

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Abteilung für pädiatrische Nephrologie

Direktor: Prof. Dr. med. K. Ullrich

## **Der Fibroblastenwachstumsfaktor 23 bei chronisch niereninsuffizienten Kindern und Jugendlichen**

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Ann-Katrin Fischer  
aus Hamburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 28.11.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. M. Kemper**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. F. Thaiss**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. M. Amling**

<b><u>Inhaltsverzeichnis</u></b>	Seite
<b>1. Arbeitshypothesen und Fragestellung</b> .....	8
<b>2. Einleitung</b> .....	9
2.1 Chronische Niereninsuffizienz (CNI) .....	9
2.2 CKD-MBD („Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorders“) .....	10
2.3 Fibroblastenwachstumsfaktor-23 (FGF23) .....	11
2.3.1 Aufbau und Funktion des FGF23 .....	11
2.3.2 FGF23 – Inhalt vieler Studien .....	16
2.3.3 Die FGF-Rezeptoren (FGFR) .....	18
2.3.4 Der Kofaktor Klotho .....	18
2.4 Phosphatonine .....	21
2.5 FGF23 bei chronischer Niereninsuffizienz .....	22
2.6 Zielsetzung der Studie .....	23
<b>3. Material und Methoden</b> .....	24
3.1 Prospektive Studie .....	24
3.1.1 Votum der Ethikkommission .....	24
3.1.2 Patientenkollektiv .....	24
3.1.3 Alters- und Geschlechterverteilung der Patienten ..	24
3.1.4 Ursachen der Niereninsuffizienz .....	25
3.1.5 Medikation der Patienten .....	25
3.2 Patientenproben .....	26
3.2.1 Vorgehen bei der Probensammlung .....	26
3.2.2 Probenaufbewahrung .....	26
3.3 Bestimmung der FGF23-Konzentration mittels ELISA .....	26
3.3.1 Prinzip des ELISA .....	27
3.3.2 Durchführung des ELISA .....	28
3.4 Biochemische Analysen weiterer Laborparameter .....	30
3.5 Statistische Analysen .....	32

<b>4. Ergebnisse</b>	33
4.1 Stadien der CNI und Gruppenverteilung	33
4.2 Deskriptive Statistik der CNI-Stadien	33
4.3 Variable im Gruppenvergleich	35
4.3.1 FGF23 im Gruppenvergleich	36
4.3.2 Phosphat im Gruppenvergleich	37
4.3.3 Parathormon im Gruppenvergleich	38
4.4 Korrelationen	39
4.4.1 Korrelation zwischen FGF23 und eGFR	39
4.4.2 Korrelation zwischen Phosphat und anderen Variablen	39
A: Korrelation zwischen FGF23 und Phosphat	39
B: Korrelation zwischen Phosphat und der eGFR	39
4.4.3 Korrelationen zwischen der PTH-Konzentration und anderen Variablen	39
A: Korrelation zwischen FGF23 und PTH	39
B: Korrelation zwischen PTH und der eGFR	39
4.4.4 Korrelation zwischen FGF23 und den Vitamin-D-Konzentrationen	39
4.4.5 Korrelation zwischen tubulärer Phosphatreabsorption und anderen Variablen	40
A: Korrelation zwischen der eGFR und der tubulären Phosphatreabsorption	40
B: Korrelation zwischen tubulärer Phosphatreabsorption und FGF23	40
4.4.6 Multivariate Analyse mit FGF23 als abhängiger Variable	45
<b>5. Diskussion</b>	46
5.1 Diskussion der Ergebnisse vor dem wissenschaftlichen Hintergrund	46
5.1.1 Der Einfluss der GFR auf FGF23	46
5.1.2 FGF23 im Phosphat-Haushalt	48
5.1.3 FGF23 und 1,25-Vitamin-D <sub>3</sub>	49

5.1.4 FGF23 und die Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus .....	51
5.1.5 FGF23 als Biomarker .....	52
5.2 Qualitätsmerkmale .....	53
5.2.1 Qualitätsmerkmale prospektiver Studien und Fehlerquellen bei der Untersuchung .....	53
5.2.2 Vorteile des verwendeten ELISA-Assays .....	53
5.2.3 Repräsentativität der Ergebnisse .....	54
5.3 Schlussfolgerungen .....	54
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>56</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>57</b>
<b>8. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>9. Anhang .....</b>	<b>65</b>
9. Patienten- und Elternaufklärung, Einverständniserklärung	
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>67</b>
<b>11. Lebenslauf .....</b>	<b>68</b>
<b>12. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>69</b>

<b><u>Tabellenverzeichnis</u></b>	Seite
Tabelle 1: Beurteilung des Schweregrades einer Niereninsuffizienz . . .	9
Tabelle 2: Geschlechterverteilung der Patienten . . . . .	24
Tabelle 3: Ursächliche Erkrankungen der Niereninsuffizienz in der Patientengruppe . . . . .	25
Tabelle 4: Medikation der niereninsuffizienten Patienten . . . . .	26
Tabelle 5: FGF23-Konzentrationen der Standardlösungen . . . . .	29
Tabelle 6: Verteilung der Patienten auf die verschiedenen Gruppen . . .	33
Tabelle 7: Hauptvariablen der Patienten in den unterschiedlichen CNI-Stadien . . . . .	34
Tabelle 8: Multivariate Analyse mit FGF23 als abhängiger Variable . . .	45

<b><u>Abbildungsverzeichnis</u></b>	Seite
Abbildung 1: Physiologischer Natrium-Phosphat-Transport im distalen Tubulus . . . . .	12
Abbildung 2: Regulation und Funktion von FGF23 . . . . .	14
Abbildung 3: Gewebeexpression von FGF23 . . . . .	15
Abbildung 4: Der FGF23-Rezeptor . . . . .	21
Abbildung 5: Prinzip des ELISA, „Sandwich-Komplex“ am Ende der Reaktion . . . . .	27
Abbildung 6: Reaktionsablauf des ELISA . . . . .	30
Abbildung 7: Anstieg des Serum-FGF23-Spiegels im Verhältnis zum CNI-Stadium . . . . .	36
Abbildung 8: Anstieg der Phosphatkonzentration im Verhältnis zum CNI-Stadium . . . . .	37
Abbildung 9: Anstieg der Serum-PTH-Konzentration im Verhältnis zum CNI- Stadium . . . . .	38
Abbildung 10: Negative Korrelation zwischen FGF23 und der eGFR . .	41
Abbildung 11: Positive Korrelation zwischen FGF23 und Phosphat . . .	41

Abbildung 12: Negative Korrelation zwischen Phosphat und der eGFR	42
Abbildung 13: Positive Korrelation zwischen FGF23 und PTH . . . . .	42
Abbildung 14: Positive Korrelation zwischen tubulärer Phosphatreabsorption und der eGFR . . . . .	43
Abbildung 15: Negative Korrelation zwischen tubulärer Phosphatreabsorption und der FGF23-Konzentration . . . . .	43
Abbildung 16: Negative Korrelation zwischen PTH und der eGFR . . . . .	44
Abbildung 17: Negative Korrelation zwischen FGF23 und 1,25-Dihydroxyvitamin-D <sub>3</sub> . . . . .	44

## **1. Arbeitshypothesen und Fragestellung**

Der Fibroblastenwachstumsfaktor-23 (FGF23) ist ein in den letzten Jahren näher charakterisiertes Peptidhormon, das als zirkulierender Faktor die renale Wiederaufnahme von anorganischem Phosphat reguliert und bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CNI) ansteigt (Fukagawa and Kazama 2006; Westerberg, Linde et al. 2007). FGF23 steigt in dem Maße an, in dem die Nierenfunktion abnimmt und ist bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in den höchsten Konzentrationen zu messen (Larsson, Nisbeth et al. 2003).

Die CNI ist mit pathologischen Veränderungen des Knochens assoziiert, die unter dem Begriff der renalen Osteodystrophie (ROD) subsummiert werden. FGF23 scheint für das Ausmaß einer ROD eine erhebliche Rolle zu spielen. Neben der Regulation der Calcium- und Phosphathomeostase supprimiert FGF23 die Expression der 1-alpha-Hydroxylase, wodurch die Synthese von 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub> in den Nieren sinkt (Liu and Quarles 2007). Ergebnisse einiger Studien kommen zu dem Schluss, dass FGF23 ein besserer Biomarker für die Verlaufsbeurteilung der CNI, als die Messung des Serum-Phosphat-Spiegels sein könnte (Gutierrez, Mannstadt et al. 2008). Außerdem könnte FGF23 ein weiterer prädiktiver Faktor für einen zukünftigen sekundären Hyperparathyreoidismus bei Dialysepatienten sein (Liu and Quarles 2007). Daten hinsichtlich der Relevanz der FGF23-Spiegel bei Kindern und Jugendlichen und dem Ausmaß einer ROD liegen bisher nicht vor. Daher bietet sich die Implementierung einer prospektiven Querschnittsstudie zur Datenerhebung bei pädiatrischen Patienten an.

### **Hypothesen:**

- FGF23-Spiegel korrelieren mit dem Ausmaß der Nierenfunktions-einschränkung pädiatrischer CNI-Patienten
- FGF23 spielt eine regulierende Funktion in der Calcium- und Phosphathomeostase
- FGF23 hat eine Schlüsselrolle im Vitamin-D-Stoffwechsel
- FGF23 korreliert mit dem Ausmaß eines sekundären Hyperparathyreoidismus



## **2. Einleitung**

### **2.1 Chronische Niereninsuffizienz (CNI)**

Die Niere spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des systemischen Mineralhaushaltes. Sie ist sowohl Zielorgan einiger Hormone, wie Parathormon (PTH), als auch Hauptstandort der aktiven 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub>-Produktion (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) (Fukagawa and Kazama 2006).

Bei normaler Nierenfunktion wandelt die Niere als Antwort auf erniedrigte Spiegel von Vitamin-D, Phosphat und Calcium, den Vitamin-D-Metaboliten 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) in 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> um. Eine Hypocalcämie signalisiert der Nebenschilddrüse PTH auszuschütten, welches wiederum die 1-alpha-Hydroxylase des 25(OH)D<sub>3</sub> stimuliert. Das dabei entstehende aktive Vitamin-D stimuliert die Absorption von Calcium und Phosphat im Darm, ihre Reabsorption in der Niere und Mobilisierung aus dem Knochen (Nemere 2007). Die CNI ist mit erniedrigten Spiegeln von 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D<sub>3</sub> und einer Hyperphosphatämie assoziiert, die anschließend zu einer Erhöhung des PTH führen (Martinez, Saracho et al. 1997; Pande, Ritter et al. 2006). Daher entwickelt sich bei CNI-Patienten ein sekundärer Hyperparathyreoidismus, der zur Entwicklung von Osteomalazie, Gewebeverkalkungen und Arteriosklerose führt (Berndt and Kumar 2007; Nemere 2007; Wagner and Murer 2008).

Zur Beurteilung der Nierenfunktion und Einteilung in ein Stadium der CNI dient die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) in Anlehnung an die Einteilung bei Erwachsenen. Aufgrund der physiologischen Reifung der Nierenfunktion gelten die Grenzen für die GFR erst ab dem 2. Lebensjahr.

**Tabelle 1: Beurteilung des Schweregrades einer Niereninsuffizienz**

<b>Stadium</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>GFR (ml/min*1,73m<sup>2</sup>)</b>
1	Nierenschaden mit normaler GFR	>90
2	Nierenschaden mit leicht reduzierter GFR	60-89
3	Moderat reduzierte GFR	30-59
4	Schwer reduzierte GFR	15-29
5	Terminales Nierenversagen	<15

(Hogg, Furth et al. 2003)

Eines der Hauptziele der CNI-Therapie ist die Normalisierung der Phosphatspiegel, da eine andauernde Hyperphosphatämie mit erhöhter kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität einhergeht. Es ist daher wichtig, die Phosphathomeostase und ihre regulierenden Hormone weiter zu erforschen, um die Behandlung der CNI-Patienten zu optimieren (Lindner, Charra et al. 1974; Qunibi, Nolan et al. 2002; Pande, Ritter et al. 2006).

Trotz der Behandlung mit Phosphatbindern und der Gabe von Vitamin-D-Präparaten, sind relevante Probleme bei pädiatrischen Patienten mit CNI unter anderem Wachstumsretardierungen, Störungen in der Knochenheilung nach Verletzungen, Gewebeverkalkungen und eine Nephrokalzinose (Liu and Quarles 2007).

Nierentransplantation (NTX) ist die Methode der Wahl für Patienten mit terminalem Nierenversagen. Nierentransplantierte Patienten haben eine geringere Morbidität und Mortalität im Vergleich zu denen unter chronischer Dialyse (Medin, Elinder et al. 2000; Ghanekar, Welch et al. 2006).

## **2.2 CKD-MBD („Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorders“)**

Die CNI ist mit pathologischen Veränderungen des Knochens assoziiert, die bisher mit dem Begriff der renalen Osteodystrophie (ROD) umschrieben wurden. Die ROD stellt jedoch nur eine Facette der Systemerkrankung dar, die nicht allein durch Veränderungen im Knochen, sondern auch durch Veränderungen im Bereich der Biomarker (u.a. PTH, Serum-Calcium, alkalische Phosphatase (AP)), sowie durch vaskuläre Verkalkungen und Weichteilverkalkungen gekennzeichnet ist. Da der sekundäre Hyperparathyreoidismus mit Freisetzung von Calcium und Phosphat aus dem Knochen auch zu einer Arteriosklerose führt, besteht eine eindeutige Assoziation der pathogenetischen Mechanismen der ROD zur Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, die ihrerseits für die Langzeitprognose von niereninsuffizienten Patienten entscheidend sind (Kurokawa and Fukagawa 1999; Goodman, London et al. 2004; Moe, Drueke et al. 2006; Westerberg, Linde et al. 2007).

Dieses Verständnis der ROD als Systemerkrankung wird mit dem 2006 eingeführten Begriff „CKD-MBD“ (Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone

Disorders) erfasst (Moe, Drueke et al. 2006). Diese führt bei fehlender adäquater Therapie insbesondere im Kindesalter zu Störungen des Knochenaufbaus und aufgrund der Nierenbeteiligung zu einer Verlangsamung des Wachstums (Klaus, Watson et al. 2006; Weisinger, Carlini et al. 2006).

Die Krankheit äußert sich in Knochen- und Gelenkschmerzen, strukturellen Knochenanomalien und spontanen Knochenbrüchen. Die Röntgenbefunde ähneln denen einer Vitamin-D-Mangelrachitis. Die führenden Veränderungen betreffen den Epiphysenknorpel und -knochen, mit Rarefizierung der Kortikalis, Looser-Umbauzonen, Osteodystrophia fibrosa cystica („braune Tumore“), Osteosklerose und ektopischen Verkalkungen. Auch Epiphysenlösungen am Femurkopf können bei Kindern auftreten (Martin and Gonzalez 2007).

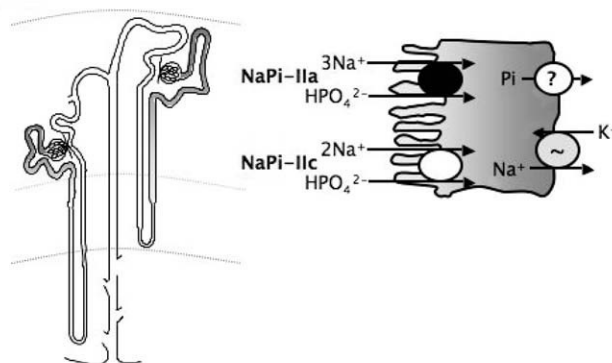
### **2.3 Fibroblastenwachstumsfaktor-23 (FGF23)**

In der Pathogenese der CKD-MBD spielt neben den bekannten Mediatoren PTH, Vitamin-D und weiteren Faktoren wie Steroid- und immunsuppressiver Therapie, nach neueren Daten die Gruppe der Phosphatonine eine bedeutende Rolle (Fukagawa and Kazama 2006; Weisinger, Carlini et al. 2006). Als Hauptvertreter wurde der Fibroblasten-Wachstums-Faktor-23 (FGF23) identifiziert, der eine Schlüsselrolle in der Phosphathomeostase spielt (Burnett, Gunawardene et al. 2006; Fukagawa and Kazama 2006; Pande, Ritter et al. 2006; Nemere 2007). FGF23 stammt aus der Familie der Fibroblastenwachstumsfaktoren, die aus 22 Mitgliedern mit jeweils unterschiedlichen Funktionen besteht (Itoh and Ornitz 2004).

#### **2.3.1 Aufbau und Funktion des FGF23**

Da FGF23 bei gesunden Probanden in Mengen von 10-50 pg/ml im Serum vorkommt, geht man von ihm als physiologischem, humoralem Faktor aus (Fukumoto and Nakahara 2004; Liu and Quarles 2007). Jonsson et al. wiesen in einer Studie FGF23 bei gesunden Erwachsenen in mittleren Konzentrationen von  $55 \pm 50$  RU/ml und bei gesunden Kindern von  $69 \pm 36$  RU/ml im Serum nach (Jonsson, Zahradnik et al. 2003).

