

Aus der Klinik für Innere Medizin IV
Nieren- und Hochdruckkrankheiten
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg / Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Danilo Fliser

**Einfluss von FGFR4- und Klotho-Polymorphismen
auf die linksventrikuläre Hypertrophie
bei chronisch nierenkranken Patienten**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2022**

vorgelegt von
Alexander Benedikt Thomas Sellier
geboren am 9. Juni 1993 in Saarbrücken

Tag des Kolloquiums: 26.09.2022
Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Gunnar H. Heine
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Schäfers

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Zusammenfassung	8
2. Summary	10
3. Einleitung	12
3.1. Epidemiologische Bedeutung der chronischen Nierenerkrankung	12
3.2. Kardiovaskuläre Komplikationen der chronischen Nierenerkrankung	13
3.3. Kardiovaskuläre Risikofaktoren bei chronisch nierenkranken Menschen	14
3.4. Physiologische Aspekte von FGF23	17
3.5. Physiologische Aspekte von Klotho und sKlotho	18
3.6. Bedeutung von FGF23 und Klotho bei chronischer Nierenerkrankung.....	18
3.7. Rolle der FGF23/Klotho-Achse bei urämischer Kardiomyopathie.....	21
3.8. Mendelsche Randomisierung	22
3.9. Hypothesen.....	22
4. Material und Methodik	24
4.1. Population.....	24
4.1.1. <i>CARE FOR HOME</i>	24
4.1.2. <i>Studienpopulation</i>	24
4.1.3. <i>Einschlusskriterien</i>	25
4.1.4. <i>Ausschlusskriterien</i>	25
4.1.5. <i>Definition von kardiovaskulären Risikofaktoren und Komorbiditäten</i>	26
4.1.6. <i>Definition der Ereignisse</i>	26
4.1.7. <i>Studienablauf</i>	27
4.1.8. <i>Echokardiographische Untersuchungen</i>	28
4.2. Material	30
4.2.1. <i>Geräte</i>	30

4.2.2. Kits und Assays.....	30
4.2.3. Chemikalien und Lösungen	31
4.2.4. Verbrauchsmaterial.....	31
4.2.5. Software.....	32
4.3. DNA-Isolation	32
4.4. Konzentrationsbestimmung.....	34
4.5. Real-Time Qualitative PCR	35
4.5.1. Prinzip der Real-Time Qualitative PCR.....	35
4.5.2. Durchführung der Real-Time Qualitative PCR	37
4.5.3. Verwendete TaqMan®-Assays	38
4.6. Statistische Auswertung	39
5. Ergebnisse	41
5.1. Baseline-Charakteristika	41
5.2. Querschnittsanalysen echokardiographischer Parameter bei Studienbeginn	46
5.3. Längsschnittanalysen echokardiographischer Parameter im Studienverlauf	51
5.4. Kaplan-Meier-Überlebensanalysen	58
5.5. Cox-Regressions-Analysen	63
6. Diskussion	66
6.1. Die chronische Nierenerkrankung und kardiovaskuläres Risiko	66
6.2. Bedeutung von FGF23 und FGFR4 bei urämischer Kardiomyopathie.....	67
6.3. Pathomechanismen einer FGF23-induzierten Myokardschädigung	70
6.4. Rolle von sKlotho bei urämischer Kardiomyopathie	73
6.5. Protektive Effekte von Klotho und sKlotho	75
6.6. Limitationen	77
6.7. Zusammenfassung und Ausblick	78
7. Literaturverzeichnis.....	80
8. Publikationen / Danksagung	99
8.1. Publikationen.....	99

8.1.1. Originalarbeiten.....	99
8.1.2. Präsentationen und Vorträge.....	99
8.2. Danksagung.....	101
9. Lebenslauf.....	102

Abkürzungsverzeichnis

cFGF23	<i>c-terminal Fibroblast Growth Factor 23</i> ; c-terminaler Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
CKD	<i>Chronic Kidney Disease</i> ; chronische Nierenerkrankung
CKD-MBD	<i>Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder</i>
CRP	C-reaktives Protein
CVD	<i>Cardiovascular Disease</i> ; Kardiovaskuläre Erkrankung
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
eGFR	<i>Estimated Glomerular Filtration Rate</i> ; geschätzte glomeruläre Filtrationsrate
ESRD	<i>End-stage Renal Disease</i>
FePi	<i>Fractional excretion of phosphate</i> ; Fraktionelle Phosphatausscheidung
FGF23	<i>Fibroblast Growth Factor 23</i> ; Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
FGFR4	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 4</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFR	<i>Glomerular Filtration Rate</i> ; glomeruläre Filtrationsrate
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
iFGF23	<i>Intact Fibroblast Growth Factor 23</i> ; intakter Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
KDIGO	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
KDOQI	<i>Kidney Disease Outcomes Quality Initiative</i>
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LVMI	<i>Left Ventricular Mass Index</i> ; linksventrikulärer Massenindex
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
MDRD	<i>Modification of Diet in Renal Disease</i>
NT-proBNP	N-terminales pro <i>Brain Natriuretic Peptide</i>
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Polymerasekettenreaktion
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	Perkutane transluminale Coronarangioplastie
SNP	<i>Single Nucleotid Polymorphism</i> ; Einzelnukleotidpolymorphismus

1. Zusammenfassung

Einfluss von FGFR4- und Klotho-Polymorphismen auf die linksventrikuläre Hypertrophie bei chronisch nierenkranken Patienten

Erhöhte Plasmaspiegel des Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) prädictieren auch nach Korrektur für die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse bei chronisch nierenkranken Patienten. Rezente tierexperimentelle Studien suggerieren, dass FGF23 über eine Aktivierung des FGF-Rezeptors 4 (FGFR4) eine linksventrikuläre Hypertrophie direkt und unabhängig vom FGF23-Korezeptor Klotho induziert. In konkurrierenden Studien erwies sich jedoch nicht ein Anstieg von FGF23, sondern eine Verminderung der Plasmaspiegel von löslichem Klotho als Induktor der kardialen Hypertrophie.

Um die klinische Relevanz dieser gegensätzlichen tierexperimentellen Daten zu überprüfen, untersuchten wir in der prospektiven CARE FOR HOME-Studie, inwieweit das Vorliegen genetischer Varianten von FGFR4 und Klotho einerseits mit prävalenter linksventrikulärer Hypertrophie bei Studienbeginn und andererseits mit Veränderungen dieser innerhalb einer fünfjährigen Nachbeobachtungszeit assoziiert ist. Darüber hinaus untersuchten wir, ob das Vorliegen dieser genetischen Varianten einen Einfluss auf das Auftreten inzidenter kardialer Dekompensationen hat.

Die CARE FOR HOME-Studie rekrutierte 544 chronisch nierenkranke Patienten in den GFR-Kategorien G2 bis G4. Von 519 Teilnehmern wurde DNA isoliert und Single Nucleotid Polymorphismen für FGFR4 (Gly388Arg) und Klotho (Phe352Val) mittels qualitativer Real-Time PCR genotypisiert.

Zur Bestimmung von Parametern der linksventrikulären Hypertrophie wurden Echokardiographien zum Studieneinschluss (n = 458) und zur Nachuntersuchung nach fünf Jahren (n = 254) durchgeführt. Die Untersuchungen folgten den Empfehlungen der American Society of Echocardiography und wurden von einem einzigen Arzt durchgeführt. Über einen Zeitraum von $5,1 \pm 2,1$ Jahren wurde bei den Teilnehmern das Auftreten des primären Endpunktes (kardiale Dekompensation) erfasst.

Patienten mit unterschiedlichem FGFR4-Genotyp unterschieden sich weder in Querschnittsanalysen in Bezug auf den Left Ventricular Mass Index (LVMI) (Gly/Gly: $91,7 \pm 28,5$ g/m², Gly/Arg: $91,4 \pm 24,4$ g/m², Arg/Arg: $93,9 \pm 28,7$ g/m², $p = 0,861$) noch in Längsschnittanalysen in Bezug auf Veränderungen des LVMI innerhalb der fünfjährigen Nachbeobachtung (Gly/Gly: $+ 0,1 \pm 17,9$ g/m², Gly/Arg: $+ 1,5 \pm 23,1$ g/m², Arg/Arg: $- 7,7 \pm 24,1$ g/m², $p = 0,181$). Patienten mit unterschiedlichem Klotho-Genotyp unterschieden sich ebenso nicht signifikant bezüglich der LVMI (Phe/Phe: $91,1 \pm 25,4$ g/m², Phe/Val: $92,8 \pm 28,2$ g/m², Val/Val: $100,9 \pm 48,0$ g/m², $p = 0,379$) und bezüglich Änderungen des LVMI (Phe/Phe: $- 0,2 \pm 19,5$ g/m², Phe/Val: $+ 0,2 \pm 25,3$ g/m², Val/Val: $- 0,1 \pm 21,0$ g/m², $p = 0,995$). Innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums erlitten 119 Patienten eine kardiale Dekompensation. Weder Gly388Arg- noch Phe352Val-Genotypen waren in univariaten Analysen mit Auftreten einer kardialen Dekompensation assoziiert (log rank Test: Gly388Arg: $p = 0,316$; Phe352Val: $p = 0,765$).

Zusammenfassend konnten wir in der CARE FOR HOME-Kohorte zeigen, dass genetische Varianten von FGFR4 und Klotho bei chronisch nierenkranken Patienten weder mit einer linksventrikulären Hypertrophie in Querschnittsanalysen noch mit Veränderungen dieser in Längsschnittanalysen assoziiert ist. Darüber hinaus sind diese Varianten nicht mit dem Auftreten einer kardialen Dekompensation assoziiert. Bevor tierexperimentelle Daten in Form pharmakologischer Interventionen in die klinische Nephrologie übersetzt werden können, sind daher weitere Studien an größeren Patientenkollektiven nötig, um einen kausalen Einfluss von FGFR4 und Klotho auf die Genese der linksventrikulären Hypertrophie bei chronisch nierenkranken Patienten zu untersuchen.

2. Summary

Impact of SNPs within FGFR4 and Klotho genes on left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease patients

High circulating levels of fibroblast growth factor 23 (FGF23) predict future cardiovascular events in patients with chronic kidney disease (CKD) even after adjustment for glomerular filtration rate (GFR). Recent rodent studies suggest that high plasma levels of FGF23 may directly induce left ventricular hypertrophy (LVH) by activating FGF-receptor 4 (FGFR4) independently from its co-receptor Klotho. Opposing studies however reported a deficiency of soluble Klotho, rather than high circulating levels of FGF23, to aggravate LVH.

To prove the clinical relevance of these opposed pathophysiological pathways, we examined whether SNPs within the FGFR4 and Klotho genes affect the risk of prevalent LVH and of alteration of LVH within a 5-year-follow-up. Moreover, we investigated if these SNPs have an impact on the risk of incident cardiac decompensations.

The CARE FOR HOME study recruited 544 chronic kidney disease G2 - G4 patients, of whom 519 patients consented to DNA isolation and genotyping using qualitative real-time PCR (Gly388Arg for FGFR4 and Phe352Val for klotho).

To determine LVH, echocardiography was conducted at baseline (n = 458) and after 5-year-follow-up (n = 254) by one single physician following American Society of Echocardiography guidelines. All patients were followed for the occurrence of the primary endpoint cardiac decompensation for 5.1 ± 2.1 years.

Carriers of the different alleles of Gly388Arg did neither differ significantly in their left ventricular mass index (LVMI) (Gly/Gly: 91.7 ± 28.5 g/m², Gly/Arg: 91.4 ± 24.4 g/m², Arg/Arg: 93.9 ± 28.7 g/m², p = 0.861) nor did they in alteration of their LVMI within a 5-year-follow-up (Gly/Gly: $+ 0,1 \pm 17,9$ g/m², Gly/Arg: $+ 1,5 \pm 23,1$ g/m², Arg/Arg: $- 7,7 \pm 24,1$ g/m², p = 0,181). Similarly, carriers of the different Phe352Val alleles did not differ significantly in their LVMI (Phe/Phe: $91,1 \pm 25,4$ g/m², Phe/Val: $92,8 \pm 28,2$ g/m², Val/Val: $100,9 \pm 48,0$ g/m², p = 0,379) and in the alteration of their LVMI within five years (Phe/Phe: $- 0,2 \pm 19,5$ g/m², Phe/Val: $+ 0,2 \pm 25,3$ g/m², Val/Val: $- 0,1 \pm 21,0$ g/m², p = 0,995).

During follow-up, cardiac decompensation occurred in 119 patients. Neither Gly388Arg nor Phe352Val genotypes were significantly associated with risk of cardiac decompensation in univariate analysis (log rank test: Gly388Arg: $p = 0.316$; Phe352Val: $p = 0,765$).

In summary, we could show in the CARE FOR HOME cohort that in CKD patients, genetic variants of FGFR4 and Klotho are associated neither with prevalent LVH in cross-sectional analyses nor with alterations of LVH in longitudinal analyses. Moreover, these genetic variants are not associated with risk of incident cardiac decompensation. We suggest to analyze the causal impact of FGFR4 and klotho on LVH in larger CKD cohorts before transferring preclinical data into pharmacological interventions for clinical nephrology.

3. Einleitung

3.1. Epidemiologische Bedeutung der chronischen Nierenerkrankung

Eine chronische Nierenerkrankung (CKD, Chronic Kidney Disease) ist gemäß der Festlegung der KDIGO-Leitlinien (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) [76] als eine über mindestens drei Monate bestehende strukturelle oder funktionelle Beeinträchtigung der Niere definiert. Dabei wird sie anhand der Ursache der Beeinträchtigung, der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der Albuminurie klassifiziert.

Tabelle 1. Kategorien der glomerulären Filtrationsrate (GFR) bei chronischer Nierenerkrankung nach KDIGO

KDIGO GFR-Kategorie	GFR (ml/min/1,73 m²)	Beschreibung
G1	≥ 90	Normale oder erhöhte GFR
G2	60 - 89	GFR leicht erniedrigt
G3a	45 - 59	GFR leicht bis moderat erniedrigt
G3b	30 - 44	GFR moderat bis stark erniedrigt
G4	15 - 29	GFR stark erniedrigt
G5	< 15	Nierenversagen

Tabelle 2. Kategorien der Albuminurie bei chronischer Nierenerkrankung nach KDIGO

KDIGO Albuminurie-Kategorie	Albuminurie (mg/g Kreatinin)	Beschreibung
A1	< 30	Normale bis leicht erhöhte Albuminurie
A2	30 - 300	Moderat erhöhte Albuminurie
A3	> 300	Stark erhöhte Albuminurie

Die chronische Nierenerkrankung weist in westlichen Industrieländern, bedingt durch eine sich wandelnde Altersstruktur und ansteigende Komorbiditäten, eine seit Jahren steigende Prävalenz auf und entwickelt sich daher zu einer zunehmenden medizinischen und auch ökonomischen Herausforderung [33,90]. So zeigte sich in den Erhebungen der National Health and Nutrition Examination Surveys (NHANES) in den Vereinigten Staaten die Prävalenz des Vorliegens einer CKD in den GFR-Kategorien 3 bis 4 von 4,8 % im Zeitraum von 1988 bis 1994 auf einen Wert von 6,9 % im Zeitraum von 2011 bis 2012 [109]. Für die deutsche Bevölkerung schätzt eine Datenanalyse der bundesweiten DEGS1-Erhebung (Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland) des Robert-Koch-Instituts, dass 12,7 % der deutschen Bevölkerung im Alter zwischen 18 und 79 Jahren entweder eine eingeschränkte GFR oder eine Albuminurie aufweisen [47].

3.2. Kardiovaskuläre Komplikationen der chronischen Nierenerkrankung

In der klinischen Betreuung chronisch nierenkranker Patienten stellt die Verhinderung einer Progression der CKD bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz (ESRD; End-Stage Renal Disease) und der damit einhergehenden Dialysepflichtigkeit klassischerweise die zentrale Säule der Therapie dar.

Dass jedoch für chronisch nierenkranke Menschen nicht alleine die Progression der CKD von essentieller prognostischer Bedeutung ist, zeigen rezente epidemiologische Beobachtungen. So konnten Go und Mitarb. in der prospektiven Kaiser Permanente Renal Registry Studie mit 1 120 295 US-Amerikanern aus der Allgemeinbevölkerung zeigen, dass eine Assoziation zwischen einer niedrigen geschätzten glomerulären Filtrationsrate (eGFR) bei Studienbeginn und einem erhöhten Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse, Krankenhausaufnahmen und Todesfälle besteht [48].

Dieses gesteigerte kardiovaskuläre Risiko bei chronisch nierenkranken Patienten spiegelt sich in einem substantiell höheren Risiko wider, im Verlauf der Nierenerkrankung an einem kardiovaskulären Ereignis zu sterben, als dialysepflichtig zu werden [25].

