UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Abteilung für pädiatrische Nephrologie

Klinikdirektorin: Univ.-Prof. Dr. med. Ania C. Muntau

sKlotho und renaler Phosphatstoffwechsel bei chronisch niereninsuffizienten Kindern und Jugendlichen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Christin Kleinke
aus Rostock

Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.05.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Markus Kemper

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Ralf Oheim

Inhaltsverzeichnis **Seite**

1. Arbeitshypothese und Fragestellung 7

2. Einleitung 8-20

2.1 chronische Niereninsuffizienz und Phosphathomöostase 8

2.2 Definition der CNI und Stadieneinteilung 8

2.3 Epidemiologie der CNI im Kindesalter 9

2.4 CKD-MBD 10

2.5 FGF-23 – Fibroblastenwachstumsfaktor-23 12

2.6 Klotho 12

2.6.1 membrangebundenes Klotho als Kofaktor für FGF-23 13

2.6.2 lösliches Klotho – mehr als ein Kofaktor für FGF-23 15

2.7 FGF-23-Klotho-Achse 16

2.7.1 FGF-23-Klotho-Achse bei chronischer Niereninsuffizienz 18

2.8 Klotho: Inhalt vieler Studien 19

2.9 Zielsetzung der Studie 20

3. Material und Methoden 21-29

3.1 Retrospektive Studie 21

3.1.1 Herkunft des Probenmaterials 21

3.1.2 Votum der Ethikkommission 21

3.1.3 Patientenkollektiv 21

3.1.4 Alters- und Geschlechtsverteilung 21

3.1.5 Grunderkrankungen 22

3.1.6 Medikation der CNI-Patienten 23

3.2 Probengewinnung und – Aufbewahrung 23

3.2.1 Nachweis von sKlotho mittels ELISA 24

3.2.2 Funktionsprinzip des Sandwich ELISAS 24

3.3 Durchführung des ELISAS 25

3.3.1 Herstellung des Standards 25

3.3.2 Messung der Proben 26

3.3.3 Berechnung der Testergebnisse 27

3.4 Bestimmung von FGF-23 27

3.5 Weitere erfasste Parameter 27

3.6 Statistische Auswertung 29

4. Ergebnisse 30-42

4.1 Verteilung der Patienten auf die einzelnen CNI-Stadien 30

4.2 Deskriptive Statistik und Mittelwertsvergleich 30

4.3 Gruppenvergleiche für sKlotho 34

4.4 Korrelationen 37

4.4.1 sKlotho und Alter 37

4.4.2 sKlotho und Serumkreatinin 38

4.4.3 sKlotho und b-ALP 39

4.5 Multivariate Regressionsanalyse 40

4.5.1 Klotho als abhängige Variable 40

4.5.2 FGF-23 als abhängige Variable 40

4.5.3 Serumphosphat als abhängige Variable 41

4.5.4 TPR als abhängige Variable 42

5. Diskussion 43-51

5.1 sKlotho und der Zusammenhang mit der Nierenfunktion 43

5.2 sKlotho und FGF-23 44

5.3 Konzentration von FGF-23 44

5.4 Klotho und sein Zusammenhang mit dem Alter und Phosphat 45

5.5 Einfluss von Vitamin-D auf sKlotho-Werte 46

5.6 Zusammenhang mit b-ALP 47

5.7 sKlotho und das Geschlecht 48

5.8 Qualitätsmerkmale von Querschnittsstudien 49

5.9 Vor- und Nachteile des verwendeten Nachweisverfahrens 49

5.10 Repräsentativität der Studie 51

6. Zusammenfassung 52

7. Abkürzungsverzeichnis 54

8. Literaturverzeichnis 56

9. Danksagung 64

10. Lebenslauf 65

11. Eidesstattliche Versicherung 66

Tabellenverzeichnis **Seite**

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CNI nach Schweregrad 9

Tabelle 2: Geschlechterverteilung der untersuchten Stichprobe 22

Tabelle 3: Grunderkrankungen der CNI-Patienten 22

Tabelle 4: Medikation der Patienten 23

Tabelle 5: Konzentration des Standards 26

Tabelle 6: Patientenanzahl in den einzelnen CNI-Stadien 30

Tabelle 7: Variablen des Knochenstoffwechsels 31

Tabelle 8: multivariate Regression sKlotho als abhängige Variable 40

Tabelle 9: multivariate Regression FGF-23 als abhängige Variable 41

Tabelle 10: multivariate Regression Phosphat als abhängige Variable 42

Tabelle 11: multivariate Regression TPR als abhängige Variable 42

Abbildungsverzeichnis **Seite**

Abbildung 1: Klotho-FGF-23-Rezeptorkomplex 14

Abbildung 2: Möglichkeiten der Entstehung von sKlotho 16

Abbildung 3: Wechselspiel zwischen FGF-23-Klotho-Vitamin-D-PTH 18

Abbildung 4: Sandwich-ELISA nach Zugabe des löslichen Antikörpers 25

Abbildung 5: typische Standardkurve mit Absorption bei 450 nm 27

Abbildung 6: Gruppenvergleich sKlotho Kontrollgruppe vs. CNI 1-5 34

Abbildung 7: Gruppenvergleich sKlotho über alle CNI-Stadien 35

Abbildung 8: Variablen mit signifikanten Mittelwertsunterschieden 36

Abbildung 9: Korrelation zwischen sKlotho und Alter 37

Abbildung 10: Korrelation zwischen sKlotho und Serumkreatinin 38

Abbildung 11: Korrelation zwischen sKlotho b-ALP 39

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Klotho, ein Protein, welches ursprünglich bei der Erforschung von Alterungsprozessen entdeckt wurde (Kuro-o et al. 1997), spielt im Rahmen chronischer Nierenerkrankungen (CNI) eine wesentliche Rolle. Ein derangierter Kalzium- und Phosphatstoffwechsel ist ein Problem, welches bei nahezu allen Patienten mit zunehmender Verschlechterung der Nierenfunktion auftritt (Kemper et al. 2014). Das systemische Krankheitsbild, welches stark zur erhöhten Morbidität und Mortalität der CNI bereits im Kindesalter beiträgt, wird als CKD-MBD (chronic kidney disease mineral and bone disorder) in der Fachliteratur beschrieben (Moe et al. 2006). Klotho beeinflusst als obligater Kofaktor für FGF-23 (Urakawa et al. 2006), einem Vertreter der Phosphatoine sowie unabhängig von diesem, den Kalzium- und Phosphatstoffwechsel maßgeblich (Hu et al. 2010). Die FGF-23-Klotho-Achse hat in den letzten Jahren das pathophysiologische Verständnis der CKD-MBD stark erweitert. FGF-23 vermindert über verschiedene Wege den Phosphatserumspiegel, benötigt aber für seine gewebespezifische Wirkung Klotho.

Ein Anstieg von FGF-23 bereits in frühen Stadien der CNI scheint gesichert. Ob sich der Klothoserumspiegel im Rahmen der CNI gegensätzlich absenkt, ist Gegenstand aktueller klinischer Forschung. Insbesondere im Kindesalter liegen wenige Studienergebnisse zu Höhe der Serumklothowerte sowie ihr Zusammenhang mit der Nierenfunktion und anderen Parameter des Knochenstoffwechsels vor.

Hypothesen:

- Die Konzentration von löslichem Klotho (sKlotho) korreliert mit dem Schweregrad der CNI im Kindesalter
- sKlotho steht mit dem FGF-23-Serumspiegel in Zusammenhang
- sKlotho steht mit etablierten Parametern zur Beurteilung des Knochenstoffwechsels in Zusammenhang

2. Einleitung

2.1 Chronische Niereninsuffizienz (CNI) und Phosphathomöostase

Die Niere ist ein Organ mit vielfältigen Aufgaben für den Organismus. Neben ihrer Entgiftungs- und endokrinologischen Funktion spielt die Niere für die Regulation des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels eine Schlüsselrolle. Erfüllt die Niere im Rahmen einer chronischen Insuffizienz, ganz gleich welcher Genese, diese Aufgabe nicht mehr, zeigen sich eine Vielzahl von Problemen, die die Lebensqualität und die Lebenserwartung der Betroffenen stark einschränken. Insbesondere die gestörte Phosphathomöostase scheint die entscheidende Ursache für die Ausbildung charakteristischer Folgeerkrankungen zu sein, die mit der CNI einhergehen (Shroff 2013). Im Verlauf der CNI beobachtet man einen vorzeitigen Alterungsprozess, der sich durch typische Erkrankungen des älteren Menschen wie Arterioskleose, Knochenstoffwechselstörungen, Wundheilungsstörungen, Sarkopenie, Insulinresistenz und Hypogonadismus (Stenvinkel et al. 2013) zeigt und letztendlich den vorzeitigen Tod der Erkrankten bedingt.

2.2 Definition der CNI und Stadieneinteilung

Von einer chronischen Nierenerkrankungen spricht man laut Leitlinie der National Kidney Foundation DOQI (Disease Outcomes Quality Initative) bei einer dauerhaften Nierenfunktionseinschränkung über mehr als 3 Monate, welche durch eine strukturelle oder funktionelle Störung der Niere mit oder ohne Einschränkung der GFR (glomeruläre Filtratiosrate) bedingt ist oder bei einer Einschränkung der GFR auf unter 60ml/min/1.73 m² über mehr als 3 Monate mit oder ohne Nierenschädigung(Guidelines National Kidney Foundation 2002). Der zeitliche Aspekt gilt nicht für Kinder, die eine Nierenfunktionseinschränkung aufweisen und jünger als 3 Monate sind. Um den Schweregrad der Erkrankung zu beschreiben gibt es die allgemein gebräuchliche Stadieneinteilung der CNI in 5 Schweregrade, wobei das Stadium 3 nochmals genauer in die Stadien 3a und 3b unterteilt werden kann. Maßgeblich für die Einteilung ist die GFR, welche näherungsweise bei Erwachsenen über die CNI-EPI-Formel aus Serumkreatinin, Alter und Geschlecht berechnet wird. Im Kindesalter ist die neue Modifikation der Schwartz-Formel für die GFR-Abschätzung maßgeblich.

Diese bezieht in ihrer gebräuchlichen Kurzform das Serumkreatinin und die Körpergröße ein (Schwartz et al. 2009). Aufgrund physiologischer Reifungsprozesse der Niere ist eine Abschätzung der Nierenfunktion mittels GFR-Bestimmung erst ab einem Alter von 2 Jahren zulässig. Im Stadium 5 der CNI wird meist eine Nierenersatztherapie notwendig, die mit einer Vielzahl von negativen körperlichen und psychosozialen Folgeerscheinungen für die Patienten einhergeht (Hamilton et al. 2018). Einzig kausale Behandlung der CNI im Endstadium ist die Nierentransplantation.

Tabelle 1: Stadieneinteilung der CNI nach Schweregrad

Stadium CNI	eGFR (ml/min/1.73m²)	Bezeichnung
1	≥ 90	Normal bis hoch
2	60-89	Wenig vermindert
3a	45-59	Wenig-moderat vermindert
3b	30-44	Moderat-schwer vermindert
4	15-29	Schwer vermindert
5	≤ 15	Nierenversagen

Stadieneinteilung CKD gemäß KDIGO-Leitlinie 2012

2.3 Epidemiologie der CNI im Kindesalter

Im Kindesalter gibt es wenige Studien, die eine Aussage über die Inzidenz und Prävalenz der Erkrankung über alle CNI-Stadien zulassen, da über viele Jahre nur Patienten, die sich im Endstadium der Erkrankung befanden, erfasst wurden. Es gibt außerdem weltweit gesehen deutliche regionale Unterschiede, was neben unterschiedlichen Prävalenzen auch in einer unterschiedlichen Datenbankpflege und in dem ungleichen Zugang zu Behandlungsressourcen begründet liegen könnte. In Europa geht man nach Auswertung nationaler Datenbanken von einer jährlichen Inzidenz von 11-12 pro Million Kinder derselben Altersstufe in den CNI-Stadien 3-5 und einer Inzidenz von 8 in den CNI-Stadien 4-5 aus (Harambat et al. 2012). Die Prävalenz der CNI über alle Stadien liegt in Europa zwischen 56-75 Erkrankungsfälle pro Million Kinder derselben Altersstufe (Harambat et al. 2012). Ursächlich sind in Industrieländern für 2/3 aller Fälle angeborene Nierenfehlbildungen, als CAKUT (congenital anomalies of kidney and urinary tract) bezeichnet und hereditäre

Nephropathien. Jungen sind hiervon häufiger betroffen als Mädchen. Erworbene Nephropathien, wie Glomerulonephritiden und das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), sind gemeinsam in circa 10-20 Prozent der Fälle ursächlich. In Entwicklungs- und Schwellenländern sind die beiden letzteren jedoch führende Ursache. Weitere 10 Prozent gehen auf Zystinosen zurück (Harambat et al.2012). Obwohl sich in den letzten Jahren die Überlebenswahrscheinlichkeit für Kinder mit CNI erhöht hat, ist die Lebenserwartung von Kindern unter Nierenersatztherapie gegenüber Gleichaltrigen noch immer um das 30fache vermindert (Harambat et al. 2012). Die häufigsten Todesursachen von Kindern im Endstadium der Erkrankung und von Kindern nach Nierentransplantation sind kardiovaskuläre Ereignisse und Infektionen (Groothoff et al. 2002).

2.4 CKD-MBD: Chronic Kidney Disease Mineral and Bone Disorder

Abweichungen im Kalzium- und Phosphatstoffwechsel sowie im Knochenstoffwechsel sind relevante klinische Probleme bei nahezu allen Patienten mit fortgeschrittener CNI (Kemper et al. 2014). Während man früher für alle Störungen dieser Art den Begriff Renale Osteodystrophie (ROD) verwendete, sollte laut DOQI Leitlinie der Begriff ROD nur noch für Störungen der Knochenmorphologie im engeren Sinn verwendet werden (Moe S. et al. 2006). Die ROD selbst umfasst Veränderungen des Knochenumsatzes. Entweder zeigt sich dies in einer Verminderung (Osteomalazie, Knochenverlust, Adynamische Knochenerkrankung) oder Beschleunigung des Knochenumsatzes (Osteitis fibrosa) (Mac Way et al. 2012). Auch Mischformen von erhöhtem und vermindertem Knochenumsatz können auftreten. Besonders im Kindesalter sind diese Knochenveränderungen für die Lebensqualität der Betroffenen einschränkend, resultieren sie doch häufig in Frakturen, Knochendeformitäten und Verzögerungen des Längenwachstums (Hanudel und Salusky 2017). Auch Epiphysenlösungen treten im Rahmen der ROD verstärkt auf, was neben Schmerzen auch zu Gelenkdeformitäten und Wachstumsstörungen an der betroffenen Extremität führen kann (Mehls et al. 1975). Die Häufigkeit gestörter Knochenmineralisation nimmt mit zunehmender Verschlechterung der Nierenfunktion zu und zeigt ihre höchste Prävalenz bei

Dialysepatienten (Wesseling-Perry et al. 2012) und bleibt auch nach Nierentransplantation häufig bestehen (Sanchez et al. 1989).

Der Begriff CKD-MBD bezeichnet hingegen ein breiteres, systemisches Krankheitsbild, welches sich nicht ausschließlich durch Knochenstoffwechselstörungen, sondern auch durch einen derangierten Kalzium- und Phosphatstoffwechsel sowie durch extraskeletale Weichteilverkalkungen und Verkalkungen kardiovaskulärer Strukturen zeigt (Moe S. et al. 2006).

Knochenbiopsien können zwar alle Formen von Knochenumbauprozessen anzeigen, sind allerdings aufgrund der Invasivität der Untersuchung als Verlaufsparameter ungeeignet. Bildgebende Verfahren, wie die weit verbreitete duale-Röntgen-Absorptiometrie (DXA), erlauben im Kindesalter keine verlässlichen Aussagen über Knochendichte und -mineralisation (Bianchi et al. 2010). Die Abschätzung des Frakturrisikos ist anhand der Messwerte nicht verlässlich möglich. Deshalb ist die DXA im Kindesalter ein ungeeignetes Verfahren zur Beurteilung der Knochenmorphologie (Griffin et al. 2012).

Um die systemischen Abweichungen im Kalzium- und Phosphatstoffwechsel möglichst frühzeitig zu erfassen, ist man seit längerer Zeit auf der Suche nach Biomarkern, die zuverlässig eine CKD-MBD bereits in frühen Erkrankungsstadien anzeigen. Neben etablierten Parametern, wie der Messung von Parathormon, Kalzium, Phosphat und Vitamin-D wurden, vor einigen Jahren so genannte Phosphatoine, wie der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-23 (FGF-23) mit seinem Kofaktor Klotho entdeckt, die das pathophysiologische Verständnis der CKD-MBD erweitert haben und die zur Früherkennung der CKD-MBD beitragen könnten (Shimamura et al. 2012, Kitagawa et al. 2013).

Die bisherige Therapie der CKD-MBD umfasst einerseits die diätetische Phosphatrestriktion, andererseits eine stadiengerechte medikamentöse Therapie mit Phosphatbindern, Vitamin-D-Analoga und Calcimimetika. Dennoch lassen sich die Folgen der CKD-MBD besonders in fortgeschrittenen Stadien trotz optimaler, leitliniengerechter Therapie noch nicht zufriedenstellend behandeln. So stellt sich die Frage, ob sich ggf. neue therapeutische Optionen aus der Entdeckung der FGF-23-Klotho-Achse ergeben könnten.