Das Peptid, überwiegend von Osteocysten gebildet, supprimiert in der Niere die tubuläre Phosphatrückresorption und hemmt die Synthese des aktiven Vitamin-D, indem es die 1-alpha-Hydroxylase (1- $\alpha$ -Hydroxylase) inhibiert (Shimada, Hasegawa et al. 2004; Bhan, Shah et al. 2006; Fukagawa and Kazama 2006). FGF23 reduziert die renale Phosphatrückresorption, indem es die apikale Expression des natriumabhängigen Phosphat-Kotransporters-IIa (NaPi-IIa) in der Bürstenmembran des proximal renalen Tubulus reduziert (Shimada, Mizutani et al. 2001). Drei Familien des NaPi-Transporters wurden in Säugetieren identifiziert; Typ I, II und III. Die Isoformen NaPi-I, -IIa und -IIc werden in der apikalen Bürstenmembran des proximalen Tubulus exprimiert. Typ IIb ist eine primär intestinale Isoform. Die Expression und Aktivität dieser Transporter wird durch PTH, Calcitriol, Glukokortikoide, durch Phosphat selbst und durch Phosphatonine, wie unter anderem FGF23 reguliert (Murer, Hernando et al. 2003; Ghanekar, Welch et al. 2006; Wagner and Murer 2008).



*Abbildung 1: Physiologischer Natrium-Phosphat-Transport im distalen Tubulus, aus „Phosphatonine – neuartige Phosphathormone“, (Wagner and Murer 2008). Phosphat wird in der Niere frei resorbiert; anschließend werden im proximalen Tubulus ca. 80% rückresorbiert. Dies geschieht durch aktive Transportprozesse der Transporter NaPi-IIa und NaPi-IIc, die Natrium-abhängig Phosphat rückresorbieren. Die Aktivität der basolateralen Na-K-ATPase sorgt für eine geringe intrazelluläre Na-Konzentration, die die Energie für die beiden NaPi-Transporter bereitstellt (Wagner and Murer 2008).*

Burnett et al. berichteten, dass FGF23 im Menschen über die Phosphatspiegel im Blut reguliert wird. Erhöhte Phosphatspiegel stimulieren die Ausschüttung von FGF23 aus den Osteocyten und Osteoblasten, während erniedrigte Phosphatspiegel zu erniedrigten FGF23-Werten führen. 1,25-OH<sub>2</sub>-Vitamin-D<sub>3</sub> stimuliert ebenfalls die FGF23-Synthese (Burnett, Gunawardene et al. 2006). Bestätigt wird dies durch eine Studie von Pande et al. (Pande, Ritter et al. 2006), in der diese zeigten, dass eine Reduzierung der Phosphatbinder, die CNI-Patienten als medikamentöse Therapie erhielten, die FGF23-Spiegel erhöht. Das Absinken des Phosphatspiegels löst eine kompensatorische Steigerung der Calcitriol-Synthese durch die renale 1 $\alpha$ -Hydroxylase aus. Da FGF23 die 1 $\alpha$ -Hydroxylase ebenfalls hemmt, verhindert es diese Gegenregulation. Aufgrund niedriger Phosphatspiegel, die eine Ausschüttung von FGF23 reduzieren, kann so durch einen Feedback-Mechanismus ein zu starkes Absinken des Phosphatspiegels durch FGF23 verhindert werden (Berndt and Kumar 2007; Emmett 2008; Wagner and Murer 2008).

Die Ausschüttung von FGF23 scheint kein schneller Vorgang zu sein, sondern die Reaktion erfolgt eher langsamer und chronisch (Emmett 2008).

Andere Zielorgane als die Niere konnten bisher nicht vollständig identifiziert werden, wobei ein neuerer Bericht die Vermutung anstellte, dass FGF23 möglicherweise auch die intestinale Phosphatresorption supprimiert (Miyamoto, Ito et al. 2005). Weitere Daten lassen zudem vermuten, dass das Peptidhormon auch direkte Signale an die Nebenschilddrüsen sendet (Urakawa, Yamazaki et al. 2006).

FGF23 erhöht möglicherweise die Synthese von PTH und einige Evidenzen deuten darauf hin, dass PTH wiederum die FGF23 Spiegel erhöht. Es wird ebenfalls in Betracht gezogen, dass FGF23 auch die Knochenmineralisation vermindert (Liu and Quarles 2007).

Wesseling-Perry et al. konnten in einer Studie an pädiatrischen Patienten unter Peritonealdialyse keine Korrelation zwischen PTH und FGF23 nachweisen. Die Knochenschäden korrelierten mit PTH, jedoch nicht mit FGF23. Erst bei hohen FGF23-Konzentrationen zeigten sich Assoziationen zu Knochenschäden und Mineralisierungsstörungen (Wesseling-Perry, Pereira et al. 2009).

Weitere Daten lassen vermuten, dass hohe FGF23-Spiegel durch Suppression der Calcitriol-Synthese protektiv im Hinblick auf die Ausbildung von Gefäßverkalkungen sind (Fukagawa and Kazama 2006).

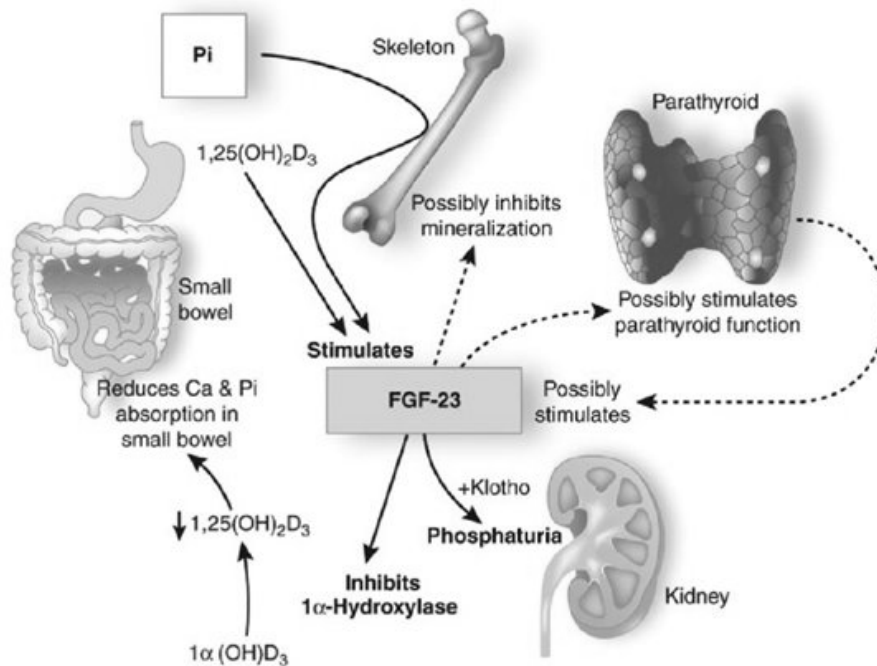


Abbildung 2: Regulation und Funktion von FGF23, aus "What does serum fibroblast growth factor 23 do in hemodialysis patients" (Emmett 2008).

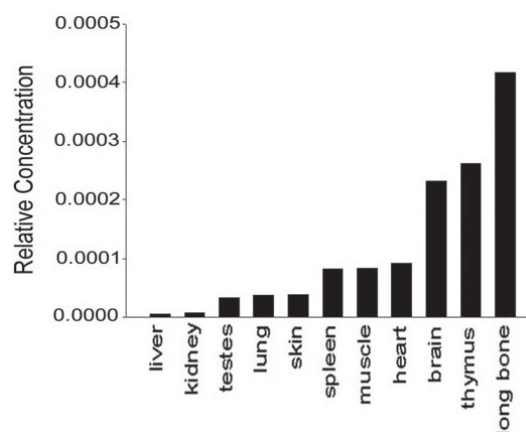
Hyperphosphatämie (Pi) verursacht eine Ausschüttung von FGF23 aus den Osteocyten und Osteoblasten. 1,25-OH<sub>2</sub>-Vitamin-D<sub>3</sub> stimuliert ebenfalls eine Ausschüttung von FGF23. Die wichtigsten Effekte von FGF23 sind eine Inhibierung des Natrium-Phosphat-Kotransporters in den Nieren und eine Hemmung der 1α-Vitamin-D<sub>3</sub>-Hydroxylase, wodurch der Calcitriolspiegel erniedrigt ist. Reduzierte Calcitriolspiegel reduzieren die intestinale Phosphat- und Calciumresorption. FGF23 interagiert mit spezifischen Rezeptoren und dem Transmembranprotein Klotho. Die gestrichelten Linien zeigen eine Reihe zusätzlich möglicher Effekte von FGF23. Das Protein könnte die Nebenschilddrüse direkt stimulieren, wie auch direkt die Mineralisierung des Knochens inhibieren. PTH gilt ebenfalls als ein möglicher Stimulator der FGF23-Sekretion (Emmett 2008).

Das Peptidhormon besteht aus 251 Aminosäuren (251 AS, 32kD) und ist nur in voller Länge biologisch aktiv (Fukumoto and Nakahara 2004). Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der FGF-Familie enthält FGF23 N-terminal ein 24 AS langes Signalpeptid und wird in die Zirkulation sezerniert (Shimada, Mizutani et al. 2001; Liu and Quarles 2007).

Das FGF23 Gen ist auf dem Chromosom 12p13 lokalisiert und phylogenetisch mit FGF19 und 21 Genprodukten gruppiert, mit denen es zu 24% bzw. 22% der AS identisch ist (Yamashita, Yoshioka et al. 2000; Itoh and Ornitz 2004).

Das zirkulierende FGF23-Molekül ist größtenteils gespalten, sodass viele Spaltungsprodukte (N- und C-terminale Peptide) in der Peripherie zirkulieren. Obwohl die meisten Studien aufzeigten, dass diese Amino- und Carboxyfragmente inaktiv sind, sind einzelne biologisch aktive Fragmente identifiziert worden (Berndt, Craig et al. 2007).

Wie berichtet, ist der Knochen Bildungsort des Hauptanteils von FGF23 (Liu, Guo et al. 2003). Zusätzlich wird FGF23 auch im ventrolateralen Thalamus, im Thymus, und Lymphknoten gebildet, wo es wahrscheinlich noch eine Reihe weiterer Funktionen hat, die noch unbekannt sind. Das zirkulierende FGF23 ist jedoch prinzipiell skelettaler Herkunft (Emmett 2008).



*Abbildung 3: Gewebeexpression von FGF23, aus „How fibroblast growth factor 23 works“ (Liu and Quarles 2007). Die Abbildung zeigt FGF23-Konzentrationen in verschiedenen Geweben. Die FGF23-Spiegel wurden in gesundem Mausgewebe bestimmt.*

Transkriptionale und posttranskriptionale Mechanismen regulieren die FGF23-Serum-Spiegel. Systemische Faktoren und lokale aus dem Knochen stammende Faktoren scheinen die Aktivität des FGF23-Promoters zu regulieren (Liu, Tang et al. 2006).

Phosphat (Saito, Maeda et al. 2005), 1,25-Vitamin-D<sub>3</sub> (Liu, Tang et al. 2006), PHEX (Phosphate-regulating endopeptidase homolog, X-linked), welches in den Osteocyten lokalisiert ist (Liu, Zhou et al. 2006), DMP1 (Dentin matrix protein) (Lorenz-Depiereux, Bastepe et al. 2006) und MEPE (Matrix extracellular phosphoglycoprotein) (Liu, Rowe et al. 2007) regulieren die Knochenmineralisation und FGF23-Expression (Liu and Quarles 2007).

Noch nicht identifiziert sind Sensoren für Phosphat, von denen man annimmt, dass sie die lokale Phosphatkonzentration messen können, woraufhin FGF23 ausgeschüttet wird. Eine spannende Frage bleibt deren Lokalisation und Funktion (Liu and Quarles 2007; Wagner and Murer 2008).

### **2.3.2 FGF23 - Inhalt vieler Studien**

In den 90er Jahren leiteten verschiedene Formen der Rachitis, die alle durch eine Hypophosphatämie und übermäßige Phosphaturie charakterisiert waren, zu der Entdeckung einer Gruppe von Phosphat regulierenden Proteinen, die man Phosphatonine nannte. Durch genetische Studien an Patienten mit verschiedenen Störungen im Phosphathaushalt, wurde FGF23 bei Erkrankungen identifiziert, in denen Phosphatverlust gekoppelt mit unangemessen geringen 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-Spiegeln auftrat (Burnett, Gunawardene et al. 2006).

Eine dieser hereditären Erkrankungen ist die autosomal dominante hypophosphatämische Rachitis (ADHR). Die Patienten mit ADHR leiden am sogenannten Phosphatdiabetes, dem renalen Verlust großer Mengen Phosphat mit dem Urin. FGF23 wurde erstmalig als ein Produkt eines mutierten FGF23-Gens bei diesen Patienten nachgewiesen (ADHR-Consortium and Author 2000). Diese Mutation, die eine spezifische AS-Sequenz im FGF23-Gen zerstört (RXXR, zwischen AS 176 und 179), verhindert eine Inaktivierung des FGF23 durch Endoproteasen, was im Endeffekt zu erhöhten FGF23-Spiegeln



führt. (Yamazaki, Okazaki et al. 2002; Jonsson, Zahradnik et al. 2003; Liu, Guo et al. 2003; Wagner and Murer 2008).

Mittels genetischer Linkage-Analyse konnte neben dem FGF23-Gen ein weiteres Gen namens PHEX (Phosphate regulating gene with homology to endopeptidases on the X-chromosome) kloniert werden. Dieses PHEX-Gen begründet eine weitere phänotypisch ähnliche Erkrankung, die X-chromosomale hypophosphatämische Rachitis (XHR), bei der dieses Gen mutiert ist. PHEX ist eine Zn-Metalloprotease, von der man annimmt, dass sie am Abbau von FGF23 beteiligt ist und dessen Synthese hemmt. Dies hat zur Konsequenz, dass reduzierte PHEX-Aktivität die FGF23-Spiegel erhöht (Quarles 2003; Berndt and Kumar 2007; Wagner and Murer 2008). Beide isolierten Gene verursachen bei den betroffenen Patienten fast identische Symptome, da beide den Abbau von FGF23 verzögern.

Fast zeitgleich kam es zu zusätzlichen Erkenntnissen durch eine weitere Erkrankung, deren Analyse ebenfalls wieder zu FGF23 führte. Diese Erkrankung ist die Tumor induzierte Osteomalazie (TIO), ein paraneoplastisches Syndrom, assoziiert mit mesenchymalen Tumoren. Die Patienten leiden unter denselben Symptomen, wie beim Phosphatdiabetes, die alle zurückgehen, wenn man den mesenchymalen, meist benignen Tumor entfernt. Es wurde entdeckt, dass diese Tumoren, verschiedene Proteine sezernierten, die die renale Phosphatresorption hemmten (Cai, Hodgson et al. 1994; Berndt and Kumar 2007; Wagner and Murer 2008).

In den letzten Jahren konnte die komplexe physiologische Funktion von FGF23 weiter aufgeklärt werden. Vor allem verschiedene Mausmodelle halfen zu weiteren Erkenntnissen und bestätigten die Annahme, dass es sich bei FGF23 um ein Protein mit weitreichender regulatorischer Funktion handelt. (Shimada, Kakitani et al. 2004; Liu, Zhou et al. 2006; Liu and Quarles 2007).

Es ist unsicher, ob die weiteren phänotypischen Veränderungen in Knochen, Pankreas und Thymus parallel zu den Veränderungen im Serum-Phosphat und Abweichungen im Vitamin-D-Stoffwechsel auftreten oder direkte Effekte des FGF23 in weiteren Geweben sind (Liu and Quarles 2007).

### **2.3.3 Die FGF-Rezeptoren (FGFR)**

FGF interagiert mit einer Gruppe von vier FGF-Rezeptoren (FGFR), die zu den Typ I transmembranen Phosphotyrosinkinase-Rezeptoren gehören (Liu and Quarles 2007). Diese FGFR werden nach Bindung des Liganden FGF, mittels Autophosphorylierung aktiviert, woraufhin eine intrazelluläre Signalkaskade mit nachfolgender Genaktivierung in Gang gesetzt wird. Die Phosphorylierung dieser Rezeptoren scheint auf einem zyklischen, AMP-unabhängigen Weg vorstatten zu gehen (Yan, Yokote et al. 2005).

Obwohl FGF23 an multiple FGFR binden kann (Yu, Ibrahimi et al. 2005), hat es unterschiedliche Affinität zu den Rezeptoren ( $KD = 200-700nM$ ) und benötigt oft Kofaktoren, wie Heparin oder Glycosaminoglykane (Yamashita, Konishi et al. 2002; Yu, Ibrahimi et al. 2005).

In vitro Studien deuten darauf hin, dass FGF23 die Rezeptoren FGFR1c, 3c und 4c aktivieren kann (Urakawa, Yamazaki et al. 2006; Liu and Quarles 2007). Die Fragen nach dem physiologisch relevanten FGF23-Rezeptor und dem Mechanismus, durch den FGF23 seine Effekte auf den renal tubulären Phosphattransport vermittelt, bleiben jedoch noch ungelöst. Die Existenz eines anderen neuartigen FGF23-Rezeptors wird vermutet, da man beobachtete, dass weder eine Aktivierung noch eine Inaktivierung der bekannten Rezeptoren durch FGF23 zu einer Hypo- oder Hyperphosphatämie führt (Liu and Quarles 2007).