In der Vergangenheit wurde diese kardiovaskuläre Komorbidität chronisch nierenkranker Menschen vor allem auf das vorzeitige Auftreten atherosklerotischer Erkrankungen zurückgeführt [92]. So weist der Datenreport des US Renal Data Systems (USRDS) aus dem Jahr 2008 mit fortschreitender Nierenerkrankung eine ansteigende Inzidenz und Mortalitätsrate akuter Myokardinfarkte auf [22]. Ebenso konnte eine erhöhte Inzidenz zerebraler Insulte [88]

und peripher-arterieller Verschlusskrankheiten [114,115] bei nierenkranken Menschen beobachtet werden.

In den letzten Jahren wurde jedoch erkannt, dass für die hohe Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei chronisch nierenkranken Menschen insbesondere myokardiale Erkrankungen verantwortlich erscheinen [131]. So tritt bereits in frühen Stadien der chronischen Nierenerkrankung eine linksventrikuläre Hypertrophie auf [119], welche langfristig die Gefahr einerseits von malignen Arrhythmien [19], andererseits einer Herzinsuffizienz birgt [31]. Übereinstimmend damit wurde in der populationsbasierten ARIC-Kohorte (Atherosclerosis Risk in Communities) für US-Amerikaner mittleren Alters gezeigt, dass das Risiko eines inzidenten Vorhofflimmerns für Patienten mit eingeschränkter eGFR < 60 ml/min/1,73 m² im Vergleich zu Patienten mit erhaltener GFR ≥ 90 ml/min/1,73 m² um den Faktor 1,6 erhöht [3] und das Risiko einer inzidenten Herzinsuffizienz für diese Patienten nahezu verdoppelt ist [78].

Patienten mit fortgeschrittener chronischer Nierenerkrankung weisen regelmäßig linksventrikuläre Erkrankungen auf. In einer Kohorte von 433 inzidenten Dialysepatienten wiesen 74 % der Teilnehmer zu Beginn der Dialyse eine linksventrikuläre Hypertrophie und 15 % bereits eine systolische Dysfunktion auf [41]. In einer weiteren Kohorte von 137 inzidenten Dialysepatienten war während einer 41-monatigen Nachbeobachtung die Änderung des Left Ventricular Mass Index (LVMI) innerhalb eines Jahres mit der späteren Entwicklung einer Herzinsuffizienz assoziiert [42]. In einer dritten Kohorte von 432 inzidenten Dialysepatienten wiesen 16% der Teilnehmer eine systolische Dysfunktion und 41% eine linksventrikuläre Hypertrophie auf; diese betroffenen Patienten hatten ein wesentlich höheres Mortalitätsrisiko als herzgesunde Probanden [120].

Im Einklang damit konnten Zoccali und Mitarb. bei prävalenten Dialysepatienten zeigen, dass echokardiographische Parameter der linksventrikulären Funktion unabhängig von traditionellen Risikofaktoren das Eintreten kardiovaskulärer Ereignisse voraussagen [180]. Umgekehrt konnten London und Mitarb. nachweisen, dass ein Rückgang der linksventrikulären Hypertrophie bei prävalenten Dialysepatienten die Gesamtmortalität substantiell reduziert [95].

3.3. Kardiovaskuläre Risikofaktoren bei chronisch nierenkranken Menschen

Bei chronisch nierenkranken Patienten liegt eine erhöhte Prävalenz klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren vor [121], zumal eine CKD häufig ursächlich auf eine

arterielle Hypertonie und einen Diabetes Mellitus zurückgeführt werden kann [45]. Intuitiv vermutet man daher, dass die hohe kardiovaskuläre Mortalität im Wesentlichen durch klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren begründet ist. Longenecker und Mitarb. [96] konnten in der CHOICE-Studie bei inzidenten Dialysepatienten jedoch zeigen, dass traditionelle Risikofaktoren das hohe Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen nicht alleine erklären können.

Im Einklang damit bewirkt eine Reduktion einzelner klassischer kardiovaskulärer Risikofaktoren nur eine eingeschränkte Verbesserung der Prognose. So konnte bei terminal niereninsuffizienten Patienten für die medikamentöse Senkung des LDL-Cholesterins mit Statinen keine substantielle Prognoseverbesserung erreicht werden [37,165], wohingegen bei nierengesunden Patienten diese Therapie zu einer erheblichen kardiovaskulären Prognoseverbesserung führt [23].

Zwei zentrale nicht-klassische Risikofaktoren bei nierenkranken Menschen sind die verminderte glomeruläre Filtrationsrate und die Albuminurie, welche bei Diabetikern und Nicht-Diabetikern [44] und gleichermaßen bei Patienten mit und ohne arterielle Hypertonie [98] zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse vorauszusagen vermögen.

In der Kaiser Permanente Renal Registry Studie [48] konnte darüber hinaus eine von klassischen Risikofaktoren unabhängige Assoziation der eGFR mit der kardiovaskulären Mortalität beobachtet werden. Matsushita und Mitarb. [102] konnten außerdem in einer Metaanalyse zeigen, dass die Hinzunahme der GFR und der Albuminurie die Prädiktion kardiovaskulärer Ereignisse in der Allgemeinbevölkerung signifikant gegenüber alleiniger Betrachtung klassischer Risikofaktoren verbessert.

Über die GFR und die Albuminurie hinaus sind weitere nicht-klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren seit einiger Zeit Fokus intensiver Untersuchung zur kardiovaskulären Ereignisrate bei chronisch nierenkranken Menschen (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3. Klassische und Nicht-klassische Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen bei Chronischer Nierenerkrankung nach Sarnak und Mitarb. [132]

Klassische Risikofaktoren	Nicht-klassische Risikofaktoren
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Höheres Alter ▪ Männliches Geschlecht ▪ Arterielle Hypertonie ▪ Erhöhtes LDL-Cholesterin ▪ Diabetes Mellitus 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Dysregulierter Calcium-Phosphat-Metabolismus ▪ Oxidativer Stress ▪ Chronische Inflammation ▪ Malnutrition

-
-
- | | |
|---------------------------|------------------------|
| ▪ Rauchen | ▪ Erhöhtes Homocystein |
| ▪ Körperliche Inaktivität | ▪ Anämie |
-
-

Als wichtiger nicht-klassischer Risikofaktor wird dabei insbesondere der dysregulierte Mineral- und Knochenstoffwechsel chronisch nierenkranker Menschen („Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder“; CKD-MBD) betrachtet. Die CKD-MBD steht seit mehreren Jahrzehnten im Fokus der klinischen Nephrologie, da hier, anders als etwa für oxidativen Stress oder chronische Inflammation, etablierte therapeutische Interventionen zur Verfügung stehen. Die klinischen Kriterien der CKD-MBD sind in Tabelle 4 aufgezeigt.

Tabelle 4. Kriterien der Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder [75]

-
- Störung des Calcium-, Phosphat-, Parathormon- oder Vitamin D-Stoffwechsels
 - Störung in Knochenumsatz, -mineralisierung, -volumenwachstum oder -stärke
 - Extraskelletale Kalzifikation
-
-

Im traditionellen Verständnis ist die CKD-MBD klinisch geprägt durch das Auftreten einer Hypovitaminose D, einer Hyperphosphatämie und eines sekundären Hyperparathyreoidismus [91]. Das Vorliegen dieser einzelnen Störungen ist dabei unabhängig mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert [79,152,161,168].

Im klinischen Alltag stehen daher die Identifikation und die Behandlung dieser Störungen im Vordergrund, obgleich mehrere randomisiert-kontrollierte Studien keine Evidenz für eine kardiovaskuläre Risikoreduktion durch eine medikamentöse Intervention liefern konnten. So wurden weder in der PRIMO- [153] noch in der OPERA-Studie [162] positive Effekte einer Gabe von aktiven Vitamin-D-Analoga auf linksventrikuläre Masse und Funktion beobachtet. Die Ergebnisse der EVOLVE-Studie zeigten weiterhin, dass das Calcimimetikum Cinacalcet keine signifikante kardiovaskuläre Risikoreduktion bei Patienten mit Hyperparathyreoidismus bewirkt [20].

Ebenso konnte für Phosphatbinder zwar eine Senkung der Phosphatspiegel nachgewiesen werden, allerdings fehlen prospektive Studien, die eine Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen durch Phosphatbinder aufzeigen. Einzelne Studien weisen insbesondere bei Verwendung calciumhaltiger Phosphatbinder sogar auf eine mögliche Progression von Gefäßverkalkungen hin, was die Sicherheit und Effizienz dieser Medikamente in Frage stellt [12].

3.4. Physiologische Aspekte von FGF23

Die Entdeckungen des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 23 (Fibroblast Growth Factor 23, FGF23) sowie seines Korezeptors Klotho haben dabei das Verständnis der Mineral- und Knochenstoffwechselstörungen bei chronisch nierenkranken Patienten bedeutend verbessert [127]. Fibroblasten-Wachstumsfaktoren spielen wichtige Rollen in verschiedenen biologischen Prozessen wie der Angio- und Mitogenese, der Zelldifferenzierung und -migration und Gewebsreparaturmechanismen [68].

FGF23 wurde erstmals im Jahr 2000 von Yamashita und Mitarb. [175] im murinen ventrolateralen Thalamuskern als Teil dieser Familie beschrieben. Das Gen für FGF23 ist auf Chromosom 12 lokalisiert [68], und codiert für das FGF23-Protein, welches aus 251 Aminosäuren zusammengesetzt ist, bestehend aus einer 24 Aminosäuren langen N-terminalen Signalsequenz, einer „FGF-like-Sequenz“ und der FGF23-spezifischen C-terminalen Region [176].

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren lassen sich nach ihren jeweiligen Aktionsmechanismen in eine intrazelluläre, eine parakrine und eine „hormone-like“ Subgruppe einteilen [68], FGF23 gehört dabei zusammen mit FGF19 und FGF21 der „hormone-like“ Subgruppe an [49]. FGF23 wird maßgeblich in Osteozyten und Osteoblasten in Knochen exprimiert [155], allerdings auch in deutlich niedrigeren Mengen in Zellen in Thymus, Gehirn, Skelettmuskel, Milz, Haut, Lunge, Hoden, Niere und Leber [93].

Tierexperimentell bewirkt eine Injektion von rekombinantem FGF23 oder die Implantation von FGF23-produzierenden Tumorzellen eine verstärkte renale Phosphatausscheidung mit konsekutiver Hypophosphatämie [141]. Als Ursache dafür konnte nach einer einmaligen Injektion von FGF23 eine verminderte Expressionsrate des Natrium-Phosphat-Cotransporters Iia im renalen proximalen Tubulus, die eine gesteigerte fraktionelle Phosphatexkretion bedingt, beobachtet werden [142].

Als weiterer Effekt von FGF23 konnte eine verminderte intestinale Phosphataufnahme gezeigt werden, welche indirekt aus der Hemmung der 1-alpha-Hydroxylase-Expression und Steigerung der 24-Hydroxylase-Aktivität mit signifikanter Reduktion von $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin D3 im Plasma resultiert [82].

Dies erklärt, warum die klinische Relevanz von FGF23 erstmals bei der autosomal-dominanten hypophosphatämischen Rachitis erkannt wurde, bei der es zu erhöhten Spiegeln von intaktem FGF23 und zu einer erhöhten renalen Phosphatexkretion kommt, welche zu einer Osteopenie prädisponieren [1].

Die biologischen Wirkungen von FGF23 werden durch Bindung an FGF-Rezeptoren (FGFR) vermittelt, von denen bisher vier (FGFR1 - 4) identifiziert werden konnten. Diese sind allesamt transmembrane Rezeptor-Tyrosinkinasen, deren extrazelluläre Ligandenbindungsstelle aus zwei bis drei Ig (Immunglobulin)-like Domänen und einer Bindungsstelle für Heparin gebildet wird [178].

3.5. Physiologische Aspekte von Klotho und sKlotho

Für die FGF23-vermittelte Rezeptoraktivierung ist in den klassischen Zielorganen - insbesondere in renalen Tubuluszellen - die Existenz des Transmembranproteins Klotho als Korezeptor von entscheidender Bedeutung. Das Klotho-Gen wurde erstmals von Kuro-O und Mitarb. [81] beschrieben, die eine verminderte Expression von Klotho mit vorzeitigem Altern sowie mit Atherosklerose, Hautatrophie und Osteoporose in Verbindung setzten. Umgekehrt konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Klotho in Mäusen lebensverlängernd wirkt [83].

Erst nachfolgend konnten Kurosui und Mitarb. [84] Klotho als FGF-Korezeptor identifizieren, indem sie aufzeigten, dass der FGFR-Klotho-Komplex FGF23 mit wesentlich höherer Affinität als FGFR alleine bindet. *In vivo* konnte im Einklang damit gezeigt werden, dass bei FGF23-Klotho-Doppel-Knock-Out-Mäusen eine Injektion von bioaktivem FGF23 keinen Effekt auf das Serum-Phosphat hatte; hingegen resultierte bei FGF23-Single-Knock-Out-Mäusen, welche Klotho regulär exprimierten, eine Injektion in der erwarteten Phosphatsenkung [110]. Obwohl *in vitro* gezeigt wurde, dass FGF23 an verschiedene FGF-Rezeptoren binden kann (FGFR1c, FGFR3c und FGFR4), konnte nachgewiesen werden, dass für die renalen Effekte vor allem der Komplex aus FGFR1c und Klotho relevant ist [94,160].

Neben der Transmembranform existiert zusätzlich lösliches Klotho (sKlotho, soluble Klotho), welches durch alternatives Splicen des Klotho-Gens an Exon 3 entsteht [101]. sKlotho übt eine eigenständige endokrine Aktivität aus, welche zur physiologischen Kalium-, Calcium- und Phosphatregulation beiträgt. So vermindert sKlotho in den renalen Tubuluszellen die Kalium- [17] und Calcium-Resorption [18] und erhöht die renale Phosphatexkretion [62].

3.6. Bedeutung von FGF23 und Klotho bei chronischer Nierenerkrankung

Bereits in sehr frühen Stadien einer chronischen Nierenerkrankung und somit vor Auftreten einer Phosphatüberladung wird ein Anstieg von FGF23 beobachtet [66], dessen

pathophysiologische Ursache noch ungeklärt ist. Es wird postuliert, dass ein solcher früher FGF23-Anstieg eine Akkumulation von Phosphat zumindest bei Patienten mit milder und moderater CKD verhindern soll [71]. Bei weiterer Progression der CKD tritt dann ein sukzessiver Anstieg von FGF23 auf, welcher bei Dialysepatienten in bis zu 100-fach erhöhten Plasmaspiegeln mündet [86].

Trotz seiner vermeintlich protektiven Wirkung durch Verhinderung einer Hyperphosphatämie zumindest bei milder oder moderater CKD konnte in den letzten Jahren erkannt werden, dass FGF23 einen eigenständigen renalen und kardiovaskulären Risikofaktor darstellt:

So wurde erstmals in der prospektiven MMKD-Studie (Mild to Moderate Kidney Disease Studie) 2007 [39] nachgewiesen, dass FGF23 bei 227 Patienten mit nicht dialysepflichtiger CKD ein unabhängiger Prädiktor der renalen Progression ist. Bei Dialysepatienten konnten Gutierrez und Mitarb. [54] in einer Fall-Kontroll-Studie bei 400 Patienten der ArMORR-Studie (Accelerated Mortality on Renal Replacement Studie) einen direkten Zusammenhang zwischen FGF23-Spiegeln und der Mortalität aufzeigen, welcher unabhängig vom Plasma-Phosphat war. Diese Beobachtung konnte in der wesentlich größeren CRIC-Kohorte bei 3879 Patienten mit nicht dialysepflichtiger CKD bestätigt werden [67].

Dabei konnten Kohortenstudien zeigen, dass diese erhöhte Mortalität aus einer erhöhten kardiovaskulären Ereignisrate resultiert. Erstmals zeigte eine kleinere Untersuchung unserer Arbeitsgruppe [136] an 149 nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten, dass FGF23-Plasmaspiegel das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse vorhersagen. Diese Erkenntnis konnte in der wesentlich größeren HOST-Studie (Homocysteine in Kidney and End Stage Renal Disease Studie) mit 1099 CKD-Patienten von Kendrick und Mitarb. [74] und erneut in der CRIC-Studie mit 3860 nicht-dialysepflichtigen CKD-Patienten bestätigt werden [135].

Auch in der nierengesunden Allgemeinbevölkerung konnte erhöhtes FGF23 als Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse bestätigt werden [13].