2.5 FGF-23 – Fibroblastenwachstumsfaktor-23

FGF-23, welches zur FGF-19-Familie gehört, reguliert zusammen mit seinem Kofaktor Klotho den Kalzium- und Phosphatstoffwechsel maßgeblich. Erstmals entdeckt wurde FGF-23 bei genetischen Untersuchungen an Patienten, die an autosomal-dominant vererbter hypophosphatämische Rachitis litten (White et al. 2000). Diese Patienten scheiden exzessiv hohe Mengen an Phosphat über den Urin aus, weshalb die Erkrankung auch als Phosphatdiabetes bezeichnet wird. Weiterhin zeigen sich sehr niedrige Serumwerte von aktivem 1,25$(OH)_2$-VitaminD_3 sowie rachitische Knochendeformationen. Die genetische Analyse zeigte, dass die Betroffenen eine missense-Mutation für das FGF-23-Gen tragen. Dieses Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert (Yamashita et al. 2000). Diese Mutation führt zu exzessiv erhöhten FGF-23-Serumwerten. Im Gegensatz dazu entwickelten FGF-23-Knockout-Mäuse, denen das komplette FGF-23-Gen fehlt, ein Hyperphosphatämiesyndrom mit starken extraskelatalen Verkalkungen (Shimada et al. 2004a). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass FGF-23 den Phosphatstoffwechsel beeinflusst. Produziert wird FGF-23 hauptsächlich von Osteozyten und zu einem geringen Anteil von Osteoblasten. FGF-23 kommt als systemischer humoraler Faktor nahezu ubiquitär vor (Urakawa et al. 2006). FGF-23 kann in physiologisch vorkommenden Konzentrationen seinen Rezeptor nicht unabhängig aktivieren (Kuroso et al. 2006), sondern ist auf seinen spezifischen Kofaktor Klotho angewiesen. In den letzten Jahren wurde nachgewiesen, dass FGF-23 in stark erhöhter Konzentration auch unabhängig von Klotho bestimmte Rezeptoren aktivieren kann. Über welche Art der Signaltransduktion dies geschieht, ist jedoch noch fraglich (Grabner und Faul 2016, Faul et al. 2011).

2.6 Klotho

Bereits vor der Entdeckung von FGF-23 entdeckten Kuro-o et al. bei Mäusen, denen ein bestimmtes Gen fehlte, Anzeichen vorzeitiger Alterungsprozesse, wie Arteriosklerose, Unfruchtbarkeit, Hautatrophie, Osteoporose und Wachstumsretardierung. Im Gegensatz dazu alterten Mäuse, die dieses Gen verstärkt exprimieren, weniger schnell und überlebten länger (Kuro-o et al. 1997). Sie benannten das entsprechende Gen, welches offensichtlich

Alterungsprozesse zu steuern schien, nach der griechischen Göttin, die den Lebensfaden spinnt – Klotho. In weiterführenden Untersuchungen an Klotho-Knockout-Mäusen zeigte sich ein gestörter Kalzium- und Phosphatstoffwechsel (Tsujikawa 2003). Es traten eine Hyperphosphatämie und eine Hyperkalziämie sowie Arteriosklerose auf. Eine verminderte Knochendichte, mit einer verringerten Anzahl an Osteoklasten und Osteoblasten, zeigte sich in der Knochenhistologie (Kawaguchi et al. 1999). Diese beobachteten Pathologien entsprachen phänotypisch den Folgeerkrankungen der CNI in fortgeschrittenen Stadien, sodass ein pathophysiologischer Zusammenhang zwischen Klotho und der CNI (Hu et al. 2011) naheliegend war. Das Klotho-Gen, lokalisiert auf Chromosom 13 (Matsmura et al. 1998), besteht aus 5 Exons und kodiert für ein 130-kDa großes Transmembranprotein, welches aus 1012 Aminosäuren besteht (Kuro-o et al. 1997). Es besteht aus einer kurzen transmembranen Domäne und einer extrazellulären Domäne bestehend aus zwei Tandemwiderholungen Kl1 und Kl2. Transmembranöses Klotho weist eine enzymatische Aktivität ähnlich der Familie-1-Glykosidasen auf (Mian 1998).

Die phänotypische Ähnlichkeit zwischen FGF-23- und Klotho-Knockoutmäusen gab den entscheidenden Hinweis, dass diese zwei Faktoren miteinander in Zusammenhang stehen müssen (Razzaque et al. 2006).

2.6.1 Membrangebundenes Klotho als Kofaktor für FGF-23

Es gibt bei Säugern 4 bekannte FGF-Rezeptor-Isoformen. FGF-Rezeptoren sind Rezeptor-Tyrosinkinasen und bestehen aus einer extrazellulären Bindungsdomäne, einer transmembranären Domäne und einer intrazellulär lokalisierten Tyrosinkinasedomäne (Eswarakumar 2005). Alle Typen der FGF-Familie benötigen Korezeptoren, um eine genügende Rezeptoraffinität aufzubauen. Die meisten parakrin wirkenden FGF-Subtypen benötigen Heparin oder Heparansulfat als obligaten Kofaktor (Eswarakumar 2005). Endokrin wirkende FGF, wie FGF-23, haben eine ungenügende Affinität zu Heparin (Goetz et al. 2007). Die Bindung von FGF-23 an seinen Rezeptor erfordert die Anwesenheit von Klotho um eine genügende Rezeptoraffinität aufzubauen (Urakawa et al.2006). Klotho lagert sich mit dem FGF-Rezeptor1-IIIc zusammen und stabilisiert den dimeren Rezeptorkomplex und macht ihn spezifisch für

FGF-23 (Urakawa et al. 2006). Durch Heparin wird die Bindung zwischen Klotho-FGF-Rezeptor1-IIIc und FGF-23 stabilisiert (siehe Abbildung1). In den letzten Jahren gab es eine Vielzahl von Untersuchungen zur Gewebeexpression von Klotho. In hohen Konzentrationen ist membrangebundenes Klotho im distalen und proximalen Tubulus der Niere, im Plexus choroideus und in der Nebenschilddrüse nachweisbar (Li et al. 2004). Dies sind auch die Hauptorte der FGF-23-Wirkung, obwohl FGF-23 und FGFR1 selbst in nahezu allen Geweben exprimiert werden. Geringere Konzentrationen von membranständigem Klotho kommen in Teilen des ZNS, wie Groß- und Kleinhirn sowie Rückenmark (Lim et al. 2015), in Teilen der Retina (Kokkinaki et al. 2015), des Innenohrs (Kamemorooi et al. 2002), des endokrinen Systems wie Pankreas, Hypophyse und Schilddrüse vor (Kuro-o et al. 1997). Ebenfalls nachgewiesen wurde Klotho in der weiblichen Brustdrüse (Wolf I. et al. 2008), in Teilen des Hodens, im Ovar und der Plazenta (Kuro-o et al. 1997), im Sinusknoten (Takeshita et al. 2004) und in Knochenzellen (Komaba et al. 2017). Ob Klotho in Gefäßwänden vorkommt, darüber gibt es uneinheitliche Berichte (Lim et al. 2012, Mencke et al. 2015). Die genaue Höhe der Expression sowie die Wirkung von Klotho in diesen Organen ist allerdings noch fraglich (Olauson et al. 2017).

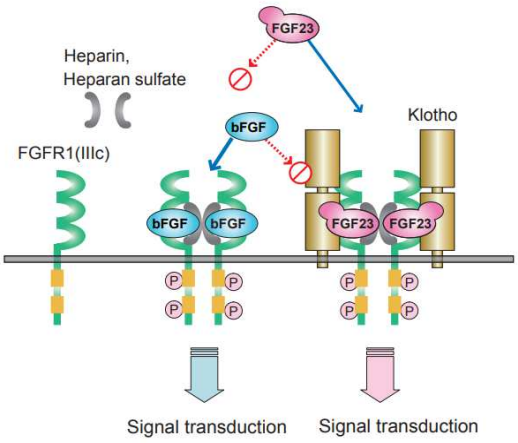

Abbildung 1: Klotho-FGF-23-Rezeptorkomplex

membrangebundenes Klotho bindet sowohl an FGF-23 als auch an den spezifischen Rezeptor (FGFR1IIIc) und stabilisiert diesen Komplex. Dieser Komplex wird durch Heparin weiter stabilisiert. Heparin allein reicht für die Rezeptorbindung allerdings nicht aus. Weitere parakrin wirkende FGF-Subtypen (bFGF) können über den FGFR1(IIIc) wirken und erfordern lediglich die Anwesenheit von Heparin (Urakawa et al. 2006)

2.6.2 Lösliches Klotho – mehr als ein Kofaktor für FGF-23

Neben der membrangebunden Form, gibt es eine lösliche Variante von Klotho, welche als sKlotho (soluble Klotho) bezeichnet wird. Obwohl Klotho in unterschiedlichen Geweben exprimiert wird, ist die Niere die Hauptquelle für sKlotho (Lindberg et al. 2014) und wird von dort in die Zirkulation abgegeben. Nachweisen lässt sich sKlotho in Blut, Urin und Liquor. Weiterhin filtriert die Niere sKlotho und gibt es über die apikale Membran des proximalen Tubulus in den Urin ab (Hu et al. 2015a). Es gibt zwei Mechanismen, die zur Bildung von sKlotho führen (siehe Abbildung 2). Einmal kann durch alternatives RNA-Splicing ein verändertes Gentranskript entstehen, welches für ein lösliches Klotho-Protein, das nur aus der Kl1-Domäne besteht, kodiert (Matsmura et al. 1998). Neueste Studien geben jedoch Hinweise darauf, dass dieses alternative Gentranskript wahrscheinlich nicht funktionsfähig ist (Mencke et al. 2017). Der hauptsächliche Anteil von sKlotho entsteht allerdings durch Spaltung von membranständigem Klotho durch ADAMs-Proteasen in der Niere (Van Loon et al. 2015). Dieses so erzeugte sKlotho besteht entweder aus der Kl1-Domäne (Beta-Cut) oder aus der gesamten extrazellulären Domäne, bestehend aus Kl1 und Kl2 (so genannter Alpha-Cut). Auch sKlotho fungiert als Kofaktor für FGF-23. Anders als membrangebundenes Klotho, stabilisiert sKlotho den FGF-23-FGFR1-Rezeptorkomplex allerdings auf einem nicht-enzymatischen Weg (Chen G. et al. 2018). Die FGF-23-Klotho-Signaltransduktion scheint in gleichem Umfang für sKlotho und für membrangebundenes Klotho zu existieren (Chen G. et al. 2018). Es ist allerdings bisher umstritten, ob die Kl1-Domäne allein den FGF-23-Klotho-Signalweg aktivieren kann oder ob dazu der Alpha-Cut notwendig ist (Chen G. et al. 2018). sKlotho beeinflusst darüber hinaus, unabhängig von FGF-23, eine Vielzahl von Stoffwechselvorgängen (Abramovitz et al.2011). sKlotho kann hierbei als endokriner, parakriner und autokriner Faktor wirken (Hu et al 2010). Nachweislich stimuliert sKlotho bestimmte Kalziumrezeptoren (TRPV5) im distalen Tubulus der Niere und fördert die Kalziumwiederaufnahme aus dem Urin (Chang 2005). Ebenso werden Kaliumkanäle (ROMK) im distalen Tubulus der Niere aktiviert, was zu einer erhöhten renalen Kaliumausscheidung führt (Cha et al. 2009). Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass sKlotho unabhängig von FGF-23 den NaPi2-

Transporter im proximalen Tubulus der Niere hemmt und somit zu einer erhöhten Phosphatausscheidung führt (Hu et al 2010). Der exakte Mechanismus der zellulären Signaltransduktion von sKlotho, unabhängig von FGF-23, ist nach wie vor Gegenstand der Forschung. Es gibt Belege dafür, dass der Insulin-like-Growth-Factor-1-Signalweg von sKlotho beeinflusst wird (Kurosu 2005). Ebenfalls scheint sKlotho den TGF-Beta-Signalweg zu inhibieren (Doi et al. 2011). Weiterhin verlangsamt sKlotho die Zellalterung durch Unterdrückung des Wnt-Signalweges (Liu H. 2007). Ein weiterer Wirkmechanismus von sKlotho könnte sein, dass seine Domänen Kl1 und Kl2 die Möglichkeit haben Sialinsäuren zu binden und diese dann direkt an die äußere Zellmembran zu platzieren (Dalton et al. 2017).

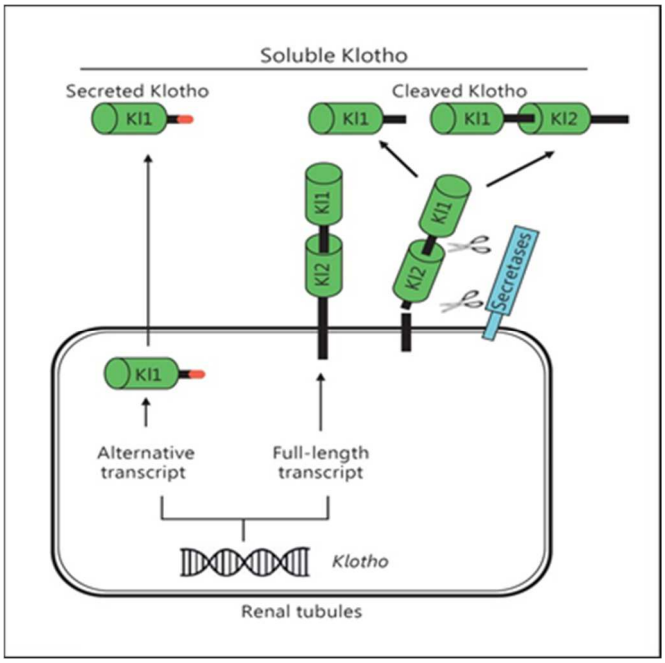

Abbildung 2: Möglichkeiten der Entstehung von sKlotho (Lu und Hu 2017)

2.7 FGF-23-Klotho-Achse

Hauptsächlich reguliert wird der Kalzium-Phosphatstoffwechsel über das Wechselspiel zwischen FGF-23, welches durch Osteozyten und Osteoblasten abgegeben wird, mit seinem Kofaktor Klotho, Vitamin-D, welches den letzten Schritt zur Aktivierung im proximalen Tubulus der Niere erfährt und Parathormon, welches in der Nebenschilddrüse produziert wird. Diese Faktoren stehen in einer wechselseitigen Beziehung zueinander und können nur im Zusammenhang miteinander verstanden werden (siehe Abbildung 3).

Die Ausschüttung von FGF-23 durch die Osteozyten und Osteoblasten wird einerseits durch die Phosphatkonzentration, allerdings auch durch Vitamin-D und Parathormon reguliert (Burnett et al. 2006). Die FGF-23-Klotho-Signaltransduktion senkt über verschiedene Mechanismen den Serumphosphatspiegel. Eine verminderte Phosphat-Rückresorption im proximalen Tubulus der Niere wird durch eine Verringerung der Aktivität des Natrium-Phosphat-Kotransporters 2 (NaPi2a, NaPi2c) erreicht (Shimada et al. 2004b, Andrukhova et al. 2012). Zusätzlich senkt FGF-23-Klotho die Konzentration von aktivem $1,25(OH)_2D_3$ ab, wodurch die Phosphataufnahme weiter reduziert wird. Dies geschieht über 2 Wege: Einerseits wird die Hydroxylierung von inaktivem $25(OH)D_3$ zum aktiven $1,25(OH)_2D_3$ im proximalen Tubulus der Niere durch Herunterregulation bestimmter Steuerungsgene der CYP-Familie verhindert (Shimada et al. 2004b). Andererseits kommt es zum verstärkten Abbau von aktivem Vitamin-D durch Heraufregulation der Aktivität von Hydroxylasen, die aktives Vitamin-D wieder zur inaktiven Form abbauen (Shimada et al. 2004b).

Aktives Vitamin-D führt über Aktivation des intestinalen Vitamin-D-Rezeptors zur Aufnahme von Kalzium und Phosphat über den Darm. Weiterhin bindet es an den Vitamin-D-Rezeptor der Nebenschilddrüse und reguliert die Produktion von Parathormon (PTH) herunter. Das heißt, ein verminderter Spiegel an Vitamin-D, bedingt durch FGF-23-Klotho-Signaltransdurktion, führt zu einer verringerten intestinalen Aufnahme von Kalzium und Phosphat und erhöht die Konzentration von PTH. Neben diesem Mechanismus wird die Ausschüttung von PTH durch die Nebenschilddrüse zusätzlich durch die Höhe des ionisierten Serumkalziums und durch einen direkten negativen Feedback-Mechanismus von FGF-23-Klotho reguliert. PTH bewirkt durch Aktivierung von Osteoklasten eine Mobilisation von Kalzium und Phosphat aus den Knochen. Zusätzlich wird sowohl die intestinale Kalziumaufnahme als auch die renale Kalziumrückresorption erhöht. Gleichzeitig führt PTH zu einer verstärkten Phosphatausscheidung über die Niere.