### **2.3.4 Der Kofaktor Klotho**

Wie zuvor berichtet, bindet FGF23 an verschiedene FGFR zu denen es unterschiedliche Affinität besitzt und benötigt oft Kofaktoren, wie Heparin oder Glycosaminoglykane, um die FGF-Signalkaskade in Gang zu setzen (Ornitz 2000; Yamashita, Konishi et al. 2002; Yu, Ibrahimi et al. 2005). Als ein wichtiger Kofaktor wurde 1997 in Japan das Protein Klotho identifiziert (Kuro-o, Matsumura et al. 1997; Torres, Prie et al. 2007).

Das Klotho-Gen kodiert für ein 130-kDa großes Protein mit einer Transmembrandomäne und einem kleinen cytoplasmatischen Teil von 10 AS, welches Homologien mit  $\beta$ -Glukuronidasen hat (Kurosu, Ogawa et al. 2006;

Urakawa, Yamazaki et al. 2006). Es wird vor allem in der Niere als membranständiges Protein und als sezernierte Variante produziert. Die sezernierte Variante hat Hormoncharakter und wirkt als Kofaktor mit FGF23 über die FGF23-Rezeptoren 1c und 3c (Torres, Prie et al. 2007). Klotho ist ein Glykoprotein; im Immunoblot wurden zwei Banden nachgewiesen. Die zwei Banden sind unterschiedlich glykosyliert (Kurosu, Ogawa et al. 2006). Zudem wurde gezeigt, dass Klotho direkt an die FGFR bindet und dass der FGFR-Klotho-Komplex wiederum eine höhere Affinität zu FGF hat, als FGFR oder Klotho separat. Die Interaktion zwischen Klotho, FGFR und FGF23 ist ein neuer Typ der Rezeptormodulation (Kurosu, Ogawa et al. 2006; Urakawa, Yamazaki et al. 2006; Torres, Prie et al. 2007).

Klotho-Knock-out-Mäuse erregten besonderes Interesse, da sie sehr früh und schnell alterten und dabei viele typische degenerative Symptome von Alterungsprozessen zeigten. Diese Mäuse zeigten einen fast identischen Phänotyp zu Mäusen mit defizientem FGF23-Gen. Auch sie entwickelten eine Hyperphosphatämie, erhöhte 1,25-OH<sub>2</sub>-Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel und starben verfrüht. Zusätzlich zeigten sie ein Syndrom aus Muskelatrophie, Hörschädigungen, Osteoporose, Arteriosklerose, Thymusatrophie, Lungenemphysem und Ataxie. Im Gegensatz dazu alterten Mäuse, die Klotho übermäßig exprimierten verlangsamt und lebten länger (Kuro-o, Matsumura et al. 1997; Shimada, Kakitani et al. 2004; Kurosu, Ogawa et al. 2006; Liu, Zhou et al. 2006; Liu and Quarles 2007).

Diese Beobachtungen führen zu der Vermutung, dass Klotho eine wichtige Rolle im Alterungsprozess spielt. Das Protein wurde daher nach der griechischen Schicksalsgöttin Klotho benannt, die der Mythologie nach den Lebensfaden spinnt (Torres, Prie et al. 2007; Wagner and Murer 2008).

Da beide Mausmodelle fast identische phänotypische Ausprägungen und zusätzlich eine Hypophosphatämie hatten, schloss man auf einen Zusammenhang zwischen Klotho und FGF23 und identifizierte Klotho als Kofaktor (Kurosu, Ogawa et al. 2006; Torres, Prie et al. 2007).

Ob Klotho auch im menschlichen Organismus eine Rolle im Alterungsprozess spielt und ob dies abhängig vom Phosphathaushalt oder weiteren Faktoren geschieht, muss noch weiter erforscht werden.

Die FGF23-Klotho-Koexpression gibt weitere Hinweise auf die gewebespezifische Funktion von FGF23. Die Tatsache, dass die FGFR weit verbreitet sind, Klotho jedoch limitiert gebildet wird, weist darauf hin, dass die Nieren, Nebenschilddrüsen, Hypophyse, und der choroidale Plexus im Hirn als mögliche Ziele für FGF23 zur Verfügung stehen, während in Knochen, Leber, Lunge, Haut, Milz, Dünndarm und Nebenniere kein Klotho vorkommt und diese daher als direkte Zielorgane für FGF23 eher unwahrscheinlich sind.

1,25-OH<sub>2</sub>-Vitamin-D<sub>3</sub> induziert die Expression von Klotho in der Niere (Kuro-o, Matsumura et al. 1997; Liu and Quarles 2007). Die höchste Expression des Klotho-FGFR-Komplexes ist im distalen Tubulus zu finden (Li, Watanabe et al. 2004), wobei die Haupteffekte des FGF23 im proximalen Tubulus lokalisiert sind. Entweder sind die geringen Konzentrationen des Klotho-FGFR im proximalen Tubulus für die Wirkungen auf die Phosphatrückresorption und die Hemmung der 1- $\alpha$ -Hydroxylase dort verantwortlich oder die Effekte werden möglicherweise indirekt durch die Stimulation des distalen Tubulus und daraufhin ausgeschüttete parakrine Faktoren weitergeleitet (Liu and Quarles 2007).

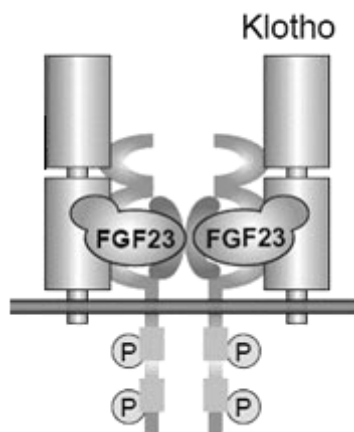


Abbildung 4: Der FGF23-Rezeptor, nach „Klotho converts canonical FGF-receptor into a specific receptor for FGF23“, aus Urakawa et al. (Urakawa, Yamazaki et al. 2006). Die Abbildung zeigt den Klotho-FGF23-Komplex gebunden an den FGFR, wodurch die intrazelluläre Autophosphorylierung und Signalkaskade in Gang gesetzt wird.

## 2.4 Phosphatonine

Neben FGF23 charakterisierte man weitere Proteine, die eine Phosphaturie induzieren, unter anderem FRP4 (Frizzled related protein-4), MEPE (Matrix extracellular phosphoglycoprotein), FGF7 (Fibroblast growth factor-7) und PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin E<sub>2</sub>). (Rowe, de Zoysa et al. 2000; Fukumoto and Yamashita 2002; Schiavi and Moe 2002; Berndt, Craig et al. 2003; Quarles 2003; Rowe 2004; Pande, Ritter et al. 2006; Berndt and Kumar 2007; Wagner and Murer 2008).

Der Begriff ist ein Sammelbegriff für eine uneinheitliche Gruppe von Hormonen und Faktoren, die alle in der Niere zu einer Herunterregulierung der Phosphattransporter führen. Während PTH und Calcitriol primär Auswirkungen auf den Kalziumstoffwechsel haben, regulieren diese Hormone spezifisch den Phosphathaushalt. Sie scheinen auf verschiedenen Ebenen, wie der Niere oder dem Darm eingreifen zu können und eine direkte Interaktion zwischen Organen zu vermitteln. FGF23 vermittelt vor allem zwischen dem Phosphathaushalt und dem Knochensystem. Andere Faktoren scheinen weitere Systeme miteinander

zu verknüpfen, wie die Niere und den Darm (Berndt and Kumar 2007; Wagner and Murer 2008).

Es gibt zweifellos noch weitere regulierende Faktoren, die im komplexen Phosphathaushalt eine Rolle spielen und noch entdeckt werden müssen. Bei der Behandlung der Niereninsuffizienz könnte ein besseres Verständnis der Mechanismen Auswirkungen auf die Pharmakotherapie haben (Nemere 2007; Wagner and Murer 2008).

## **2.5 FGF23 bei chronischer Niereninsuffizienz**

Die Studie von Ureña-Torres et al. (Urena Torres, Friedlander et al. 2008) zeigte, dass die FGF23-Spiegel bei erwachsenen Dialysepatienten um den Faktor 10 bis 600 Mal erhöht sind und dass diese streng mit den Phosphat-Spiegeln vor Dialysebeginn und dem Calcium-Phosphat-Produkt korrelieren.

Weitere Studien zeigten, dass die FGF23-Spiegel während der Dialyse nicht fallen. Dies lässt vermuten, dass keine Elimination dieses Proteins stattfindet.

Niereninsuffiziente Patienten zeigen in Korrelation zur GFR-Einschränkung einen Anstieg des FGF23 ohne die Hyperphosphatämie kompensieren zu können (Gutierrez, Isakova et al. 2005). Sekundär folgt eine weitere Reduktion des aktiven Vitamin-D. Sowohl Hyperphosphatämie, als auch niedriges Calcitriol dienen als Stimulus für einen sekundären Hyperparathyreoidismus, dessen Anteil an der ROD evident ist (Fukagawa and Kazama 2006; Fukagawa, Nakanishi et al. 2006; Pande, Ritter et al. 2006). Die Ausschüttung von FGF23, die das Ziel hat, einer Hyperphosphatämie im Rahmen der CNI entgegenzuwirken, geht somit auf Kosten eines erniedrigten 1-25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> und einem Hyperparathyreoidismus („trade-off“-Hypothese) (Fukagawa, Nakanishi et al. 2006).

Es ist jedoch noch unklar, ob die CKD-MBD ein direkter pathologischer Effekt der FGF23-Hyperaktivität ist oder ob diese durch erhöhte Serum-Phosphat- und niedrige Calcitriol-Spiegel entsteht oder von allen dreien abhängt. Ebenso ist unklar, ob die erhöhten FGF23-Spiegel bei Dialysepatienten vor allem durch die verminderte Clearance des natürlichen FGF23-Proteins oder dessen aktiven

und inaktiven Metaboliten bedingt sind oder ob diese eine übertriebene Antwort auf das pathophysiologische Milieu der Niere sind (Emmett 2008).

Neben dem prädiktiven Wert für einen sekundären Hyperparathyreoidismus schreiben Studien dem Ausmaß der Erhöhung des FGF23-Spiegels auch Auswirkungen auf die Ansprechrate einer Therapie mit exogenem Calcitriol zu (Quarles 2003; Gutierrez, Isakova et al. 2005; Fukagawa and Kazama 2006; Liu and Quarles 2007).

Daten an erwachsenen Dialysepatienten zeigen neben massiv erhöhten FGF23-Werten eine positive Korrelation derselben zum PTH-Spiegel (Fukagawa and Kazama 2006).

Darüberhinaus scheint aber auch FGF23 selbst einen stimulierenden Effekt auf die PTH-Produktion und das Wachstum der Nebenschilddrüse zu haben (Fukagawa and Kazama 2006; Fukagawa, Nakanishi et al. 2006).

Gutiérrez et al. (Gutierrez, Mannstadt et al. 2008) kommen zu dem Schluss, dass FGF23 bei erwachsenen Patienten ein besserer Biomarker für die Verlaufsbeurteilung der CNI, als die Messung des Serum-Phosphat-Spiegels sein könnte. Außerdem könnte seine Toxizität zu einem beschleunigten Funktionsverlust der Niere führen (Razzaque 2009).

## **2.6 Zielsetzung der Studie**

Diese prospektive Studie hat zum Ziel, die Bedeutung von FGF23 im Rahmen der chronischen Niereninsuffizienz bei pädiatrischen Patienten näher zu beleuchten. Alle vorhandenen Studien beziehen sich auf erwachsene nephrologische Patienten. Daten zur Bedeutung von FGF23 im Rahmen einer CNI bei Kindern und Jugendlichen lagen nicht vor. Daher bot sich die Implementierung einer prospektiven Querschnittsstudie bei pädiatrischen Patienten an.

Daten und Schlussfolgerungen aus Studien an erwachsenen Patienten dienen als Basis für die Hypothesen dieser Studie.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Prospektive Studie**

##### **3.1.1 Votum der Ethikkommission**

Vor Beginn der Probensammlung wurde ein Antrag bei der Ethikkommission eingereicht, der positiv bewertet wurde.

Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie war die Aufklärung der Patienten und Eltern über den Zweck und die Durchführung der Studie und die anschließende schriftliche Einverständniserklärung der Erziehungsberechtigten und gegebenenfalls auch der Patienten.

##### **3.1.2 Patientenkollektiv**

Es wurden 69 pädiatrische Patienten in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz rekrutiert. Zusätzlich wurden 10 Kinder mit normaler Nierenfunktion in die Kontrollgruppe aufgenommen.

Alle Patienten der Studie sind in der KfH-Nierenambulanz (Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.v.) der Kinderklinik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in Behandlung. Die Eingangskriterien für die Patienten in die Studie war das Vorliegen einer chronischen Niereninsuffizienz im Stadium 1-5.

##### **3.1.3 Alters- und Geschlechterverteilung der Patienten**

Das mittlere Alter betrug 10,46 ( $\pm$  5,17) Jahre.

Die Alters- und Geschlechterverteilung in den einzelnen Untergruppen ist im Ergebnisteil ausführlicher aufgeführt.

**Tabelle 2: Geschlechterverteilung der Patienten**

	<b>N</b>	<b>(%)</b>
<b>Männlich</b>	52	65,8
<b>Weiblich</b>	27	34,2
<b>Gesamt</b>	79	100



### 3.1.4 Ursachen der Niereninsuffizienz

Als Kriterium für den Einschluss in die Studie, galt das Vorliegen einer Niereninsuffizienz.

Bei vielen Patienten waren angeborene Nierenerkrankungen wie unter anderem Cystennieren oder eine Nierendysplasie ursächlich.

**Tabelle 3: Ursächliche Erkrankungen der Niereninsuffizienz in der Patientengruppe**

<b>Ursache der Niereninsuffizienz</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Kongenitale Anomalien der Niere und des Harntraktes (Dysplasie, Urethralklappen, Prune-Belly-Syndrom)	20	28
Kongenitale Nephropathien (Cystinosen, Fokal segmentale Glomerulonephrose, weitere Syndrome)	12	17
Glomerulonephritis	11	16
Hämolytisch urämisches Syndrom	5	7
Cystennieren (Autosomal rezessive polyzystische Nierenerkrankungen)	13	19
Andere	8	13

### 3.1.5 Medikation der Patienten

Bei einer Hyperphosphatämie erfolgte eine Therapie mit Phosphatbindern. Bei normaler oder erniedrigter Serum-Calciumkonzentration erfolgte die Behandlung mit Calciumcarbonat, während Patienten mit erhöhtem Serum-Calciumspiegel calciumfreie Phosphatbinder erhielten.

Zur Kontrolle eines sekundären Hyperparathyreoidismus erfolgte eine Therapie mit Vitamin-D. Bei Vitamin-D-Mangel erfolgte eine Substitution von 25(OH)D<sub>3</sub>, während die Patienten bei sekundärem Hyperparathyreoidismus 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> erhielten.

**Tabelle 4: Medikation der niereninsuffizienten Patienten**

<b>Medikation</b>	<b>N</b>	<b>(%)</b>
Calciumcarbonat	7	10
Calciumfreie Phosphatbinder	13	19
25-Hydroxyvitamin-D <sub>3</sub>	26	38
1,25-Dihydroxyvitamin-D <sub>3</sub>	37	54

### **3.2 Patientenproben**

#### **3.2.1. Vorgehen bei der Probensammlung**

Im Rahmen einer klinisch notwendigen routinemäßigen Blutentnahme wurde den Patienten ein zusätzliches Serumröhrchen zur FGF23-Bestimmung abgenommen. Andere für den Knochenstoffwechsel wichtige Variable wurden routinemäßig mitbestimmt. Ihre Aufzählung erfolgt unter 3.4.

Die Labordiagnostik entspricht den European Guidelines zur Prävention und Behandlung der ROD.

#### **3.2.2 Probenaufbewahrung**

Nach der Blutentnahme wurde das Serumröhrchen auf Eis im Laborkühlschrank aufbewahrt, anschließend wurde durch Zentrifugation das Serum gewonnen und bei -30°C bis zur FGF23-Bestimmung aufbewahrt.

Alle Proben wurden direkt nach Blutentnahme pseudonymisiert verwahrt.

### **3.3 Bestimmung der FGF23-Konzentration mittels ELISA**

Es gibt drei verschiedene ELISA-Assay, um zirkulierende FGF23-Spiegel zu messen. Ein Test misst die C-terminalen Fragmente (Immunotopics C-terminal assay, Carlsbad, CA), die zwei anderen messen intaktes FGF23 (Immunotopics Intakt und Kainos Intact assay) (Imel, Peacock et al. 2006).

In dieser Studie wurde das Serum-intakte FGF23 durch den Kainos Intact assay nach der Anleitung des Herstellers bestimmt (Kainos Laboratories International;

Tokyo, Japan) (Yamazaki, Okazaki et al. 2002). Dieser ELISA hat sich in anderen Studien zur Detektierung des biologisch aktiven, intakten FGF23 bewährt (Yamazaki, Okazaki et al. 2002).

### 3.3.1 Prinzip des ELISA

Bei dem FGF23-ELISA-Kit handelt es sich um einen Sandwich-ELISA für die Messung von FGF23 im Serum. Zwei spezifische murine monoklonale Antikörper binden die gesamte Länge des FGF23. Ein Antikörper befindet sich immobilisiert auf der Mikrotiterplatte und soll FGF23 erfassen und binden, während der andere Antikörper, an HRP (horseradish peroxidase) gebunden für die Auffindung des FGF23 zuständig ist.