Bei detaillierter Betrachtung der kardiovaskulären Ereignisse in großen Kohortenstudien fällt auf, dass FGF23 weniger stark atherosklerotische Ereignisse als kardiale Dekompensationen vorhersagt. So zeigte sich in unserer CARE FOR HOME-Kohorte mit 444 nicht dialysepflichtigen CKD-Patienten eine signifikante Assoziation von FGF23 mit kardialen Dekompensationen in multivariaten Regressionsmodellen, während die Assoziation mit atherosklerotischen Ereignissen nach Korrektur für klassische und nicht-klassische Risikomarker nicht bestehen blieb [138]. Diese Ergebnisse konnten in der größeren CRIC-Kohorte bestätigt werden, in der in verschiedenen multivariaten Regressionsmodellen hohe

FGF23-Spiegel unabhängig mit kardialen Dekompensationen assoziiert waren, wohingegen keine konsistente unabhängige Assoziation mit atherosklerotischen Ereignissen bestand [135]. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Querschnittsanalysen, die erhöhtes Plasma-FGF23 mit linksventrikulärer Hypertrophie und linksventrikulärer Insuffizienz assoziierten. So zeigten erstmals Gutierrez und Mitarb. [55] in einem Kollektiv von 210 Probanden, dass erhöhte FGF23-Spiegel unabhängig mit einem höheren LVMI assoziiert waren. 162 dieser Probanden hatten eine vorbestehende chronische Nierenerkrankung; diese Patienten hatten eine stärkere Assoziation zwischen FGF23 und LVMI als nierengesunde Probanden. In der PIVUS-Kohorte [105] mit 795 Probanden im Alter von über 70 Jahren konnte die Assoziation zwischen FGF23-Spiegel und LVMI bestätigt werden; dieser Zusammenhang, der auch in multivariaten Analysen persistierte, war erneut deutlicher bei Patienten mit eingeschränkter eGFR < 60 ml/min/1,73 m² als bei nierengesunden Probanden.

In der in Kooperation der Kliniken für Inneren Medizin III und IV des Universitätsklinikums des Saarlandes durchgeführten HOM SWEET HOME-Studie (Heterogeneity of Monocytes in Subjects Who Undergo Elective Coronary Angiography - The Homburg Evaluation study) konnte erstmals eine Assoziation von FGF23 mit der systolischen linksventrikulären Funktion aufgezeigt werden [137]. Patienten mit einer Ejektionsfraktion (EF) < 40 % in der Laevokardiographie hatten auch nach Korrektur für die Nierenfunktion und für weitere Störvariablen signifikant höhere FGF23-Werte als solche mit einer EF > 40 %.

Während im Verlauf der chronischen Nierenerkrankung die Plasmaspiegel von FGF23 ansteigen, vermindert sich die renale Expression von Klotho. Inwieweit dies in einer Verminderung von sKlotho in der peripheren Zirkulation mündet, ist nicht abschließend geklärt, zumal bislang keine zuverlässige, standardisierte Messmethodik für humanes sKlotho zur Verfügung steht, welche in epidemiologischen Untersuchungen eingesetzt werden kann [51].

Im Vergleich zu der starken Assoziation zwischen FGF23 und dem kardiovaskulären Risiko besteht für eine Assoziation zwischen sKlotho und dem kardiovaskulären Risiko nur eine limitierte Evidenz. Seiler und Mitarb. [138] konnten in der untersuchten CARE FOR HOME-Kohorte keine signifikante Assoziation zwischen sKlotho-Spiegeln und dem kardiovaskulären Risiko sehen. Brandenburg und Mitarb. [14] konnten diese negativen Ergebnisse in der größeren LURIC-Kohorte mit nierengesunden Patienten bestätigen.

3.7. Rolle der FGF23/Klotho-Achse bei urämischer Kardiomyopathie

Als möglichen Pathomechanismus, der den starken Zusammenhang zwischen erhöhten FGF23-Spiegeln, linksventrikulärer Hypertrophie und späterer kardialer Dekompensationen erklären kann, postulierten Faul und Mitarb. eine direkte myokardiale Schädigung durch FGF23 [36]. Im Mausmodell konnten sie durch FGF23-Injektion eine signifikant gesteigerte linksventrikuläre Hypertrophie beobachten, eine Blockade der FGFR führte umgekehrt zu einer Regredienz der linksventrikulären Hypertrophie. Allerdings wurde dabei ein Pan-FGFR-Blocker eingesetzt, der alle vier FGFR inhibierte, so dass der verantwortliche Rezeptor zunächst nicht charakterisiert werden konnte. Tierexperimentelle Ergebnisse der gleichen Arbeitsgruppe [50] suggerieren darauf aufbauend, dass FGF23 eine Hypertrophie in Kardiomyozyten direkt über eine Aktivierung von FGFR4 induziert, während eine spezifische Blockade von FGFR4 die Mäuse vor einer kardialen Hypertrophie schützt.

Andere Studien suggerieren hingegen, dass im Kontext der chronischen Nierenerkrankung auch erniedrigte sKlotho-Spiegel zur Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie beitragen. So konnten Xie und Mitarb. 2012 im murinen Modell aufzeigen [172], dass sKlotho das Myokard vor einer stressinduzierten Hypertrophie schützt, indem es TRPC6-Kanal-vermitteltes pathologisches Calcium-Signaling inhibiert. Von besonderer Bedeutung erscheinen nachfolgende Tiermodelle, die suggerieren, dass sKlotho seine kardioprotektiven Effekte auch ohne die Anwesenheit von pathologisch erhöhtem FGF23 ausübt [173], während umgekehrt eine Normalisierung von FGF23 bei Klotho-Mangel keinen Benefit aufweist.

Damit existieren zwei alternative pathophysiologische Erklärungen für kardiale Veränderungen im Kontext des CKD-MBD, welche alternativ einen FGF23-Überschuss oder einen Mangel von sKlotho betonen. Ein besseres Verständnis dieser beiden potentiellen pathophysiologischen Signalkaskaden ist von Bedeutung, da sie auf sehr unterschiedliche therapeutische Optionen weisen. Sollte FGF23 der zentrale kardiotoxische Schädigungsfaktor sein, so stellt die pharmakologische Blockade von FGFR4 einen potentiellen zukünftigen Therapieansatz dar, um die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie bei CKD-Patienten zu reduzieren [50]. Sollte jedoch der sKlotho-Mangel von zentraler Bedeutung sein, könnte die Substitution von Klotho eine wichtige kardioprotektive Behandlungsstrategie darstellen [173].

Die klinische Relevanz dieser beiden alternativen Interventionsmöglichkeiten ist bisher nicht untersucht worden; sie erfordert die Realisierung einer randomisierten kontrollierten Studie, welche einerseits hohe ökonomische Ressourcen verlangt, andererseits bei Wahl einer nicht

protektiven Behandlungsstrategie mit einem schwer abschätzbaren Risiko für die behandelten Studienpatienten einhergeht.

3.8. Mendelsche Randomisierung

Eine gängige Methode, um vor Initiierung interventioneller Studien Assoziationen auf ihre Kausalität sowie Pathomechanismen auf ihre klinische Relevanz zu überprüfen, ist die Mendelsche Randomisierung. Dabei macht man davon Gebrauch, dass eine lebenslange Assoziation zwischen einem Allel und der Aktivität des Genproduktes besteht. Da die während der Meiose zufällig verteilten Allele eines Polymorphismus weitestgehend unabhängig von anderen Risikofaktoren oder Erkrankungen vorliegen, wird zusätzlich ein Confounding durch andere Störgrößen weitgehend ausgeschlossen.

Die erste Mendelsche Randomisierung wurde von Katan und Mitarb. [73] 1986 durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen Cholesterinspiegeln und Krebs zu untersuchen. Seitdem hat sich die Methode allerdings auch im Bereich der kardiovaskulären Medizin zunehmend bewährt [11,70]; so konnte die Kausalität des Lipoprotein(a) in der Genese des Myokardinfarktes durch Mendelsche Randomisierung bestätigt werden [72].

Die Mendelsche Randomisierung benutzt zumeist genetische Varianten, die häufig in der Allgemeinbevölkerung vorkommen. Insbesondere werden Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotid Polymorphism, SNP) untersucht, die als DNA-Basenpaare definiert werden, deren verschiedenen Allelvariationen mehr als 1 % der Allgemeinbevölkerung tragen [15].

3.9. Hypothesen

Vor diesem Hintergrund soll in der vorliegenden Dissertationsschrift die klinische Bedeutung von FGF-Rezeptors 4 und von Klotho bei der Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie bei chronischer Nierenerkrankung näher charakterisiert werden.

Zu diesem Zweck soll in der prospektiven CARE FOR HOME-Studie anhand einer Mendelschen Randomisierung erstmals die Assoziation zwischen genetischen Varianten von FGFR4 und Klotho, der linksventrikulären Muskelmasse als Indikator einer linksventrikulären Hypertrophie und der kardiovaskulären Ereignisrate bei chronisch nierenkranken Patienten überprüft werden.

Wir stellen hierbei folgende alternative Hypothesen auf:

- Da FGF23 zentral zur Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie beiträgt, besteht bei chronisch nierenkranken Patienten eine Assoziation zwischen dem Trägerstatus für den SNP Gly388Arg mit einem höheren LVMI bei Studieneinschluss, sowie mit einer stärkeren Zunahme der LVMI und mit einem erhöhten Risiko für kardiale Dekompensationen bei longitudinaler Nachbeobachtung.
- Da ein Klotho-Mangel zentral zur Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie beiträgt, besteht bei chronisch nierenkranken Patienten eine Assoziation zwischen dem Trägerstatus für den SNP Phe352Val mit einem höheren LVMI bei Studieneinschluss, sowie mit einer stärkeren Zunahme der LVMI und mit einem erhöhten Risiko für kardiale Dekompensationen bei longitudinaler Nachbeobachtung.

4. Material und Methodik

4.1. Population

4.1.1. CARE FOR HOME

In der vorgelegten Dissertationsschrift wurden Vollblutproben von Teilnehmern der prospektiven CARE FOR HOME (Cardiovascular and Renal Outcome in CKD 2-4 Patients - The Fourth Homburg Evaluation) -Studie untersucht, in die über einen Zeitraum von 2008 bis 2014 insgesamt 544 Patienten mit chronischer Nierenerkrankung (CKD) in den GFR-Kategorien G2 - G4 nach KDOQI (Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) eingeschlossen wurden. Ziel der Studie ist es, neue nicht-klassische nicht-traditionelle Prädiktoren für das Auftreten kardiovaskulärer und renaler Ereignisse bei chronisch nierenkranken Patienten zu untersuchen.

Die Patientenrekrutierung erfolgte im Rahmen eigenständiger Dissertationen; nähere Angaben zu den dazu erfolgten Einschlussuntersuchungen sind in den entsprechenden Dissertationsschriften beschrieben worden [40,59,166]. Die jährlichen Nachuntersuchungen erfolgen fortlaufend seit September 2009 ebenfalls im Rahmen eigenständiger Dissertationen. Nähere Angaben zu den dazu erfolgten Untersuchungen sind ebenso eingehend anderweitig beschrieben worden [133].

Das der Studie zugrundeliegende Protokoll wurde von der Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes geprüft und genehmigt; alle Patienten gaben zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses ihr schriftliches Einverständnis. Weiterhin haben alle Patienten, deren Vollblut für Genotypisierungsuntersuchungen in dieser Arbeit verwendet wurde, eine gesonderte schriftliche Einwilligung dazu gegeben.

4.1.2. Studienpopulation

Die Aufklärung über die Genotypisierung und die Asservation von Blutproben erfolgt seit Februar 2010 bei Studieneinschluss. Bei Patienten, die zuvor in CARE FOR HOME eingeschlossen wurden, erfolgte die Aufklärung über die Genotypisierung und die Asservation von Blutproben im Rahmen von jährlichen Nachuntersuchungen. Dementsprechend standen von 320 Patienten (Einschluss ab Februar 2010) Blutproben vom Zeitpunkt des Einschlusses

und von den restlichen 199 Patienten (Einschluss vor Februar 2010) Blutproben bei der erstmöglichen Nachuntersuchung zur Verfügung. Bei einzelnen Patienten, bei denen keine Nachuntersuchung erfolgte, konnte aus diesem Grund keine Genotypisierung erfolgen. Eine einzige Patientin lehnte die Genotypisierung nach Aufklärung ab. Es verblieben somit 519 der 544 Probanden, die bis 2014 in CARE FOR HOME eingeschlossen wurden, bei denen Material für eine DNA-Isolation zur Verfügung stand und ein Einverständnis zur Genotypisierung vorlag.

4.1.3. Einschlusskriterien

Ein Einschluss der Patienten in die CARE FOR HOME-Studie erfolgte bei Vorliegen einer chronischen Nierenerkrankung in den GFR Kategorien G2 - G4 nach KDOQI. Die Abschätzung der glomerulären Filtrationsrate (eGFR) erfolgte mittels der Formel der MDRD-Studie (engl. *Modification of Diet in Renal Disease*), die Serum-Kreatinin sowie Geschlecht, Ethnizität und Alter berücksichtigt.

Bei Patienten mit einer eGFR von 60 - 89 / 61 - 90 ml/min/1,73 m² erfolgte die Definition einer chronischen Nierenerkrankung durch das zusätzliche Vorliegen eines oder mehrerer der folgenden Kriterien:

- Proteinurie > 300 mg/g Kreatinin
- Albuminurie > 17 mg/g Kreatinin bei Männern bzw. > 25 mg/g Kreatinin bei Frauen
- Persistierende glomeruläre Hämaturie
- Erhöhtes Plasma-Cystatin C (> 1,05 mg/l)
- Erhöhtes Plasma-Kreatinin (> 1,2 mg/dl bei Männern, > 0,9 mg/dl bei Frauen)
- Bioptisch gesicherte Nierenerkrankung und / oder Tubulopathie

4.1.4. Ausschlusskriterien

Folgende Ausschlusskriterien wurden zu Studienbeginn festgelegt:

- Vorliegen einer chronischen Nierenerkrankung in der Kategorie G 1 (eGFR \geq 90 ml/min/1,73 m²) Kategorie G 5 (eGFR < 15 ml/min/1,73 m²) nach KDOQI
- Einnahme systemisch-immunsuppressiver Medikation
- Vorliegen einer HIV-Infektion, eines klinisch apparenten fieberhaften und / oder antibiotikapflichtigen Infektes oder einer asymptomatischen Erhöhung des CRP
- Vorliegen einer aktiven hämatologisch-onkologischen Erkrankung

- Vorliegen eines akuten Nierenversagens (Kreatininanstieg > 50% innerhalb von 4 Wochen vor Studieneinschluss)

4.1.5. Definition von kardiovaskulären Risikofaktoren und Komorbiditäten

Als Diabetiker wurden Patienten mit einem Nüchtern-Blutzucker von > 126 mg/dl, mit einem ärztlich vordiagnostizierten Diabetes mellitus und / oder mit antidiabetischer Medikation definiert.

Als Raucher wurden Patienten definiert, die in den letzten 28 Tagen mindestens eine Zigarette geraucht hatten.

Als Patienten mit einer positiven Familienanamnese wurden Patienten definiert, deren Verwandte 1. Grades (Eltern oder Geschwister) vor dem Erreichen des 65. Lebensjahres einen Myokardinfarkt oder einen ischämischen Apoplex erlitten.

Als Komorbiditäten wurden definiert:

- Prävalente koronare Erkrankung: stattgehabte koronare Interventionen (PTCA / Stent / Bypassoperation) und / oder stattgehabter Myokardinfarkt
- Prävalente periphere arterielle Erkrankung: stattgehabte peripher-arterielle Revaskularisation (PTA / Stent / Bypassoperation) und / oder stattgehabte nichttraumatische Amputation proximal des Fußgrundgelenkes
- Prävalente zerebrovaskuläre Erkrankung: stattgehabte zerebrovaskuläre Revaskularisation (Carotis-Thrombendarterektomie / -Stent) und / oder stattgehabter Apoplex mit klinischen Symptomen, die mindestens 24 Stunden persistierten
- Prävalente kardiovaskuläre Erkrankung: prävalente koronare, periphere arterielle oder zerebrovaskuläre Erkrankung

4.1.6. Definition der Ereignisse

Als atherosklerotisches kardiovaskuläres Ereignis wurden definiert:

- Eine koronararterielle Intervention (PTCA / Stent / Bypassoperation)
- Ein Myokardinfarkt
- Eine peripher-arterielle Revaskularisation (PTA / Stent / Bypassoperation)
- Eine nichttraumatische Amputation proximal des Fußgrundgelenkes
- Eine zerebrovaskuläre Revaskularisation (Carotis-Thrombendarterektomie / -Stent)
- Ein Apoplex mit klinischen Symptomen, die mindestens 24 Stunden persistierten

Eine kardiale Dekompensation wurde bei Patienten definiert, die mit Symptomen (progressive Dyspnoe) in Verbindung mit klinischen (periphere Ödeme, pulmonales Rasseln) oder radiologischen Zeichen (Kardiomegalie, pulmonales Ödem, Pleuraerguss) einer dekompensierten Herzinsuffizienz stationär aufgenommen wurden.

Alle Angaben der Patienten wurden über die Datenbank des Universitätsklinikums des Saarlandes respektive durch Anfordern von Arztbriefen externer Krankenhäuser validiert.

4.1.7. Studienablauf

Zum Studieneinschluss wurden die Patienten zunächst gebeten, eine Spontanurinprobe abzugeben, aus welcher eine Bestimmung von Albumin, Phosphor, Calcium, Eiweiß und Kreatinin erfolgte. Aus der Urinprobe wurden darüber hinaus 9 ml für eventuell später zu bestimmende Parameter in Mikroreaktionsgefäße abgefüllt und bei -80 °C tiefgefroren.