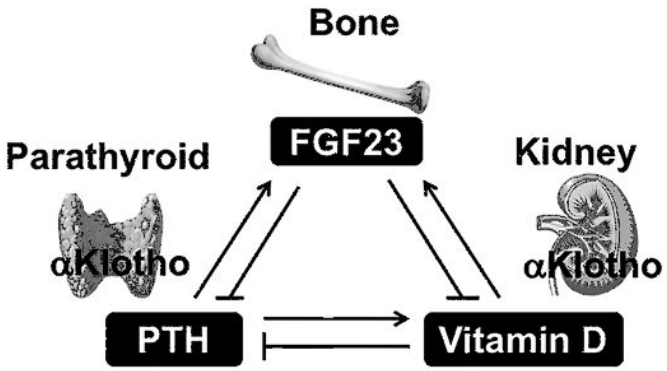

Abbildung 3: Wechselspiel zwischen FGF-23 – Klotho – Vitamin-D – PTH (Kuro-o 2018)

2.7.1 FGF-23-Klotho-Achse bei chronischer Niereninsuffizienz

Eine Disbalance zwischen den körpereigenen Regulationsmechanismen des Phosphatstoffwechsels ist bezeichnend für die CNI im Kindes- und Erwachsenenalter. Studien zeigen, dass FGF-23 bereits in frühen Stadien der CNI ansteigt (Guiterrez 2005). Dies beobachtet man sowohl bei erwachsenen als auch bei pädiatrischen CNI-Patienten (van Husen et al. 2012, Portale et al. 2014), weshalb FGF-23 als früher Biomarker einer CNI geeignet ist. Der Anstieg von FGF-23 ist weiterhin mit der frühen Abnahme des Vitamin-D-Serumspiegels assoziiert (Guiterrez 2005). Zu diesem Zeitpunkt sind die Phosphat- und PTH-Spiegel im Blut normalerweise noch im Normbereich. Bemerkenswert ist, dass die FGF-23-Werte mit zunehmender Verschlechterung der Nierenfunktion sehr stark ansteigen und trotzdem eine Hyperphosphatämie (van Husen et al. 2010) und ein sekundärer Hyperparathyroidismus regelhaft zu beobachten sind. Der sekundäre Hyperparathyroidismus, der durch die stark verringerten Vitamin-D-Spiegel auftritt, bedingt einen erhöhten Knochenumsatz. Es wäre denkbar, dass durch eine Abnahme des Kofaktors Klotho bereits in frühen Stadien der CNI eine FGF-23-Resistenz an den Zielorganen verursacht wird. Das heißt, dass FGF-23 seine physiologische Funktion für den Phosphatstoffwechsel im Rahmen der CNI verliert und trotz erhöhter FGF-23-Konzentrationen eine suffiziente Phosphatausscheidung nicht gelingt. Die auftretende Hyperphosphatämie erhöht die kardiovaskuläre Mortalität als unabhängiger Risikofaktor (Shroff 2013). Darüber hinaus hat FGF-23 selbst in hoher Konzentration einen direkten kardiotoxischen Effekt (Faul C. 2011, Di Marco et al. 2014). Ein Mangel an Klotho wiederum scheint ein unabhängiger

Risikofaktor für das Auftreten von Ateriosklerose (Hu M.C. et al. 2011, Kitagawa et al. 2013), für das Auftreten renaler Fibrose (Doi 2011) und für kardiales Remodelling (Hu M.C. et al. 2015b) im Rahmen der CNI zu sein. Experimentelle sKlotho-Injektionen und Klotho-Gen-Transfer zeigten bei Mäusen eine Verbesserung der endothelialen Dysfunktion (Saito et al. 2000, Chen T.-H. et al. 2013), sodass die gezielte therapeutische Erhöhung der sKlotho-Konzentrationen eine Behandlungsmöglichkeit für die CKD-MBD darstellen könnte. Somit könnte die Konzentration von Klotho die entscheidende Stellschraube in der komplexen Beziehung der Regulationsfaktoren des Kalzium-Phosphatstoffwechsels sein.

2.8 Klotho: Inhalt vieler Studien

Die Studienlage bezüglich des Zusammenhangs der Serumkonzentration von sKlotho mit der Nierenfunktion, den FGF-23-Serumwerten und weiteren Parametern zur Beurteilung des Knochenstoffwechsels ist weiterhin uneinheitlich. Einige klinische Studien an Erwachsenen stützen die Annahme, dass die CNI einen Zustand des Klotho-Mangels darstellt. Sie zeigen eine Abnahme von sKlotho bereits im Frühstadium der Erkrankung (Sakan et al. 2014, Shimamura et al. 2012). Diese frühe sKlotho-Verminderung scheint der Erhöhung von FGF-23, Parathormon und Phosphat vorauszugehen (Barker et al. 2015). Je weiter die CNI fortschreitet, umso geringer war die nachgewiesene Konzentration von sKlotho (Pavik et al. 2013). Im Gegensatz dazu konnten andere klinische Studien an erwachsenen CNI-Patienten keinen Zusammenhang zwischen der Nierenfunktion und der sKlotho-Konzentration feststellen (Scholze et al. 2014, Akimoto et al. 2012, Seiler et al. 2013). Eine im Jahr 2018 erschienene Metaanalyse von Wang et al. wertete 611 bereits publizierte Studien zum Thema Klotho und CNI bei Erwachsenen aus, von diesen wurden 9 Studien in die Metaanalyse eingeschlossen. Hier zeigte sich bei erwachsenen CNI-Patienten ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen der Nierenfunktion und sKlotho (Wang et al. 2018). Bei Kindern wiesen bisher 2 klinische Studien einen positiven Zusammenhang von sKlotho mit der Nierenfunktion nach (Wan et al. 2013, Sawires et al. 2015). Zwischen sKlotho und FGF-23 konnte einerseits bei Erwachsenen im Rahmen der CNI ein stark negativer Zusammenhang nachgewiesen werden (Pavik et al. 2013,

Barker et al. 2015, Wang et al. 2018). Andererseits konnten Sawires et al. im Kindesalter keinen Zusammenhang zwischen FGF-23 und sKlotho-Konzentrationen nachweisen (Sawires et al. 2015).

2.9 Zielsetzung der Studie

Insgesamt gibt es bei pädiatrischen CNI-Patienten einen sehr kleinen Umfang an klinischen Studien, die bisher keine verlässliche Aussage über die Serumkonzentration von sKlotho und seinen Zusammenhang mit weiteren Parametern des Knochenstoffwechsels im Rahmen der CNI zulassen. Diese retrospektive Querschnittsstudie untersucht den Zusammenhang zwischen sKlotho, FGF-23 und weiteren etablierten Parametern zur Beurteilung des Knochenstoffwechsels im Rahmen der CNI. Es soll weiterhin abgeleitet werden, ob die Bestimmung von sKlotho im Serum eine klinische Berechtigung als früher Biomarker der CKD-MBD im Kindesalter hat.

3. Material und Methoden

3.1 Retrospektive Studie

3.1.1 Herkunft des Probenmaterials

Es wurde eine retrospektive Querschnittsstudie durchgeführt. Das Probenmaterial stammt aus einer vorangegangenen Studie, die am Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation (KfH) des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf durchgeführt wurde. Die Proben wurden bis zur Untersuchung bei -30°C tiefgefroren und anonymisiert verwahrt.

3.1.2 Votum der Ethikkommission

Im Rahmen der vorangegangenen Studie, aus welcher die Serumproben stammten, wurde vor Probensammlung ein schriftlicher Antrag bei der Ethikkommission des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf gestellt. Diese willigte in die Studiendurchführung ein. Es erfolgte die mündliche Aufklärung über Studienziel und -durchführung sowie im Anschluss daran das Einholen des schriftlichen Einverständnisses der Erziehungsberechtigten sowie gegebenenfalls der Patienten selbst.

3.1.3 Patientenkollektiv

Es wurden 81 Kinder in den CNI-Stadien 1-5, welche sich im KfH des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf in Behandlung befanden, in die Studie eingeschlossen. Als gesunde Kontrollgruppe wurden 27 Kinder in die Studie aufgenommen, die sich an der Universitätskinderklinik Hamburg Eppendorf wegen anderer Erkrankungen bzw. operativer Eingriffe in ärztlicher Behandlung befanden. In die Kontrollgruppe wurden nur Patienten aufgenommen, die keine Nierenschädigung, akuten Infektionen, malignen oder neurologischen Erkrankungen aufwiesen.

3.1.4 Alters- und Geschlechtsverteilung

Das mittlere Alter der Patienten betrug 10,2 ± 5,3 Jahre. 63 Prozent der Patienten waren männlich, 37 Prozent weiblich.

Tabelle 2: Geschlechterverteilung der untersuchten Stichprobe

		Anzahl	%
Geschlecht	Männlich	51	63
	Weiblich	30	37

3.1.5 Grunderkrankungen

Die Erkrankungen, die zur Entstehung der chronischen Niereninsuffizienz führten, waren in unserem Patientenkollektiv folgendermaßen verteilt: Den Großteil der Grunderkrankungen, 44 Prozent, machten angeborene Anomalien von Nieren- oder Harntrakt aus (CAKUT). Zystennieren und Glomerulonephritiden waren in jeweils 12 Prozent der Fälle ursächlich für die CNI. Kongenitale Nephropathien waren in 10 Prozent der Fälle als Grunderkrankung erfasst. 7 Prozent der CNI-Fälle waren als Folge eines hämolytisch-urämischen Syndroms aufgetreten. 15 Prozent waren andere, nicht gesondert erfasste Ursachen einer CNI.

Tabelle 3: Grunderkrankungen der CNI-Patienten

		n	**%**
Diagnose	Kongenitale Anomalien von Niere oder Harntrakt (Urethralklappen, Prune-Belly-Syndrom, Dysplasien)	36	44
	Zystennieren (autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankung)	10	12
	Glomerulonephritis	10	12
	Kongenitale Nephropathien (Zystinosen, fokal segmentale Glomerulosklerose)	7	10
	hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS)	6	7
	Andere (nicht näher bezeichnet)	12	15

3.1.6 Medikation der CNI Patienten

87% der Patienten wurden mit Vitamin-D-Derivaten behandelt. Davon wurde der größte Teil mit aktivem $1,25(OH)_2D_3$ therapiert, was zur Senkung von Parathormon und somit zur Vermeidung eines sekundären Hyperparathyroidismus beiträgt. Vitamin-D3 wurde zur Behandlung eines Vitamin-D-Mangels verordnet. Kalziumhaltige, wie Kalziumcarbonat, und kalziumfreie Phosphatbinder, wie Sevelamer, kamen zur Senkung der Phosphatspiegel in jeweils 12% der Fälle zum Einsatz. Cinacalcet zur Behandlung des sekundären Hyperparathyroidismus wurde von 6% der CNI-Patienten eingenommen.

Tabelle 4: Medikation der Patienten

Medikament	**n**	**%**
Calcitriol [$1,25(OH)_2D$]	45	55,5
Vitamin-D3 [25(OH)D]	26	32,1
Calciumcarbonat	10	12,3
Sevelamer	10	12,3
Cinacalcet	5	6,2

3.2 Probengewinnung und – Aufbewahrung

Im Rahmen einer klinisch notwenigen, routinemäßigen Blutentnahme wurde ein Serumröhrchen Blut zusätzlich abgenommen. Das Blut wurde im Anschluss 10 Minuten bei 5000/min zentrifugiert und das Serum abpipettiert. Bis zur Durchführung des ELISAs wurden die Serumproben bei -30°C im Laborkühlschrank gelagert. Die weiteren Parameter zur Beurteilung des Knochenstoffwechsels wurden im Rahmen der Blutentnahme routinemäßig mitbestimmt und entsprechen den Empfehlungen der KDIGO zur Behandlung der CKD-MBD im Kindesalter.

3.2.1 Nachweis von sKlotho mittels ELISA

Für den Nachweis von sKlotho in humanem Serum verwendeten wir den Sandwich-ELISA von IBL (Immuno-Biological Laboratories, Japan). Dieses ELISA-Verfahren beruht auf den, von Yamazaki et al. entwickelten, murinen monoklonalen IgG-Antikörpern (67G3 als Fangantikörper und 91F1 als Detektionsantikörper). Mittels dieser Antikörper gelingt sowohl der Nachweis von membrangebundenen als auch von sKlotho. Die monoklonalen Antiköper richten sich dementsprechend gegen eine tertiäre extrazelluläre Proteinstruktur von Klotho (Yamazaki et al. 2010).

3.2.2 Funktionsprinzip des Sandwich-ELISAS

Bei dem verwendeten IBL-ELISA handelt es sich um einen Sandwich-ELISA mit fester Phase.
Auf die immobilisierten murinen Antikörper (Fang- bzw. Capture-Antikörper) der festen Phase wird das Serum hinzugegeben.
Das im Serum enthaltene sKlotho bindet im ersten Schritt als Antigen an den festen Antikörper. Es folgen mehrfache Waschvorgänge, um ungebundenes sKlotho und andere im Serum enthaltene Komponenten zu entfernen. Danach wird ein zweiter hochspezifischer Antikörper (Detektionsantikörper) in löslicher Form hinzugegeben, welcher mit einer anderen Bindungsstelle an sKlotho bindet. An diesen Antikörper ist HRP (horseradish peroxidase) gebunden. Es erfolgen weitere Waschungen, um nicht gebundenen Antikörper zu beseitigen. Um die Bindung mittels Farbreaktion sichtbar zu machen wird im letzten Arbeitsschritt TMB (Tetramethylbenzidin) als chromogenes Substrat für HRP hinzugegeben. Proportional zur Aktivität der HRP und somit indirekt zur Konzentration von sKlotho entsteht ein blaues Farbprodukt. Es wird dann eine schwefelhaltige Lösung (1NH_2SO_4) hinzugegeben, welche die Farbreaktion stoppt und einen stabilen gelben Farbkomplex bildet. Photometrisch wird dann die Absorption bei 450nm gemessen. Im Vergleich mit der Standartverdünnungsreihe, die unterschiedliche Konzentrationen von rekombinantem humanem sKlotho enthält, kann so die Konzentration von sKlotho im Serum der Probanden bestimmt werden. Die minimale

Nachweisgrenze von sKlotho beträgt 93,75 pg/ml. Maximal kann eine Konzentration von 6000 pg/ml nachgewiesen werden.

Abbildung 4: Sandwich-ELISA nach Zugabe des löslichen Antikörpers

3.3 Durchführung des ELISAS

Das verwendete IBL-ELISA-Kit ist für den quantitativen Nachweis von humanem löslichem Alphaklotho im Serum, Plasma und Urin zu Forschungszwecken bestimmt. Pro Kit sind 96 Mikrotiterplatten mit immobilisiertem Antigen enthalten. Alle für die Reaktion notwendigen Reagenzien wurden vom Hersteller mitgeliefert. Waschpuffer und löslicher Antikörper wurden mit deionisiertem Wasser nach Herstellervorschrift verdünnt. Der Standard wurde in einer Verdünnungsreihe hergestellt. Alle Messungen sind als Doppelbestimmung durchgeführt worden.

3.3.1 Herstellung des Standards

In 8 nebeneinanderliegende Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurden je 230µL des EIA-Puffers gegeben. In die erste Vertiefung gaben wir anschließend 230 µL der Standardlösung hinzu und durchmischten diese sorgfältig. Danach wurden von jeder Vertiefung 230 µL in die folgende pipettiert. Die Verdünnungsreihe setzten wir bis in Kavität 7 fort. Die 8. Vertiefung blieb frei und wurde nur mit Pufferlösung gefüllt.

Tabelle 5: Konzentration des Standards

Mikrotiterplatte	Konzentration sKlotho (pg/ml)
1	6000
2	3000
3	1500
4	750
5	375
6	187,5
7	93,75
8	0

3.3.2 Messung der Proben

- Die gefrorenen Serumproben und alle Testreagenzien wurden 30 Minuten vor der Messung auf Raumtemperatur erwärmt.
- In alle Vertiefungen der Mikrotiterplatte gaben wir jeweils 100 µL der Pufferlösung. Wir pipettierten je 100 µL der Proben, beziehungsweise der verdünnten Standardlösung hinzu.
- Die Platte wurde daraufhin abgedeckt und 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- Es folgte das Waschen der Mikrotiterplatte mit Waschpuffer. Der Waschvorgang wurde wie vom Hersteller beschrieben 7 Mal wiederholt.
- In jede der Vertiefungen pipettierten wir daraufhin 100 µL des markierten Antikörpers und inkubierten die Platte 30 Minuten mit verschlossener Plattenabdeckung bei Raumtemperatur.
- Es folgten 9 weitere Waschungen mit Waschpuffer.
- Als chromogene Substanz wurden pro Vertiefung je 100 µL der TMB-Lösung hinzugegeben.
- Weitere 30 Minuten inkubierten wir die Platte bei Raumtemperatur mit Abdeckung (Abschirmung vor Lichteinfall).
- Um die Reaktion zu beenden, wurden jeweils 100 µL schwefelhaltige Stopp-Lösung hinzugefügt und durch Klopfen der Platte gemischt.

- Innerhalb von 30 Minuten maßen wir die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im Photometer.

3.3.3 Berechnung der Testergebnisse

Anhand der Absorption der Standardlösung mit bekannter Konzentration, berechneten wir aus der jeweiligen Absorption der Proben, die enthaltene Menge an sKlotho.

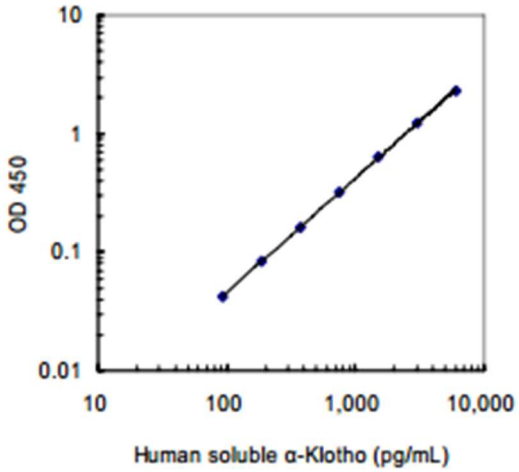

Abbildung 5: typische Standardkurve mit Absorption bei 450 nm (IBL America 2013)

3.4 Bestimmung von FGF-23

Die FGF-23 Konzentration im Patientenserum wurde in einer vorangegangenen Studie mittels Sandwich-ELISA der Firma Kainos (Kainos Laboratories International, Japan) entsprechend den Herstellerangaben gemessen. Dieses Verfahren misst intaktes Serum-FGF-23 und hat sich zur Messung des biologisch aktiven FGF-23 bewährt (Yamazaki et al. 2002).

3.5 Weitere erfasste Parameter

Alle weiteren erfassten Parameter wurden mittels Routineverfahren in den Zentrallaboratorien des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf bestimmt. Die untersuchten Parameter dienten der klinischen Verlaufsbeobachtung der Patienten und orientieren sich an den KDIGO-Leitlinien zur Behandlung der CNI im Kindesalter.