In der ersten Reaktion wird eine Stichprobe des Serums mit dem immobilisierten Antikörper auf der Mikrotiterplatte inkubiert. Das FGF23 der Stichprobe wird vom Antikörper gebunden. Am Ende dieser Reaktion werden das ungebundene FGF23 und andere Komponenten auf der Mikrotiterplatte ausgewaschen.

In einer zweiten Reaktion wird das immobilisierte FGF23 mit HRP-gebundenem Antikörper inkubiert und bildet mit diesem einen „Sandwich-Komplex“:

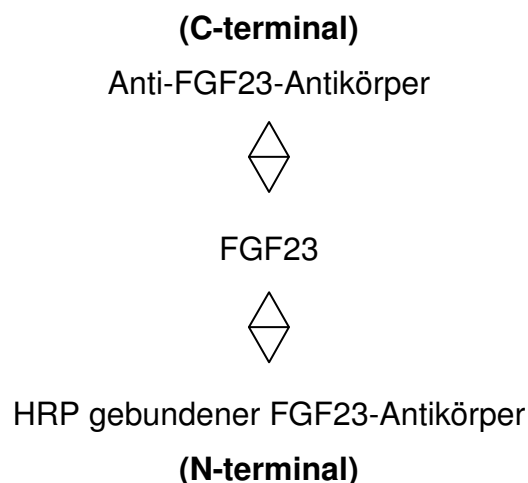


Abbildung 5: Prinzip des ELISA, „Sandwich-Komplex“ am Ende der Reaktion

Am Ende dieser Reaktion wird die Mikrotiterplatte erneut ausgewaschen, um ungebundene Komponenten zu entfernen. Während der Enzymreaktion wird der immobilisierte auf der Mikrotiterplatte gebundene Sandwich-Komplex mit einer Substratlösung inkubiert und die Dichte des entstehenden Farbkomplexes dann durch ein Photometer gemessen. Die enzymatische Aktivität des Komplexes ist direkt proportional zu der Menge in der Stichprobe.

Eine Standardkurve entsteht, wenn man die Absorption gegen die einzelnen Konzentrationen des FGF23 in der Stichprobe aufzeichnet. Die Konzentration von FGF23 kann dann mithilfe der Kurve ermittelt werden.

Die minimal erfassbare Konzentration beträgt 3 pg/ml, die maximal messbare Konzentration 800 pg/ml. Höhere Konzentrationen wurden durch Verdünnungsreihen bestimmt (Yamazaki, Okazaki et al. 2002).

### **3.3.2 Durchführung des ELISA**

Das ELISA-Kit enthielt alle zur Durchführung notwendigen Reagenzien bzw. Materialien. Die FGF23-Mikrotiterplatte besitzt 96 Kammern. Jede Kammer enthält einen immobilisierten monoklonalen Antikörper gegen FGF23.

- 1) In jede Kammer der Mikrotiterplatte wurden im ersten Schritt 50  $\mu$ L Pufferlösung (Assay Diluent) pipettiert.
- 2) Danach wurden jeweils 50  $\mu$ L des FGF23-Standards beziehungsweise des Patientenserums hinzupipettiert. Der Test enthält 7 Standardlösungen zur Positivkontrolle:

**Tabelle 5: FGF23-Konzentrationen der Standardlösungen**

<b>FGF23-Standard</b>	<b>pg/mL</b>
1	0
2	10
3	50
4	100
5	250
6	500
7	800

Es wurde eine doppelte Positivkontrolle durchgeführt und jeder Standard somit zweimal gemessen. Abgedeckt wurde die Mikrotiterplatte nun 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Plattenmixer inkubiert.

- 3) Nach Entfernung der Abdeckung wurde der ungebundene Inhalt der Platte ausgeworfen und 4 Male mit 300  $\mu\text{L}$  einer Pufferlösung ausgewaschen.
- 4) In jede Kammer wurden 100  $\mu\text{L}$  FGF23-Conjugate hinzugefügt, die Platte wieder mit einem Sealer abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Plattenmixer inkubiert.
- 5) Mit 300  $\mu\text{L}$  der Waschlösung wurden die ungebundenen Bestandteile wie oben beschrieben viermal ausgewaschen.
- 6) In jede Kammer wurden 100  $\mu\text{L}$  des Substrates addiert. Die Mikrotiterplatte wurde verschlossen und für 30 Minuten bei absoluter Dunkelheit, bei Raumtemperatur inkubiert.
- 7) Die Abdeckung wurde entfernt und 100  $\mu\text{L}$  Stop-Lösung hinzugefügt. Für eine Minute wurde die Mikrotiterplatte auf dem Plattenmixer geschüttelt.
- 8) Bei 450 nm wurde die Absorption im Photometer gemessen.

Proben, die eine höhere Konzentration, als der Standard hatten, wurden nach Anleitung des Herstellers mit Standard 1-Lösung verdünnt und erneut gemessen (Yamazaki, Okazaki et al. 2002).

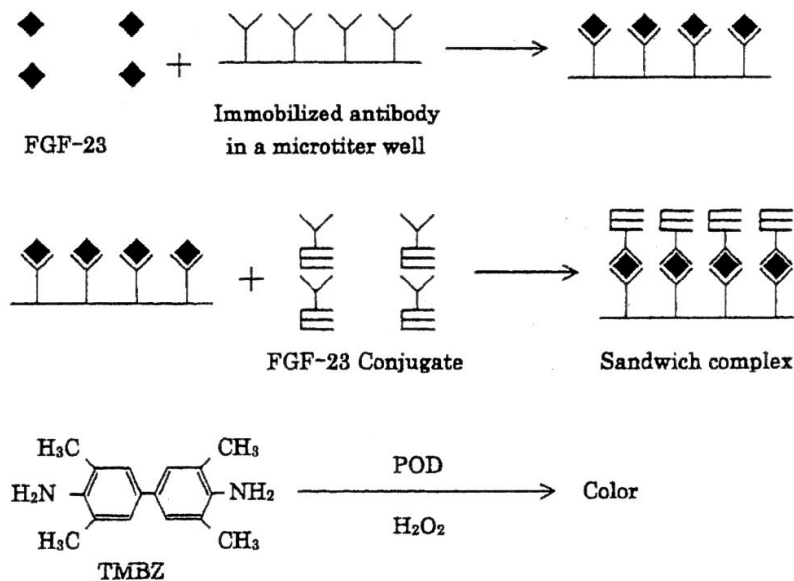


Abbildung 6: Reaktionsablauf des ELISA, aus „Principles of the Assay“, Kainos Laboratories, Inc. (Yamazaki, Okazaki et al. 2002)

### 3.4 Biochemische Analysen weiterer Laborparameter

Im Rahmen der routinemäßigen Blutentnahme entsprechend der European Guidelines zur Prävention und Behandlung der ROD wurden folgende Parameter vom Zentrallabor des UKE durch Standardmethoden bestimmt:

Zur Beurteilung des Knochenstoffwechsels:

- Serum-Ca
- Serum-PO<sub>4</sub>
- knochenspezifische AP
- intaktes PTH
- 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

Zur Beurteilung der Nierenfunktion:

- Harnstoff
- Kreatinin

- Harnsäure
- Kalium
- Natrium
- Venöse Blutgasanalyse
- Calcium ionisiert s.o.
- Phosphat s.o.
- Intaktes PTH
- 25(OH)D<sub>3</sub>
- 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

(Klaus, Watson et al. 2006)

Die geschätzte GFR = estimated GFR (eGFR) wurde durch die Schwartz-Formel ermittelt:

$$eGFR = \text{Länge (cm)} \times \text{Faktor} / \text{Kreatinin (mg/dl)}$$

<u>Faktor:</u>	Pat. < 1. Lbj.:	0,45
	Pat. > 1. Lbj.:	0,55
	männliche Pat. ≥ 13.Lbj.:	0,7

(Schwartz, Haycock et al. 1976)

Außerdem wurden das Wachstum und das Gewicht aufgezeichnet.

Anamnestische Angaben ergänzten die Diagnostik. Hierzu wurden sowohl das Dialyseregime (wie Verwendung kalziumhaltiger Dialysatlösung bei Peritonealdialyse), als auch die individuelle Medikation, die Einfluss auf den Calcium-Phosphat-Haushalt und die Knochendichte und -struktur hat, einbezogen (vor allem Phosphatbinder, Calcitriol, Calcimimetika, Wachstumshormon).

### **3.5 Statistische Analysen**

Zur Bearbeitung der Daten wurden die Programme Microsoft Excel, Microsoft Word und SPSS Version 13 (Statistik-Software; Statistical Package for the Social Sciences; Chicago, IL, USA) verwendet.

Sämtliche statistische Auswertungen wurden mittels SPSS ermittelt. Zur statistischen Auswertung der Parameter wurden parametrische, nicht-parametrische Tests und multivariate Analysen eingesetzt. Es wurde der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test (U-Test) angewandt. Es handelt sich um einen nicht-parametrischen Test zum Vergleich zweier unverbundener Stichproben quantitativer Merkmale.

Signifikant galten Unterschiede bei einem p-Wert  $<0,05$ .



## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Stadien der CNI und Gruppenverteilung**

Die nachfolgende Tabelle zeigt die Verteilung der Patienten auf die verschiedenen Gruppen. An der Studie nahmen 69 Patienten (= 87,3%) in den verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz und 10 nierengesunde Patienten (= 12,7%) in der Kontrollgruppe teil.

**Tabelle 6: Verteilung der Patienten auf die verschiedenen Gruppen**

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl der Patienten</b>	<b>%</b>
CNI-Stadium 1	16	20,3
CNI-Stadium 2	10	12,7
CNI-Stadium 3	7	8,9
CNI-Stadium 4	11	13,9
CNI-Stadium 5	25	31,6
Kontrollgruppe	10	12,7
Gesamt	79	100

### **4.2 Deskriptive Statistik der CNI-Stadien**

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die für die Auswertungen wichtigsten Variablen, bezogen auf die Gruppen der CNI-Stadien. Da es keinen signifikanten Anstieg der Parameter zwischen den ersten beiden CNI-Stadien gab, wurden diese zu einer Gruppe zusammengefasst.

**Tabelle 7: Hauptvariablen der Patienten in den unterschiedlichen CNI-Stadien**

<b>CNI-Stadium</b>	<b>1+2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Anzahl der Patienten (N)</b>	26	7	11	25
<b>Geschlecht (M:W)</b>	23:3	3:4	7:4	12:13
<b>Alter (in Jahren)</b>	9,6 ± 5,0	7,7 ± 5,5	10,8 ± 5,5	11,2 ± 5,4
<b>FGF23 (ng/l)</b>	47 ± 26	144 ± 91**	313 ± 275***	734 ± 397***
<b>eGFR (ml/min *1,73m<sup>2</sup>)</b>	113 ± 51	41 ± 8 ***	27 ± 7 ***	10 ± 2 ***
<b>Kreatinin (mg/dl)</b>	0,83 ± 0,43	1.61 ± 0.66 **	3.18 ± 1.18***	7.63 ± 2.68 ***
<b>PTH (ng/l)</b>	67 ± 47	202 ± 148 *	308 ± 219***	425 ± 371***
<b>Calcium (mmol/l)</b>	2,34 ± 0,12	2,41 ± 0,14 <sup>§</sup>	2,38 ± 0,11 <sup>§</sup>	2,31 ± 0,37 <sup>§</sup>
<b>Phosphat (mmol/l)</b>	1,27 ± 0,25	1,43 ± 0,19 <sup>§</sup>	1,62 ± 0,22***	2,01 ± 0,44***
<b>TPR (%)</b>	83,5 ± 10,8	73,7 ± 7,6*	56,7 ± 18,0***	38,9 ± 28,9***
<b>25(OH)D<sub>3</sub> (µg/l)</b>	21,0 ± 11,8	31,2 ± 17,9 <sup>§</sup>	27,1 ± 13,1 <sup>§</sup>	24,3 ± 9,4 <sup>§</sup>
<b>1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (µg/l)</b>	49,4 ± 18,1	50 ± 41,0 <sup>§</sup>	36,8 ± 45,7**	30,9 ± 39,8***

Statistische Unterschiede des CNI-Stadiums 1-2 zu den Stadien 3, 4 und 5.

P-Werte: <sup>§</sup> nicht signifikant, \* p <0.05; \*\* p ≤0.01; \*\*\* p ≤0.001.

### **4.3 Variable im Gruppenvergleich**

Im vorhergehenden Kapitel „Deskriptive Statistik“ wurde bereits in Tabelle 7 ein Überblick über die wichtigsten Variablen in den einzelnen CNI-Stadien gegeben. Im Folgenden wird im Einzelnen auf die Variablen eingegangen.

Die gewählten Graphiken in Form des Boxplot zeigen die Werte in den einzelnen Gruppen, beruhend auf den empirischen Quartilen. Der Interquartilsabstand wird als Kasten (box) dargestellt, von dem aus Linien bis zum Minimum beziehungsweise Maximum gezogen sind. Im Kasten wird der Median durch eine Linie gekennzeichnet.

Auch hier sind die CNI-Stadien 1 und 2 zu einer Gruppe zusammengefasst, da es keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Stadien gab. Zur Kontrollgruppe bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

### 4.3.1 FGF23 im Gruppenvergleich

Im Gruppenvergleich zeigte sich ein signifikanter Anstieg der FGF23-Spiegel in Abhängigkeit zum Funktionsverlust der Niere. Entsprechend zeigten sich die höchsten FGF23-Spiegel im CNI-Stadium 5, während im CNI-Stadium 1 und 2 nur eine Konzentration von  $47 \pm 26$  ng/l gemessen wurde.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten in der Gruppe CNI 1 + 2 zur Kontrollgruppe.

Eine deutlich signifikante Erhöhung der FGF23-Konzentration zeigte sich ab dem CNI-Stadium 3 ( $144 \pm 91$  ng/l). Bei Patienten im CNI-Stadium 4 lagen die Konzentrationen bei  $313 \pm 275$  ng/l, während sie bei Kindern im Stadium 5 unter Dialysetherapie auf  $734 \pm 397$  ng/l erhöht waren.

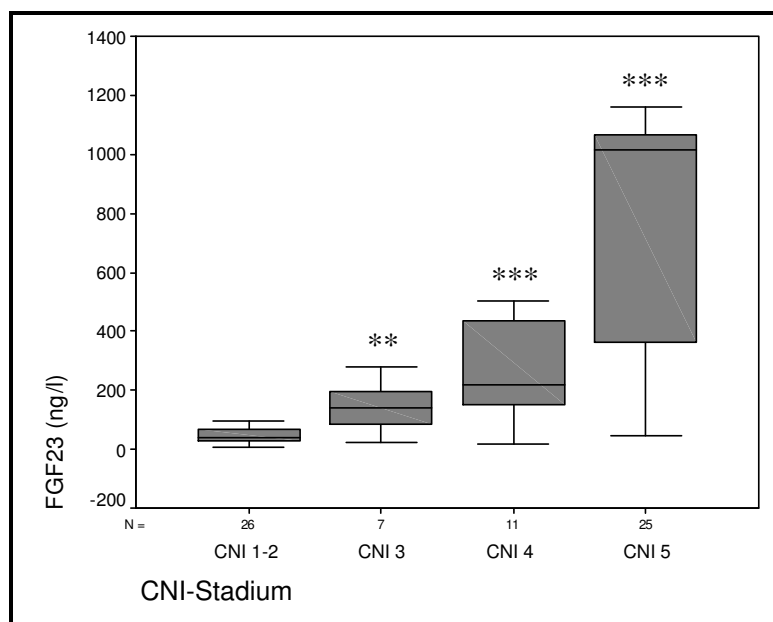


Abbildung 7: Erhöhung des Serum-FGF23-Spiegels im Verhältnis zum CNI-Stadium, \*\*  $p < 0.01$  CNI 1-2 zu CNI 3, \*\*\*  $p < 0.001$  CNI 1-2 zu CNI 4, \*\*\*  $p < 0.001$  CNI 1-2 zu CNI 5

### 4.3.2 Phosphat im Gruppenvergleich

In den frühen CNI-Stadien 1 und 2 zeigte sich keine signifikante Erhöhung des Serumphosphates.

Erst in den CNI-Stadien 4 und 5 trat eine signifikante Erhöhung auf (im Vergleich zum CNI-Stadium 1 + 2:  $p < 0,001$ ). In den CNI-Stadien 1 und 2 lagen die Konzentrationen bei  $1,27 \pm 0,25$  mmol/l und in Stadium 3 war diese im Mittel auf  $1,43 \pm 0,19$  mmol/l erhöht. Im Stadium 4 wurden Konzentrationen von  $1,62 \pm 0,22$  mmol/l ermittelt und in Stadium 5 von  $2,01 \pm 0,44$  mmol/l.