Nach fünfminütigem Sitzen wurde unter standardisierten Bedingungen eine Blutentnahme durchgeführt, um einerseits Routineparameter zu bestimmen und andererseits Proben für die spätere Bestimmung etwaiger weiterer Parameter zu asservieren.

Für die Bestimmung der Routineparameter (Vitamin D, Albumin, Phosphat, Kalzium, Cholesterin, CRP, Cystatin C, Kreatinin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyzeride) wurde 2,7 ml Blut in EDTA-versetzte Entnahmeröhrchen und je 4,7 ml Blut in EDTA-versetzte Entnahmeröhrchen und Serum-Entnahmeröhrchen entnommen. Alle Routineparameter wurden nach standardisierter Methodik im Zentrallabor des Universitätsklinikums des Saarlandes untersucht.

Zur Asservierung der Proben wurden 20,7 ml Blut in ein 9 ml Serum-, ein 9 ml und ein 2,7 ml EDTA-Entnahmeröhrchen entnommen. Nach 10-minütiger Wartezeit wurden die 9 ml Entnahmeröhrchen für 10 Min. bei 4000 rpm zentrifugiert, das gewonnene Serum oder Plasma entnommen und in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße abpipettiert und bei -80 °C bis zur späteren Bestimmung von cFGF23 (ELISA; Immunotopics International, San Clemente, CA, USA), iFGF23 (ELISA; Immunotopics International, San Clemente, CA, USA) und Klotho (ELISA; Immuno-Biologic Laboratories, Fujiokashi, Gunma, Japan) tiefgefroren. Weiterhin wurde aus dem 2,7 ml EDTA-Entnahmeröhrchen insgesamt 1,2 ml Vollblut entnommen, welches ebenfalls in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße gefüllt wurde, die dann auch auf -80 °C tiefgefroren wurden.

Anschließend wurde ein 12-Kanal-Ruhe-Elektrokardiogramm geschrieben, das Körpergewicht erfasst und mit einem geeichten Maßband der Taillenumfang, gemessen auf Höhe des

Trochanter major, sowie der Hüftumfang, expiratorisch am Mittelpunkt einer Verbindungslinie von Crista iliaca und Unterrand der 12. Rippe, gemessen. Darüber hinaus wurde der Body-Mass-Index (BMI) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{BMI} = \text{Körpergewicht [kg]} / (\text{Körpergröße [m]})^2$$

Daraufhin folgte an beiden Armen jeweils eine einmalige Blutdruckmessung nach 10-minütigem ruhigen Sitzen und nach Verlassen des Raumes durch den Untersucher am Arm mit dem höheren Blutdruckwert eine automatische Blutdruckintervallmessung in einminütigen Abständen über insgesamt fünf Minuten.

Weiterhin erfolgt eine standardisierte transthorakale Echokardiographie von einem einzigen Untersucher, auf die später näher eingegangen wird. Die Patienten wurden im Anschluss mittels standardisierter Fragebogen in Hinblick auf kardiovaskuläre Risikofaktoren, Komorbiditäten und aktuelle Medikation befragt.

In den ersten fünf Jahren nach Einschluss fanden jährlich Nachuntersuchungen statt; dazu wurde abermals eine Spontanurinprobe abgegeben, um o.g. Parameter zu bestimmen und Proben zu asservieren. Ebenso erfolgte nach selbem Procedere wie bei Einschluss eine Blutentnahme.

Zur Nachuntersuchung fünf Jahre nach Einschluss erfolgte zusätzlich eine standardisierte Echokardiographie von einem einzigen Untersucher.

Nach Abschluss dieser fünfjährigen Nachbeobachtung sind alle zwei Jahre Telefoninterviews vorgesehen, um etwaige kardiovaskuläre und renale Ereignisse zu erfassen.

4.1.8. Echokardiographische Untersuchungen

Die echokardiographischen Daten wurden im Rahmen der CARE FOR HOME-Studie zum Studieneinschluss und zum Zeitpunkt von fünf Jahren nach Studieneinschluss erhoben. Dabei wurden unter Beachtung der Leitlinien der American Society of Echocardiography die Untersuchung von einem einzigen Arzt mit dem Ultraschallgerät ACUSON Sequoia (Siemens, München, Deutschland) durchgeführt. Insgesamt erhielten 471 Patienten zum Studieneinschluss eine echokardiographische Untersuchung, 228 Patienten zum Zeitpunkt fünf Jahre nach Einschluss.

Die linksventrikuläre Masse wurde dabei basierend auf der Modellierung des linken Ventrikels als verlängertes Rotationsellipsoid mithilfe der von der American Society of Echocardiography empfohlenen Formel [85] abgeschätzt:

$$\mathbf{LVM [g] = 0,8 * (1,04 * [(LVEDD + IVST + PWT)^3 - LVEDD^3]) + 0,6}$$

LVM = Linksventrikuläre Masse

LVEDD = Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter

IVST = Interventricular Septal Wall Thickness, linksventrikuläre Wanddicke im Bereich des Septums

PWT = Posterior Wall Thickness, linksventrikuläre Wanddicke im Bereich der Hinterwand

Um nun den Left Ventricular Mass Index zu erhalten, wurde die Linksventrikuläre Masse auf die Körperoberfläche, welche nach Mosteller und Mitarb. [108] bestimmt wurde, normalisiert:

$$\mathbf{LVMI [g/m^2] = LVM [g] / \text{Körperoberfläche [m}^2\text{]}}$$

Eine linksventrikuläre Hypertrophie lag vor, wenn der LVMI > 115 g/m² bei Männern respektive > 95 g/m² bei Frauen betrug.

Das linksatriale Volumen wurde mithilfe der von der American Society of Echocardiography empfohlenen Formel [85] abgeschätzt:

$$\mathbf{LAV [ml] = 8/3 * \pi * [A1 * A2 / L]}$$

A1 = Vorhof im apikalen Vierkammerblick

A2 = Vorhof im apikalen Zweikammerblick

L = Strecke zwischen der Hinterwand des linken Vorhofs zur Linie über die Ansatzpunkte der Mitralklappe [dabei wird *L* sowohl im apikalen Vier- als auch Zweikammerblick gemessen, das jeweils kürzere *L* geht in die Formel ein]

Zur Berechnung des Left Atrial Volume Index (LAVI) erfolgte nun eine Normalisierung auf die Körperfläche:

$$\text{LAVI [ml/m}^2\text{]} = \text{LAV [ml]} / \text{Körperoberfläche [m}^2\text{]}$$

Um die diastolische linksventrikuläre Funktion zu berechnen, wurde das Verhältnis von früher diastolischer Mitralanstromgeschwindigkeit (E, gemessen mit Pulswellen-Doppler-Ultraschall) zur frühen diastolischen Mitralseptum-Ringgeschwindigkeit (e', gemessen mit Gewebsdoppler-Ultraschall) bestimmt.

Die Bestimmung der linksventrikulären Funktion erfolgte einerseits qualitativ, andererseits mittels Bestimmung der Fractional Shortening (FS). Hierbei wurden die linksventrikuläre systolische Funktion in Zusammenschau von qualitativer Beurteilung und FS als „normal“, „geringgradig eingeschränkt“, „mittelgradig eingeschränkt“ und „hochgradig eingeschränkt“ klassifiziert.

4.2. Material

4.2.1. Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Tischrüttler Vortex Mixer VM-300	neoLab Migge, Heidelberg, Deutschland
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
HTMR 131 Heizblock	Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
MX3005P qPCR System	Stratagene, Waldbronn, Deutschland
Picofuge II Microcentrifuge	Stratagene, Waldbronn, Deutschland
Pipette 1 - 10 µl Pipetman	Gilson, Limburg, Deutschland
Pipette 2 - 20 µl Labmate	ABIMED, Langenfeld, Deutschland
Pipette 10 - 100 µl Labmate	ABIMED, Langenfeld, Deutschland
Pipette 20 - 200 µl Labmate	ABIMED, Langenfeld, Deutschland
Pipette 100 - 1000 µl Pipetman	Gilson, Limburg, Deutschland
Qubit Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

4.2.2. Kits und Assays

Kit mit Inhalt	Bezugsquelle
-----------------------	---------------------

QIAamp DNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> - QIAamp Mini Spin Columns (Kieselgel-Filterröhrchen) - Collection Tubes (2 ml) - QIAGEN Protease - Protease Solvent - Buffer AL - Buffer AW1 - Buffer AW2 - Buffer AE 	
Qubit® dsDNA BR Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> - Qubit® dsDNA BR Buffer (50 ml) - Qubit® dsDNA BR Reagent (250 µl) - Qubit® dsDNA BR Standard #1 (1 ml, 0 ng/µl in TE-Puffer) - Qubit® dsDNA BR Standard #2 (1 ml, 100 ng/µl in TE-Puffer) 	
TaqMan® SNP Genotyping Assay Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
SensiFAST Genotyping Lo-ROX Mix 1 ml	Bioline, Luckenwalde, Detuschland
Tris-EDTA Buffer Solution 100 ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

4.2.3. Chemikalien und Lösungen

Gerät	Bezugsquelle
Ethanol 99,9%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris-EDTA Buffer Solution 100 ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

4.2.4. Verbrauchsmaterial

Material	Bezugsquelle
Filter-Pipettenspitzen 10 µl Biosphere	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Filter-Pipettenspitzen 20 µl SafeSeal	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filter-Pipettenspitzen 100 µl SafeSeal	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filter- Pipettenspitzen 200 µl Biosphere	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filter- Pipettenspitzen 1250 µl Biosphere	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikroreaktionsgefäß 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MultiPLY® µStrip 0,2 ml 8er-Kette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
MultiPLY® 8er-Deckelkette	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

4.2.5. Software

Software	Bezugsquelle
SPSS Statistics	IBM, Armonk (NY), USA
MxPro QPCR Software Mx3000P, Mx3005P	Stratagene, Waldbronn, Deutschland

4.3. DNA-Isolation

Die in der vorgelegten Arbeit verwendete Methode der DNA-Isolation basiert prinzipiell auf der Bindung der DNA an eine Kieselgelmembran (eng. silica gel membrane).

Durch Zugabe von Protease-Lösung und einem Lysepuffer werden Proteine verdaut und die Lymphozyten lysiert.

Durch Zugabe von 99,9 %-igem Ethanol bindet die nun freigesetzte DNA an die Kieselgelmembran, welche sich an der Unterseite des Mikroreaktionsgefäßes befindet. Anschließend wird durch mehrere Waschschriffe sichergestellt, dass eventuelle Verunreinigungen entfernt werden, bevor die DNA durch die Membran eluiert wird.

Die DNA-Isolation in der vorgelegten Arbeit erfolgte mit dem QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden) aus venösem Vollblut gemäß dem Protokoll des Herstellers [QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook, Third Edition, June 2012, Spin Protocol, S. 26 f.]. Die einzelnen Schritte sind im Folgenden beschrieben:

- *Verdauen von Proteinen und Zelllyse:*

In ein autoklaviertes 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß wurden 20 µl QIAGEN Protease, 200 µl venöses Vollblut, welches vorher durch 15-maliges Auf- und Abpipettieren gut durchmischt wurde, sowie 200 µl QIAGEN Buffer AL (Lysepuffer) gegeben. Die Proben werden im Tischrüttler für 15 Sek. gut durchmischt und anschließend für 10 Min. bei 56 °C im Heizblock inkubiert. Danach wurden die Proben für 5 Sek. anzentrifugiert, um Tropfen vom Deckel des Mikroreaktionsgefäßes zu entfernen.

Zum Ausfällen der DNA wurde zu den Proben 200 µl Ethanol 99,9 % (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben. Die Proben werden dann für 15 Sek. im Tischrüttler gut durchmischt und danach für 5 Sek. anzentrifugiert, um Tropfen vom Deckel des Mikroreaktionsgefäßes zu entfernen.

- *DNA-Bindung an die Kieselgelmembran:*

Die Proben wurden nun in die QIAamp Mini Spin Columns (QIAGEN, Hilden, Deutschland), an deren Boden sich die Kieselgelmembranen befinden, gegeben. Die Spin Columns wurden in 2 ml Sammelröhrchen eingesetzt und für 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugiert, wodurch eine Bindung der DNA an die Kieselgelmembran hergestellt wird. Das Sammelröhrchen mit dem darin enthaltenen Filtrat wurde verworfen und die Spin Columns in neue 2 ml Sammelröhrchen eingesetzt.

- *Erster Waschschrift:*

In die Spin Columns wurden anschließend 500 µl QIAGEN Buffer AW1 (Waschpuffer 1) gegeben und für 1 Min. bei 8000 rpm zentrifugiert, um Verunreinigungen aus der Probe zu entfernen. Das Sammelröhrchen mit dem darin enthaltenen Filtrat wird verworfen und die Spin Columns in neue 2 ml Sammelröhrchen eingesetzt.

- *Zweiter Waschschrift:*

In die Spin Columns wurden anschließend 500 µl QIAGEN Buffer AW2 (Waschpuffer 2) gegeben und für 3 Min. bei 14000 rpm zentrifugiert, um noch bestehende Verunreinigungen aus der Probe zu entfernen. Das Sammelröhrchen mit dem darin enthaltenen Filtrat wurde verworfen und die Spin Columns in neue 2 ml Sammelröhrchen eingesetzt.

- *Entfernen übrigen Waschpuffers:*

Die Spin Columns wurden für 1 Min. bei 14000 rpm zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer aus der Probe zu entfernen. Das Sammelröhrchen mit dem darin enthaltenen Filtrat wurde verworfen.

▪ *Elution der DNA:*

Die Spin Columns wurden in 1,5 ml Mikroreaktionsgefäße gesetzt, in welche die Elution erfolgte. Dazu wurden 100 µl QIAGEN Buffer AE (Elutionspuffer) in die Spin Columns gegeben, welcher anschließend für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubierte. Durch Zentrifugation für 1 Min. bei 8000 rpm erfolgt nun die Elution der DNA in das Mikroreaktionsgefäß.

Dieser Elutionsschritt wurde anschließend wiederholt, um den Ertrag an DNA zu erhöhen. Die Elution erfolgte in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß.

Für die in der vorgelegten Arbeit erfolgten Real-Time Qualitative PCRs wurde die im zweiten Elutionsschritt gewonnene DNA verwendet, die bis zur Versuchsdurchführung bei -80 °C tiefgekühlt wurde.

4.4. Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der eluierten DNA erfolgte mit dem Qubit Fluorometer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) durch die Messung der optischen Dichte.

Zur Vorbereitung der zu messenden Proben wurde das Qubit® dsDNA BR Assay Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Als erstes wurde ein Mastermix vorbereitet, für den Qubit® dsDNA BR Reagent im Verhältnis 1:200 in Qubit® dsDNA BR Buffer verdünnt wurde.

Zunächst wurde das Fluorometer mit Hilfe von Standardlösungen kalibriert. Dazu wurden 190 µl des Mastermixes in zwei Fluorometer-Tubes gegeben, und je 10 µl der beiden im Kit enthaltenen Standardlösungen mit den bekannten Konzentrationen von 0 ng/µl (Qubit® dsDNA BR Standard #1) und 100 ng/µl (Qubit® dsDNA BR Standard #2). Die Proben wurden nun sanft für 3 Sek. im Tischrüttler durchmischt; dabei wurde beachtet, dass sich keine sichtbaren Luftblasen bilden, die das Fluoreszenzsignal stören könnten. Durch Messung der beiden Proben wurde das Fluorometer kalibriert.

Anschließend wurde die Konzentration der eigentlichen DNA-Proben bestimmt. Dazu wurden jeweils 195 µl des Mastermixes und 5 µl der DNA in ein Fluorometer-Tube gegeben und sanft

für 3 Sek. im Tischrüttler durchmischt, ohne dass sich Luftblasen bilden. Nach dreiminütiger Inkubation der Proben bei Raumtemperatur wurde die Konzentration im Fluorometer unter Korrektur der Verdünnung der DNA-Proben bestimmt.

4.5. Real-Time Qualitative PCR

4.5.1. Prinzip der Real-Time Qualitative PCR

Die Real-Time PCR ist ein molekularbiologisches Verfahren, das, basierend auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR), Nukleinsäuren vervielfältigen kann. Darüber hinaus ermöglicht sie, simultan das gewonnene PCR-Produkt quantitativ oder qualitativ nachzuweisen; letzteres war das Ziel der Real-Time PCR in der vorliegenden Arbeit.

