL: **Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)1 in organ transplantation.** *Drugs* 2001, **61**(13):1957-2016.
  171. Schwarz C, Regele H, Huttary N, Wahrmann M, Exner M, Nagy-Bojarsky K, Kletzmayer J, Horl WH, Bohmig GA: **Rescue therapy with tacrolimus and mycophenolate mofetil does not prevent deterioration of graft function in C4d-positive chronic allograft nephropathy.** *Wien Klin Wochenschr* 2006, **118**(13-14):397-404.
  172. Tanabe K: **Calcineurin inhibitors in renal transplantation: what is the best option?** *Drugs* 2003, **63**(15):1535-1548.
  173. Scott LJ, McKeage K, Kean SJ, Plosker GL: **Tacrolimus: a further update of its use in the management of organ transplantation.** *Drugs* 2003, **63**(12):1247-1297.
  174. Vincenti F, Ramos E, Brattstrom C, Cho S, Ekberg H, Grinyo J, Johnson R, Kuypers D, Stuart F, Khanna A *et al*: **Multicenter trial exploring calcineurin inhibitors avoidance in renal transplantation.** *Transplantation* 2001, **71**(9):1282-1287.
  175. Barbari AG, Stephan AG, Masri MA: **Calcineurin inhibitor-free protocols: risks and benefits.** *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2007, **18**(1):1-23.
  176. Bestard O, Cruzado JM, Grinyo JM: **Calcineurin-inhibitor-sparing immunosuppressive protocols.** *Transplant Proc* 2005, **37**(9):3729-3732.
  177. Guerra G, Srinivas TR, Meier-Kriesche HU: **Calcineurin inhibitor-free immunosuppression in kidney transplantation.** *Transpl Int* 2007.
  178. Tonshoff B, Hocker B: **Treatment strategies in pediatric solid organ transplant recipients with calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity.** *Pediatr Transplant* 2006, **10**(6):721-729.
  179. Flechner SM: **Minimizing calcineurin inhibitor drugs in renal transplantation.** *Transplant Proc* 2003, **35**(3 Suppl):118S-121S.
  180. Woodroffe R, Yao GL, Meads C, Bayliss S, Ready A, Raftery J, Taylor RS: **Clinical and cost-effectiveness of newer immunosuppressive regimens in renal transplantation: a systematic review and modelling study.** *Health Technol Assess* 2005, **9**(21):1-194.
  181. Moriyama T, Kitamura H, Ochi S, Izumi M, Yokoyama K, Yamauchi A, Ueda N, Kamada T, Imai E: **Association of angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism with susceptibility to antiproteinuric effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitors in patients with proteinuria.** *J Am Soc Nephrol* 1995, **6**(6):1676-1678.
  182. Ha SK, Yong Lee S, Su Park H, Ho Shin J, Jung Kim S, Hun Kim D, Rae Kim K, Yung Lee H, Suk Han D: **ACE DD genotype is more susceptible than ACE II and ID genotypes to the antiproteinuric effect of ACE inhibitors in patients with proteinuric non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *Nephrol Dial Transplant* 2000, **15**(10):1617-1623.
  183. Perna A, Ruggerenti P, Testa A, Spoto B, Benini R, Misefari V, Remuzzi G, Zoccali C: **ACE genotype and ACE inhibitors induced renoprotection in chronic proteinuric nephropathies1.** *Kidney Int* 2000, **57**(1):274-281.
  184. van Essen GG, Rensma PL, de Zeeuw D, Sluiter WJ, Scheffer H, Apperloo AJ, de Jong PE: **Association between angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and failure of renoprotective therapy.** *Lancet* 1996, **347**(8994):94-95.
  185. Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Zucchelli P: **Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril**

- on the progression of chronic renal insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med* 1996, 334(15):939-945.**
186. Hou FF, Zhang X, Zhang GH, Xie D, Chen PY, Zhang WR, Jiang JP, Liang M, Wang GB, Liu ZR *et al*: **Efficacy and safety of benazepril for advanced chronic renal insufficiency. *N Engl J Med* 2006, 354(2):131-140.**
187. Maschio G, Alberti D, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Janin G, Zucchelli P: **Angiotensin-converting enzyme inhibitors and kidney protection: the AIPRI trial. The ACE Inhibition in Progressive Renal Insufficiency (AIPRI) Study Group. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999, 33 Suppl 1:S16-20; discussion S41-13.**
188. Ruilope LM, Aldigier JC, Ponticelli C, Oddou-Stock P, Botteri F, Mann JF: **Safety of the combination of valsartan and benazepril in patients with chronic renal disease. European Group for the Investigation of Valsartan in Chronic Renal Disease. *J Hypertens* 2000, 18(1):89-95.**
189. Nakao N, Yoshimura A, Morita H, Takada M, Kayano T, Ideura T: **Combination treatment of angiotensin-II receptor blocker and angiotensin-converting-enzyme inhibitor in non-diabetic renal disease (COOPERATE): a randomised controlled trial. *Lancet* 2003, 361(9352):117-124.**
190. Stigant CE, Cohen J, Vivera M, Zaltzman JS: **ACE inhibitors and angiotensin II antagonists in renal transplantation: an analysis of safety and efficacy. *Am J Kidney Dis* 2000, 35(1):58-63.**
191. Formica RN, Jr., Friedman AL, Lorber MI, Bia MJ: **Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers used for the treatment of hypertension appear to be safe in the early posttransplant period. *Transplant Proc* 2004, 36(9):2675-2678.**
192. Suwelack B, Kempkes-Koch M, Kobelt V, Hillebrand U, Matzkies F, Gerhardt U, Hohage H: **Impact of ACE polymorphism on renal allograft function, blood pressure, and proteinuria under ACE inhibition. *Transplant Proc* 2002, 34(5):1763-1766.**
193. Lorenz M, Billensteiner E, Bodingbauer M, Oberbauer R, Horl WH, Haas M: **The effect of ACE inhibitor and angiotensin II blocker therapy on early posttransplant kidney graft function. *Am J Kidney Dis* 2004, 43(6):1065-1070.**
194. Tutone VK, Mark PB, Stewart GA, Tan CC, Rodger RS, Geddes CC, Jardine AG: **Hypertension, antihypertensive agents and outcomes following renal transplantation. *Clin Transplant* 2005, 19(2):181-192.**
195. Heinze G, Mitterbauer C, Regele H, Kramar R, Winkelmayr WC, Curhan GC, Oberbauer R: **Angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin II type 1 receptor antagonist therapy is associated with prolonged patient and graft survival after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2006, 17(3):889-899.**
196. Zaltzman JS, Nash M, Chiu R, Prasad R: **The benefits of renin-angiotensin blockade in renal transplant recipients with biopsy-proven allograft nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2004, 19(4):940-944.**
197. Premasathian NC, Muehrer R, Brazy PC, Pirsch JD, Becker BN: **Blood pressure control in kidney transplantation: therapeutic implications. *J Hum Hypertens* 2004, 18(12):871-877.**
198. Lin J, Valeri AM, Markowitz GS, D'Agati VD, Cohen DJ, Radhakrishnan J: **Angiotensin converting enzyme inhibition in chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2002, 73(5):783-788.**
199. Requião-Moura LR, Moscoso-Solorzano GT, Franco MF, Ozaki KS, Pacheco-Silva A, Kirsztajn GM, Camara NO: **Prognostic factors associated with poor graft outcomes**

- 
- in renal recipients with post-transplant glomerulonephritis.** *Clin Transplant* 2007, **21**(3):363-370.
200. CTS: **CTS Newsletter**. 2006,4.