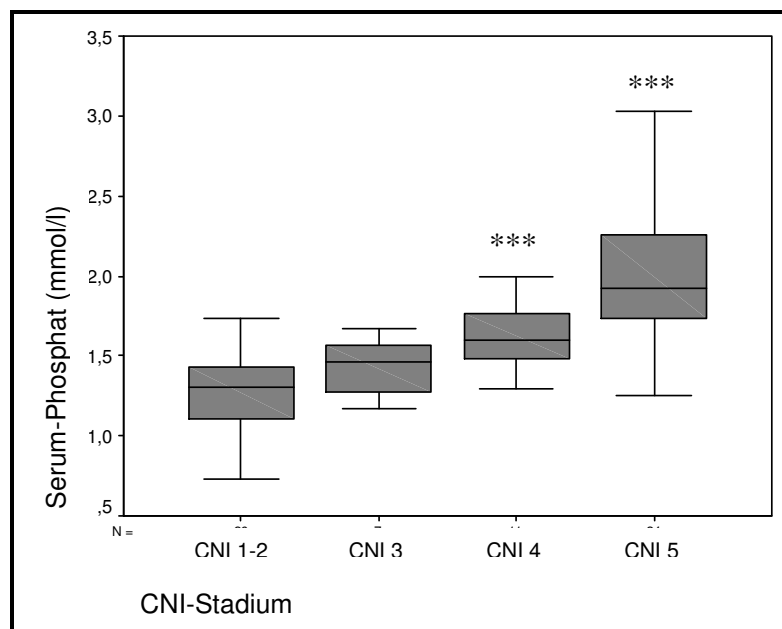


Abbildung 8: Erhöhung der Phosphatkonzentration im Verhältnis zum CNI-Stadium, \*\*\*  $p = 0.001$  CNI 1-2 zu CNI 4, \*\*\*  $p < 0.001$  CNI 1-2 zu CNI 5

### 4.3.3 Parathormon im Gruppenvergleich

Im Gruppenvergleich der PTH-Konzentrationen ergab sich eine statistisch signifikante Erhöhung der PTH-Konzentration im Verhältnis zum Stadium der CNI.

Kinder im Stadium CNI 1 und 2 zeigten PTH-Spiegel von  $67 \pm 47$  ng/l, während in Stadium 3 der CNI die Werte des PTH bei  $202 \pm 148$  ng/l lagen. Im Stadium 4 wurden Konzentrationen von  $308 \pm 219$  ng/l ermittelt und im Stadium 5 unter Dialysetherapie waren die Konzentrationen bereits auf  $425 \pm 371$  ng/l erhöht.

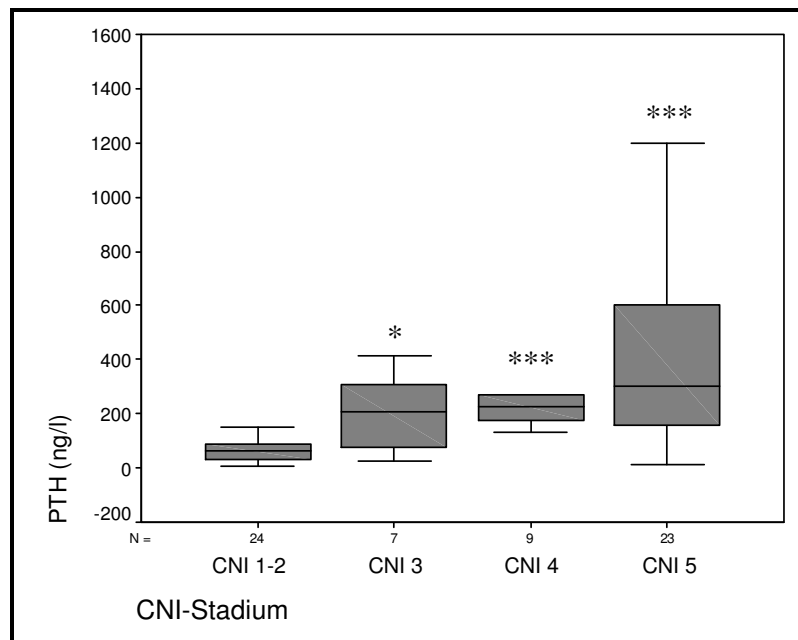


Abbildung 9: Erhöhung der Serum-PTH-Konzentration im Verhältnis zum CNI-Stadium, \*  $p < 0.05$  CNI 1-2 zu CNI 3, \*\*\*  $p < 0.001$  CNI 1-2 zu CNI 4, \*\*\*  $p < 0.001$  CNI 1-2 zu CNI 5

#### **4.4 Korrelationen**

Es zeigten sich Korrelationen zwischen den einzelnen Parametern, die im Folgenden aufgeführt sind. Die Abbildungen folgen im Anschluss.

##### **4.4.1 Korrelation zwischen FGF23 und eGFR**

FGF23 zeigte zur ermittelten GFR eine signifikant negative Korrelation ( $r = -0,57$ ,  $p < 0,001$ ).

##### **4.4.2 Korrelationen zwischen Phosphat und anderen Variablen**

A: Korrelation zwischen FGF23 und Phosphat: Zwischen der Konzentration des FGF23 und der Konzentration des Phosphates zeigte sich eine statistisch signifikant positive Korrelation ( $r = 0,56$ ,  $p < 0,001$ ).

B: Korrelation zwischen Phosphat und der eGFR: Die Messung der Phosphatkonzentration ergab eine signifikant negative Korrelation zur bestimmten GFR der Patienten ( $r = -0,486$ ,  $p < 0,001$ ).

##### **4.4.3 Korrelationen zwischen der PTH-Konzentration und anderen Parametern**

A: Korrelation zwischen FGF23 und PTH

Es zeigte sich eine statistisch signifikant positive Korrelation zwischen FGF23 und PTH ( $r = 0,26$ ,  $p = 0,04$ ).

B: Korrelation zwischen PTH und eGFR

Zwischen den PTH-Konzentrationen der Patienten und der ermittelten GFR zeigte sich eine signifikant negative Korrelation ( $r = -0,477$ ,  $p < 0,001$ ).

##### **4.4.4 Korrelation zwischen FGF23 und den Vitamin-D-Konzentrationen**

Von 61 Kindern mit Daten über 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel hatten 26 (42,6%) ein Vitamin-D-Defizit (<20 ng/ml). 21 Kinder (34,4%) zeigten eine relative Vitamin-D-Insuffizienz (20-30 ng/ml).

Es gab keine Korrelation zwischen 25-Hydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-Spiegeln und der eGFR oder mit anderen biochemischen Variablen des Knochenstoffwechsels.

Im Kontrast dazu, zeigten Serum-1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel eine signifikant negative Korrelation zu FGF23 ( $r = -0,61$ ,  $p < 0,001$ ) und PTH-Spiegeln ( $r = -0,48$ ,  $p < 0,001$ ).

Parallel zum relevanten Anstieg der Serum FGF23-Spiegel in Stadium 4 und 5 konnte im Vergleich zu den CNI-Stadien 1 und 2 ein signifikanter Abfall der Serum 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel gemessen werden.

#### **4.4.5 Korrelationen zwischen tubulärer Phosphatreabsorption (TPR) und anderen Variablen**

##### **A: Korrelation zwischen der eGFR und der tubulären Phosphatreabsorption**

Es bestand eine signifikant positive Korrelation zwischen der tubulären Phosphatreabsorption und der eGFR ( $r = 0,62$ ,  $p < 0,001$ ).

##### **B: Korrelation der tubulären Phosphatreabsorption zur FGF23-Konzentration**

Die tubuläre Phosphatrückresorption zeigte eine signifikant negative Korrelation zur FGF23-Konzentration ( $r = -0,48$ ,  $p < 0,001$ ).



Abbildungen zu 4.4.1 – 4.4.5:

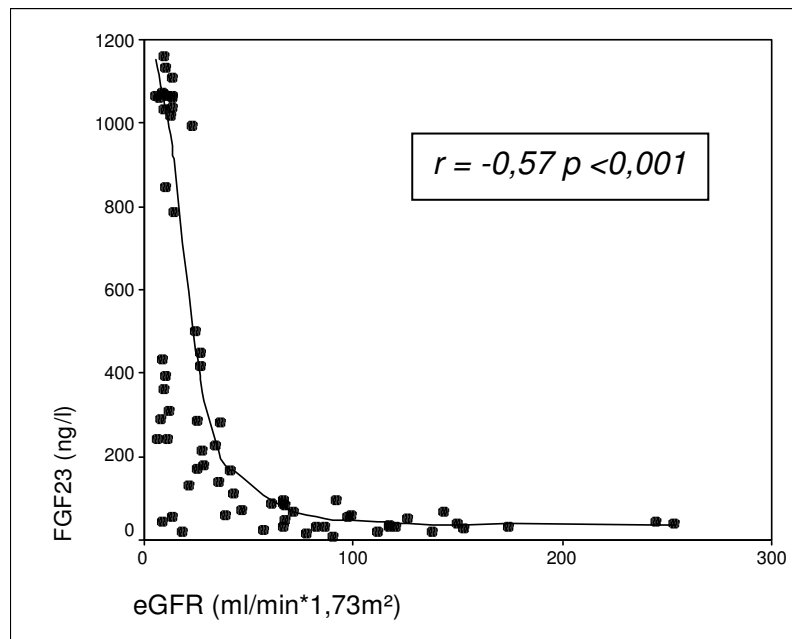


Abbildung 10: Negative Korrelation zwischen FGF23 und der eGFR

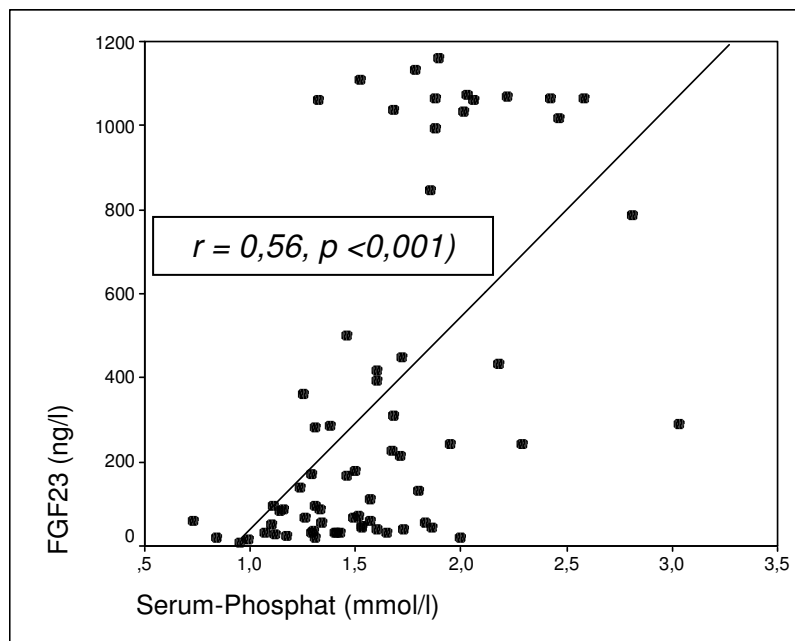


Abbildung 11: Positive Korrelation zwischen FGF23 und Phosphat

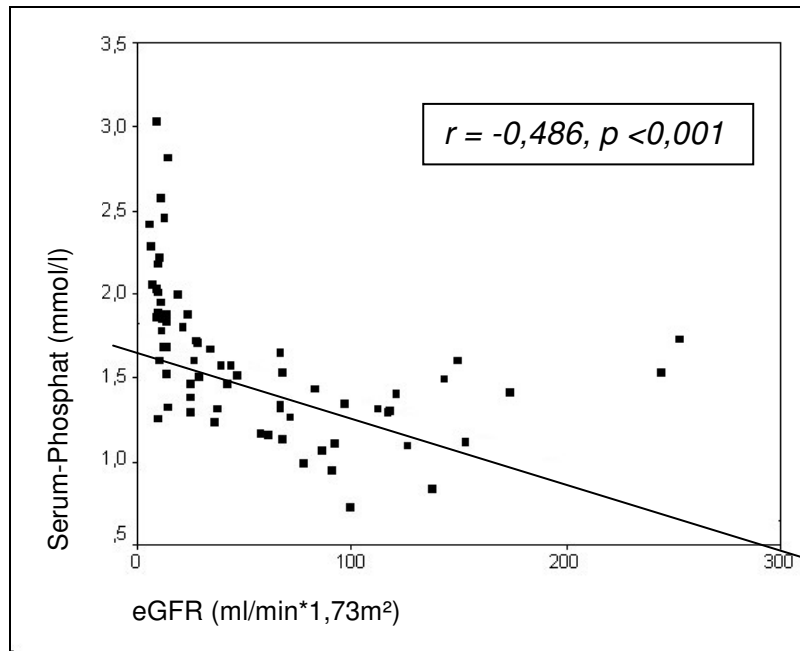


Abbildung 12: Negative Korrelation zwischen Phosphat und der eGFR

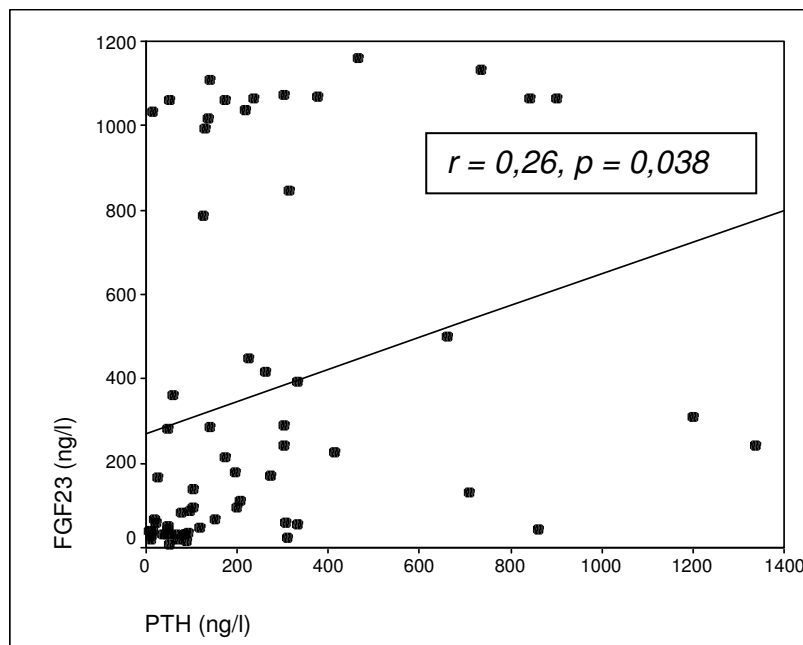


Abbildung 13: Positive Korrelation zwischen FGF23 und PTH

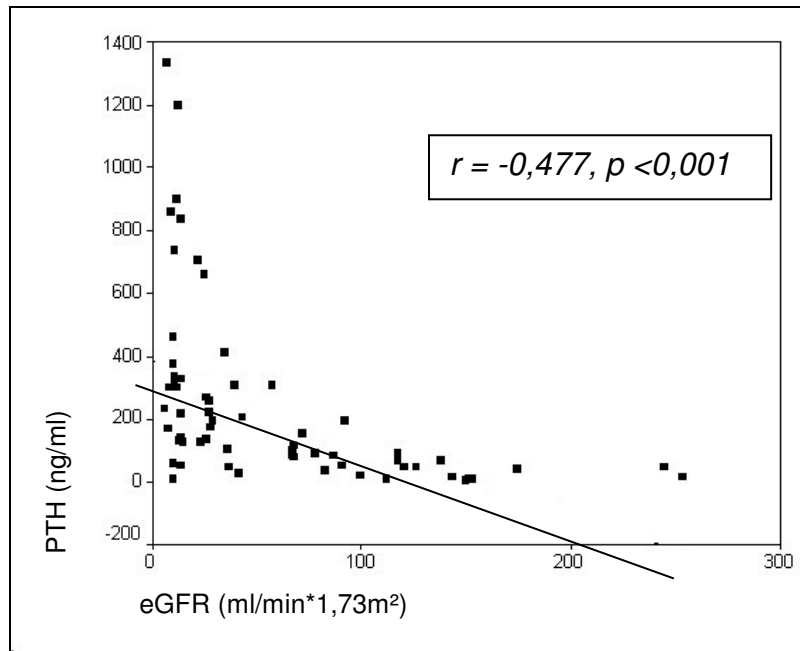


Abbildung 14: Negative Korrelation zwischen PTH und der eGFR

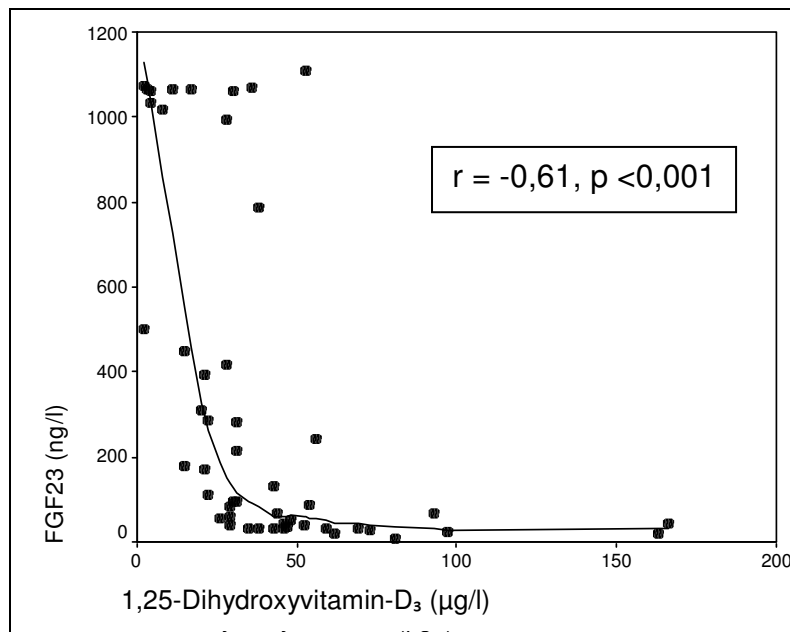


Abbildung 15: Negative Korrelation zwischen FGF23 und 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>