Beurteilung der Nierenfunktion:

- Kreatinin
- Harnstoff
- Harnsäure
- Kalium
- Venöse BGA

Beurteilung des Knochenstoffwechsels:

- Ionisiertes Kalzium
- Ionisiertes Phosphat
- PTH
- b-ALP
- $1,25(OH)_2D_3$
- $25(OH)D_3$

Die geschätzte Glomeruläre Filtrationsrate (eGFR) wurde durch die angepasste Schwartz-Bedside-Formel bestimmt

$$eGFR = 0,413 \times L(cm)/Scr\ (mg/dl)$$

(Schwartz et al. 2009)

L= Körperlänge; Scr = Serumkreatinin

3.6 Statistische Auswertung

Sämtliche statistische Auswertungen wurden mittels SPSS Version 22 (SPSS, Chicago, IL, USA) vorgenommen. Um Normalverteilung zu erreichen führten wir eine ln-Transformation für folgende Variablen durch: sKlotho, FGF-23, PTH, Serumphosphat, b-ALP, 25(OH)D_3, 1,25$(OH)_2D_3$, eGFR und Serumkreatinin. Der Mittelwertsvergleich zwischen den CNI-Stadien wurde mittels t-Test auf Basis von ln-retransformierten Daten durchgeführt. Univariate und Multivariate schrittweise vorwärts Regressionsanalysen wurden zur Beurteilung des Zusammenhangs zwischen den untersuchten Variablen durchgeführt. Für alle Analysen wurde ein p-Wert von <0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Verteilung der Patienten auf die einzelnen CNI-Stadien

Tabelle 6 zeigt die Anzahl der Patienten und deren Verteilung auf die einzelnen CNI-Stadien. An der Studie nahmen 81 Patienten teil, von diesen wurde bei 54 Patienten sKlotho im Serum bestimmt. 27 Patienten wurden in die Kontrollgruppe aufgenommen.

Tabelle 6: Patientenanzahl in den einzelnen CNI-Stadien

CNI-Stadium	Patientenanzahl	Verteilung in %
1	8	9,9
2	6	7,4
3	22	27,2
4	13	16,0
5	32	39,5
Gesamt	81	100

4.2 Deskriptive Statistik und Mittelwertsvergleich

Tabelle 7 zeigt die relevanten Parameter des Knochenstoffwechsels aufgeschlüsselt nach den einzelnen CNI Stadien. Angegeben sind der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Es wurde ein t-Test für den Mittelwertsvergleich zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen CNI-Stadien durchgeführt. Signifikante Unterschiede sind entsprechend ihres Signifikanzniveaus gekennzeichnet.

Verwendete Abkürzungen: CNI – chronische Niereninsuffzienz, eGFR – geschätzte glomeruläre Filtrationsrate, FGF-23 – Fibroblasten-Wachstumsfaktor-23, PTH – Parathormon, b-ALP- knochenspezifische Alkalische Phosphatase, 25(OH)D – 25-Hydroxy-Vitamin-D_3, 1,25(OH)2D – 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D_3, TPR – Tubuläre Phosphatreabsorption

Tabelle 7: Variablen des Knochenstoffwechsels

Gruppenvergleich zwischen CNI-Stadium und Kontrollgruppe mittels T-Test**;** Kennzeichnung des Signifikanzniveaus p<0,05 *, p<0,01**, p<0,001 ***

Mittelwert (95 CI)	**Kontrollen n= 27**	**CNI 1 (eGFR > 90) n= 8**	**CNI 2 (eGFR 60-89) n= 6**	**CNI 3 (eGFR 30-59) n= 22**	**CNI 4 (eGFR 15-29) n= 13**	**CNI 5 (eGFR <15) n= 32**
Alter (Jahre)	9.9 (8.3-11.5)	7.7 (3.8-11.7)	10.3 (7.0-13.6)	10.3 (8.2-12.4)	9.2 (6.1-12.3)	11.1 (9.2-13.0)
eGFR (ml/min*1.73 qm²)	129 (117-143)	116 (94-143)	66 *** (57-76)	43 *** (39-47)	21 *** (18-24)	8 *** (7-9)
sKlotho (pg/ml)	1889 (1587-2249)	1073 (681-1692)	1322 (960-1822)	1175 (756-1827)	1052 (633-1746)	800 *** (588-1088)
FGF23 (ng/l)	81 (62-106)	40 *** (33-49)	39 *** (27-55)	81 (59-110)	208 *** (128-335)	440 *** (297-653)
PTH (ng/l)	56 (40-78)	25 *** (15-42)	83 (53-128)	90 *** (67-120)	213 *** (148-305)	241 *** (165-354)
Phosphat (mmol/l)	1.38 (1.31-1.45)	1.41 (1.26-1.57)	1.29 (1.14-1.47)	1.30 (1.21-1.41)	1.62 *** (1.47-1.79)	1.85 *** (1.70-2.02)
Kalzium (mmol/l)	2.33 (2.29-2.37)	2.33 (2.23-2.43)	2.31 (2.20-2.42)	2.39 (2.35-2.44)	2.43 *** (2.38-2.49)	2.32 (2.20-2.44)
B-ALP (µg/l)	52 (39-69)	51 (40-65)	37 (25-53)	58 (43-79)	65 (43-98)	49 (34-69)
25 (OH)D (µg/l)	11 (8-14)	20 *** (15-27)	29 *** (20-44)	20 *** (15-27)	25 *** (20-33)	22 *** (18-26)
1,25(OH)$_2$D (ng/l)	48 (43-54)	53 (42-69)	42 (35-50)	38 (30-48)	29 *** (20-43)	16 *** (10-28)
TPR (%)	90 (87-93)	92 (90-94)	82 *** (78-86)	80 *** (75-85)	65 *** (57-73)	39 *** (29-49)

sKlotho:

Es besteht ein signifikanter Unterschied in den sKlothokonzentrationen zwischen den gesunden Kontrollpatienten **1889 (1587-2249) pg/ml** und den niereninsuffizienten Patienten in den CNI Stadien 1-5 **982 (82-1172 pg/ml; p<0.001)** (Siehe Abbildung 6). Vergleicht man die einzelnen CNI-Stadien mit der Kontrollgruppe, zeigt sich jedoch erst ab dem CNI-Stadium 5 mit **800 (588-1088) pg/ml** eine signifikante Abnahme von sKlotho. Unsere Daten zeigen keine Unterschiede in den sKlotho-Konzentrationen zwischen Patienten unter Peritoneal- und Hämodialyse.

FGF-23:

Es zeigen sich zwischen der Kontrollgruppe mit **81 (62-106) ng/l** und den einzelnen CNI-Stadien signifikante Unterschiede im Mittelwertsvergleich. Wir fanden überraschender Weise eine signifikante Verminderung der FGF-23-Werte in den CNI Stadien 1 **40 (33-49) ng/l** und 2 **30 (27-55) ng/l**. Einen signifikanten Anstieg von FGF-23 beobachteten wir erst ab dem CNI-Stadium 4 **208 (128-335) ng/l** und 5 **440 (297-653) ng/l**.

PTH:

Parathormon zeigt einen signifikanten Anstieg im Vergleich zur Kontrollgruppe **56 (40-78) ng/l** ab dem CNI-Stadium 3 mit **90 (67-120) ng/l**. Im Stadium 4 **213 (148-305) ng/l** und 5 **241 (165-354) ng/l** ist das Parathormon deutlich erhöht.

Serumphosphat:

Die Mittelwerte unterscheiden sich von der Kontrollgruppe **1,38 (1,31-1,45) mmol/l** ab CNI-Stadium 4 mit **1,62(1,47-1,79) mmol/l** signifikant. Im Stadium 5 sind die Werte deutlich erhöht **1,85 (1,70-2,02) mmol/l.**

Kalzium:

In den CNI-Stadien 1,2,3, und 5 unterscheiden sich die Mittelwerte nicht signifikant von der Kontrollgruppe die einen Wert von **2,33 (2,29-2,37) mmol/l** aufweist. Kinder im CNI-Stadium 4 hatten signifikant höhere Kalziumwerte, die sich aber noch immer im Normbereich befanden.

Knochenspezifische Alkalische Phosphatase:

Wir wiesen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Kontrollgruppe und der einzelnen CNI-Stadien nach.

25(OH)D_3:

Ab dem CNI-Stadium 1 ergab sich im Mittelwertsvergleich eine signifikante Erhöhung der 25(OH)-Vitamin-D-Spiegel verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe zeigte mit einem Mittelwert von **11 (8-14) µg/l** einen Vitamin-D-Mangel. Alle CNI-Gruppen zeigten im Vergleich dazu Werte um die **20 µg/l (20-29 µg/l)** was dem Normwert entspricht.

1,25$(OH)_2D_3$:

Die Werte verminderten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ab CNI-Stadium 4. Die Kontrollgruppe weist Werte für aktives 1,25$(OH)_2D_3$ von **48 (43-52) ng/l** auf. Im Stadium 4 ist der Mittelwert auf **29 (20-43) ng/l** vermindert, und nimmt im Stadium 5 auf den niedrigsten Wert von **16 (10-28) ng/l** ab.

TPR:

Eine verminderte Phosphatreabsorption zeigte sich im Mittelwertsvergleich ab CNI Stadium 2 verglichen mit der Kontrollgruppe. Eine TPR von **90** Prozent in der Kontrollgruppe vermindert sich ab Stadium 2 und ist mit **39** Prozent in Stadium 5 am geringsten.

4.3 Gruppenvergleiche für sKlotho

Die grafische Darstellung der Gruppenunterschiede für sKlotho erfolgt mit Hilfe von Boxplots. Dargestellt werden Interquartilsabstände, Median und Lage der Verteilung.

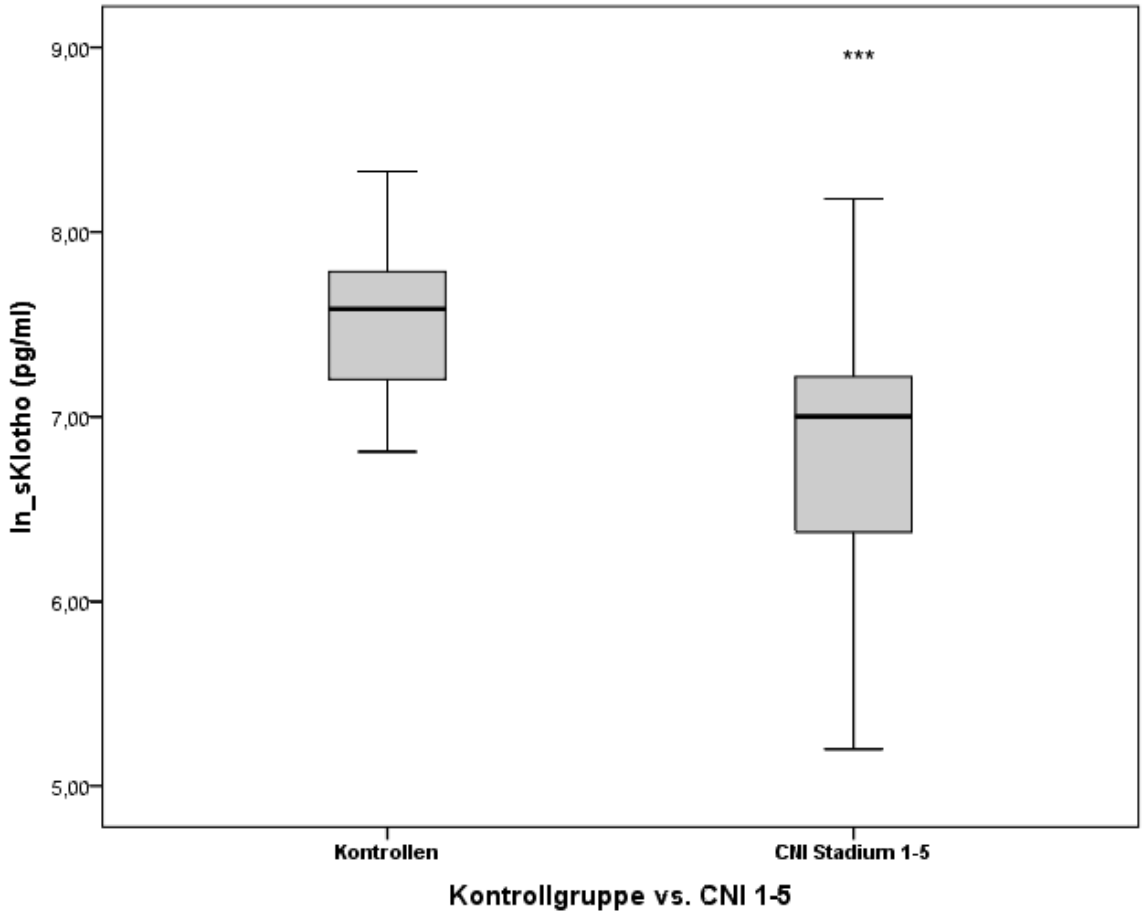

Abbildung 6: zeigt den signifikanten Mittelwertsunterschied in der Konzentration von sKlotho zwischen der Kontrollgruppe und der zusammengefassten Gruppe aller niereninsuffizienten Patienten der CNI-Stadien 1-5.

Das Signifikanzniveau von $p<0,001$ ist gekennzeichnet mit ***

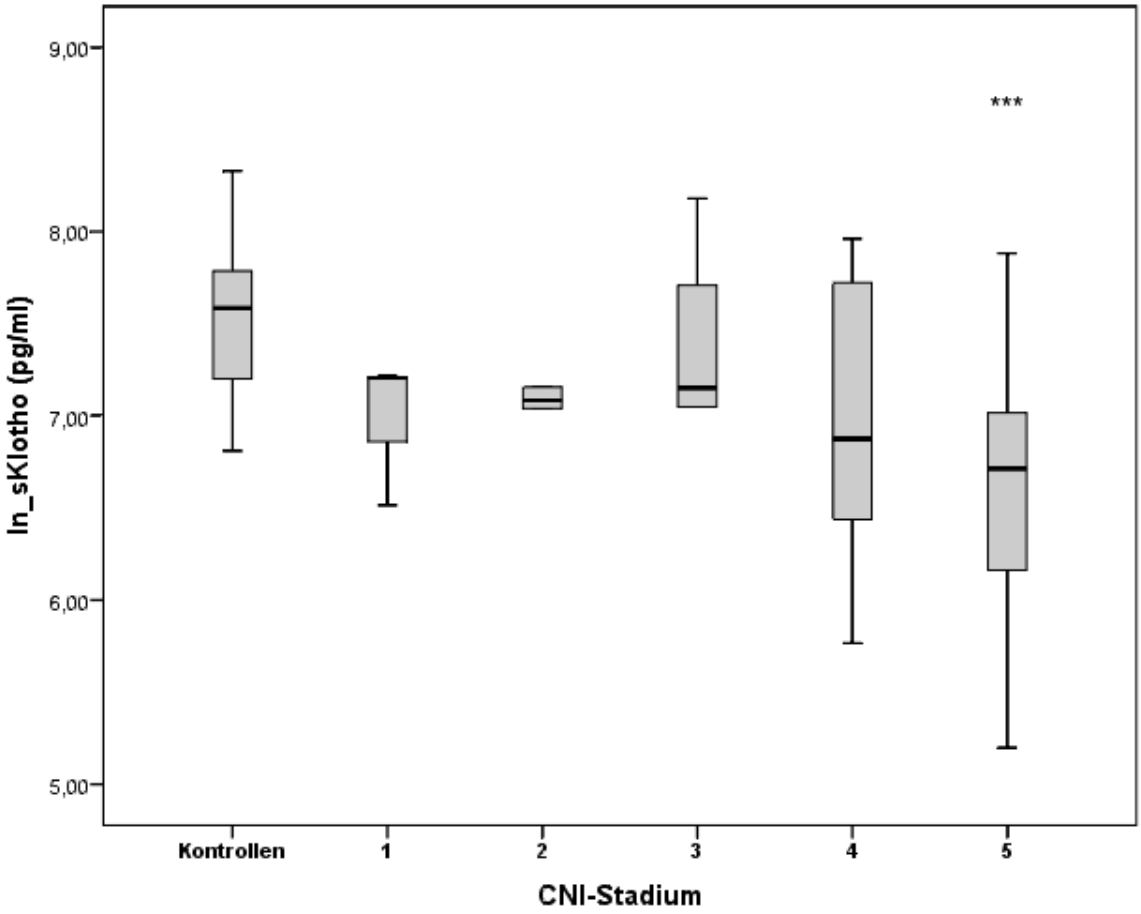

Abbildung 7: stellt die Konzentration von sKlotho aufgeschlüsselt nach CNI-Stadium dar. Die höchsten sKlotho-Werte findet man in der Kontrollgruppe. Es zeigt sich erst ab CNI-Stadium 5 ein signifikanter Abfall von sKlotho.

Das Signifikanzniveau von $p<0,001$ ist gekennzeichnet mit ***

Die untenstehende Grafik zeigt die Mittelwerte der Parameter des Knochenstoffwechsels, bei denen ein signifikanter Unterschied zwischen den CNI-Stadien besteht.