Die Vervielfältigung der Nukleinsäuren erfolgt dabei in mehreren Zyklen, in denen sich jeweils die Menge der ursprünglichen DNA verdoppelt, was einer exponentiellen Vervielfältigung entspricht. Dabei besteht jeder Zyklus aus drei einzelnen Schritten:

- *Denaturierung:*
Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf eine hohe Temperatur, (~95 °C) erhitzt. Durch diese Hitze werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen DNA-Strängen aufgebrochen und es liegen nun Einzelstränge vor, die als Matrize dienen können.
- *Primer-Hybridisierung:*
Im zweiten Schritt wird die Temperatur auf eine niedrigere Temperatur (~60 °C) abgekühlt. Nun lagern sich vorher zugegebene Einzelstrang-Oligonukleotide, die s.g. Forward- und Reverse-Primer, spezifisch an die Enden der DNA-Einzelstränge an, zu denen sie komplementär sind. Die Auswahl der Primer bestimmt dabei die Zielsequenz, die von den Primern flankiert wird und dadurch erst vervielfältigt werden kann. Die Temperatur, unter der diese Anlagerung (engl. *Annealing*) stattfindet, wird daher auch Annealing-Temperatur genannt.
- *Elongation:*

Im dritten Schritt, der Elongation, synthetisiert die DNA-Polymerase aus vorher zugegebenen freien Nukleotiden an den Einzelsträngen die DNA. Dabei beginnt die DNA-Polymerase an einem freien 3'-Ende, welches vom Primer zur Verfügung gestellt wird, und folgt dann dem Einzelstrang.

Die simultan zur Vervielfältigung erfolgende Unterscheidung verschiedener Allele erfolgt durch die Anwendung von sequenzspezifischen Sonden und der Taq-Polymerase, einer speziellen Variante der DNA-Polymerase. Die Sonden sind dabei Einzelstrang-Oligonukleotide, die zum gesuchten DNA-Abschnitt komplementär sind.

Am 5'-Ende der Sonden befinden sich ein fluoreszenzmarkierter Reporter, am 3'-Ende ein nicht-fluoreszierender Quencher. Durch die räumliche Nähe zwischen Reporter- und Quencherfarbstoff unterdrückt der Quencher dabei die Fluoreszenz des Reporters. Dies ist auf den Förster-Resonanzelektronentransfer (FRET) zurückzuführen, der besagt, dass ein Reporter, der durch eine Lichtquelle angeregt wird, seine Energie an einen nahe gelegenen Quencher abgibt. Sobald jedoch die Entfernung dieser zueinander zunimmt, kann der Reporter nicht mehr die Energie abgeben und beginnt selbst zu fluoreszieren.

Zusätzlich zu ihrer Funktion als DNA-Polymerase hat die Taq-Polymerase auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität; dadurch baut sie die Sonde während der DNA-Synthetisierung am 5'-Ende ab, wodurch sich der Reporter räumlich vom Quencher entfernt und aufgrund des FRET bei entsprechender Anregung als Fluoreszenz detektiert werden kann.

Die Reporter-Fluoreszenz ist das Signal, was nun nach jedem Zyklus der DNA-Vervielfältigung gemessen wird. Diese Emission kann zum quantitativen Nachweis der Genexpression (Real-Time Quantitative PCR) verwendet werden, wenn sie den Beginn der exponentiellen Phase erreicht hat, gekennzeichnet durch Erreichen des CT-Wertes (Threshold Cycle, Schwellenwertzyklus). Dieser Wert charakterisiert die Anzahl der Zyklen, die notwendig sind, bis die Reporterfluoreszenz erstmalig die Hintergrundfluoreszenz übersteigt.

Alternativ kann, falls zwei verschiedene Sonden mit unterschiedlichen Reporterfarbstoffen (z.B. VIC oder FAM) eingesetzt werden, die Real-Time PCR auch zur qualitativen Diskriminierung von Allelen (Real-Time Qualitative PCR) eingesetzt werden. Die Sonden haben dabei eine unterschiedliche Basensequenz, damit die verschiedenen Allele detektiert werden können. Bei homozygoten Allelträgern wird demzufolge nur ein Fluoreszenzsignal detektiert, bei heterozygoten Trägern werden entsprechend beide Fluoreszenzsignale detektiert.

4.5.2. Durchführung der Real-Time Qualitative PCR

Mit der Qualitative Real-Time PCR in der vorliegenden Arbeit wurden die DNA-Proben auf das Vorliegen von zwei Einzelnukleotid-Polymorphismen auf den Genen für FGFR4 (Gly388Arg / rs351855) und Klotho (Phe352Val / rs9536314) untersucht.

Die Untersuchung wurde mit dem Gerät MX3005P (Stratagene, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Zunächst wurde ein Mastermix angesetzt:

Reagenz	Menge
SensiFAST Genotyping Lo-ROX Mix	10 µl
Nuclease-Free Water	7 µl
Tris-EDTA Buffer Solution	0,5 µl
TaqMan® SNP Genotyping Assay Mix	0,5 µl

Der SensiFAST Genotyping Lo-ROX Mix (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) ist ein Mix, der unter anderem die für die Durchführung der PCR notwendigen Enzyme wie Taq-Polymerasen und freie Nukleotide zur DNA-Synthese enthält.

In ein PCR Strip Tube wurden nun je 18 µl Mastermix und je 2 µl der extrahierten DNA gegeben. Bei den Negativkontrollen wurde anstelle der DNA je 2 µl nukleasefreies Wasser (Nuclease-free water, QIAGEN, Hilden, Deutschland) dazugegeben. Nach kurzem Anzentrifugieren der Strips, um die DNA gut mit dem Mastermix zu durchmischen, wurde die qPCR mit folgendem Programm durchgeführt:

Für die Bestimmung des SNPs Gly388Arg / rs351855:

Segment Nr.	Zyklen	Programm
1	1	180 Sek. bei 95° C
2	40	10 Sek. bei 95° C, dann 45 Sek. bei 60° C
3	1	120 Sek. bei 25 °C

Für die Bestimmung des SNPs Phe352Val / rs9536314:

Segment Nr.	Zyklen	Programm
1	1	180 Sek. bei 95° C
2	40	10 Sek. bei 95° C, dann 45 Sek. bei 65° C
3	1	120 Sek. bei 25 °C

Die Filter Gain Settings des PCR-Gerätes wurden für die Fluoreszenzfarbstoffe folgendermaßen eingestellt:

Farbstoff	Verstärkung
VIC	2-fach
FAM	4-fach

Bei jeder qPCR wurden als Negativkontrolle jeweils 4 Tubes mit 2 µl nukleasefreiem Wasser anstelle der DNA befüllt.

Die Auswertung der qPCR wurde mit der MxPro QPCR Software (Stratagene, Waldbronn, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde ein manueller Threshold gesetzt, welcher den Beginn der exponentiellen Phase der DNA-Amplifikation darstellt.

4.5.3. Verwendete TaqMan®-Assays

Für die Analyse der Polymorphismen wurden zwei vorgefertigte TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Der gelieferte Mix enthielt zum einen Primer mit passenden Sequenzen, um den gesuchten DNA-Abschnitt zu amplifizieren, und zum anderen die SNP-spezifischen Sonden, die mit den Fluoreszenzfarbstoffen HEX und VIC markiert sind. In der vorliegenden Arbeit verwendeten wir die folgenden beiden Assays:

Tabelle x - Details der verwendeten TaqMan® SNP Genotyping Assays

<i>SNP</i>	<i>FGFR4</i>	<i>Klotho</i>
Assay ID	C_3166614_10	C_2983037_20
dbSNP ID	rs351855	rs9536314
Gen	FGFR4 / Fibroblast Growth Factor Receptor 4	KL / Klotho

Allele / Polymorphismus	Mis-sense Mutation	Mis-sense Mutation
Codonaustausch	AGG, GGG	GTT, TTT
Aminosäureaustausch	Gly388Arg	Phe352Val
Homozygot f. Wildtyp	Gly/Gly	Phe/Phe
Heterozygot	Gly/Arg oder Arg/Gly	Phe/Val oder Val/Phe
Homozygot f. Mutante	Arg/Arg	Val/Val
Reporter	FAM für Gly HEX für Arg	FAM für Phe HEX für Val

4.6. Statistische Auswertung

Die Datenerfassung erfolgte mit Microsoft Excel 2010, anschließend wurden die Daten für die statistische Auswertung in die Statistiksoftware IBM SPSS Statistics übertragen.

Die kategorialen Merkmale sind als Anzahl (Prozentwert) aufgeführt. Alle stetigen Merkmale sind als Mittelwert \pm Standardabweichung [bei nicht-parametrischer Verteilung Median (25. / 75. Perzentile)] angegeben. Der statistische Vergleich von kategorialen Merkmalen erfolgte für zwei unabhängige Stichproben mittels Fisher Test, bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben nach dem χ^2 Test. Stetige Merkmale wurden mittels T-Test für zwei unabhängige Stichproben verglichen, bei mehr als zwei Stichproben erfolgte der Vergleich mittels des einfaktoriellen ANOVA mit Test für linearen Trend. Nicht-parametrisch verteilte Merkmale wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen. Überlebensanalysen erfolgten mittels Kaplan-Meier-Analyse und nachfolgendem log-rank Test. Schließlich erfolgten Cox-Regressionsanalysen, bei denen cFGF23, iFGF23 und sKlotho jeweils als kontinuierliche und als in Tertile kategorisierte Ausgangsvariablen betrachtet wurden. In Analogie an unsere vorherigen Auswertungen [138] erfolgte in den Regressionsanalysen eine vordefinierte Adjustierung für eGFR und log Albuminurie (Modell 2), zusätzlich für Alter und Geschlecht (Modell 3), zusätzlich für prävalenten Diabetes Mellitus und prävalente kardiovaskuläre Erkrankung (Modell 4) und zusätzlich für Variablen der CKD-MBD (Phosphor, FePi, Parathormon, log sKlotho [wenn cFGF23 oder iFGF23 Ausgangsvariable], log FGF23 [wenn Klotho Ausgangsvariable]).

Die Korrelationsanalysen wurden mit Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson durchgeführt. Dabei wurden Korrelationen bei $r > 0,5$ als stark, bei $r > 0,3$ als moderat und bei $r > 0,1$ als schwach angesehen.

Als statistisch signifikant gelten in allen angewandten statistischen Verfahren p-Werte von $\leq 0,05$.

5. Ergebnisse

5.1. Baseline-Charakteristika

Die Baseline-Charakteristika der 519 untersuchten Patienten sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Der Frauenanteil liegt bei insgesamt 40,7 %, das mittlere Alter bei $65,0 \pm 12,2$ Jahre. 10,4 % der untersuchten Patienten sind aktive Raucher, 37,8 % sind Diabetiker, und 30,8% haben prävalente kardiovaskuläre Erkrankungen.

Stratifiziert man die Patienten anhand ihres Trägerstatus für den SNP Gly388Arg, zeigt sich, dass ein Großteil der Patienten erwartungsgemäß Träger des Wildtyp-Allels GG oder der heterozygoten Variante GA ist. Für Geschlecht, Alter, Raucherstatus und prävalenten Diabetes Mellitus ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Träger des AA-Allels haben indes eine signifikant erhöhte Prävalenz an kardiovaskulären Erkrankungen und koronaren Herzkrankheiten, Träger der GA-Variante weisen signifikant niedrigere FGF23-Spiegel und fraktionelle Phosphatausscheidungen auf.

Untersucht man die Patienten anhand ihres Trägerstatus für die verschiedenen Allele des Phe352Val-SNPs, zeigt sich, dass ein Großteil der Patienten auch hier erwartungsgemäß Träger des Wildtyp-Allels FF oder der heterozygoten Variante FV sind. Dabei ergeben sich für Geschlecht, Alter, Raucherstatus und prävalenten Diabetes Mellitus keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen. Träger der VV-Variante weisen jedoch einen signifikant erhöhten diastolischen Blutdruck auf.

Tabelle 5. Patientencharakteristika bei Studieneinschluss, stratifiziert nach Allelen der SNPs Gly388Arg (GG, GA, AA) und Phe352Val (FF, FV, VV).

	Gesamt- kohorte	GG	GA	AA	p	FF	FV	VV	p
n	519	257 [49,5 %]	207 [39,9 %]	55 [10,6 %]		376 [72,4 %]	128 [24,7 %]	15 [2,9 %]	
Alter [Jahre]	65,0 ± 12,2	65,1 ± 12,4	65,3 ± 11,6	64,2 ± 13,6	0,853	64,7 ± 12,7	66,4 ± 10,5	62,7 ± 12,4	0,275
Geschlecht [weiblich]	211 [40,7 %]	101 [39,3 %]	89 [43,0 %]	21 [38,2 %]	0,669	159 [42,3 %]	49 [38,3 %]	3 [20,0 %]	0,186
Diabetes Mellitus [ja]	196 [37,8 %]	100 [38,9 %]	74 [35,7 %]	22 [40,0 %]	0,734	135 [35,9 %]	56 [43,8 %]	5 [33,3 %]	0,268
Aktiver Nikotin- konsum [ja]	54 [10,4 %]	28 [10,9 %]	23 [11,1 %]	3 [5,5 %]	0,444	41 [10,9 %]	12 [9,4 %]	1 [6,7 %]	0,790
Prävalente KHK	114 [22,0 %]	53 [20,6 %]	40 [19,3 %]	21 [38,2 %]	0,008	81 [21,5 %]	33 [25,8 %]	0 [0,0 %]	0,069
Prävalente zerebrovaskuläre Erkrankung	48 [9,2 %]	29 [11,3 %]	15 [7,2 %]	4 [7,3 %]	0,285	37 [9,8 %]	10 [7,8 %]	1 [6,7 %]	0,744
Prävalente pAVK	33 [6,4 %]	17 [6,6 %]	11 [5,3 %]	5 [9,1 %]	0,578	25 [6,6 %]	8 [6,3 %]	0 [0,0 %]	0,584

	Gesamt- kohorte	GG	GA	AA	p	FF	FV	VV	p
Prävalente kardiovaskuläre Erkrankung	160 [30,8 %]	83 [32,3 %]	53 [25,6 %]	24 [43,6 %]	0,028	116 [30,9 %]	43 [33,6 %]	1 [6,7 %]	0,102
Systolischer BD [mmHg]	152 ± 24	153 ± 24	151 ± 25	151 ± 19	0,697	152 ± 24	151 ± 23	156 ± 32	0,802
Diastolischer BD [mmHg]	86 ± 13	86 ± 13	86 ± 13	82 ± 13	0,108	86 ± 13	84 ± 13	92 ± 18	0,047
eGFR [mg/ml/1,73 m²]	47 ± 16	47 ± 16	46 ± 15	48 ± 18	0,653	47 ± 16	45 ± 16	45 ± 17	0,345
Albuminurie [mg/g]	30 [8; 180]	42 [9; 257]	27 [6; 120]	22 [9; 193]	0,191	32 [8; 183]	24 [7; 195]	45 [7; 163]	0,948
NT-proBNP [ng/l]	201 [85; 524]	185 [83; 503]	194 [88; 529]	258 [102; 865]	0,335	193 [84; 527]	209 [95; 651]	140 [54; 376]	0,498
Troponin T [ng/l]	18 ± 31	18 ± 17	18 ± 46	17 ± 15	0,960	18 ± 36	18 ± 15	19 ± 15	0,987
Ges.-Cholesterin [mg/dl]	191 ± 43	192 ± 41	190 ± 43	195 ± 50	0,747	193 ± 43	188 ± 46	185 ± 24	0,425
LDL-Cholesterin [mg/dl]	114 ± 36	115 ± 35	112 ± 37	115 ± 39	0,549	115 ± 36	112 ± 39	108 ± 28	0,582

	Gesamt- kohorte	GG	GA	AA	p	FF	FV	VV	p
HDL-Cholesterin [mg/dl]	52 ± 17	51 ± 16	53 ± 18	49 ± 17	0,188	52 ± 17	51 ± 17	49 ± 12	0,777
Triglyceride [mg/dl]	165 ± 117	163 ± 116	160 ± 116	194 ± 128	0,144	168 ± 127	158 ± 87	157 ± 110	0,679
CRP [mg/l]	2,65 [1,10; 5,00]	2,70 [1,20; 5,30]	2,35 [1,00; 4,53]	3,00 [1,60; 5,10]	0,218	2,70 [1,20; 5,10]	2,60 [1,03; 5,23]	2,00 [1,00; 2,90]	0,379
Phosphor [mg/dl]	3,35 ± 0,65	3,35 ± 0,65	3,38 ± 0,67	3,27 ± 0,58	0,542	3,37 ± 0,64	3,32 ± 0,70	3,39 ± 0,54	0,757
FePi [%]	24 ± 12	26 ± 14	23 ± 11	25 ± 12	0,028	24 ± 13	26 ± 12	22 ± 10	0,263
25-OH-Vitamin D [ng/ml]	23 ± 13	23 ± 13	24 ± 15	23 ± 12	0,823	23 ± 13	23 ± 14	24 ± 14	0,888
Parathormon [pg/ml]	52 [37; 83]	53 [38; 84]	50 [33; 81]	57 [41; 96]	0,112	52 [36; 78]	57 [38; 106]	53 [32; 87]	0,222
FGF23 c-terminal [rU/ml]	99 [64; 156]	103 [68; 168]	91 [58; 149]	110 [58; 153]	0,049	99 [62; 158]	106 [68; 159]	79 [55; 118]	0,256
FGF23 intakt [pg/ml]	64 [47; 97]	65 [48; 98]	63 [45; 99]	65 [46; 97]	0,698	63 [47; 99]	68 [50; 98]	48 [39; 74]	0,212

	Gesamt- kohorte	GG	GA	AA	p	FF	FV	VV	p
sKlotho [pg/ml]	399 [331; 483]	392 [319; 476]	411 [335; 493]	424 [366; 571]	0,283	388 [321; 480]	413 [350; 493]	408 [353; 447]	0,297

Abkürzungen: KHK = Koronare Herzkrankheit; pAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit; BD = Blutdruck; eGFR = *estimated Glomerular Filtration Rate* (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate); NT-Pro-BNP = N-terminales pro *Brain Natriuretic Peptide*; LDL = *Low-Density Lipoprotein*; HDL = *High-Density Lipoprotein*; CRP = C-reaktives Protein; FePi = *fractional excretion of phosphorus* (fraktionelle Phosphatausscheidung).