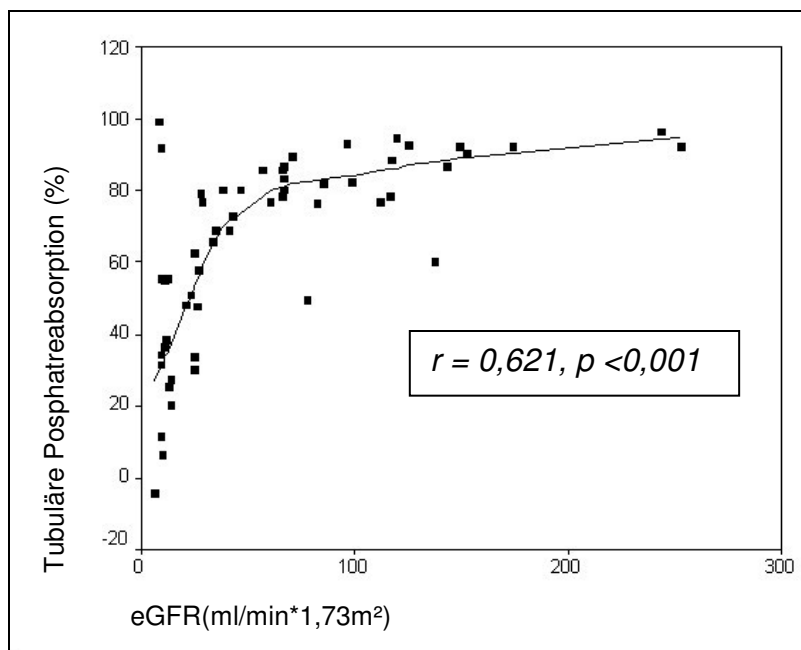


Abbildung 16: Positive Korrelation zwischen tubulärer Phosphatreabsorption und der eGFR

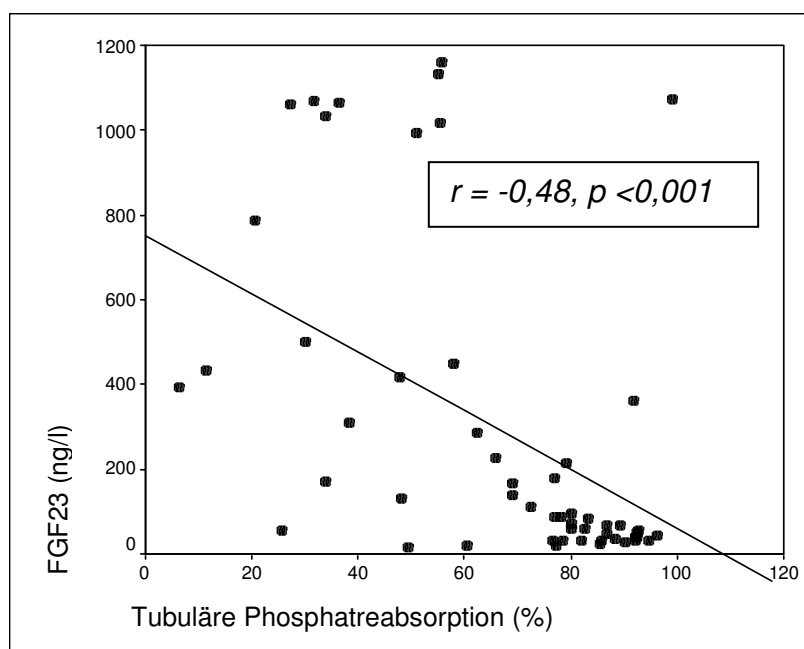


Abbildung 17: Negative Korrelation zwischen tubulärer Phosphatreabsorption und der FGF23-Konzentration

#### 4.4.6 Multivariate Analyse mit FGF23 als abhängiger Variable

In der multivariaten Analyse, in der FGF23 als abhängige Variable eingesetzt wurde, zeigten die Konzentrationen des Serumphosphates ( $p < 0,001$ ), die eGFR ( $p = 0,002$ ) und die Serumkonzentrationen des 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> ( $p = 0,03$ ) eine signifikante Assoziation zu den FGF23-Konzentrationen. Die Serumkonzentrationen des PTH lagen mit einem p-Wert von 0,06 knapp außerhalb einer signifikanten Aussage, zeigten jedoch die Tendenz zu einer Assoziation zu FGF23-Konzentrationen.

**Tabelle 8: Multivariate Analyse mit FGF23 als abhängiger Variable**

Unabhängige Variable	$\beta$ Coefficient	s.e.	T	P	R <sup>2</sup>
Phosphat (mmol/l)	479.1	101.2	4.74	<0.001	0.64
eGFR (ml/min*1.73sqm)	-2.6	0.77	-3.39	0.002	
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub> (µg/l)	-3.2	1.40	-2.30	0.03	
PTH (ng/l)	-0.3	0.15	-1.91	0.06	

## **5. Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Ergebnisse vor dem wissenschaftlichen Hintergrund**

Mit der vorliegenden prospektiven Querschnittsuntersuchung sollte die Regulation und Bedeutung von FGF23 in Abhängigkeit zu anderen Laborvariablen bei Kindern in verschiedenen Stadien der Niereninsuffizienz ermittelt werden.

FGF23 war Inhalt vieler Studien, jedoch nur an erwachsenen CNI-Patienten. Es handelt sich hierbei um die ersten Ergebnisse für die FGF23-Konzentration bei Kindern und Jugendlichen mit CNI.

Die Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus Studien an erwachsenen CNI-Patienten waren Basis für die Planung dieser Studie. Die Hypothesen, die vor Beginn der Studie aufgestellt wurden, konnten durch diese Ergebnisse für pädiatrische Patienten bestätigt werden.

Wie in den Ergebnissen anderer Studien konnte auch durch diese Daten gezeigt werden, dass die Konzentration von FGF23 bei einer verminderten Nierenfunktion erhöht ist und mit dem Grad der Niereninsuffizienz in den größten Konzentrationen zu messen ist (Larsson, Nisbeth et al. 2003; Fukagawa and Kazama 2006; Westerberg, Linde et al. 2007).

Die Rolle von FGF23 bei der CNI und im Rahmen der CKD-MBD war und ist Forschungsinhalt zahlreicher Gruppen. Die Messungen dieser Studien ergaben unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich des GFR-Wertes, bei dem erstmalig ein signifikanter FGF23-Anstieg nachweisbar ist.

Die Daten deuten auf eine bedeutende Rolle des FGF23 im Calcium-, Phosphat- und Vitamin-D-Haushalt bei Kindern hin. Dies scheint auch schon in frühen CNI-Stadien bedeutend zu sein.

Auf die Ergebnisse der einzelnen Parameter im Hinblick auf den wissenschaftlichen Hintergrund wird im Weiteren näher eingegangen.

#### **5.1.1 Der Einfluss der GFR auf FGF23**

Verschiedene Studien bei erwachsenen Patienten ermittelten unterschiedliche Werte der GFR, bei der die FGF23-Konzentration signifikant anstieg. Larsson et. al untersuchten die FGF23-Konzentrationen bei Patienten mit CNI und

stellten fest, dass FGF23 in dem Maße ansteigt, in dem die Nierenfunktion sinkt. Dementsprechend wurden bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz im Stadium 5 der CNI die höchsten Konzentrationen von FGF23 bestimmt (Larsson, Nisbeth et al. 2003).

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen einen signifikanten Anstieg der FGF23-Konzentration bei einer ermittelten GFR unter  $60 \text{ ml/min} \cdot 1,73 \text{ m}^2$ .

Die Konzentration von FGF23 war in den ersten CNI-Stadien nicht signifikant erhöht (CNI 1+2:  $47 \pm 26 \text{ pg/ml}$ ), eine signifikante Erhöhung zeigte sich erst in CNI-Stadium 3 ( $144 \pm 91 \text{ pg/ml}$ , verglichen mit CNI 1+2:  $p = 0,006$ ). Wie erwartet wurden die höchsten FGF23-Spiegel bei Patienten im CNI-Stadium 5 gemessen ( $734 \pm 397 \text{ pg/ml}$ , verglichen mit CNI 1+2:  $p < 0,001$ ).

Westerberg et al. konnten einen signifikanten Anstieg von FGF23 erst ab dem CNI-Stadium 4, also bei einer eGFR unter  $30 \text{ ml/min} \cdot 1,73 \text{ m}^2$  aufzeigen (Westerberg, Linde et al. 2007). Shigematsu et al. ermittelten einen signifikanten FGF23-Anstieg schon bei einer eGFR von 30 bis  $80 \text{ ml/min} \cdot 1,73 \text{ m}^2$  (Shigematsu, Kazama et al. 2004) und auch Guitérrez et al. zeigten einen Anstieg bei  $60 \text{ ml/min} \cdot 1,73 \text{ m}^2$  (Gutierrez, Isakova et al. 2005).

Diese unterschiedlichen Ergebnisse basieren unter anderem auch auf den unterschiedlichen Methoden, die eGFR zu ermitteln.

Bei den Patienten der vorliegenden Studie wurde die GFR, wie in Kapitel 3.4 beschrieben nach der Schwartz-Formel berechnet (Schwartz, Haycock et al. 1976). Diese Formel ist zur Berechnung der GFR bei pädiatrischen Patienten zwischen 0 und 18 Jahren etabliert, während bei Daten von erwachsenen Patienten andere Formeln unter anderem nach „Modification of Diet in Renal Disease“ (MDRD)- oder der Crockroft-Gault-Formel benutzt wurden. Diese Verfahren benutzen den Filtrationsmarker Kreatinin zur Berechnung; in neueren Formeln wird auch Cystatin C eingesetzt. Diese verschiedenen Verfahren erschweren es, Vergleiche zwischen den Studienergebnissen herzustellen.

Dennoch deutet eine Mehrheit der Daten wie auch die Ergebnisse dieser Studie auf einen FGF23-Anstieg schon in frühen CNI-Stadien hin. Inwiefern altersabhängige Faktoren auf die Ergebnisse einwirken und ob ein direkter

Vergleich pädiatrischer Daten mit denen von adulten Patienten möglich und sinnvoll ist, muss weiter untersucht werden.

### **5.1.2 FGF23 im Phosphat-Haushalt**

Bisher gab es zahlreiche Veröffentlichungen, die das Verhältnis zwischen dem Phosphatmetabolismus und FGF23 näher beleuchteten. Antonucci et al. zeigten eine unverzügliche Phosphatausscheidung nach Phosphatanstieg, ohne dass die FGF23-Konzentration sich veränderte (Antonucci, Yamashita et al. 2006). Dagegen wurde jedoch die Hypothese aufgestellt, dass längere Perioden von hohen Serum-Phosphatkonzentrationen zu einer erhöhten FGF23-Produktion führen, beziehungsweise dass der FGF23-Anstieg abhängig von der Phosphataufnahme geschieht (Ferrari, Bonjour et al. 2005). Keine dieser Studien beinhaltete Daten von pädiatrischen Patienten.

Die Ergebnisse unserer Studie konnten eine positive Korrelation der FGF23-Spiegel zu den Phosphat-Spiegeln aufzeigen. Eine signifikante Erhöhung der Phosphat-Spiegel trat jedoch erst im CNI-Stadium 4 auf ( $1,62 \pm 0,22$  mmol/l), während die Werte in den ersten beiden Stadien gering ausfielen ( $1,27 \pm 0,25$  mmol/l,  $p = 0,001$ ).

Die Tatsache, dass in der Studie eine signifikante Erhöhung der FGF23-Konzentration in Stadium 3 gemessen wurde, eine signifikante Erhöhung der Serum-Phosphat-Konzentration jedoch erst in Stadium 4, unterstützt die Hypothese, dass FGF23 die Entwicklung einer Hyperphosphatämie abmildert oder verzögert (Gutierrez, Isakova et al. 2005).

Weiter bekräftigt wird dies durch die negative Korrelation zwischen FGF23 und der tubulären Phosphatreabsorption, die die Auswertungen ergaben.

Ein relevanter Faktor, der neben allen anderen biochemischen Veränderungen mit einer erhöhten Mortalität der CNI-Patienten assoziiert ist, ist eine Hyperphosphatämie (Gutierrez, Mannstadt et al. 2008). Einige Studienergebnisse deuten darauf hin, dass die FGF23-Synthese über die Phosphatspiegel im Blut reguliert wird und eine Hyperphosphatämie im Endeffekt zu einer vermehrten FGF23-Synthese führt (Burnett, Gunawardene et al. 2006).



Wichtig ist zu berücksichtigen, dass die Serum-Phosphat-Spiegel bei CNI-Patienten durch verschiedene Faktoren, wie die Phosphataufnahme mit der Nahrung, die Therapie mit Phosphatbindern oder einen pathologischen Knochenstoffwechsel beeinflusst werden können. So konnten Pande et al. zeigen, dass eine Reduzierung der Medikation mit Phosphatbindern zu einem Anstieg der FGF23-Konzentration führt (Pande, Ritter et al. 2006).

Werden die Phosphatspiegel separat als prognostische Faktoren verwendet, kann dies zu Fehlinterpretationen der Stoffwechsellage führen, insbesondere, wenn normale Werte für die Phosphatkonzentration vorliegen.

Neueste Studien stellten die Vermutung an, dass die FGF23-Konzentration unter normophosphatämischen Bedingungen ein besserer Biomarker für die Abschätzung der Morbiditätsrisiken bei CNI-Patienten sei (Zoccali 2009).

In Zukunft sollte ein besseres Verständnis der Phosphathomeostase und dessen Zusammenhänge zum FGF23-Metabolismus Ziel weiterer Forschungen sein, um mehr Informationen über die Interaktionen von FGF23 zu erhalten und um in Endeffekt die Behandlung der CNI-Patienten optimieren zu können (Lindner, Charra et al. 1974; Qunibi, Nolan et al. 2002; Pande, Ritter et al. 2006).

### **5.1.3 FGF23 und 1-25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>**

Zahlreiche Studien zeigten, dass FGF23 die Serum-Spiegel von 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> reduziert, indem es das Schlüsselenzym dessen Synthese, die 1- $\alpha$ -Hydroxylase inhibiert (Liu and Quarles 2007). Bestätigt wurde dies durch Versuche mit FGF23-Knock-out-Mäusen, bei denen erhöhte 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel gemessen wurden (Shimada, Kakitani et al. 2004). Diese These konnte durch die Ergebnisse dieser Studie ebenfalls bestätigt werden. Wie auch in anderen Studien wurden erniedrigte 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-Konzentrationen bei den niereninsuffizienten Kindern gemessen und es ergab sich eine negative Korrelation zwischen diesen und der FGF23-Konzentration.

Von Saito et al. wurde außerdem gezeigt, dass FGF23 wiederum von den 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-Spiegeln reguliert wird, die durch einen negativen

Feedback-Mechanismus die weitere Produktion von aktivem Vitamin-D reduzieren (Saito, Maeda et al. 2005).

Welche Auswirkungen die routinemäßige medikamentöse Behandlung einiger Patienten der vorliegenden Studie mit Calcitriol auf diesen Mechanismus und die FGF23-Spiegel hat, bleibt weiterhin unklar. Möglicherweise wurden die FGF23-Spiegel dieser Patienten davon beeinflusst und sind nicht ohne weiteres mit denen der Patienten ohne Calcitriolgabe vergleichbar. Schon andere Studienergebnisse deuteten darauf hin, dass die Vitamin-D-Therapie als Stimulus zu einem Anstieg der FGF23-Spiegel beiträgt (Fukagawa and Kazama 2006). Die Auswirkungen der medikamentösen Vitamin-D-Substitution auf die Konzentrationen des FGF23 sollte in weiteren Studien beobachtet werden.

Bei den CNI-Patienten dieser Studie wurden bei Kindern in Stadium 4 und 5 der CNI besonders geringe Werte für 25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> gemessen. 25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> ist die gespeicherte Form des Vitamin-D und Substrat für die renale 1- $\alpha$ -Hydroxylase. Einige Studien bestätigen diese Ergebnisse (Seeherunvong, Abitbol et al. 2009). Diese Tatsache könnte den Mangel an Calcitriol ebenfalls mit induziert haben.

Ein Defizit von 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> und sehr hohe Konzentrationen von FGF23 scheinen mit einer erhöhten Mortalität erwachsener CNI-Patienten einherzugehen.

Fukagawa et al. stellten die Hypothese auf, dass hohe FGF23-Spiegel protektiv für die Ausbildung von Gefäßverkalkungen sind, da die Calcitriolsynthese gehemmt wird (Fukagawa and Kazama 2006). Für pädiatrische Patienten lassen sich hierzu aufgrund fehlender Daten noch keine Aussagen machen.