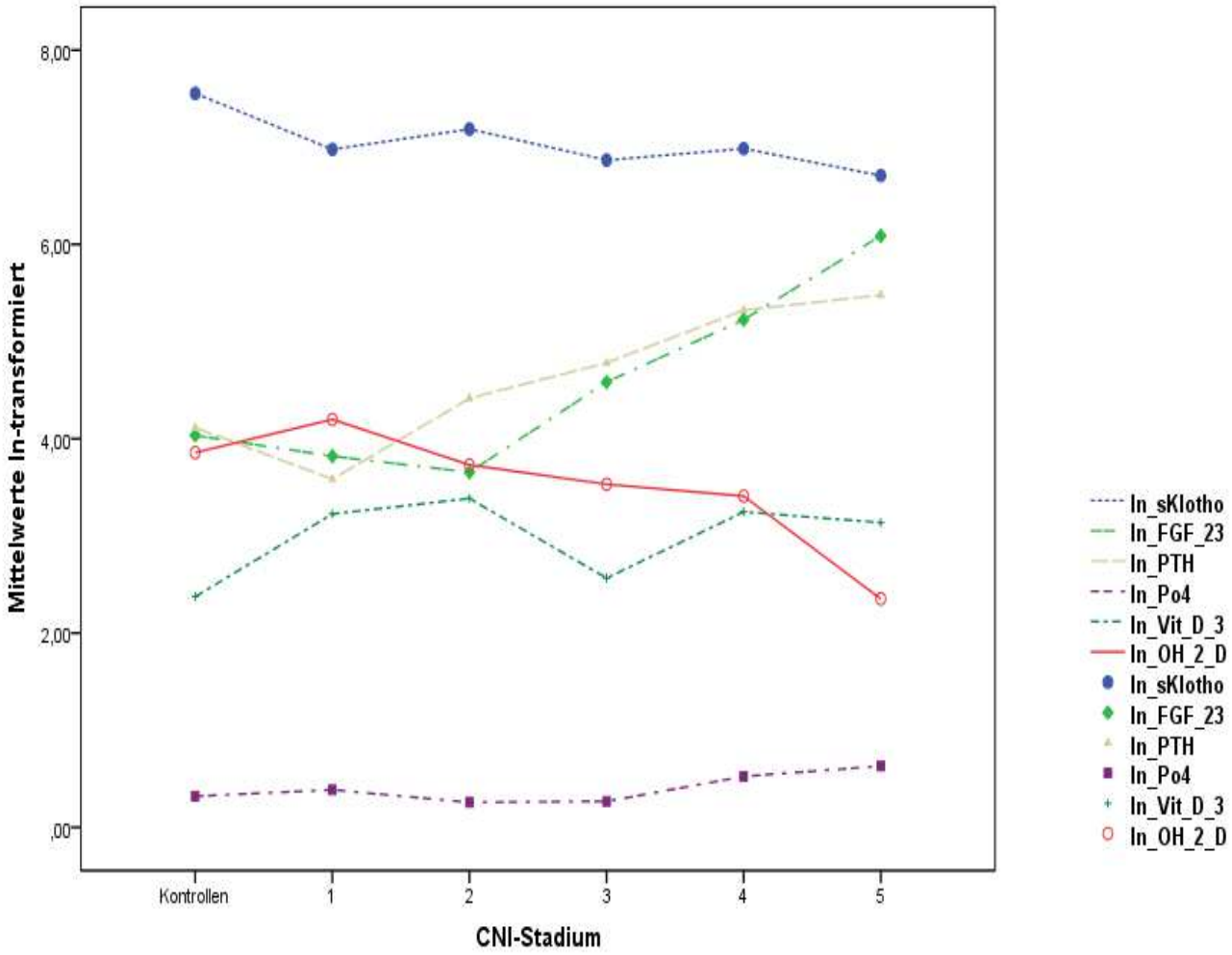

Abbildung 8: Variablen (Legende am rechten Bildrand), für die ein signifikanter Mittelwertsunterschied zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen CNI-Stadien existiert.

4.4 Korrelationen

In univariater Analyse korreliert sKlotho mit folgenden Variablen: Alter (siehe Abbildung 9), Serumkreatinin (siehe Abbildung 10) und knochenspezifischer Alkalische Phosphatase (siehe Abbildung 11)

4.4.1 sKlotho und Alter

Es zeigt sich eine negative Korrelation von sKlotho mit dem Alter der Patienten (r= -0,32; p=0,017).

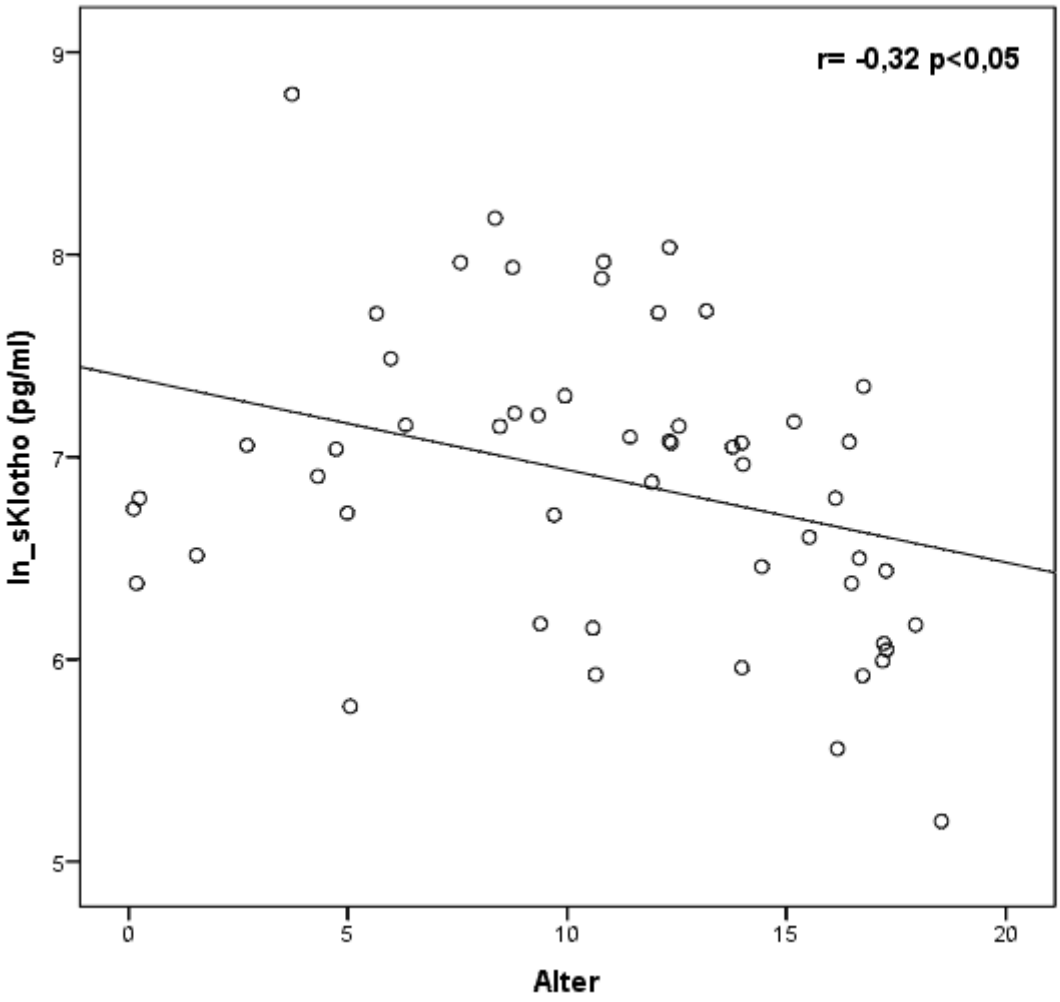

Abbildung 9: univariat negative Korrelation zwischen sKlotho und Alter

4.4.2 sKlotho und Serumkreatinin

Eine negative Korrelation besteht zwischen Kreatinin und sKlotho (r= -0,29 p=0,035).

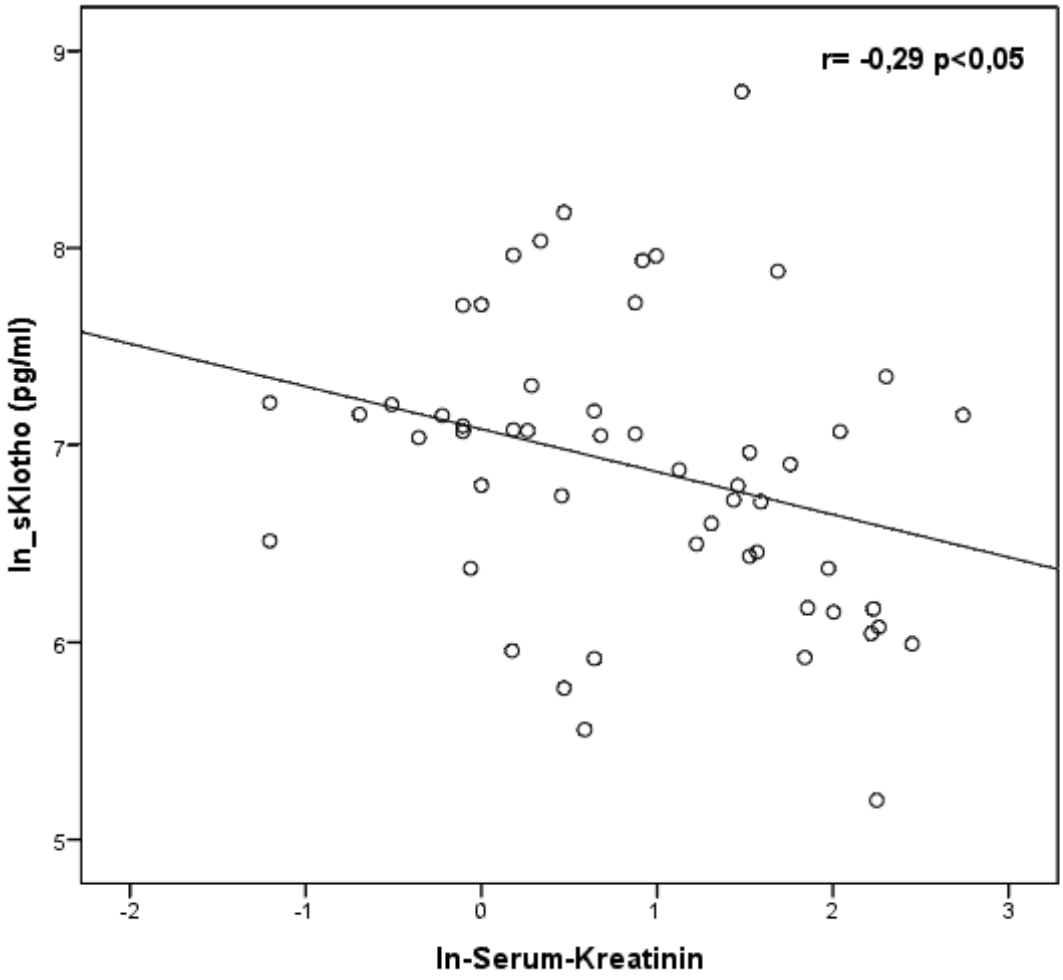

Abbildung 10: univariat negative Korrelation zwischen sKlotho und Serumkreatinin

4.4.3 sKlotho und knochenspezifische Alkalische Phosphatase

Eine positive Korrelation besteht zwischen sKlotho und Knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase (r=0,55 p<0,01).

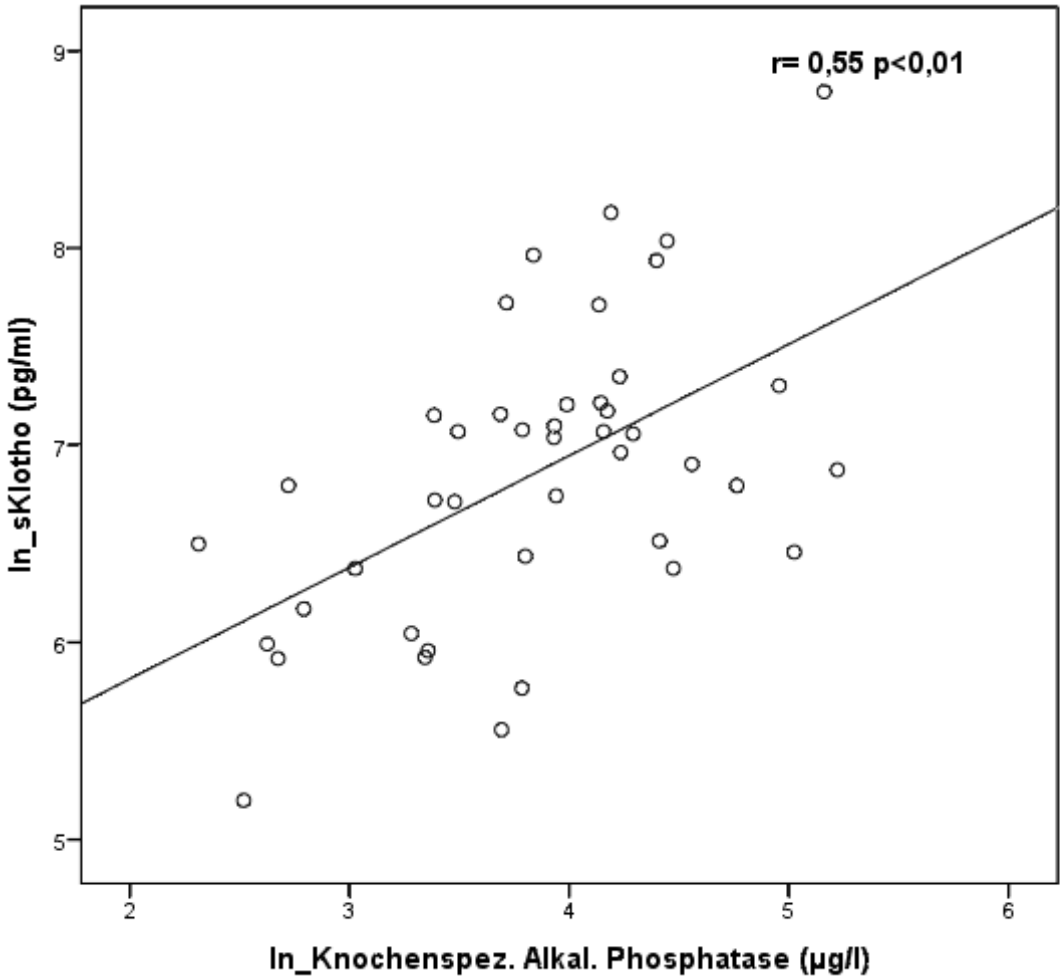

Abbildung 11: univariat positive Korrelation zwischen sKlotho und knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase

4.5 Multivariate Regressionsanalyse

4.5.1 sKlotho

In der multivariaten Regressionsanalyse, welche sKlotho als abhängige Variable und Alter, eGFR, Phosphat, FGF-23, PTH, knochenspezifische Alkalische Phosphatase (b-ALP), 25(OH)D_3, 1,25$(OH)_2D_3$ und Tubuläre Phosphatreabsorption als unabhängige Variablen betrachtet, zeigte sich allein für sKlotho und knochenspezifische Alkalische Phosphatase ein signifikanter Zusammenhang.

Tabelle 8: multivariate Regression sKlotho als abhängige Variable

Independent variables	β	s.e.	t	p	R^2
Ln-b-ALP	*0.55*	0.15	3.7	0.001	0.29

4.5.2 FGF-23

Eine negative Korrelation besteht zwischen FGF-23 und eGFR (r= - 0,77, p<0,001), 1,25$(OH)_2D_3$-Serumspiegel (r= -0,66; p<0,001) und der Tubulären Phosphatreabsorption (r= -0,69; p<0,001).

Ein univariat positiver Zusammenhang besteht zwischen FGF-23 und Serumphosphat (r=0,54; p<0,001), PTH (r=0,44; p<0,001), Serumkreatinin (r= 0,78; p<0,001) und dem Patientenalter (r=0,28; p=0,016).

In multivariater Regressionsanalyse, welche FGF-23 als abhängige Variable und Alter, eGFR, Phosphat, sKlotho, PTH, knochenspezifische Alkalische Phosphatase, $25(OH)D_3$, $1,25(OH)_2D_3$, und Tubuläre Phosphatreabsorption als unabhängige Variablen betrachtet, zeigten sich für FGF-23 und $1,25(OH)_2D_3$ (p= 0,001) sowie für FGF-23 und die eGFR (p<0,001) ein signifikanter Zusammenhang.

Tabelle 9: multivariate Regression FGF-23 als abhängige Variable

Independent variables	β	s.e.	t	p	R^2
Ln-eGFR	*-0.58*	0.14	-5.4	<0.001	0.71
Ln-$1,25(OH)_2D_3$	*-0.39*	0.14	-3.7	0.001	0.71

4.5.3 Serumphosphat

Unsere Daten zeigen negative Korrelationen zwischen Phosphat und $1,25(OH)_2D_3$ (r= -0,25; p<0,05), dem Alter (r= -0,22; p=<0,05), eGFR (r= -0,61; p<0,01) sowie der Tubulären Phosphatreabsorption (r= -0,56; p<0,01).

Positive Korrelationen bestehen zwischen Serumphosphat und PTH (r=0,45; p<0,001), zwischen Serumphosphat und FGF-23 sowie zwischen Serumphosphat und Serumkreatinin (r=0,47; p<0,001).

In multivariater Regressionsanalyse, welche Phosphat als abhängige Variable und Alter, eGFR, FGF-23, sKlotho, PTH, knochenspezifische Alkalische Phosphatase, $25(OH)D_3$, $1,25(OH)_2D_3$, und Tubuläre Phosphatreabsorption als unabhängige Variablen benutzte, zeigten sich nur für die eGFR und das Alter ein signifikanter Zusammenhang mit den Serumphosphatwerten.

Tabelle 10: multivariate Regression Phosphat als abhängige Variable

Independent variables	β	s.e.	t	p	R^2
Ln-GFR	*-0.69*	0.03	-5.7	0.000	0.49
Alter	-0.35	0.01	-2.7	0.01	0.49

4.5.4 Tubuläre Phosphatreabsorption

In univariater Analyse zeigten sich signifikant negative Zusammenhänge zwischen der TPR und Serumkreatinin (r= -0,77; p<0,001) sowie zwischen der TPR und dem Serumkalzium (r= -0,29; p<0,05).

Positive Korrelationen bestanden zwischen der TPR und der eGFR (r=0,80; p<0,001), zwischen TPR und PTH (r=0,51; p<0,001) und TPR und $1,25(OH)_2D_3$ (r=0,49; p>0,01).