5.2. Querschnittsanalysen echokardiographischer Parameter bei Studienbeginn

471 der 519 untersuchten Patienten erhielten bei Studieneinschluss eine Echokardiographie; bei den übrigen 48 Patienten war aus logistischen Gründen keine Echokardiographie möglich. Von diesen 471 Patienten wurden bei 458, 431 und 435 LVMI, LAVI und E/e' bestimmt. Die fehlenden Untersuchungsergebnisse resultierten zumeist aus nicht ausreichender Darstellbarkeit; zudem umfasste das echokardiographische Untersuchungsprogramm bei den ersten 25 Patienten nicht die Bestimmung der LAVI.

Von den 458 Patienten, deren LVMI bestimmt wurde, hatten 107 (23 %) eine linksventrikuläre Hypertrophie. Von den 471 Patienten, bei denen eine Echokardiographie erfolgte, hatten 60 Patienten eine reduzierte linksventrikuläre systolische Funktion und 411 Patienten eine normale linksventrikuläre systolische Funktion.

In Tabelle 6 sind Korrelationsanalysen nach Pearson nach Logarithmierung von nicht-normal verteilten Variablen dargestellt. Der LVMI bei Studieneinschluss korrelierte moderat mit höherem NT-Pro-BNP und schwach mit höherem Alter, systolischem Blutdruck, Albuminurie, Troponin T, Triglyceriden, FePi, Parathormon, cFGF23, iFGF23 sowie mit niedrigerer eGFR, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin und sKlotho. Der LAVI bei Studieneinschluss korrelierte stark mit höherem NT-Pro-BNP, moderat mit höherem Alter und schwach mit höherem systolischem Blutdruck, Albuminurie, Troponin T, Phosphor, FePi, Parathormon, cFGF23 und iFGF23 sowie mit niedrigerer eGFR, Gesamtcholesterin und sKlotho. E/e' bei Studieneinschluss korrelierte moderat mit höherem Alter, NT-Pro-BNP und Troponin T, und schwach mit höherem systolischem Blutdruck, Albuminurie, CRP, Phosphor, Parathormon, cFGF23 und iFGF23, sowie mit niedrigerem diastolischem Blutdruck und eGFR.

In Tabelle 7 sind die echokardiographischen Parameter bei Studieneinschluss, gruppiert nach Allelträgerstatus der SNPs Gly388Arg und Phe352Val, dargestellt. Bei Stratifizierung der Patienten anhand des Gly388Arg-Genotyps zeigen sich, mit Ausnahme eines bei Trägern der AA-Variante verminderten Fractional Shortenings, keine signifikanten Unterschiede in den bei Studieneinschluss erhobenen echokardiographischen Parametern. Stratifiziert man die Patienten für die verschiedenen Allele des Phe352Val-SNPs, so zeigen sich keinerlei signifikante Unterschiede in echokardiographischen Parametern bei Studieneinschluss.

Tabelle 6. Korrelationsanalysen nach Pearson

	LVMI [g/m ²]		LAVI [ml/m ²]		E / e ⁴	
	r	p	r	p	r	p
Alter [Jahre]	0,183	< 0,001	0,353	< 0,001	0,380	< 0,001
Systolischer BD [mmHg]	0,157	0,001	0,160	0,001	0,262	< 0,001
Diastolischer BD [mmHg]	0,056	0,229	-0,080	0,096	-0,139	0,004
eGFR [mg/ml/1,73 m ²]	-0,174	< 0,001	-0,229	< 0,001	-0,256	< 0,001
log Albuminurie [mg/g]	0,143	0,002	0,162	0,001	0,125	0,009
log NT-Pro BNP [ng/l]	0,355	< 0,001	0,564	< 0,001	0,455	< 0,001
Troponin T [ng/l]	0,213	< 0,001	0,143	0,003	0,328	< 0,001
Ges.-Cholesterin [mg/dl]	-0,110	0,019	-0,115	0,017	-0,044	0,358
LDL-Cholesterin [mg/dl]	-0,090	0,054	-0,090	0,063	-0,023	0,629

	LVMI [g/m ²]		LAVI [ml/m ²]		E / e ⁴	
	r	p	r	p	r	p
HDL-Cholesterin [mg/dl]	-0,221	< 0,001	-0,078	0,106	-0,054	0,263
Triglyceride [mg/dl]	0,101	0,031	-0,020	0,681	0,011	0,824
log CRP [mg/l]	0,048	0,311	0,076	0,116	0,141	0,003
Phosphor [mg/dl]	0,030	0,516	0,155	0,001	0,200	< 0,001
FePi [%]	0,252	< 0,001	0,196	< 0,001	0,084	0,085
25-OH-Vitamin D [ng/ml]	-0,003	0,954	0,027	0,584	-0,032	0,512
log Parathormon [pg/ml]	0,251	< 0,001	0,283	< 0,001	0,160	0,001
log FGF23 c-terminal [rU/ml]	0,155	0,001	0,288	< 0,001	0,184	< 0,001
log FGF23 intakt [pg/ml]	0,217	< 0,001	0,207	< 0,001	0,107	0,026

	LVMI [g/m ²]		LAVI [ml/m ²]		E / e ⁴	
	r	p	r	p	r	p
log sKlotho [pg/ml]	-0,134	0,010	-0,119	0,028	-0,022	0,680

Abkürzungen: BD = Blutdruck; eGFR = *estimated Glomerular Filtration Rate* (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate); NT-Pro-BNP = N-terminales pro *Brain Natriuretic Peptide*; LDL = *Low-Density Lipoprotein*; HDL = *High-Density Lipoprotein*; CRP = C-reaktives Protein; FePi = *fractional excretion of phosphorus* (fraktionelle Phosphatausscheidung).

Tabelle 7. Echokardiographische Parameter bei Studieneinschluss, stratifiziert nach Allelen der SNPs Gly388Arg (GG, GA, AA) und Phe352Val (FF, FV, VV).

	Gesamt- kohorte	GG	GA	AA	p	FF	FV	VV	p
n	471	234 [49,5 %]	190 [40,3 %]	47 [10,0 %]		343 [72,8 %]	114 [24,2 %]	14 [3,0 %]	
LVMI [g/m²]	91,8 ± 27,0	91,7 ± 28,5	91,4 ± 24,7	93,9 ± 28,7	0,861	91,1 ± 25,4	92,8 ± 28,2	100,9 ± 48,0	0,379
Fractional Shortening [%]	39,1 ± 8,3	39,6 ± 8,3	39,3 ± 7,9	35,7 ± 8,8	0,022	39,1 ± 8,3	38,9 ± 8,0	40,3 ± 9,3	0,867
E max [cm/s]	83,9 ± 27,0	84,6 ± 28,5	81,9 ± 24,4	88,6 ± 29,1	0,285	83,9 ± 28,4	85,1 ± 23,3	74,8 ± 13,7	0,450
A max [cm/s]	84,9 ± 24,6	85,9 ± 25,0	85,0 ± 24,2	79,5 ± 23,6	0,295	84,8 ± 24,1	84,8 ± 24,5	86,5 ± 36,4	0,973
LAVI [ml/m²]	37,6 ± 12,7	37,5 ± 12,6	37,9 ± 12,9	37,5 ± 13,0	0,945	37,4 ± 13,0	38,4 ± 12,0	37,5 ± 12,2	0,790
E / e[‘]	8,8 ± 3,3	8,8 ± 3,1	8,8 ± 3,3	9,0 ± 3,8	0,881	8,9 ± 3,5	8,7 ± 2,8	8,0 ± 2,4	0,618
e[‘] [cm/s]	10,0 ± 2,7	9,9 ± 2,6	9,9 ± 2,8	10,5 ± 3,1	0,408	9,9 ± 2,9	10,3 ± 2,4	9,5 ± 2,2	0,441

5.3. Längsschnittanalysen echokardiographischer Parameter im Studienverlauf

228 der 471 bei Studieneinschluss echokardiographisch untersuchten Patienten wurden nach fünf Jahren erneut echokardiographisch untersucht (Tabellen 8 und 9; Abbildungen 1 und 2). Wie bei der initialen Untersuchung gelang auch bei der Verlaufskontrolle die Bestimmung von LVMI, LAVI und E/e' (zumeist aus technischen Gründen) nicht bei allen Patienten, so dass LVMI, LAVI und E/e' bei 224, 213, und 219 Patienten vorlagen. Veränderungen von LVMI (Δ LVMI), LAVI (Δ LAVI) und E/e' (Δ E/e') zwischen der 5-Jahresuntersuchung und der Ausgangsuntersuchung konnten bei 217, 191 und 200 Patienten bestimmt werden; bei den übrigen Patienten lagen keine echokardiographischen Parameter bei Einschluss und / oder bei der 5-Jahresuntersuchung vor.

In Tabelle 8 sind Korrelationsanalysen nach Pearson der Veränderungen der echokardiographischen Parameter mit den bei Studieneinschluss erhobenen klassischen und nicht-klassischen kardiovaskulären und renalen Risikofaktoren dargestellt. Dabei erfolgten die Analysen nach Logarithmierung von nicht-normal verteilten Variablen. Die Veränderung der LVMI (Δ LVMI) im Studienverlauf korrelierte schwach mit niedrigerem diastolischem Blutdruck. Die Veränderung der LAVI (Δ LAVI) im Studienverlauf korrelierte schwach mit höherem Alter, NT-Pro-BNP und FePi sowie mit niedriger eGFR. Die Veränderung von E/e' im Studienverlauf (Δ E/e') korrelierte schwach mit erhöhten Triglyceriden und FePi. Alle sonstigen Analysen erbrachten keine signifikanten Korrelationen von Veränderungen echokardiographischer Parameter mit traditionellen und nichttraditionellen kardiovaskulären und renalen Risikofaktoren.

Bei Stratifizierung der Patienten anhand ihres Trägerstatus für den SNP Gly388Arg und für den SNP Phe352Val zeigen sich zwischen den Patientengruppen keine signifikanten Unterschiede in Δ LVMI, Δ LAVI und Δ E/e' (Tabelle 9).

Betrachtet man innerhalb dieser Patientengruppen LVMI, LAVI und E/e' bei Studieneinschluss und nach 5-jähriger Nachbeobachtung, so wurde in keiner Patientengruppe eine signifikante Veränderung von LVMI oder E/e' beobachtet, während LAVI in allen Patientengruppen numerisch anstieg; in der Patientengruppe mit dem VV-Genotyp erreichte dieser Anstieg aufgrund der geringen Zahl von Patienten dieses Genotyps keine Signifikanz, während alle anderen Patientengruppen einen signifikanten Anstieg verzeichneten (Abbildungen 1 und 2).

Tabelle 8. Korrelationsanalysen nach Pearson

	Δ LVMI [g/m ²]		Δ LAVI [ml/m ²]		Δ E / e'	
	r	p	r	p	r	p
Alter [Jahre]	0,054	0,427	0,224	0,002	-0,131	0,064
Systolischer BD [mmHg]	-0,039	0,570	-0,043	0,553	0,029	0,686
Diastolischer BD [mmHg]	-0,178	0,009	-0,120	0,097	-0,039	0,582
eGFR [mg/ml/1,73 m ²]	-0,121	0,075	-0,209	0,004	-0,090	0,206
log Albuminurie [mg/g]	-0,052	0,444	-0,092	0,207	0,022	0,758
log NT-Pro BNP [ng/l]	-0,025	0,710	0,286	< 0,001	-0,078	0,275
Troponin T [ng/l]	0,079	0,245	0,132	0,069	0,120	0,092
Ges.-Cholesterin [mg/dl]	0,001	0,987	-0,040	0,586	-0,005	0,945
LDL-Cholesterin [mg/dl]	-0,033	0,633	-0,049	0,503	-0,076	0,284

	Δ LVMI [g/m ²]		Δ LAVI [ml/m ²]		Δ E / e ⁶	
	r	p	r	p	r	p
HDL-Cholesterin [mg/dl]	0,030	0,655	0,001	0,986	-0,093	0,188
Triglyceride [mg/dl]	0,022	0,745	0,012	0,871	0,180	0,011
log CRP [mg/l]	-0,009	0,892	-0,022	0,759	-0,023	0,744
Phosphor [mg/dl]	0,031	0,652	0,062	0,393	-0,103	0,147
FePi [%]	0,011	0,871	0,149	0,041	0,176	0,014
25-OH-Vitamin D [ng/ml]	-0,054	0,435	-0,044	0,546	-0,011	0,873
log Parathormon [pg/ml]	0,024	0,730	0,005	0,948	0,108	0,130
log FGF23 c-terminal [rU/ml]	0,022	0,742	0,115	0,112	0,038	0,593
log FGF23 intakt [pg/ml]	0,024	0,720	0,116	0,109	0,101	0,156

	Δ LVMI [g/m ²]		Δ LAVI [ml/m ²]		Δ E / e ⁶	
	r	p	r	p	r	p
log sKlotho [pg/ml]	0,097	0,154	-0,122	0,092	0,105	0,138

Abkürzungen: BD = Blutdruck; eGFR = *estimated Glomerular Filtration Rate* (geschätzte glomeruläre Filtrationsrate); NT-Pro-BNP = N-terminales pro *Brain Natriuretic Peptide*; LDL = *Low-Density Lipoprotein*; HDL = *High-Density Lipoprotein*; CRP = C-reaktives Protein; FePi = *fractional excretion of phosphorus* (fraktionelle Phosphatausscheidung).

Tabelle 9. Echokardiographische Parameter im Studienverlauf, stratifiziert nach Allelen der SNPs Gly388Arg (GG, GA, AA) und Phe352Val (FF, FV, VV).

	Gesamt- kohorte	GG	GA	AA	p	FF	FV	VV	p
n	228	106 [46,5 %]	97 [42,5 %]	25 [11,0 %]		170 [74,6 %]	56 [24,6 %]	2 [0,9 %]	
Δ LVMI [g/m ²]	-0,1 ± 21,0	0,1 ± 17,9	1,5 ± 23,1	-7,7 ± 24,1	0,181	-0,2 ± 19,5	0,2 ± 25,3	-0,1 ± 21,0	0,995
Δ LAVI [ml/m ²]	8,6 ± 10,6	9,2 ± 11,1	7,4 ± 9,6	11,0 ± 12,1	0,287	9,2 ± 10,6	6,7 ± 10,8	13,5 ± 3,6	0,281
Δ E / e'	0,0 ± 2,5	-0,1 ± 2,7	0,2 ± 2,5	-0,3 ± 2,3	0,605	0,1 ± 2,7	-0,2 ± 2,0	-1,3 ± 2,3	0,628