#### **5.1.4 FGF23 und die Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus**

FGF23 könnte ein weiterer prädiktiver Faktor für die Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus bei Dialysepatienten sein (Liu and Quarles 2007). Die Entwicklung eines sekundären Hyperparathyreoidismus spielt in der Pathophysiologie der CNI eine bedeutende Rolle. Ihr Einfluss auf die kardiovaskuläre Morbidität und eine verstärkte vaskuläre Verkalkung ist bedeutend (Klaus, Watson et al. 2006; Berndt and Kumar 2007; Nemere 2007; Wagner and Murer 2008).

Diese positive Korrelation eines Hyperparathyreoidismus zur FGF23-Konzentration, auch bei pädiatrischen Patienten konnte durch die vorliegenden Daten ebenfalls bekräftigt werden. In der multivariaten Analyse wurde dies nicht bestätigt, PTH zeigte zu FGF23 als abhängiger Variable keine signifikante Korrelation, mit einem p-Wert von 0,06 jedoch eine Tendenz in diese Richtung. Dies könnte möglicherweise durch einen Einfluss der Phosphatkonzentrationen im Serum auf PTH zustande kommen. Hyperphosphatämie und reduzierte zirkulierende Spiegel von 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> tragen zu einer Erhöhung der PTH-Spiegel bei. Trotzdem unterstützen die Daten die Hypothese, dass PTH und FGF23 auch bei Kindern einer gemeinsamen Regulation unterliegen (Westerberg, Linde et al. 2007).

Die ansteigende PTH-Konzentration könnte die Entwicklung der renalen Osteodystrophie und folglich auch die kardiovaskuläre Morbidität bei pädiatrischen Patienten negativ beeinflussen (Oh, Wunsch et al. 2002).

Wie auch die FGF23-Konzentration zeigt auch die PTH-Konzentration eine negative Korrelation zu der tubulären Phosphatreabsorption und eine positive Korrelation zu den Phosphatkonzentrationen. Neuere Studien stellen die Vermutung an, dass FGF23 und PTH unabhängig voneinander ihre phosphaturischen Effekte herbeiführen. Zusätzlich scheint es einen anderen biologischen Effekt dieser Phosphatonine auf den Natrium-Phosphat-Kotransporter-IIa (Na-Pi-IIa) in den proximalen Tubuli der Niere zu geben (Shimada, Mizutani et al. 2001; Gattineni, Bates et al. 2009).

### **5.1.5 FGF23 als Biomarker**

FGF23 kann, laut einiger Studienergebnisse ein besserer Biomarker für die Risiko- und Verlaufsbewertung bei CNI, als die alleinige Messung des Serum-Phosphat-Spiegels sein (Gutierrez, Mannstadt et al. 2008). Außerdem könnte ein zukünftiger oder beginnender sekundärer Hyperparathyreoidismus durch FGF23 als weiteren prädiktiven Faktor frühzeitig erkannt werden (Liu and Quarles 2007).

Wichtig ist zu berücksichtigen, dass die Serum-Phosphat-Spiegel bei CNI-Patienten durch verschiedene Faktoren, wie die Phosphataufnahme mit der Nahrung, die Therapie mit Phosphatbindern oder einen pathologischen Knochenstoffwechsel beeinflusst werden können. Wenn diese Spiegel allein als prognostische Faktoren verwendet werden, kann dies zu Fehlinterpretationen der Stoffwechsellage führen, insbesondere, wenn normale Werte für die Phosphatkonzentration vorliegen. Daher scheint die Möglichkeit eines weiteren Biomarkers für die Risikoeinschätzung verlockend. Es werden jedoch noch zahlreiche Studien nötig sein, um weitere Informationen, vor allem im Hinblick auf die langzeitige Entwicklung der FGF23-Werte im Verhältnis zur Stoffwechsellage zu bekommen und ob diese einen Stellenwert für die Prognose der Patienten haben. Daten für pädiatrische Patienten, die die FGF23-Konzentrationen über einen langjährigen Zeitraum verfolgen, liegen bisher nicht vor.

Ebenfalls sollte weiter untersucht werden, ob FGF23 als Biomarker für die prognostische Einschätzung der kardiovaskulären Morbidität, die Progression des Nierenschadens und der Wachstumsretardierung im Rahmen der renalen Osteodystrophie sinnvoll ist.

## **5.2 Qualitätsmerkmale**

### **5.2.1 Qualitätsmerkmale prospektiver Studien und Fehlerquellen bei der Untersuchung**

Das Studiendesign entscheidet im Wesentlichen darüber, wie aussagekräftig die erhaltenen Daten nach Durchführung der Studie sind.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine prospektive Querschnittsstudie, die die Ermittlung der FGF23-Konzentrationen einer Gruppe niereninsuffizienter pädiatrischer Patienten zum Ziel hat. Das Patientenkollektiv stammt, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben aus der Nierenambulanz des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die vor Beginn der Studie aufgestellten Hypothesen konnten durch die Ergebnisse bestätigt werden.

Ein wichtiger Vorteil der prospektiven Studie ist, dass im Vorfeld eine freie Planung der Fragestellung und eine Festlegung der Rahmenbedingungen und der Beurteilungskriterien möglich ist. Das vorliegende Datenmaterial ist genau auf die Anforderungen der Studie zugeschnitten.

Einer weiterer Vorteil prospektiver Studien ist die Möglichkeit eines direkten Eingreifens. So konnte unter anderem in einzelnen Fällen die Blutentnahme wiederholt werden, wenn einer der Laborwerte bei der Bestimmung fehlte oder die Probe nicht ausreichend gekühlt wurde.

### **5.2.2 Vorteile des verwendeten ELISA-Assays**

Es gibt drei verschiedene ELISA-Assays, um zirkulierende FGF23-Spiegel zu messen. Ein Test misst die C-terminalen Fragmente (Immunotopics C-terminal assay, Carlsbad, CA), die zwei anderen messen intaktes FGF23 (Immunotopics Intakt und Kainos Intact assay) (Imel, Peacock et al. 2006).

Zur Bestimmung der FGF23-Konzentrationen wurde der Kainos Intact assay (Kainos Laboratories Inc., Toxyo, Japan) verwendet, der unter anderem in Studien zur TIO eine größere Sensitivität im Vergleich zu den beiden anderen Assays zeigte (Yamazaki, Okazaki et al. 2002; Liu and Quarles 2007).

Auch in dieser Studie lieferte der Assay zuverlässige Ergebnisse. Das typische biochemische Profil der Patienten, mit geringem Serum-Phosphat, niedrigen 1,25-Vitamin-D<sub>3</sub>-Spiegeln und einer leichten PTH-Erhöhung, kann schon einen

eindeutigen Hinweis auf eine Erhöhung der FGF23-Spiegel geben (Liu and Quarles 2007). Diese im Vorfeld erwarteten FGF23-Serumkonzentrationen wurden durch die gemessenen Werte des Testes bestätigt und bekräftigen ebenfalls dessen Zuverlässigkeit.

### **5.2.3 Repräsentativität der Ergebnisse**

Da das Patientenkollektiv von n=79 eine relativ große Gruppe einschließt, ist anzunehmen, dass die Aussagen nicht nur auf die Patientengruppe im UKE, sondern auch auf eine größere Grundgesamtheit zutreffen, die Studie also eine gute Repräsentativität hat. Sinnvoll wären weitere Datenerhebungen großer Fallzahlen, unter anderem in Zusammenarbeit mehrerer nephrologischer Zentren.

### **5.3 Schlussfolgerungen**

Die Auswertung der ersten Daten von pädiatrischen Patienten bestätigen die Vermutung, dass FGF23 eine wichtige Rolle in der Calcium- und Phosphatregulation, sowie auch im Vitamin-D-Haushalt spielt. Die Studie zeigte erstmalig, dass FGF23 bei Kindern mit CN1 erhöht ist. Wie bei erwachsenen Patienten steht die Erhöhung von FGF23 im Zusammenhang mit dem Absinken der GFR. In der multivariaten Analyse mit FGF23 als abhängiger Variable zeigten die eGFR, die Serumphosphatspiegel und auch die 1,25-Dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>-Spiegel eine signifikante Assoziation zu den FGF23-Konzentrationen. PTH ist nicht signifikant ( $p = 0,06$ ) mit FGF23 assoziiert.

Eine signifikante Erhöhung des FGF23 konnte schon in Stadium 3 aufgezeigt werden, während eine signifikante Erhöhung des Phosphatspiegels erst in Stadium 4 gemessen wurden. Daher scheint eine FGF23-Erhöhung einer Hyperphosphatämie voranzugehen.

FGF23 scheint die Produktion von aktivem Vitamin-D<sub>3</sub> zu unterdrücken, wie die entgegengesetzten Spiegel aufzeigten. In der Konsequenz steigen die PTH-Spiegel an und können eine renale Osteodystrophie fördern.

Eine Erhöhung des FGF23 ist auch in den frühen Stadien der Niereninsuffizienz zu beobachten. Zwar tritt eine signifikante Erhöhung erst in Stadium 3 der CN1

auf, dennoch könnte FGF23 ein früher Indikator eines unkontrollierten Calcium- und Phosphathaushaltes werden und deren negative Effekte auf den Knochenstoffwechsel, Wachstumsstörungen und kardiovaskulärer Morbidität rechtzeitig anzeigen.

Es werden weitere Studien zur Aufklärung der Physiologie von FGF23 nötig sein, um dessen Rolle in der renalen Osteodystrophie und die damit einhergehende Wachstumsretardierung bei Kindern mit chronischer Niereninsuffizienz zu klären. Diesem kommt eine besondere Bedeutung im Kindesalter zu, da die Auswirkungen der renalen Osteodystrophie, wie unter anderem die Wachstumsretardierung, dort erhebliche Konsequenzen haben. Der Einsatz als weiterer Biomarker zur Beurteilung der Nierenfunktion und als prognostischer Wert für die Entwicklung der renalen Osteodystrophie sollte weiter untersucht werden; auch welche altersbezogenen Faktoren die FGF23-Konzentration zusätzlich beeinflussen könnten.

Die bei erwachsenen Patienten aufgezeigten Auswirkungen auf die kardiovaskuläre Morbidität sind bei Kindern bisher noch nicht weiter untersucht; auch dies sollte Inhalt weiterer Studien sein.

## **6. Zusammenfassung**

Die vorliegende Arbeit beinhaltet eine prospektive Querschnittsstudie, die zum Ziel hat, die Bedeutung von FGF23 und dessen Zusammenhänge mit anderen biochemischen Variablen des Knochen- und Nierenstoffwechsels bei CNI-Patienten im Kindes- und Jugendalter näher zu untersuchen.

Bei 69 pädiatrischen Patienten in verschiedenen Stadien der CNI und 10 Kindern in der Kontrollgruppe wurden intaktes FGF23 und diese Variablen (u.a. Kreatinin, Serum-PO<sub>4</sub>, Serum-Ca, PTH, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 25(OH)D<sub>3</sub>, AP) bestimmt. FGF23 war Inhalt vieler Studien an erwachsenen Patienten; Daten für pädiatrische Patienten fehlten. Die Ergebnisse und Schlussfolgerungen aus Studien an erwachsenen CNI-Patienten waren Basis für die Planung dieser Studie. Hypothesen, die vor Beginn der Studie aufgestellt wurden, konnten durch diese Ergebnisse für pädiatrische Patienten bestätigt werden.

Die Daten deuten auf eine bedeutende Rolle des FGF23 im Calcium-, Phosphat- und Vitamin-D-Haushalt bei Kindern, auch in frühen CNI-Stadien hin. Die Konzentration von FGF23 war in den ersten CNI-Stadien noch normwertig (CNI 1+2: 47 ± 26 pg/ml) und zeigte eine signifikante Erhöhung erst in CNI-Stadium 3 (144 ± 91 pg/ml, verglichen mit CNI 1+2: p = 0,006). Es wurden die höchsten FGF23-Spiegel bei Patienten im CNI-Stadium 5 gemessen (734 ± 397 pg/ml, verglichen mit Stadium CNI 1+2: p < 0,001). Dementsprechend zeigte die FGF23-Konzentration eine signifikant negative Korrelation zur eGFR (r = -0,57, p < 0,001). Eine signifikante Erhöhung des Phosphats wurde in CNI-Stadium 4 gemessen (1,62 ± 0,22 mmol/l), während die Werte in den ersten beiden Stadien gering ausfielen (1,27 ± 0,25 mmol/l, p = 0,001). Die PTH-Konzentration war in allen CNI-Stadien statistisch signifikant erhöht. FGF23 zeigte eine positive Korrelation zu den PTH- und Phosphat-Spiegeln und eine negative Korrelation zu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und TPR. PTH war mit FGF23 als abhängiger Variable in der multivariaten Analyse nicht signifikant assoziiert (p = 0,06).

Es werden weitere Studien nötig sein, um die physiologische Rolle von FGF23 im Knochen- und Nierenstoffwechsel zu erörtern, um diesen als Biomarker bei CNI-Patienten einsetzen zu können und um neue Ansatzpunkte für die frühzeitige Behandlung der Folgeschäden zu schaffen.



## **7. Abkürzungsverzeichnis**

ADHR	Autosomal dominant hypophosphatämische Rachitis
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure(n)
Ca	Calcium
CKD	Chronic kidney disease
CKD-MBD	Chronic kidney disease – mineral and bone disorders
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
DMP1	Dentin matrix protein
eGFR	estimated glomerular filtration rate, erwartete Glomeruläre Filtrationsrate
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESRD	end-stage renal disease
FGF7	Fibroblast growth factor-7, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-7
FGF23	Fibroblast growth factor-23, Fibroblasten-Wachstumsfaktor-23
FGFR	FGF-Rezeptoren
FRP4	Frizzled related protein-4
GRF	Glomeruläre Filtrationsrate
HRP	horseradish peroxidase
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
KFH	Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V.
Lbj.	Lebensjahr
m	männlich
MDRD	„Modification of Diet in Renal Disease“
Mean	Mittelwert
MEPE	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
Na-Pi-(I, IIa-c)	sodium-phosphorus-cotransporter (I, IIa-c), natriumabhängiger Phosphat-Kotransporter (I, IIa-c)
N	Anzahl
NTX	Nierentransplantation
p	p-Wert, P-value, Signifikanzwert

Pat.	Patient(en)
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PHEX	phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome
Pi	anorganisches Phosphat
PO <sub>4</sub>	anorganisches Phosphat
PTH	parathyroid hormone, Parathormon
R <sup>2</sup>	Determinationskoeffizient
ROD	renale Osteodystrophie
s.e.	standard error, Standardfehler
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SPSS	Statistik-Software, Statistical Package for the Social Sciences, (Superior Performing Software System)
T	Testgröße
TIO	Tumor induced osteomalacia
TPR	tubuläre Phosphatreabsorption
u.a.	unter anderem
U-Test	Mann-Withney-Wilcoxon-Test
v.a.	vor allem
w	weiblich
XLHR	x-linked hypophosphatemic rickets,
XHR	X-chromosomal hypophosphatämische Rachitis
Zn	Zink
β-Coefficient	Beta-Koeffizient, standardisierter Koeffizient
1-α-Hydroxylase	1-alpha-Hydroxylase
1,25(OH) <sub>2</sub> D <sub>3</sub>	1,25-Dihydroxyvitamin-D <sub>3</sub> , Calcitriol
25(OH)D <sub>3</sub>	25-Dihydroxyvitamin-D <sub>3</sub>

## **8. Literaturverzeichnis**

ADHR-Consortium, T. and C. Author] (2000). "Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23." *Nat Genet* 26(3): 345-348.

Antoniucci, D. M., T. Yamashita, et al. (2006). "Dietary phosphorus regulates serum fibroblast growth factor-23 concentrations in healthy men." *J Clin Endocrinol Metab* 91(8): 3144-3149.

Berndt, T., T. A. Craig, et al. (2003). "Secreted frizzled-related protein 4 is a potent tumor-derived phosphaturic agent." *J Clin Invest* 112(5): 785-794.

Berndt, T. and R. Kumar (2007). "Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis." *Annu Rev Physiol* 69: 341-359.

Berndt, T. J., T. A. Craig, et al. (2007). "Biological activity of FGF-23 fragments." *Pflugers Arch* 454(4): 615-623.

Bhan, I., A. Shah, et al. (2006). "Post-transplant hypophosphatemia: Tertiary 'Hyper-Phosphatoninism'?" *Kidney International* 70(8): 1486-1494.

Burnett, S. M., S. C. Gunawardene, et al. (2006). "Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women." *J Bone Miner Res* 21(8): 1187-1196.

Cai, Q., S. F. Hodgson, et al. (1994). "Brief report: inhibition of renal phosphate transport by a tumor product in a patient with oncogenic osteomalacia." *N Engl J Med* 330(23): 1645-1649.

Emmett, M. (2008). "What does serum fibroblast growth factor 23 do in hemodialysis patients?" *Kidney Int* 73(1): 3-5.

Ferrari, S. L., J. P. Bonjour, et al. (2005). "Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men." *J Clin Endocrinol Metab* 90(3): 1519-1524.

Fukagawa, M. and J. J. Kazama (2006). "FGF23: its role in renal bone disease." *Pediatr Nephrol* 21(12): 1802-1806.

Fukagawa, M., S. Nakanishi, et al. (2006). "Regulation of parathyroid function in chronic kidney disease (CKD)." *Clin Exp Nephrol* 10(3): 175-179.