In multivariater Regressionsanalyse, welche die TPR als abhängige Variable und Alter, eGFR, FGF-23, sKlotho, PTH, knochenspezifische Alkalische Phosphatase, $25(OH)D_3$, $1,25(OH)_2D_3$ und Phosphat als unabhängige Variablen benutzte, zeigten sich nur für die eGFR und sKlotho ein signifikanter Zusammenhang mit der TPR.

Tabelle 11: multivariate Regression TPR als abhängige Variable

Independent variables	β	s.e.	t	p	R^2
Ln-GFR	*0.861*	2.5	8.4	0.00	0.69
Ln-Klotho	*-0.21*	3.4	-2.1	0.046	0.69

5. Diskussion

Während man in den letzten Jahren belegen konnte, dass Klotho eine Schlüsselrolle in der Regulation des Kalzium- und Phosphatstoffwechsels im Rahmen der CNI erwachsener Patienten spielt, lagen bei pädiatrischen CNI-Patienten zu Studienbeginn keine klinischen Daten über sKlotho-Konzentrationen im Serum und deren Zusammenhang mit der Nierenfunktion und Parametern des Knochenstoffwechsel vor. Alle Hypothesen, auf die unsere Studie aufbaute, bezogen sich somit auf Erkenntnisse aus vorangegangenen tierexperimentellen Studien und auf klinische Studien an Erwachsenen.

5.1 sKlotho und der Zusammenhang mit der Nierenfunktion

Wir wiesen anhand unserer Daten nach, dass es auch im Kindesalter im Rahmen der CNI zu einer Verminderung von sKlotho kommt. Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit allen erkrankten Patienten zeigte sich eine signifikante Reduktion von sKlotho. Wir konnten diese Abnahme von sKlotho allerdings erst ab dem CNI-Stadium 5 feststellen. In vorherigen Stadien der Niereninsuffizienz lässt sich anhand der sKlotho-Konzentration keine Aussage über die Nierenfunktion treffen. Der zunächst univariat festgestellte Zusammenhang zwischen sKlotho und Serumkreatinin konnte in der multivariaten Analyse nicht bestätigt werden. Einen unabhängigen Zusammenhang von sKlotho mit der eGFR konnten wir dementsprechend nicht nachweisen. Diese Erkenntnisse werden gestützt durch andere Studien an pädiatrischen CNI-Patienten, die ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen sKlotho und der Nierenfunktion feststellen konnten (Wan et al. 2013). Im Gegensatz dazu zeigen klinische Studien an erwachsenen CNI-Patienten unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Zusammenhangs von sKlotho mit der Nierenfunktion. Pavik et al. beobachteten eine unabhängige lineare Abnahme von sKlotho mit zunehmendem Fortschreiten der chronischen Niereninsuffizienz (Pavik et al. 2013). Ebenfalls stellten Shimamura et al. eine signifikante Abnahme von sKlotho mit zunehmendem CNI-Stadium fest (Shimamura et al. 2012). Im Gegensatz dazu konnten andere Studien keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von sKlotho zwischen den CNI Stadien nachweisen (Seiler et al. 2013, Scholze et al. 2014). Die eingangs erwähnte Metaanalyse von Wang

et al. zeigt jedoch nach Auswertung einer Vielzahl von Studien an erwachsenen CNI Patienten einen signifikant positiven Zusammenhang zwischen der Nierenfunktion und sKlotho (Wang et al. 2018). Der Zusammenhang zwischen der sKlotho-Konzentration und der Nierenfunktion im Kindesalter ist also weiterhin nicht eindeutig geklärt und bleibt vermutlich auch in den nächsten Jahren Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Wir konnten zwar zeigen, dass eine Reduktion von sKlotho bei pädiatrischen CNI-Patienten auftritt. Dies trat allerdings erst im Endstadium der Erkrankung auf.

5.2 sKlotho und FGF-23

Wir nahmen an, dass Klotho in seiner Funktion als obligater Kofaktor für FGF-23 mit diesem auch in einem statistischen Zusammenhang stehen würde. Unsere Daten widersprechen dieser ursprünglich aufgestellten Hypothese. Auch andere Forschungsgruppen konnten keinen direkten Zusammenhang zwischen sKlotho und FGF-23 bei pädiatrischen CNI Patienten nachweisen (Wan et al. 2013, Sawires et al. 2013). Ebenso zeigten Studien an Erwachsenen dieses Ergebnis (Pavik et al. 2012). Andere klinische Studien an erwachsenen CNI Patienten konnten jedoch eine inverse Korrelation zwischen sKlotho und FGF-23 nachweisen (Shimamura et al. 2012). Auch Wang et al. konnten in ihrer Metaanalyse einen signifikant negativen Zusammenhang zwischen sKlotho und FGF-23 bei Erwachsenen zeigen (Wang et al. 2018). Diese widersprüchlichen Ergebnisse machen deutlich, dass der Zusammenhang zwischen sKlotho und FGF-23 noch nicht hinreichend geklärt ist. Der Annahme, dass eine frühe Reduktion von sKlotho ursächlich für den Anstieg von FGF-23 ist, widersprechen unsere Resultate. Ob sich sKlotho als früher Biomarker der CNI im Kindesalter eignet, bleibt abzuwarten. Unsere Daten widersprechen dieser Hypothese zunächst einmal.

5.3 Konzentrationen von FGF-23

Ein früher Anstieg von FGF-23 im Rahmen der CNI scheint sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern gesichert (Bacchetta et al. 2010, van Husen et al. 2012, Larsson et al. 2003), sodass FGF-23 als Biomarker einer CNI bereits im Frühstadium geeignet ist. Auch wir wiesen einen Anstieg von FGF-23 mit abnehmender Nierenfunktion nach, allerdings zeigte sich dieser erst ab dem

CNI Stadium 4 verglichen mit der gesunden Kontrollgruppe. Es ist fraglich, weshalb wir erst einen so späten Anstieg von FGF-23 beobachten konnten. Die FGF-23-Werte der Kontrollgruppe waren mit 81(62-106) ng/l vergleichsweise erhöht. Eine Studie an 159 gesunden Kindern, die einen ähnlichem Altersdurchschnitt wie unsere Kontrollgruppe aufwiesen, zeigte Mittelwerte für intaktes FGF-23 von 35 ng/l (Gkentzi et al. 2014). Ein Mangel an Vitamin D, den wir innerhalb der Kontrollgruppe nachwiesen, könnte für die erhöhten FGF-23-Konzentrationen ursächlich sein und somit den Gruppenvergleich beeinflussen. Wir konnten einen univariat negativen Zusammenhang zwischen FGF-23 und der eGFR bzw. FGF-23 und 1,25$(OH)_2D_3$-Serumspiegel feststellen. Außerdem zeigten sich diese beiden Variablen im multivariaten Modell als unabhängige Einflussvariablen für FGF-23. Der Einfluss der Vitamin-D-Spiegel auf die Konzentration von FGF-23 sollte bei Patienten mit CNI weiterführend untersucht werden.

5.4 Klotho und sein Zusammenhang mit dem Alter und Phosphat

Bereits bei Entwicklung des verwendeten ELISA-Verfahrens zum Nachweis von sKlotho stellten Yamazaki et al. eine altersabhängige Abnahme von sKlotho bei gesunden Probanden fest (Yamazaki et al. 2010). Auch wir wiesen eine negative Korrelation zwischen sKlotho und dem Alter der Patienten nach. Diese inverse Korrelation verlor sich allerdings in der multivariaten Analyse, sodass unsere Daten keinen unabhängigen Zusammenhang zwischen diesen Variablen zeigen. Dieser Effekt könnte durch die physiologische, altersabhängige Verminderung der Serumphosphatwerte erklärt werden. Wir bestätigten im multivariaten Modell, dass das Alter und die Phosphatwerte unabhängig von anderen untersuchten Faktoren miteinander in Zusammenhang stehen. Anderen Studien an pädiatrischen Patienten wiesen für die Höhe des Serumphosphats und sKlotho einen unabhängigen Zusammenhang nach (Wan et al. 2013, Sawires et al. 2015). Wir konnten diesen direkten Zusammenhang allerdings nicht bestätigen. Es muss bedacht werden, dass die Anwendung von Phosphatbindern, die von 24 Prozent der Patienten eingenommen wurden, unsere Ergebnisse möglicherweise verzerren. Wir betrachteten außerdem die Tubuläre Phosphatreabsorption (TPR), also den prozentualen Anteil des

Serumphosphates, der über die Niere rückresorbiert wird. Die TPR liegt physiologisch bei gesunden Kindern bei 85-97 Prozent. Im Rahmen CKD-MBD verändert sich die TPR und vermindert sich mit Abnahme der Nierenfunktion. Unsere Daten zeigen, dass sowohl die eGFR als auch sKlotho unabhängig in Zusammenhang mit der TPR stehen. Ein unabhängiger Zusammenhang zwischen sKlotho und der TPR in multivariaten Modellen konnte bereits bei erwachsenen CNI Patienten nachgewiesen werden (Tan et al. 2017). Dies spricht dafür, dass Klotho unabhängig von anderen Parametern den tubulären Phosphatstoffwechsel beeinflusst. Dies könnte ein Hinweis für die, von FGF-23 unabhängige, Regulation des Natrium-Phosphattransporters NaPiIIa durch sKlotho sein (Hu et al. 2010). sKlotho scheint bei Kindern mit CNI also einen, von anderen Faktoren unabhängigen, Einfluss auf den Phosphatstoffwechsel zu nehmen.

5.5 Einfluss von Vitamin-D auf sKlotho-Werte

Die Versorgung der Patienten mit Vitamin-D erfolgte gemäß Leitlinie bereits in frühen Stadien der Niereninsuffizienz. 88 Prozent der Patienten erhielten entweder Vitamin-D3 oder aktives 1,25$(OH)_2D_3$. Die Vitamin-D3-Spiegel waren in der Versuchsgruppe im Normbereich, während die Spiegel der Kontrollgruppe unter dem empfohlenen Referenzwert lagen. Da der Vitamin-D-Metabolismus zum größten Teil über die FGF-23-Klotho-Achse reguliert wird, stellt sich die Frage, ob eine exogene Vitamin-D-Zufuhr die sKlotho-Konzentration ggf. beeinflussen könnte. Im Mausmodell der CNI zeigte sich durch die 3-wöchige Gabe von 1,25 $(OH)_2D_3$-Analoga Calcitriol und Paricalcitriol ein signifikanter Anstieg von sKlotho (Lau et al. 2012). Scholze et al. untersuchten den Einfluss von hochdosierter Vitamin-D3-Gabe über 8 Wochen auf die sKlotho-Konzentrationen bei erwachsenen CNI Patienten. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zur mit Placebo behandelten Kontrollgruppe festgestellt werden (Scholze et al. 2014). Bei Kindern gibt es widersprüchliche Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Vitamin D-Supplementation auf sKlotho-Konzentrationen. Lerch et al. wiesen bei Kindern in den weniger fortgeschrittenen CNI Stadien bei Vitamin-D-Supplementation über 8 Monate einen signifikanten Anstieg von sKlotho nach, während der Einfluss der Vitamin-D-Aufnahme auf sKlotho-Werte bei fortgeschrittenen Stadien der CNI nicht

signifikant war (Lerch et al. 2018). Es könnte also sein, dass es durch die Supplementation von Vitamin-D bei unseren Patienten zu einer iatrogenen Erhöhung von sKlotho gekommen ist. Dies könnte eine Ursache für den erst im Spätstadium der CNI beobachteten Abfall von sKotho sein. Einen direkten statistischen Zusammenhang zwischen sKlotho und Vitamin-D-Spiegeln konnten wir allerdings nicht nachweisen. Ähnlich zu diesem Ergebnis wiesen auch Lerch et al. nur bei Patienten mit niedrigen CNI-Stadien einen Zusammenhang der 25(OH)D_3-Spiegel mit den sKlotho-Werten nach, der sich in weiter fortgeschrittenen Stadien der CNI verlor (Lerch et al. 2018).

5.6 Zusammenhang mit knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase (b-ALP)

b-ALP ist ein membrangebundenes Glycoprotein, welches sich auf der Oberfläche von Osteoblasten befindet. Die freigesetzte Menge an b-ALP repräsentiert die Aktivität der Osteoblasten, was b-ALP zu einem sensitiven Marker für Knochenumbauprozesse macht (Haarhaus et al. 2009, Sprague et al. 2016). b-ALP selbst kann an Proteine der Knochenmatrix binden und so die Knochenmineralisation induzieren (Mazzaferro et al. 2014). Wir zeigten in unserer Studie einen univariat positiven Zusammenhang zwischen sKlotho und b-ALP. Dieser Zusammenhang bestätigte sich im multivariaten Modell. Ein ähnlicher Zusammenhang zeigte sich tierexperimentell bei Klotho-Knockoutmäusen. Die Mäuse ohne vorhandene Klothoexpression entwickelten eine Adynamische Knochenerkrankung, die mit einer Verringerung der b-ALP-Konzentration einherging (Kawaguchi et al. 2000). Das heißt, ein völliges Fehlen des Klotho-Gens vermindert Knochenstoffwechselvorgänge. Dies wiederum wird durch eine Verringerung der knochenspezifischen Alkalischen Phosphatase angezeigt. Ursächlich für den verminderten Knochenstoffwechsel könnte sein, dass ein Mangel an Klotho zu einer fehlerhaften Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten aus Stammzellen des Knochenmarks führt (Kawaguchi et al. 2000, Zhang et al. 2015). Außerdem gibt es Erkenntnisse, dass über eine direkte FGF-23-sKlotho-Signalkaskade der WNT-Signalweg in Osteoblasten, der für die Osteoblastendifferenzierung essentiell ist, im Rahmen der Urämie gehemmt ist (Carillo-Lopez et al. 2016). Klotho selbst wird in geringem Maße auch auf Osteozyten, also auf reifen Knochenzellen, exprimiert.

Eine experimentelle Entfernung von Klotho auf Osteozyten zeigt überraschender Weise, dass sich am Anschluss die Knochenmasse und Knochenmineralisation erhöht (Komaba et al. 2017). Das bedeutet, dass Klotho in seiner direkten Wirkung an den Osteozyten den Knochenstoffwechsel bremst. Dies ist eigentlich der entgegengesetzte Effekt, den man erwarten würde, da ein Klothomangel bisher mit verringertem Knochenstoffwechsel in Zusammenhang gebracht wurde. Wahrscheinlich entstehen die Pathologien des Knochenstoffwechsels im Rahmen der CKD-MBD größtenteils durch das systemische Fehlen von Klotho bzw. durch den derangierten FGF-23-Klotho-Signalweg und nicht durch direkte Wirkung von Klotho auf die Osteozyten. Unsere Ergebnisse werden untermauert von Scholze et al., die in einer klinischen Studie an erwachsenen CNI Patienten ebenfalls eine positive Korrelation zwischen b-ALP und sKlotho-Werten nachwiesen (Scholze et al. 2014). Eine weitere Studie an erwachsenen Hämodialysepatienten zeigt, dass sKlotho mit der Knochendichte der Patienten assoziiert ist, wobei hier die Alkalische Phosphatase selbst nicht betrachtet wurde (Zheng et al. 2017). Der Einfluss von Klotho auf den Knochenstoffwechsel ist also komplex und noch nicht hinreichend erforscht. Klotho scheint widersprüchliche Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel zu haben, während es einerseits als Teil der FGF-23-Klotho-Achse zu einem physiologischen Knochenstoffwechsel beiträgt, erscheint die direkte Wirkung von Klotho auf den Knochen entgegengesetzt zu sein und in einer verringerten Mineralisation und Knochendichte zu resultieren. sKlotho könnte neben b-ALP ein geeigneter sensitiver Biomarker für Knochenumbauprozesse sein.

5.7 sKlotho und das Geschlecht

Studien wiesen einen Einfluss des Geschlechtes auf die Höhe von sKlotho nach. So zeigten sich bei gesunden Kindern, die ein ähnliches Durchschnittsalter wie unsere Studienpopulation aufwiesen, höhere Werte für sKlotho und FGF-23 bei Mädchen im Vergleich zu Jungen (Gkentzi et al. 2014). Dies könnte mit der unterschiedlichen Geschwindigkeit der Skelettreifung, welche durch die unterschiedliche Ausschüttung von Wachstumshormon verursacht ist, zusammenhängen. Unsere Studienpopulation war zu 63 Prozent männlich. Wir wiesen allerdings keinen statistisch signifikanten Unterschied in

den sKlotho-Werten zwischen den Geschlechtern nach. Bisher gibt es keine Daten, die einen Geschlechtsunterscheid von sKlotho im Rahmen der CNI beschreiben.

5.8 Qualitätsmerkmale von Querschnittsstudien

Die durchgeführte Querschnittsstudie greift auf bereits im Rahmen einer Vorgängerstudie gewonnenes Probenmaterial zurück und hatte das Ziel, Serumwerte für sKlotho zu bestimmen und in Zusammenhang mit weiteren Parametern der Nierenfunktion zu setzen. Der Vorteil von Querschnittstudien ist, dass für eine relativ große Anzahl an Patienten verschiedene Parameter, die von Interesse für das Studienziel sind, bestimmt werden können. Insbesondere für Krankheiten mit niedriger Prävalenz, wie zum Beispiel die CNI im Kindesalter, bot sich die Implementierung dieser Querschnittstudie an. Das Patientenkollektiv stammt wie in Kapitel 3 beschrieben aus der Nierenambulanz des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf. Eine Einschränkung der von uns durchgeführten Studie ist die relativ lange Zeitspanne, die zwischen Probengewinnung und Messzeitpunkt von sKlotho lag. Zwar stellen Yamazaki et al. keinen Unterschied in der sKlotho-Konzentration zwischen gefrorenem und frischem Probenmaterial fest (Yamazaki et al. 2010), allerdings lagerten einige unserer Serumproben fast 2 Jahren gefroren bei -30°C bis zur endgültigen Messung. Dies könnte die Messergebnisse beeinflusst haben. Darüber hinaus wäre es wünschenswert, die Patienten über einen längeren Zeitraum im Rahmen von Follow-Up-Studien zu beobachten. So wären Aussagen über intraindividuelle Veränderungen der sKlotho-Konzentrationen im Verlauf der CNI möglich.