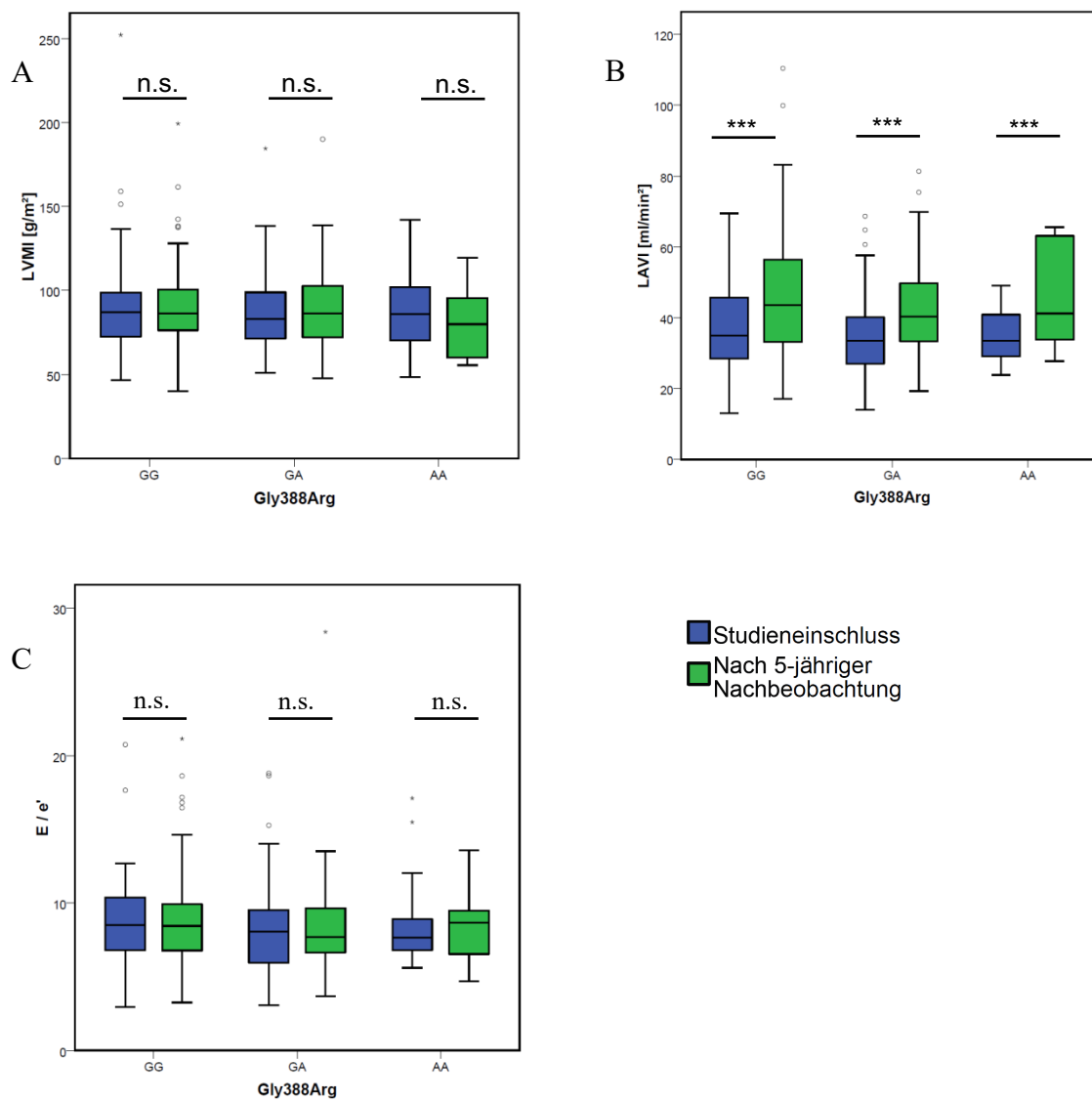


Abbildung 1. Vergleich echokardiographischer Parameter zum Studieneinschluss und nach 5-jähriger Nachbeobachtungszeit, bezogen auf den SNP Gly388Arg. **(A)** LVMI. **(B)** LAVI. **(C)** E/e'. Signifikante Unterschiede zwischen den Echokardiographien bei Studieneinschluss und nach der 5-jährigen Nachbeobachtung sind markiert (t-Test für gepaarte Stichproben; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001).

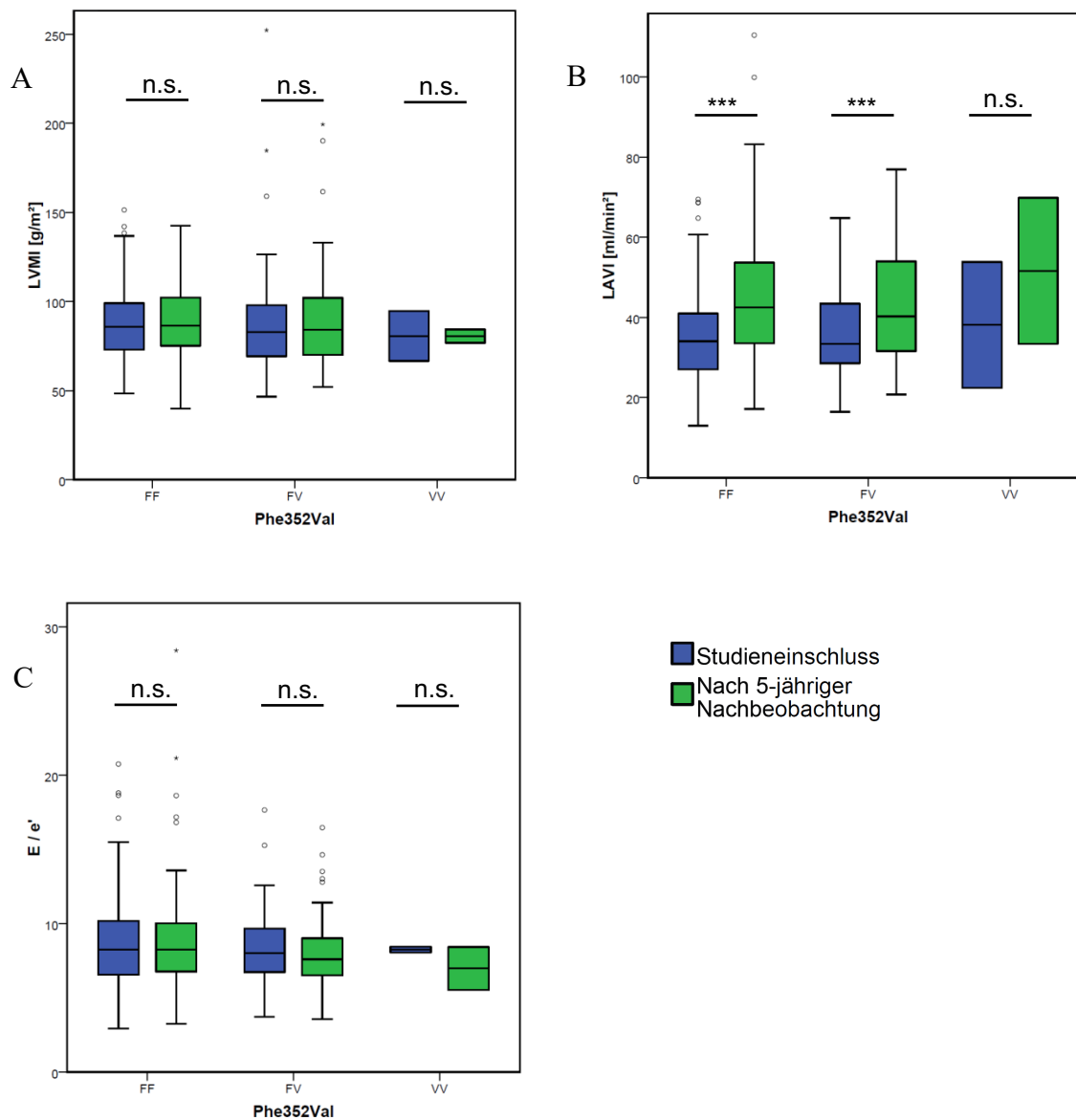


Abbildung 2. Vergleich echokardiographischer Parameter zum Studieneinschluss und nach 5-jähriger Nachbeobachtungszeit, bezogen auf den SNP Phe352Val. **(A)** LVMI. **(B)** LAVI. **(C)** E/e'. Signifikante Unterschiede zwischen den Echokardiographien bei Studieneinschluss und nach der 5-jährigen Nachbeobachtung sind markiert (t-Test für gepaarte Stichproben; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.4. Kaplan-Meier-Überlebensanalysen

Die Nachbeobachtungszeit der 519 untersuchten Patienten betrug durchschnittlich $5,1 \pm 2,1$ Jahre. In dieser Zeit erlitten 144 Patienten ein atherosklerotisches kardiovaskuläres Ereignis und 119 Patienten eine kardiale Dekompensation.

Eine Unterteilung der Patienten anhand des Gly388Arg Polymorphismus zeigte in der Kaplan-Meier-Analyse mit log-rank-Test keine signifikanten Unterschiede bezüglich des ereignisfreien Überlebens für die beiden Endpunkte atherosklerotisches kardiovaskuläres Ereignis und kardiale Dekompensation. Ebenso zeigten sich nach Unterteilung der Patienten anhand des Phe352Val Polymorphismus keine signifikanten Unterschiede bezüglich des ereignisfreien Überlebens für die obigen Endpunkte (Abbildungen 3 und 4).

Weiterhin wurden Kaplan-Meier-Analysen nach Stratifizierung der Patienten in cFGF23-, iFGF23- und sKlotho-Tertile durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass Patienten mit dem höchsten Plasma-cFGF23, mit dem höchsten Plasma-iFGF23 und mit dem niedrigsten Plasma-sKlotho jeweils ein höheres Risiko für kardiale Dekompensationen haben (Abbildung 5). Bei Betrachtung des primären Endpunktes atherosklerotisches kardiovaskuläres Ereignis zeigte sich, dass auch hier Patienten mit den höchsten Plasma-cFGF23 und mit höchsten Plasma-iFGF23 jeweils ein höheres Risiko hatten; zwischen den sKlotho-Tertilen zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im ereignisfreien Überleben (Abbildung 6).

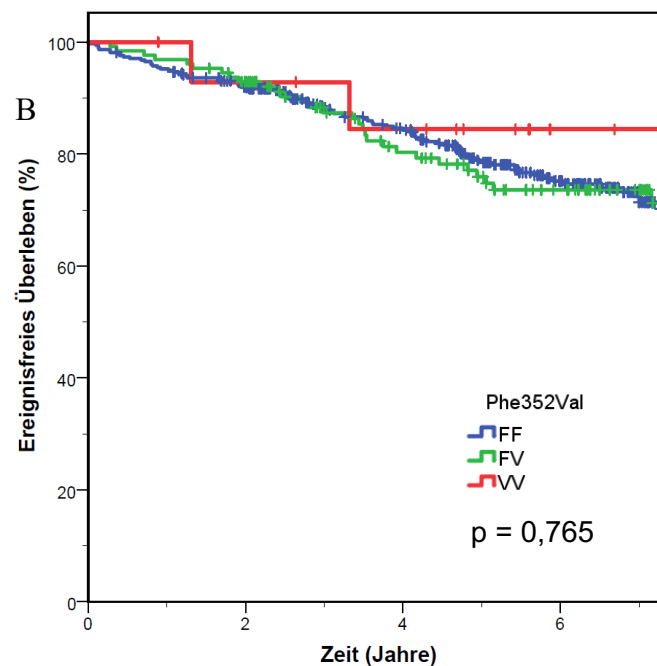
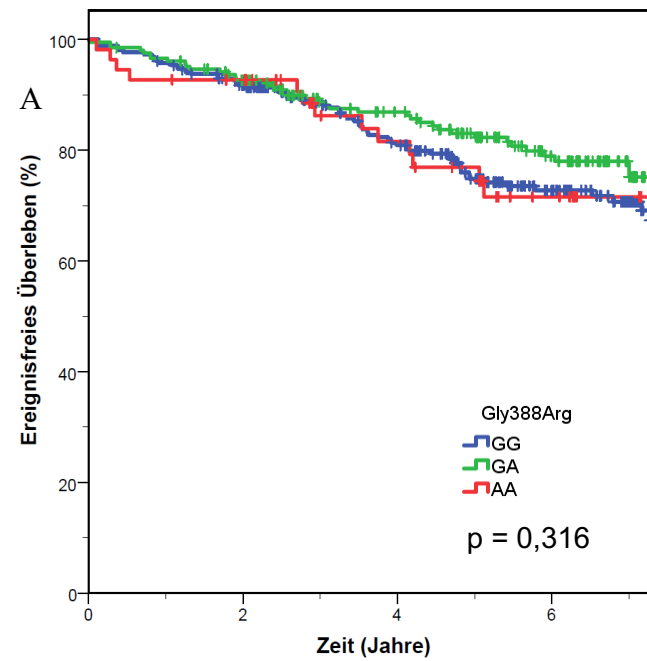


Abbildung 3. Ereignisfreies Überleben in Hinblick auf kardiale Dekompensationen. **(A)** Einteilung nach Gly388Arg-Genotyp. **(B)** Einteilung nach Phe352Val-Genotyp. Die Kaplan-Meier Analyse mit log-rank-Test ergibt jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ($p > 0,05$).

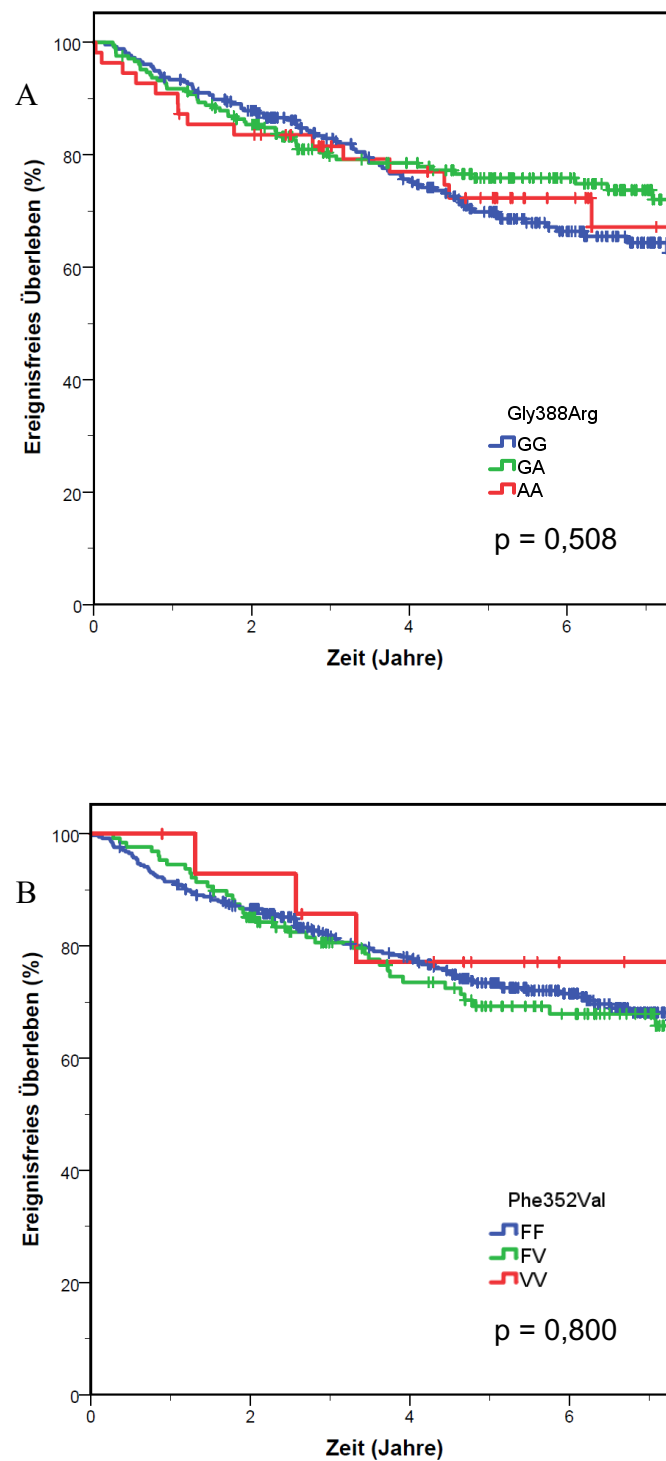


Abbildung 4. Ereignisfreies Überleben in Hinblick auf atherosklerotische kardiovaskuläre Ereignisse. **(A)** Einteilung nach Gly388Arg-Genotyp. **(B)** Einteilung nach Phe352Val-Genotyp. Die Kaplan-Meier Analyse mit log-rank-Test ergibt jeweils keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ($p > 0,05$).