Fukagawa, M., S. Nakanishi, et al. (2006). "Basic and clinical aspects of parathyroid hyperplasia in chronic kidney disease." *Kidney Int Suppl*(102): S3-7.

Fukumoto, S. and K. Nakahara (2004). "[Establishment of assay system for fibroblast growth factor (FGF)-23 and pathophysiological roles of FGF-23 in the development of hypophosphatemic diseases]." *Rinsho Byori* 52(1): 51-54.

Fukumoto, S. and T. Yamashita (2002). "Fibroblast growth factor-23 is the phosphaturic factor in tumor-induced osteomalacia and may be phosphatonin." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11(4): 385-389.

Gattineni, J., C. Bates, et al. (2009). "FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1." *Am J Physiol Renal Physiol* 297(2): F282-291.

Ghanekar, H., B. J. Welch, et al. (2006). "Post-renal transplantation hypophosphatemia: a review and novel insights." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15(2): 97-104.

Goodman, W. G., G. London, et al. (2004). "Vascular calcification in chronic kidney disease." *Am J Kidney Dis* 43(3): 572-579.

Gutierrez, O., T. Isakova, et al. (2005). "Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease." *J Am Soc Nephrol* 16(7): 2205-2215.

Gutierrez, O. M., M. Mannstadt, et al. (2008). "Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis." *N Engl J Med* 359(6): 584-592.

Hogg, R. J., S. Furth, et al. (2003). "National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification, and stratification." *Pediatrics* 111(6 Pt 1): 1416-1421.

Imel, E. A., M. Peacock, et al. (2006). "Sensitivity of fibroblast growth factor 23 measurements in tumor-induced osteomalacia." *J Clin Endocrinol Metab* 91(6): 2055-2061.

Itoh, N. and D. M. Ornitz (2004). "Evolution of the Fgf and Fgfr gene families." *Trends Genet* 20(11): 563-569.

Jonsson, K. B., R. Zahradnik, et al. (2003). "Fibroblast growth factor 23 in oncogenic osteomalacia and X-linked hypophosphatemia." *N Engl J Med* 348(17): 1656-1663.

Klaus, G., A. Watson, et al. (2006). "Prevention and treatment of renal osteodystrophy in children on chronic renal failure: European guidelines." *Pediatr Nephrol* 21(2): 151-159.

Kuro-o, M., Y. Matsumura, et al. (1997). "Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing." *Nature* 390(6655): 45-51.

Kurokawa, K. and M. Fukagawa (1999). "Uremic bone disease: advances over the last 30 years." *J Nephrol* 12 Suppl 2: S63-67.

Kurosu, H., Y. Ogawa, et al. (2006). "Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by klotho." *J Biol Chem* 281(10): 6120-6123.

Larsson, T., U. Nisbeth, et al. (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." *Kidney Int* 64(6): 2272-2279.

Li, S. A., M. Watanabe, et al. (2004). "Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice." *Cell Struct Funct* 29(4): 91-99.

Lindner, A., B. Charra, et al. (1974). "Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis." *N Engl J Med* 290(13): 697-701.

Liu, S., R. Guo, et al. (2003). "Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX." *J Biol Chem* 278(39): 37419-37426.

Liu, S. and L. D. Quarles (2007). "How fibroblast growth factor 23 works." *J Am Soc Nephrol* 18(6): 1637-1647.

Liu, S., P. S. Rowe, et al. (2007). "Phosphorylated acidic serine-aspartate-rich MEPE-associated motif peptide from matrix extracellular phosphoglycoprotein inhibits phosphate regulating gene with homologies to endopeptidases on the X-chromosome enzyme activity." *J Endocrinol* 192(1): 261-267.

Liu, S., W. Tang, et al. (2006). "Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D." *J Am Soc Nephrol* 17(5): 1305-1315.

Liu, S., J. Zhou, et al. (2006). "Pathogenic role of Fgf23 in Hyp mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291(1): E38-49.

Lorenz-Depiereux, B., M. Bastepe, et al. (2006). "DMP1 mutations in autosomal recessive hypophosphatemia implicate a bone matrix protein in the regulation of phosphate homeostasis." *Nat Genet* 38(11): 1248-1250.

Martin, K. J. and E. A. Gonzalez (2007). "Metabolic bone disease in chronic kidney disease." *J Am Soc Nephrol* 18(3): 875-885.

Martinez, I., R. Saracho, et al. (1997). "The importance of dietary calcium and phosphorous in the secondary hyperparathyroidism of patients with early renal failure." *Am J Kidney Dis* 29(4): 496-502.

Medin, C., C. G. Elinder, et al. (2000). "Survival of patients who have been on a waiting list for renal transplantation." *Nephrol Dial Transplant* 15(5): 701-704.

Miyamoto, K., M. Ito, et al. (2005). "Inhibition of intestinal sodium-dependent inorganic phosphate transport by fibroblast growth factor 23." *Ther Apher Dial* 9(4): 331-335.

Moe, S., T. Drueke, et al. (2006). "Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)." *Kidney Int* 69(11): 1945-1953.

Murer, H., N. Hernando, et al. (2003). "Regulation of Na/Pi transporter in the proximal tubule." *Annu Rev Physiol* 65: 531-542.

Nemere, I. (2007). "The ins and outs of phosphate homeostasis." *Kidney International* 72(2): 140-142.

Nishi, H., T. Nii-Kono, et al. (2005). "Intravenous calcitriol therapy increases serum concentrations of fibroblast growth factor-23 in dialysis patients with secondary hyperparathyroidism." *Nephron Clin Pract* 101(2): c94-99.

Oh, J., R. Wunsch, et al. (2002). "Advanced coronary and carotid arteriopathy in young adults with childhood-onset chronic renal failure." *Circulation* 106(1): 100-105.

Ornitz, D. M. (2000). "FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development." *Bioessays* 22(2): 108-112.

Pande, S., C. S. Ritter, et al. (2006). "FGF-23 and sFRP-4 in chronic kidney disease and post-renal transplantation." *Nephron Physiol* 104(1): p23-32.

Quarles, L. D. (2003). "FGF23, PHEX, and MEPE regulation of phosphate homeostasis and skeletal mineralization." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(1): E1-E9.

Qunibi, W. Y., C. A. Nolan, et al. (2002). "Cardiovascular calcification in patients with end-stage renal disease: a century-old phenomenon." *Kidney Int Suppl*(82): S73-80.

Razzaque, M. S. (2009). "Does FGF23 toxicity influence the outcome of chronic kidney disease?" *Nephrol Dial Transplant* 24(1): 4-7.

Rowe, P. S. (2004). "The wrickkened pathways of FGF23, MEPE and PHEX." *Crit Rev Oral Biol Med* 15(5): 264-281.

Rowe, P. S., P. A. de Zoysa, et al. (2000). "MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia." *Genomics* 67(1): 54-68.

Saito, H., A. Maeda, et al. (2005). "Circulating FGF-23 is regulated by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and phosphorus in vivo." *J Biol Chem* 280(4): 2543-2549.

Schiavi, S. C. and O. W. Moe (2002). "Phosphatonins: a new class of phosphate-regulating proteins." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 11(4): 423-430.

Schwartz, G. J., G. B. Haycock, et al. (1976). "A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine." *Pediatrics* 58(2): 259-263.

Seeherunvong, W., C. L. Abitbol, et al. (2009). "Vitamin D insufficiency and deficiency in children with early chronic kidney disease." *J Pediatr* 154(6): 906-911 e901.

Shigematsu, T., J. J. Kazama, et al. (2004). "Possible involvement of circulating fibroblast growth factor 23 in the development of secondary hyperparathyroidism associated with renal insufficiency." *Am J Kidney Dis* 44(2): 250-256.

Shimada, T., H. Hasegawa, et al. (2004). "FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis." *J Bone Miner Res* 19(3): 429-435.

Shimada, T., M. Kakitani, et al. (2004). "Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism." *J Clin Invest* 113(4): 561-568.

Shimada, T., S. Mizutani, et al. (2001). "Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(11): 6500-6505.

Torres, P. U., D. Prie, et al. (2007). "Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism." *Kidney International* 71(8): 730-737.

Urakawa, I., Y. Yamazaki, et al. (2006). "Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23." *Nature* 444(7120): 770-774.

Urena Torres, P., G. Friedlander, et al. (2008). "Bone mass does not correlate with the serum fibroblast growth factor 23 in hemodialysis patients." *Kidney Int* 73(1): 102-107.

Wagner, C. and H. Murer (2008). "Phosphatonine - neuartige Phosphathormone." *Schweiz Med Forum*(8): 8-10.

Weber, T. J., S. Liu, et al. (2003). "Serum FGF23 levels in normal and disordered phosphorus homeostasis." *J Bone Miner Res* 18(7): 1227-1234.

Weisinger, J. R., R. G. Carlini, et al. (2006). "Bone disease after renal transplantation." *Clin J Am Soc Nephrol* 1(6): 1300-1313.

Wesseling-Perry, K., R. C. Pereira, et al. (2009). "Relationship between plasma fibroblast growth factor-23 concentration and bone mineralization in children with renal failure on peritoneal dialysis." *J Clin Endocrinol Metab* 94(2): 511-517.

Westerberg, P. A., T. Linde, et al. (2007). "Regulation of fibroblast growth factor-23 in chronic kidney disease." *Nephrology Dialysis Transplantation* 22(11): 3202-3207.

Yamashita, T., M. Konishi, et al. (2002). "Fibroblast growth factor (FGF)-23 inhibits renal phosphate reabsorption by activation of the mitogen-activated protein kinase pathway." *J Biol Chem* 277(31): 28265-28270.

Yamashita, T., M. Yoshioka, et al. (2000). "Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain." *Biochem Biophys Res Commun* 277(2): 494-498.

Yamazaki, Y., R. Okazaki, et al. (2002). "Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia." *J Clin Endocrinol Metab* 87(11): 4957-4960.

Yan, X., H. Yokote, et al. (2005). "Fibroblast growth factor 23 reduces expression of type IIa Na<sup>+</sup>/Pi co-transporter by signaling through a receptor functionally distinct from the known FGFRs in opossum kidney cells." *Genes Cells* 10(5): 489-502.

Yu, X., O. A. Ibrahim, et al. (2005). "Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23." *Endocrinology* 146(11): 4647-4656.

Zoccali, C. (2009). "FGF-23 in dialysis patients: ready for prime time?" *Nephrol Dial Transplant* 24(4): 1078-1081.



## 9. Anhang



Universitätsklinikum  
Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für  
Kinder- und Jugendmedizin

Zentrum für Frauen-,  
Kinder- und Jugendmedizin

Prof. Dr. Kurt Ullrich  
Direktor

Martinstraße 52  
20246 Hamburg  
Telefon: (040) 42803-3710  
Telefax: (040) 42803-1299  
kemper@uke.uni-hamburg.de  
www.uke.uni-hamburg.de

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Martinstraße 52 20246 Hamburg  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Pädiatrische Nephrologie



Zertifikat Nr. QS-4114HH

Pädiatrische Nephrologie  
Prof. D.E. Müller-Wiefel  
PD Dr. M.J. Kemper

### Patienten- und Elternaufklärung

Liebe Eltern, Kinder & Jugendliche,

die Universitäts-Klinik für Kinder und Jugendmedizin, Abt. Kinderneurologie, plant eine wissenschaftliche Untersuchung zur Bedeutung des Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 (FGF 23) im Knochenstoffwechsel bei Kindern mit chronischen Nierenversagen und nach Nierentransplantation.

Im Blut kann man FGF 23 nachweisen. Bei erwachsenen Patienten mit chronischen Nierenversagen sind viele Hormone und Vitamine, die den Knochenstoffwechsel regeln, verändert, wie das Parathormon und Vitamin D. Neuerdings hat man den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23 entdeckt, der überwiegend im Knochen gebildet wird und sowohl die Phosphatausscheidung regelt, wie auch die Vitamin D-Bildung hemmen kann. Somit spielt FGF 23 eine wichtige Rolle in den Veränderungen des Knochens bei den Patienten mit Nierenerkrankungen.

Bei erwachsenen niereninsuffizienten Patienten hat man erhöhte FGF 23-Spiegel gefunden, die auch nach erfolgreicher Nierentransplantation längerfristig nicht abfallen. Dies könnte ein Grund sein, warum nach Nierentransplantation die Phosphatausscheidung so hoch ist. Zu FGF 23-Spiegel bei Kindern und Jugendlichen liegen bisher leider noch keine Daten vor. Deshalb bietet sich hier eine Untersuchung an.

Hierzu soll im Rahmen einer klinisch notwendigen Blutuntersuchung zusätzliches Material (ca. 5ml Blut) abgenommen und auf den Faktor FGF 23 untersucht werden. Genetische Untersuchungen werden nicht durchgeführt. Die Patientendaten werden bei der Datensammlung verschlüsselt und die Ergebnisse anschließend auch in verschlüsselter Form wissenschaftlich ausgewertet. Sie haben noch keinen unmittelbaren Wert in der klinischen Betreuung und Behandlung.

Die weiteren Daten, die zur Auswertung dieser Studie notwendig sind, werden aus den Laborergebnissen der Patienten wie zum Beispiel dem Kreatinin-Wert im Blut übernommen, die routinemäßig bei einer Kontrolle bestimmt werden. Weiter fließen Ergebnisse wie die Wachstumsdaten, die verwendeten Medikamente und die Röntgen-Untersuchung der Hand ein, die wie bisher auch in bestimmten Zeitabständen durchgeführt wird. Zusätzliche Untersuchungen, die nicht in der Routine der Betreuung nierenkranker Kinder und Jugendlicher üblich sind, werden nicht durchgeführt.

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Körperschaft des öffentlichen Rechts  
Gerichtsstand: Hamburg

Vorstandsmitglieder:  
Prof. Dr. Jörg F. Debatin (Vorsitzender)  
Dr. Alexander Kirstein  
Ricarda Klein  
Prof. Dr. Dr. Uwe Koch-Gromus

Bankverbindung:  
HSH Nordbank  
Kto.-Nr.: 104 364 000  
BLZ: 210 500 00

## Einverständniserklärung

### Fibroblasten- Wachstumsfaktor 23 bei chronisch niereninsuffizienten und nieren-transplantierten Kindern und Jugendlichen

.....(Name des Arztes)

hat mich vollständig über das Wesen und die Bedeutung der geplanten Studie aufgeklärt. Ich konnte dabei alle mich interessierenden Fragen stellen. Ferner hatte ich Gelegenheit, das Aufklärungsblatt genau durch zu lesen und auch dazu Fragen zu stellen. Ein Exemplar der Aufklärung/Einverständniserklärung ist mir zum Verbleib ausgehändigt worden.

Ich bin damit einverstanden, dass die im Rahmen dieser Studie erhobenen persönlichen Daten der Schweigepflicht und den datenschutzrechtlichen Bestimmungen unterliegen. Sie werden in Papierform aufgezeichnet und auf elektronischen Datenträgern pseudonymisiert (verschlüsselt) gespeichert. Die Nutzung der Daten erfolgt pseudonymisiert (verschlüsselt).

Eine Weitergabe an Dritte oder eine Veröffentlichung der Studienergebnisse erfolgt nur in pseudonymisierter (verschlüsselter) Form. Die Speicherung der Daten ist für die Dauer von drei Jahren vorgesehen. Bei Widerruf der Einverständniserklärung werden die bereits erhobenen personenbezogenen Daten entweder gelöscht oder anonymisiert und in dieser Form weiter genutzt.

Ich weiß, dass ich meine Einwilligung ohne Angabe von Gründen widerrufen kann, ohne dass mir daraus Nachteile bezüglich einer laufenden oder zukünftigen Behandlung entstehen.

Ich bestätige durch meine Unterschrift, dass ich die Aufklärung verstanden habe und mich mit der Durchführung der vorgenannten Studie einverstanden erkläre.

Datum:

Unterschrift des auf-  
klärenden Arztes

Unterschrift des Patienten  
bei Alter ab 16 Jahren (bzw.  
Einsichtsfähigkeit)

Unterschrift der Eltern\*

\*Grundsätzlich sollten beide Eltern die Einwilligungserklärung unterschreiben. Bei Unterschrift eines Elternteils versichert der/die Unterzeichnende zugleich, dass er/ sie im Einverständnis mit dem anderen Elternteil handelt oder er/ sie das alleinige Sorgerecht für das Kind hat.

## **10. Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei all jenen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Professor Dr. med. Markus Kemper für die Überlassung des Themas, Einführung in die Thematik und der es mir ermöglicht hat, mich mit diesem spannenden pädiatrischen Thema zu beschäftigen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Michael van Husen, der mich zum wissenschaftlichen Arbeiten anleitete und mir durch seine konstruktiven Anmerkungen und ständige Hilfsbereitschaft geduldig weiterhalf.

Ein großer Dank gilt dem gesamten Team der nephrologischen Ambulanz der Kinderklinik für die Unterstützung bei der Probensammlung, Elternaufklärung und der freundlichen Bereitstellung der Räumlichkeiten und Arbeitsplätze zur Auswertung der Patientendaten und Vorbereitung des Probenmaterials.

Frau Jutta Giesecking danke ich für die hilfreiche Anleitung und Beratung beim experimentell praktischen Teil dieser Arbeit im Labor.

Meiner Familie, besonders meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung des Studiums und die jahrelange Unterstützung und Ermutigung auf diesem Weg.

## **12. Erklärung**

### **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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 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.

Unterschrift: .....