5.9 Vor- und Nachteile des verwendeten Nachweisverfahrens

Es gibt verschiedene kommerziell erhältliche Möglichkeiten sKlotho im Blut zu bestimmen. Zwischen diesen Testverfahren gibt es Unterschiede, die einen Anteil an den teils konträren bisherigen Studienergebnissen haben könnten. Wir entschieden uns für die Messung von sKlotho für die antikörperbasierte Bestimmung mittles ELISA von IBL (IBL International GmbH, Japan). Weitere kommerziell erhältliche ELISA sind der von Cusabio (Cusabio Biotech, Wuhan, China) und USCN (USCN life Science, INc, Wuhan, China). Der ELISA von IBL

verwendet die von Yamazaki et al. entdeckten monoklonale Maus-Antikörper, die sich gegen humanes sKlotho und membrangebundenes Klotho richten (Yamazaki et al. 2010). Die Hersteller der beiden anderen ELISA geben keine Auskunft über das Epitop, gegen das sich der Antikörper richtet. Eine unabhängige Studie stellte Qualitätsunterscheide zwischen diesen ELISA-Verfahren fest (Heijboer et al. 2013), wobei der von uns verwendete IBL-ELISA als am zuverlässigsten (geringste Intratestvariabilität) abschnitt. Während es beim verwendeten IBL-ELISA keinen Unterscheid machte, ob EDTA-Plasma oder Serum verwendet wurde, variierte in beiden anderen Testverfahren die Höhe der sKlotho-Werte je nach verwendetem Material. Zwischen den verschiedenen ELISA-Verfahren gab es eine sehr hohe Intertestvariabilität, was die Ergebnisse der Tests kaum miteinander vergleichbar macht (Heijboer et al. 2013). Dies könnte dadurch verursacht sein, dass eventuell verschiedene Isoformen von sKlotho nachgewiesen werden. Im Jahr 2015 entwickelten Barker et al. einen neuartigen synthetischen Antikörper sb106-Fab, welcher spezifisch das 130-kDa große sKlotho sowohl bei Nagern als auch beim Menschen zuverlässig nachweist (Barker et al. 2015). Das von Barker et al. entwickelte Testverfahren war zum Zeitpunkt der Probenanalyse noch nicht entwickelt und ist noch immer nicht kommerziell erhältlich. Somit war der verwendete IBL-ELISA das zum Zeitpunkt der Messung geeignetste Verfahren zur Bestimmung von sKlotho. Ob die Messung von sKlotho im Blut oder Urin geeigneter zur Beurteilung der Nierenfunktion ist, ist Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Wir führten unsere Untersuchung an Serumproben durch, was der höheren Stabilität von sKlotho im Serum oder Plasma im Vergleich zu Urin geschuldet ist (IBL International). Während Akimoto zu dem Schluss kommt, dass die Bestimmung von sKlotho aus dem 24h Sammelurin eine bessere Aussage über die Nierenfunktion als die Bestimmung im Serum erlaubt (Akimoto et al. 2012), wiesen andere Studien nach, dass sKlotho sowohl im Spontanurin als auch im Plasma bereits in frühen CNI Stadien abfällt (Hu et al. 2011, Barker et al.2015). Welches Probenmaterial und welche Analysemethode sich also zukünftig am besten für die sKlothobestimmung eignet, sollte weiterführend untersucht werden.

5.10 Repräsentativität der Studie

Das beobachtete Patientenkollektiv von n=81 war relativ groß. Auch die Grunderkrankungen, die bei den untersuchten Patienten ursächlich für die CNI waren, entsprechen in etwa der beobachteten Verteilung im Gesamtkollektiv. Die Geschlechterverteilung zeigte keine signifikanten Abweichungen zwischen den CNI Stadien. Deshalb ist anzunehmen, dass sich unsere Ergebnisse auf andere pädiatrische CNI Patienten übertragen lassen, die Studie somit eine gute Repräsentativität besitzt. Eine ausgewogenere Verteilung der Patienten auf die einzelnen CNI-Stadien wäre wünschenswert, um eine bessere Gruppenvergleichbarkeit zu gewährleisten. Dies ist allerdings in Anbetracht der geringen Prävalenz der CNI im Kindesalter in einem angemessenen Studienzeitraum schwer zu realisieren.

6. Zusammenfassung

In der von uns durchgeführten Querschnittsstudie untersuchten wir die Serumkonzentrationen von sKlotho, FGF-23, PTH und anderen Biomarkern des Knochenstoffwechsels und des Phosphathaushaltes bei 81 pädiatrischen CNI-Patienten und 27 gesunden Kontrollpatienten. Klotho beeinflusst als obligater Kofaktor von FGF-23 und auch unabhängig von FGF-23 die Phosphathomöostase maßgeblich. Es gibt nur vereinzelt klinische Daten zur Konzentration von sKlotho und dem Zusammenhang mit etablierten Parametern der Nierenfunktion bei pädiatrischen CNI-Patienten. Wir fanden übereinstimmend mit anderen Forschungsgruppen eine signifikante Verminderung von sKlotho bei chronisch nierenkranken Kindern im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe [982 (832-1172) pg/ml vs. 1889 (1587-2249) pg/ml $p< 0,001$]. Eine relevante Absenkung von sKlotho wiesen wir erst ab dem CNI Stadium 5 nach, weshalb sich sKlotho unserer Meinung nach nicht als früher Biomarker für die CNI im Kindesalter eignet und nicht genug zwischen den einzelnen CNI-Stadien differenziert. Wir fanden negative Korrelationen zwischen sKlotho und dem Alter der Patienten ($r= -0,32$, $p=0,017$) und dem Serumkreatinin ($r= -0,29$, $p=0,035$) sowie eine positive Korrelation zwischen sKlotho und knochenspezifischer Alkalischer Phosphatase ($r=0,55$, $p<0,001$). In der multivariaten Analyse zeigte allein die knochenspezifische Alkalische Phosphatase einen signifikanten Einfluss auf die Serumkonzentration von sKlotho. Einen direkten Zusammenhang zwischen FGF-23 und sKlotho konnten wir bei unserem Patientenkollektiv entgegen unserer ursprünglich aufgestellten Hypothese nicht nachweisen. Unsere Ergebnisse weisen auf die von FGF-23 unabhängige Wirkung von sKlotho auf den Phosphat- und Knochenstoffwechsel im Rahmen der CNI im Kindesalter hin. Auf welchem Weg genau sKlotho unabhängig von FGF-23 wirkt, sollte weiterführend untersucht werden. So bleibt festzuhalten, dass die Bestimmung von sKlotho in Zusammenschau mit den bereits etablierten Parametern zur Beurteilung des Knochenstoffwechsels das pathophysiologische Verständnis der CKD-MBD erweitert und möglicherweise ein sensitiver Biomarker für den Knochenstoffwechsel und den tubulären Phosphatstoffwechsel ist.

6. Conclusion

In this cross-sectional study, we analyzed serum levels of sKlotho, FGF-23, PTH and other biomarkers of bone metabolism and tubular phosphate handling in 81 children with CKD and in 27 controls. Klotho influences phosphate homeostasis as an obligate cofactor for FGF-23 and independently from FGF-23. Clinical data on sKlotho concentrations and its relation to other parameters of bone metabolism in children with CKD are still scarce. Corresponding to other studies, we found a significant reduction of mean sKlotho levels (95% CI) in children with CKD compared to controls (982 [832-1172] pg/ml vs. 1889 [1587-2249] pg/ml $p<0.001$). We observed a significant decrease in sKlotho levels first in CKD-stage 5 compared to the controls, therefore sKlotho seems not to be an appropriate early biomarker for CKD in children and does not differ between CKD stages in a sufficient way. sKlotho showed a negative correlation with age ($r= -0.32$, $p= 0.017$) and creatinine ($r= -0.29$, $p= 0.035$) as well as a positive correlation with bone-specific-alkaline-phosphatase ($r= 0.55$, $p<0.001$). In multivariate regression analysis bone-specific-alkaline-phosphatase was the only significant predictor of sKlotho. In contrast to our initial hypothesis, there was no direct correlation between sKlotho and FGF-23. Our results show evidence for the FGF-23-independent influence of sKlotho on phosphate- and bone-homeostasis in children with CKD. How this FGF-23-independent way works exactly, is an upcoming field of research. All in all, our results support the assumption, that sKlotho measurement in combination with established parameters of bone metabolism, expand our pathophysiological knowledge about CKD-MBD and is a potential sensitive biomarker for bone metabolism and tubular phosphate handling.

7. Abkürzungsverzeichnis

b-ALP	bone-specific-alkaline-phosphatase
	knochenspezifische Alkalische Phosphatase
β	standardisierter Koeffizient Beta im Regressionsmodell
CAKUT	congenital anomalies of kidney and urinary tract
CKD-MBD	chronic kidney disease mineral and bone disorder
CNI	chronische Niereninsuffizienz
CYP	Cytochrom-P
DXA	Duale-Röntgen-Absorptiometrie
eGFR	estimated (geschätzte) Glomeruläre Filtrationsrate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FGF-19	Fibroblast-growth-factor-19
	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-19
FGF-23	Fibroblast-growth-factor-23
	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-23
FGFRIIIc	Fibroblast-growth-factor-receptor typ IIIc
	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor Typ IIIc
ggf	gegebenenfalls
HRP	horseradish peroxidase
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
IBL	Immuno-Biological Laboratories, Japan
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KfH	Kuratorium für Nierentransplantation und Dialyse e.V.
L	Körperlänge

n	Anzahl der Patienten
NaPi-II	sodium-phosphorus-cotransporter-II
	Natrium-Phosphat-Kotransporter Typ II
Po_4	Serumphosphat
PTH	Parathormon
p-Wert	Signifikanzwert
R^2	Bestimmtheitsmaß, Maß für die Modellgüte des Regressionsmodells
ROD	Renale Osteodystrophie
sKlotho	soluble Klotho
	lösliches Klotho
Scr	Serumkreatinin
s.e.	Standardfehler im Regressionsmodell
SPSS	statistical package for the social sciences Statistikprogramm von IBM Version 22
TGF-Beta	Transforming-growth-factor-beta
TMB	Tetramethylbenzidin
TPR	Tubuläre Phosphatreabsorption
ZNS	Zentrales Nervensystem
$1,25(OH)_2D_3$	1,25-Dihydroxy-Vitamin-D, Calcitriol
$25(OH)D_3$	25-Hydroxy-Vitamin-D, Vitamin-D3
95 CI	95%-Konfidenzintervall

8. Literaturverzeichnis

Abramovitz L., Rubinek T., Ligumsky H., Bose S., Barshack I., Avivi C. et al. (2011): KL1 Internal Repeat Mediates Klotho Tumor Suppressor Activities and Inhibits bFGF and IGF-I Signaling in Pancreatic Cancer. In: Clinical Cancer Research 17 (13), S. 4254–4266.

Akimoto T., Yoshizawa H., Watanabe Y., Numata A., Yamazaki T., Takeshima E. et al. (2012): Characteristics of urinary and serum soluble Klotho protein in patients with different degrees of chronic kidney disease. In: BMC Nephrol 13 (1), S. 45.

Andrukhova O., Zeitz U., Goetz R., Mohammadi M., Lanske, B., Erben R. G. (2012): FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2–SGK1 signaling pathway. In: Bone 51 (3), S. 621–628.

Bacchetta J., Dubourg L., Harambat J., Ranchin B., Abou-Jaoude P., Arnaud S. et al. (2010): The Influence of Glomerular Filtration Rate and Age on Fibroblast Growth Factor 23 Serum Levels in Pediatric Chronic Kidney Disease. In: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 95 (4), S. 1741–1748.

Barker S. L., Pastor J., Carranza D., Quiñones H., Griffith C., Goetz R. et al. (2015): The demonstration of αKlotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody. In: Nephrology Dialysis Transplantation 30 (2), S. 223–233.

Bianchi M. L., Baim S., Bishop N. J., Gordon C. M. Hans D. B. Langman C. B. et al. (2010): Official positions of the International Society for Clinical Densitometry (ISCD) on DXA evaluation in children and adolescents. In: Pediatr Nephrol 25 (1), S. 37–47.

Burnett S.-A. M., Gunawardene S. C., Bringhurst F. R., Jüppner H., Lee H., Finkelstein J. S. (2006): Regulation of C-Terminal and Intact FGF-23 by Dietary Phosphate in Men and Women. In: J Bone Miner Res 21 (8), S. 1187–1196.

Carrillo-López N., Panizo S., Alonso-Montes C., Román-García P., Rodríguez I., Martínez-Salgado C. et al. (2016): Direct inhibition of osteoblastic Wnt pathway by fibroblast growth factor 23 contributes to bone loss in chronic kidney disease. In: Kidney International 90 (1), S. 77–89.

Cha S.-K., Hu M.-C., Kurosu H., Kuro-o M., Moe O., Huang C.-L (2009): Regulation of Renal Outer Medullary Potassium Channel and Renal K+ Excretion by Klotho. In: Molecular Pharmacology 76 (1), S. 38–46.

Chang Q. (2005): The -Glucuronidase Klotho Hydrolyzes and Activates the TRPV5 Channel. In: Science 310 (5747), S. 490–493.

Chen G. L. Y., Goetz R., Fu L., Jayaraman S., Hu M.-C. et al. (2018): α-Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signalling. In: Nature 553 (7689), S. 461–466.

Chen T.-H., Kuro-o M., Chen C.-H., Sue Y.-M., Chen Y.-C., Wu H.-Ha. Cheng C.-Y. (2013): The secreted Klotho protein restores phosphate retention and suppresses accelerated aging in Klotho mutant mice. In: European Journal of Pharmacology 698 (1-3), S. 67–73.

Dalton G., An S.-W., Al-Juboori S. I., Nischan N., Yoon J., Dobrinskikh E. et al. (2017): Soluble klotho binds monosialoganglioside to regulate membrane microdomains and growth factor signaling. In: Proc Natl Acad Sci USA 114 (4), S. 752–757.

Di Marco G. S., Reuter S., Kentrup D., Grabner A., Amaral A. P., Fobker M. et al. (2014): Treatment of established left ventricular hypertrophy with fibroblast growth factor receptor blockade in an animal model of CKD. In: Nephrology Dialysis Transplantation 29 (11), S. 2028–2035.

Doi S., Zou Y., Togao O., Pastor J. V., John G. B., Wang L. et al. (2011): Klotho Inhibits Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1) Signaling and Suppresses Renal Fibrosis and Cancer Metastasis in Mice. In: J. Biol. Chem. 286 (10), S. 8655–8665.

Eswarakumar V.P., Lax I., Schlessinger J. (2005): Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. In: Cytokine & Growth Factor Reviews 16 (2), S. 139–149.

Faul C., Amaral A. P., Oskouei B., Hu M.-C., Sloan A., Isakova T. et al. (2011): FGF23 induces left ventricular hypertrophy. In: J. Clin. Invest. 121 (11), S. 4393–4408.

Gkentzi D., Efthymiadou A., Kritikou D., Chrysis D. (2014): Fibroblast growth factor 23 and Klotho serum levels in healthy children. In: Bone 66, S. 8–14.

Goetz R., Beenken A., Ibrahimi O. A., Kalinina J., Olsen S. K., Eliseenkova A. V. et al. (2007): Molecular Insights into the Klotho-Dependent, Endocrine Mode of Action of Fibroblast Growth Factor 19 Subfamily Members. In: Molecular and Cellular Biology 27 (9), S. 3417–3428.

Grabner A., Faul C. (2016): The role of fibroblast growth factor 23 and Klotho in uremic cardiomyopathy. In: Current Opinion in Nephrology and Hypertension 25 (4), S. 314–324.

Griffin L. M., Kalkwarf H. J., Zemel B. S., Shults J., Wetzsteon R. J., Strife C. F., Leonard M. B. (2012): Assessment of dual-energy x-ray absorptiometry measures of bone health in pediatric chronic kidney disease. In: Pediatr Nephrol 27 (7), S. 1139–1148.

Groothoff J. W., GruppenM. P., Offringa M., Hutten J., Lilien M. R., van de Kar N. J. et al. (2002): Mortality and causes of death of end-stage renal disease in children: A Dutch cohort study. In: Kidney International 61 (2), S. 621–629.

Gutierrez O. (2005): Fibroblast Growth Factor-23 Mitigates Hyperphosphatemia but Accentuates Calcitriol Deficiency in Chronic Kidney Disease. In: Journal of the American Society of Nephrology 16 (7), S. 2205–2215.

Haarhaus M., Fernstrom A., Magnusson M., Magnusson P. (2009): Clinical significance of bone alkaline phosphatase isoforms, including the novel B1x isoform, in mild to moderate chronic kidney disease. In: Nephrology Dialysis Transplantation 24 (11), S. 3382–3389.

Hamilton A. J., Caskey F. J., Casula A., Ben-Shlomo Y., Inward C. D. (2018): Psychosocial Health and Lifestyle Behaviors in Young Adults Receiving Renal Replacement Therapy Compared to the General Population: Findings From the SPEAK Study. In: American Journal of Kidney Diseases. Available online 4 October 2018, In Press 12.11.2018

Hanudel M. R., Salusky I. B. (2017): Treatment of Pediatric Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder. In: Curr Osteoporos Rep 15 (3), S. 198–206.

Harambat J., van Stralen K. J., Kim J. J., Tizard E. J. (2012): Epidemiology of chronic kidney disease in children. In: Pediatr Nephrol 27 (3), S. 363–373.

Heijboer A. C., Blankenstein M. A., Hoenderop J., Borst M. H. de., Vervloet M. G. (2013): Laboratory aspects of circulating -Klotho. In: Nephrology Dialysis Transplantation 28 (9), S. 2283–2287.

Hu M. C., Shi M., Zhang J., Pastor J., Nakatani T., Lanske B. et al. (2010): Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. In: The FASEB Journal 24 (9), S. 3438–3450.

Hu M. C., Shi M., Zhang J., Quinones H., Griffith C., Kuro-o M., Moe O. W. (2011): Klotho Deficiency Causes Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. In: Journal of the American Society of Nephrology 22 (1), S. 124–136.

Hu M. C., Shi M., Zhang J., Addo T., Cho H. J., Barker S. L. et al. (2015a): Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating Klotho. In: Journal of the American Society of Nephrology 27 (1), S. 79–90.

Hu M. C., Shi M., Cho H. J., Adams-Huet B., Paek J., Hill K. et al. (2015b): Klotho and Phosphate Are Modulators of Pathologic Uremic Cardiac Remodeling. In: Journal of the American Society of Nephrology 26 (6), S. 1290–1302.

IBL International, Instructions for Use, soluble α-Klotho ELISA [Online im Internet.] URL: https://www.ibl-international.com/media/catalog/product/J/P/JP27998_IFU_en_soluble_alpha-Klotho_ELISA_sym2.pdf [Stand:08.11.2018, 10:15]

Kamemori M., Ohyama Y., Kurabayashi M., Takahashi K., Nagai R., Furuya N. (2002): Expression of Klotho protein in the inner ear. In: Hearing Research 171 (1-2), S. 103–110.

Kawaguchi H., Manabe N., Miyaura C., Chikuda H., Nakamura K., Kuro-o M. (1999): Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in klotho mouse exhibiting low-turnover osteopenia. In: J. Clin. Invest. 104 (3), S. 229–237.

Kawaguchi H., Manabe N., Chikuda H., Nakamura K., Kuroo M. (2000): Cellular and molecular mechanism of low-turnover osteopenia in the klotho-deficient mouse. In: Cell Mol Life Sci. 57 (5), S. 731–737.

Kemper M. J., van Husen M. (2014): Renal osteodystrophy in children. In: Current Opinion in Pediatrics 26 (2), S. 180–186.

Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group KDIGO: 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. In: Kidney Int Suppl 3 (1), S.1-150.

Kitagawa M., Sugiyama H., Morinaga H., Inoue T., Takiue K., Ogawa A. et al. (2013): A Decreased Level of Serum Soluble Klotho Is an Independent Biomarker Associated with Arterial Stiffness in Patients with Chronic Kidney Disease. In: PLoS ONE 8 (2), S. e56695.

Kokkinaki M., Abu-Asab M., Gunawardena N., Ahern G., Javidnia M., Young J., Golestaneh N. (2013): Klotho Regulates Retinal Pigment Epithelial Functions and Protects Against Oxidative Stress. In: Journal of Neuroscience 33 (41), S. 16346–16359.

Komaba H., Kaludjerovic J., Hu D. Z., Nagano K., Amano K., Ide N. et al. (2017): Klotho expression in osteocytes regulates bone metabolism and controls bone formation. In: Kidney International 92 (3), S. 599–611.

Kuro-o M., Matsumura Y., Aizawa H., Kawaguchi H., Suga T., Utsugi T. et al. (1997): Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. In: Nature 390 (6655), S. 45–51.

Kuro-o M. (2018): Klotho and endocrine fibroblast growth factors: marker of chronic kidney disease progression and cardiovascular complications? In: Nephrology Dialysis Transplantation 70, S. 2702.

Kurosu H. (2005): Suppression of Aging in Mice by the Hormone Klotho. In: Science 309 (5742), S. 1829–1833.

Kurosu H., Ogawa Y., Miyoshi M., Yamamoto M., Nandi A., Rosenblatt K. P. et al. (2006): Regulation of Fibroblast Growth Factor-23 Signaling by Klotho. In: J. Biol. Chem. 281 (10), S. 6120–6123.

Larsson T., Nisbeth U.L.F., Ljunggren Ö., Jüppner H., Jonsson K. B. (2003): Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. In: Kidney International 64 (6), S. 2272–2279.

Lau W. L., Leaf E. M., Hu M. C., Takeno M. M., Kuro-o M., Moe O. W., Giachelli C. M. (2012): Vitamin D receptor agonists increase klotho and osteopontin while decreasing aortic calcification in mice with chronic kidney disease fed a high phosphate diet. In: Kidney International 82 (12), S. 1261–1270.

Lerch C., Shroff R., Wan M., Rees L., Aitkenhead H., Kaplan B. I. et al. (2018): Effects of nutritional vitamin D supplementation on markers of bone and mineral metabolism in children with chronic kidney disease. In: Nephrology Dialysis Transplantation 27, S. 314.

Li S.-A., Watanabe M., Yamada H., Nagai A., Kinuta M., Takei K. (2004): Immunohistochemical Localization of Klotho Protein in Brain, Kidney, and Reproductive Organs of Mice. In: Cell Struct. Funct. 29 (4), S. 91–99.

Lim K., Lu T.-S., Molostvov G., Lee C., Lam F.T., Zehnder D., Hsiao L.-L. (2012): Vascular Klotho Deficiency Potentiates the Development of Human Artery Calcification and Mediates Resistance to Fibroblast Growth Factor 23. In: Circulation 125 (18), S. 2243–2255.

Lim K., Groen A., Molostvov G., Lu T., Lilley K.S., Snead D., James S., Wilkinson I.B., Ting S., Hsiao L.-L. (2015): α-Klotho Expression in Human Tissues. In: The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism 100 (10), S. E1308-1318.

Lindberg K., Amin R., Moe O. W., Hu M.-C, Erben R. G., Ostman Wernerson A. et al. (2014): The Kidney Is the Principal Organ Mediating Klotho Effects. In: Journal of the American Society of Nephrology 25 (10), S. 2169–2175.

Liu H., Fergusson M. M., Castilho R. M., Liu J., Cao L., Chen J. et al. (2007): Augmented Wnt Signaling in a Mammalian Model of Accelerated Aging. In: Science 317 (5839), S. 803–806.

Lu X., Hu M. C. (2017): Klotho/FGF23 Axis in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease. In: Kidney Dis 3 (1), S. 15–23.

Mac Way F., Lessard M., Lafage-Proust M.-H. (2012): Pathophysiology of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. In: Joint Bone Spine 79 (6), S. 544–549.

Matsumura Y., Aizawa H., Shiraki-Iida T., Nagai R., Kuro-o M., Nabeshima Y. (1998): Identification of the Human Klotho Gene and Its Two Transcripts Encoding Membrane and Secreted Klotho Protein. In: Biochemical and Biophysical Research Communications 242 (3), S. 626–630.

Mazzaferro S., Tartaglione L., Rotondi S., Bover J., Goldsmith D., Pasquali M. (2014): News on Biomarkers in CKD-MBD. In: Seminars in Nephrology 34 (6), S. 598–611.

Mehls O, Ritz E., Krempien B., Gilli G., Link K., Willich E., Schärer K. (1975). Slipped epiphyses in renal osteodystrophy. In: Arch Dis Child 50 (7), S. 545–554.

Mencke R., Harms G., Mirković K., Struik J., van Ark J., van Loon E. et al. (2015): Membrane-bound Klotho is not expressed endogenously in healthy or uraemic human vascular tissue. In: Cardiovasc Res 108 (2), S. 220–231.

Mencke R., Harms G., Moser J., van Meurs M., Diepstra A., Leuvenink H. G., Hillebrands J.-L. (2017): Human alternative Klotho mRNA is a nonsense-mediated mRNA decay target inefficiently spliced in renal disease. In: JCI Insight 2 (20), S. i118.

Mian I.S (1998): Sequence, Structural, Functional, and Phylogenetic Analyses of Three Glycosidase Families. In: Blood Cells, Molecules, and Diseases 24 (2), S. 83–100.

Moe S., Drüeke T., Cunningham J., Goodman W., Martin K., Olgaard K. et al. (2006): Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). In: Kidney International 69 (11), S. 1945–1953.

National Kidney Foundation (2002): K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. In: Am J Kidney Dis 39, S1-S266 (suppl 1).

Olauson H., Mencke R., Hillebrands J.-L., Larsson T E. (2017): Tissue expression and source of circulating αKlotho. In: Bone 100, S. 19–35.

Pavik I., Jaeger P., Ebner L., Wagner C. A., Petzold K., Spichtig D. et al. (2013): Secreted Klotho and FGF23 in chronic kidney disease Stage 1 to 5: a sequence suggested from a cross-sectional study. In: Nephrology Dialysis Transplantation 28 (2), S. 352–359.

Portale A. A., Wolf M., Juppner H., Messinger S., Kumar J., Wesseling-Perry K. et al. (2014): Disordered FGF23 and Mineral Metabolism in Children with CKD. In: Clinical Journal of the American Society of Nephrology 9 (2), S. 344–353.

Razzaque M. S., Sitara D., Taguchi T., St-Arnaud R., Lanske B. (2006): Premature aging-like phenotype in fibroblast growth factor 23 null mice is a vitamin D-mediated process. In: The FASEB Journal 20 (6), S. 720–722.

Saito Y., Nakamura T., Ohyama Y., Suzuki T., Iida A., Shiraki-Iida T. et al. (2000): In Vivo klotho Gene Delivery Protects against Endothelial Dysfunction in Multiple Risk Factor Syndrome. In: Biochemical and Biophysical Research Communications 276 (2), S. 767–772.

Sakan H., Nakatani K., Asai O., Imura A., Tanaka T., Yoshimoto S. et al. (2014): Reduced Renal α-Klotho Expression in CKD Patients and Its Effect on Renal Phosphate Handling and Vitamin D Metabolism. In: PLoS ONE 9 (1), S. e86301.

Sanchez C. P., Salusky I. B., Kuizon B. D., Ramirez J. A., Gales B., Ettenger R. B., Goodman, W. G. (1998): Bone disease in children and adolescents undergoing successful renal transplantation. In: Kidney International 53 (5), S. 1358–1364.

Sawires H. K., Essam R. M., Morgan M. F., Mahmoud R. A. (2015): Serum Klotho: Relation to Fibroblast Growth Factor-23 and Other Regulators of Phosphate Metabolism in Children with Chronic Kidney Disease. In: Nephron 129 (4), S. 293–299.

Scholze A., Liu Y., Pedersen L., Xia S., Roth H. J., Hocher B. et al. (2014): Soluble α-Klotho and Its Relation to Kidney Function and Fibroblast Growth Factor-23. In: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 99 (5), S. E855.

Schwartz G. J., Munoz A., Schneider M. F., Mak R. H., Kaskel F., Warady B. A., Furth S. L. (2009): New Equations to Estimate GFR in Children with CKD. In: Journal of the American Society of Nephrology 20 (3), S. 629–637.

Seiler, S., Wen M., Roth H. J., Fehrenz M., Flügge F., Herath E. et al. (2013): Plasma Klotho is not related to kidney function and does not predict adverse outcome in patients with chronic kidney disease. In: Kidney International 83 (1), S. 121–128.

Shimada T., Urakawa I., Yamazaki Y., Hasegawa H., Hino R., Yoneya T. et al. (2004a): FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. In: Biochemical and Biophysical Research Communications 314 (2), S. 409–414.

Shimada T., Hasegawa H., Yamazaki Y., Muto T., Hino R., Takeuchi Y. et al. (2004b): FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. In: J Bone Miner Res 19 (3), S. 429–435.

Shimamura Y., Hamada K., Inoue K., Ogata K., Ishihara M., Kagawa T. et al. (2012): Serum levels of soluble secreted α-Klotho are decreased in the early stages of chronic kidney disease, making it a probable novel biomarker for early diagnosis. In: Clin Exp Nephrol 16 (5), S. 722–729.

Shroff R. (2013): Phosphate is a vascular toxin. In: Pediatr Nephrol 28 (4), S. 583–593.

Sprague S. M., Bellorin-Font E., Jorgetti V., Carvalho A. B., Malluche H. H., Ferreira A. et al. (2016): Diagnostic Accuracy of Bone Turnover Markers and Bone Histology in Patients With CKD Treated by Dialysis. In: American Journal of Kidney Diseases 67 (4), S. 559–566.

Stenvinkel P, Larsson T. E. (2013): Chronic Kidney Disease: A Clinical Model of Premature Aging. In: AJKD Volume 62 (Issue 2), S. 339–351.

Takeshita K., Fujimori T., Kurotaki Y., Honjo H., Tsujikawa H., Yasui K. et al. (2004): Sinoatrial Node Dysfunction and Early Unexpected Death of Mice With a Defect of klotho Gene Expression. In: Circulation 109 (14), S. 1776–1782.

Tan S.-J., Smith E. R., Holt S. G. Hewitson T. D. Toussaint N. D. (2017): Soluble klotho may be a marker of phosphate reabsorption. In: Clinical Kidney Journal 10 (3), S. 397–404.

Tsujikawa H., Kurotaki Y., Fujimori T., Fukuda K., Nabeshima Y.-I. (2003): Klotho, a Gene Related to a Syndrome Resembling Human Premature Aging, Functions in a Negative Regulatory Circuit of Vitamin D Endocrine System. In: Molecular Endocrinology 17 (12), S. 2393–2403.

Urakawa I., Yamazaki Y., Shimada T., Iijima K., Hasegawa H., Okawa K. et al. (2006): Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. In: Nature 444 (7120), S. 770–774.

van Husen M., Fischer A-K, Lehnhardt A., Klaassen I., Möller K., Müller-Wiefel D.-E, Kemper M. J. (2010): Fibroblast growth factor 23 and bone metabolism in children with chronic kidney disease. In: Kidney International 78 (2), S. 200–206.

van Husen M., Lehnhardt A., Fischer A.-K., Brinkert F., Loos S., Oh J., Kemper M. J. (2012): Fibroblast growth factor 23 and calcium phosphate homeostasis after pediatric renal transplantation. In: Pediatric Transplantation 16 (5), S. 443–450.

van Loon E. P. M., Pulskens W. P., van der Hagen E. A. E., Lavrijsen M., Vervloet M. G., van Goor H. et al. (2015): Shedding of klotho by ADAMs in the kidney. In: American Journal of Physiology-Renal Physiology 309 (4), S. F359.

Wan M., Smith C., Shah V., Gullet A., Wells D., Rees L., Shroff R. (2013): Fibroblast growth factor 23 and soluble klotho in children with chronic kidney disease. In: Nephrology Dialysis Transplantation 28 (1), S. 153–161.

Wang Q., Su W., Shen Z., Wang R. (2018): Correlation between Soluble α -Klotho and Renal Function in Patients with Chronic Kidney Disease: A Review and Meta-Analysis. In: BioMed Research International 2018 (1), S. 1–12.

Wesseling-Perry K., Pereira R. C., Tseng C.-H., Elashoff R., Zaritsky J. J., Yadin O. et al. (2012): Early Skeletal and Biochemical Alterations in Pediatric

Chronic Kidney Disease. In: Clinical Journal of the American Society of Nephrology 7 (1), S. 146–152.

White K. E., Evans W. E., O'Riordan J. L. H., Speer M. C., Econs M. J., Lorenz-Depiereux B. et al. (2000): Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. In: Nat Genet 26 (3), S. 345–348.

Wolf I., Levanon-Cohen S., Bose S., Ligumsky H., Sredni B., Kanety H. et al. (2008): Klotho: a tumor suppressor and a modulator of the IGF-1 and FGF pathways in human breast cancer. In: Oncogene 27 (56), S. 7094–7105.

Yamashita T., Yoshioka M., Itoh N. (2000): Identification of a Novel Fibroblast Growth Factor, FGF-23, Preferentially Expressed in the Ventrolateral Thalamic Nucleus of the Brain. In: Biochemical and Biophysical Research Communications 277 (2), S. 494–498.

Yamazaki Y., Okazaki R., Shibata M., Hasegawa Y., Satoh K., Tajima T. et al. (2002): Increased Circulatory Level of Biologically Active Full-Length FGF-23 in Patients with Hypophosphatemic Rickets/Osteomalacia. In: The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 87 (11), S. 4957–4960.

Yamazaki Y., Imura A., Urakawa I., Shimada T., Murakami J., Aono Y. et al. (2010): Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. In: Biochemical and Biophysical Research Communications 398 (3), S. 513–518.

Zhang Wei, Xue D., Hu D., Xie T., Tao Y., Zhu T. et al. (2015): Secreted klotho protein attenuates osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro via inactivation of the FGFR1/ERK signaling pathway. In: Growth Factors 33 (5-6), S. 356–365.

Zheng S., Chen Y., Zheng Y., Zhou Z., Li Z. (2018): Correlation of serum levels of fibroblast growth factor 23 and Klotho protein levels with bone mineral density in maintenance hemodialysis patients. In: Eur J Med Res 23 (1), S. 774.

9. Danksagung

Ich bedanke mich bei allen, die mich auf dem Weg zur Dissertation unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Markus Kemper für die Überlassung des Themas, die Einarbeitung in die Thematik und die kontinuierliche wissenschaftliche Betreuung der Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. med. Michael van Husen bedanken, der mich während des Promotionsvorhabens fachlich unterstützte und mich durch seinen unerschütterlichen Optimismus immer wieder zum Weiterarbeiten motivierte. Ebenso danke ich Dr. agr. Hans O. Pinnschmidt für die statistische Beratung.

Meinem Ehemann Michael Kleinke danke ich für die vielen motivierenden Gespräche und seine Unterstützung während des Studiums und der Promotion.

Auch meiner Familie insbesondere meinen Eltern möchte ich für die emotionale und finanzielle Unterstützung während des Studiums und darüber hinaus danken.

10. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....