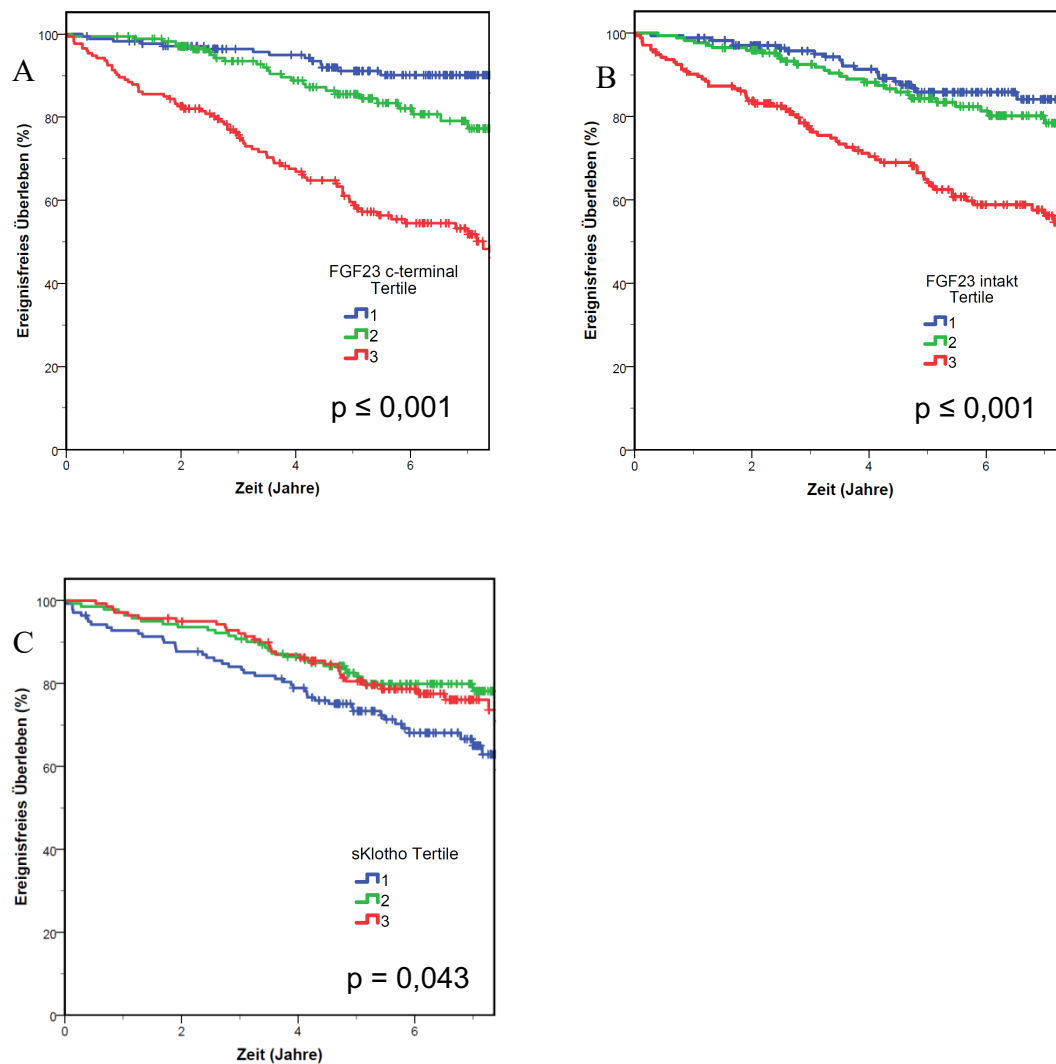


Abbildung 5. Ereignisfreies Überleben in Hinblick auf kardiale Dekompensationen, Kaplan-Meier-Analyse mit log-rank-Test. **(A)** Einteilung nach c-terminalem FGF23 (Tertil 1: 14,79 - 72,39 rU/ml; Tertil 2: 72,39 - 131,17 rU/ml; Tertil 3: 131,90 - 7441,80 rU/ml). **(B)** Einteilung nach intaktem FGF23 (Tertil 1: 7,39 - 51,26 pg/ml; Tertil 2: 51,44 - 81,75 pg/ml; Tertil 3: 82,23 - 992,23 pg/ml). **(C)** Einteilung nach sKlotho (Tertil 1: 170,46 - 359,11 pg/ml; Tertil 2: 359,48 - 443,92 pg/ml; Tertil 3: 445,96 - 2054,12 pg/ml).

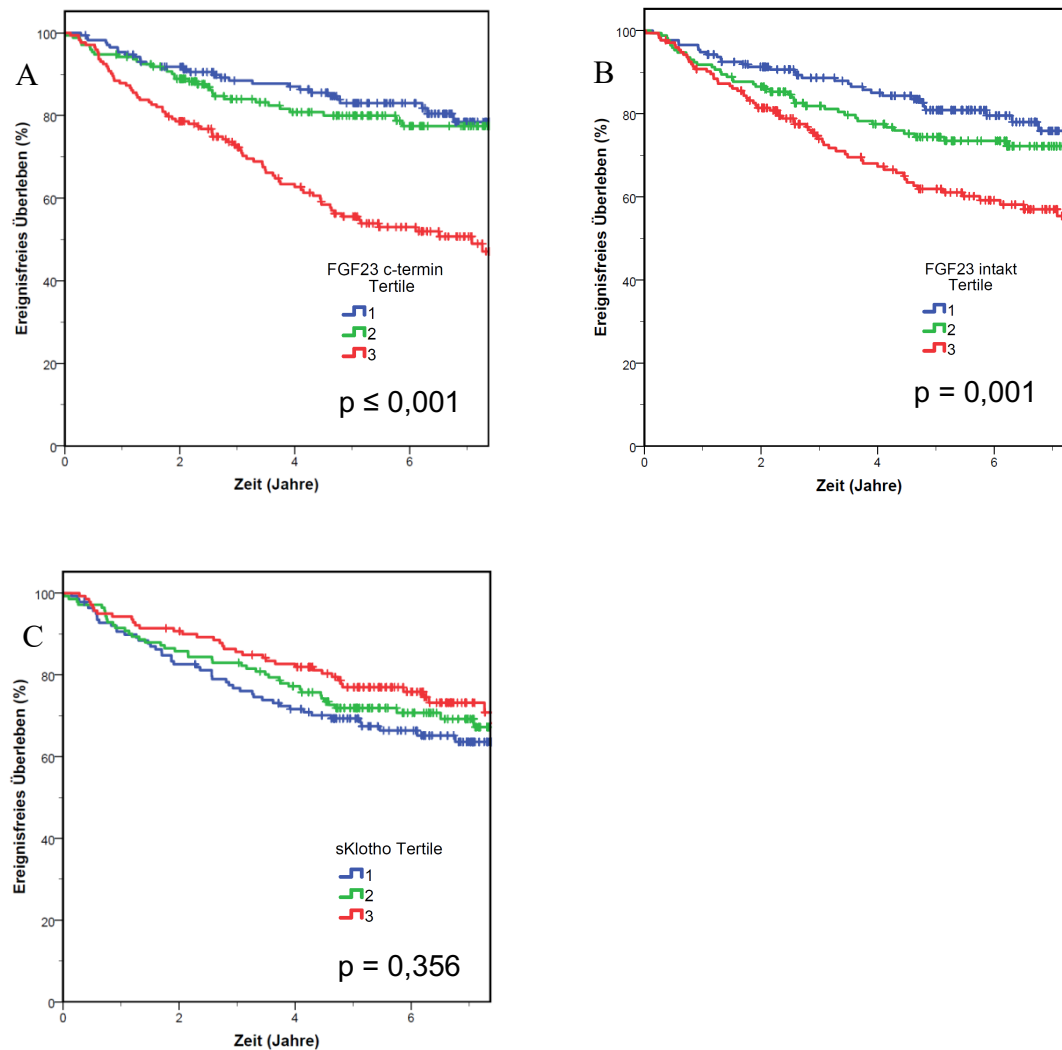


Abbildung 6. Ereignisfreies Überleben in Hinblick auf atherosklerotische kardiovaskuläre Ereignisse, Kaplan-Meier-Analyse mit log-rank-Test. **(A)** Einteilung nach c-terminalem FGF23 (Tertil 1: 14,79 - 72,39 rU/ml; Tertil 2: 72,39 - 131,17 rU/ml; Tertil 3: 131,90 - 7441,80 rU/ml). **(B)** Einteilung nach intaktem FGF23 (Tertil 1: 7,39 - 51,26 pg/ml; Tertil 2: 51,44 - 81,75 pg/ml; Tertil 3: 82,23 - 992,23 pg/ml). **(C)** Einteilung nach sKlotho (Tertil 1: 170,46 - 359,11 pg/ml; Tertil 2: 359,48 - 443,92 pg/ml; Tertil 3: 445,96 - 2054,12 pg/ml).

5.5. Cox-Regressions-Analysen

In univariaten Cox-Regressionsanalysen erwiesen sich erhöhtes cFGF23 und erhöhtes iFGF23 bei Betrachtung als kontinuierliche Variablen als signifikante Prädiktoren für kardiale Dekompensationen (Tabelle 10). sKlotho war bereits in univariaten Cox-Regressionsanalysen kein signifikanter Prädiktor. In den für kardiovaskuläre und renale Risikofaktoren sowie für andere CKD-MBD Variablen korrigierten Analysen blieb lediglich erhöhtes cFGF23 signifikanter Prädiktor.

In explorativen Analysen wurden cFGF23, iFGF23 und sKlotho als kategorisierte Variablen untersucht. Patienten in der höchsten cFGF23-Tertile hatten gegenüber Patienten in der niedrigsten cFGF23-Tertile in der univariaten Analyse ein 6,5-fach erhöhtes Risiko (95 % Konfidenzintervall [95 % KI] 3,5 - 12,0) und im volladjustierten Modell ein 4,4-fach erhöhtes Risiko (95 % KI 2,1 - 9,3) für kardiale Dekompensationen.

Patienten in der höchsten iFGF23-Tertile hatten ein 4,0-fach erhöhtes Risiko (95 % KI 2,3 - 7,0) für kardiale Dekompensationen in der univariaten Analyse. Nach Korrektur für eGFR und log Albuminurie ist iFGF23 vorübergehend kein signifikanter Prädiktor, während im volladjustierten Modell Patienten in der höchsten iFGF23-Tertile ein 2,3-fach erhöhtes Risiko (95 % KI 1,1 - 4,7) aufweisen.

Im Vergleich zu Patienten in der niedrigsten sKlotho Tertile hatten Patienten in der mittleren sKlotho-Tertile ein signifikant vermindertes Risiko für kardiale Dekompensationen in der univariaten Analyse (HR 0,5; 95 % KI 0,3 - 0,9), im Modell 2 mit Korrektur für eGFR und Albuminurie (HR 0,6; 95% KI 0,4 - 1,0), im Modell 4 mit Korrektur für eGFR, Albuminurie, Alter, Geschlecht, prävalenten Diabetes Mellitus und prävalente kardiovaskuläre Erkrankung (HR 0,5; 95% KI 0,3 - 0,9) sowie im volladjustierten Modell (HR 0,4; 95 % KI 0,3 - 0,7). Patienten in der höchsten sKlotho-Tertile hatten jedoch gegenüber Patienten in der niedrigsten sKlotho-Tertile kein signifikant erniedrigtes Risiko.

Tabelle 10. Cox-Regressions-Analysen für den Endpunkt kardiale Dekompensation.

Variable	Modell 1		Modell 2		Modell 3		Modell 4		Modell 5	
	HR (95 % KI)	p	HR (95 % KI)	p	HR (95 % KI)	p	HR (95 % KI)	p	HR (95 % KI)	p
Kontinuierliche Variablen										
log cFGF23 [rU/ml]	5,5 (3,6 - 8,3)	< 0,001	3,4 (2,0 - 5,8)	< 0,001	3,2 (1,9 - 5,4)	< 0,001	3,4 (2,0 - 5,7)	< 0,001	3,2 (1,9 - 5,6)	< 0,001
log iFGF23 [pg/ml]	4,1 (2,4 - 7,2)	< 0,001	1,2 (0,5 - 2,5)	0,725	1,3 (0,6 - 3,0)	0,557	1,6 (0,7 - 3,8)	0,304	1,1 (0,4 - 3,2)	0,792
log sKlotho [pg/ml]	0,5 (0,1 - 2,1)	0,351	1,0 (0,2 - 4,0)	0,968	1,0 (0,3 - 3,8)	0,998	0,7 (0,2 - 2,9)	0,638	0,5 (0,1 - 2,3)	0,388
Kategorisierte Variablen										
cFGF23										
2. Tertile	1,8 (0,9 - 3,8)	0,094	1,5 (0,7 - 3,1)	0,294	1,6 (0,8 - 3,4)	0,183	1,6 (0,8 - 3,3)	0,212	1,6 (0,8 - 3,4)	0,194
3. Tertile	6,5 (3,5 - 12,0)	< 0,001	3,9 (1,9 - 8,1)	< 0,001	4,6 (2,2 - 9,7)	< 0,001	4,4 (2,1 - 9,3)	< 0,001	4,4 (2,1 - 9,3)	< 0,001

Variable	Modell 1		Modell 2		Modell 3		Modell 4		Modell 5	
	HR (95 % KI)	p	HR (95 % KI)	p	HR (95 % KI)	p	HR (95 % KI)	p	HR (95 % KI)	p
iFGF23										
2. Tertile	1,5 (0,8 - 2,7)	0,239	1,2 (0,6 - 2,3)	0,564	1,7 (0,9 - 3,2)	0,121	1,5 (0,8 - 2,9)	0,217	1,6 (0,8 - 3,1)	0,175
3. Tertile	4,0 (2,3 - 7,0)	< 0,001	1,9 (1,0 - 3,8)	0,062	2,2 (1,1 - 4,5)	0,022	2,3 (1,1 - 4,6)	0,021	2,3 (1,1 - 4,7)	0,028
sKlotho										
2. Tertile	0,5 (0,3 - 0,9)	0,014	0,6 (0,4 - 1,0)	0,040	0,6 (0,4 - 1,0)	0,050	0,5 (0,3 - 0,9)	0,012	0,4 (0,3 - 0,7)	0,002
3. Tertile	0,6 (0,4 - 1,0)	0,061	0,8 (0,5 - 1,2)	0,257	0,8 (0,5 - 1,3)	0,433	0,7 (0,5 - 1,2)	0,216	0,7 (0,4 - 1,1)	0,133

Modell 1 = Univariate Analyse

Modell 2 = Adjustierung für eGFR und log Albuminurie

Modell 3 = Adjustierung für eGFR, log Albuminurie, Alter und Geschlecht

Modell 4 = Adjustierung für eGFR, log Albuminurie, Alter, Geschlecht, präv. Diabetes Mellitus und präv. kardiovaskuläre Erkrankung

Modell 5 = Adjustierung für eGFR, log Albuminurie, Alter, Geschlecht, präv. Diabetes Mellitus, präv. kardiovaskuläre Erkrankung, und CKD-MBD-Variablen (log sKlotho [bei Ausgangsvariable cFGF23 / iFGF23], log cFGF23 [bei Ausgangsvariable Klotho], Phosphor, FePi, Parathormon)

6. Diskussion

6.1. Die chronische Nierenerkrankung und kardiovaskuläres Risiko

Die chronische Nierenerkrankung wächst aufgrund ihrer steigenden Prävalenz zu einer zunehmenden medizinischen wie auch ökonomischen Herausforderung heran [33,90]. Chronisch nierenkranke Patienten sind dabei aber nicht allein durch ihre renalen Grunderkrankungen gefährdet, sondern weisen auch eine ausgeprägte extrarenale Komorbidität auf, in deren Zentrum ein massiv erhöhtes kardiovaskuläres Risiko steht [25,48].

Klassische atherosklerotische Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie oder Diabetes Mellitus haben bei chronisch nierenkranken Patienten eine erhöhte Prävalenz [121], was zunächst nahelegt, dass die hohe kardiovaskuläre Komorbidität dieser Patienten vorwiegend durch atherosklerotische Ereignisse bedingt ist. So steigt mit fortschreitender Nierenerkrankung die Inzidenz akuter Myokardinfarkte [22,104], zerebraler Insulte [88] und peripher-arterieller Verschlusskrankheiten [114,115] an.

Bei genauerer epidemiologischer Betrachtung konnte jedoch gezeigt werden, dass diese klassischen atherosklerotischen Risikofaktoren alleine gesehen das erhöhte Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse nur unvollständig erklären können [96]. Übereinstimmend damit können in der nierengesunden Bevölkerung etablierte Therapien zur Reduktion klassischer atherosklerotischer kardiovaskulärer Risikofaktoren das Outcome nierenkranker Patienten nur in einem erheblich verminderten Umfang verbessern [37,165,179].

Daher rücken myokardiale Erkrankungen als Erklärung der hohen kardiovaskulären Mortalität zunehmend in den Fokus der nephrologischen Forschung, da gezeigt werden konnte, dass chronisch nierenkranke Menschen ein substantiell erhöhtes Risiko haben, eine linksventrikuläre Hypertrophie [119], eine Herzinsuffizienz [78] und Vorhofflimmern [3,146] zu entwickeln. So weist der Datenreport des US Renal Data Systems (USRDS) aus dem Jahr 2014 die Herzinsuffizienz als häufigste kardiovaskuläre Erkrankung aus, die mit einer chronischen Nierenerkrankung in Verbindung steht [131].

Anders als die epidemiologisch sehr genau charakterisierten atherosklerotischen kardiovaskulären Risikofaktoren sind Risikofaktoren für myokardiale Erkrankungen jedoch wesentlich weniger präzise charakterisiert. Insbesondere bei chronisch nierenkranken Menschen sind die zugrundeliegenden pathophysiologischen Signalkaskaden, die zu einer

Myokardhypertrophie führen, nur wenig bekannt, obgleich sich diese Hypertrophie durchaus als Therapieziel für kardioprotektive Interventionen anbietet. So konnten London und Mitarb. [95] in der Nachbeobachtung einer Kohorte von Dialysepatienten über 5 Jahren zeigen, dass ein Rückgang einer linksventrikulären Hypertrophie um 10% mit einer Reduktion der kardiovaskulären Mortalität um 28% einhergeht.

Allerdings wurde in den letzten Jahren insbesondere der dysregulierte Mineral- und Knochenstoffwechsel chronisch nierenkranker Menschen („Chronic kidney disease - mineral and bone disorders; CKD-MBD“) als Ursache myokardialer Erkrankungen intensiv diskutiert. Die CKD-MBD ist insbesondere durch das Auftreten einer Hypovitaminose D, einer Hyperphosphatämie sowie eines sekundären Hyperparathyreoidismus [91] charakterisiert, wobei jede einzelne dieser Störungen in Längsschnittanalysen mit einer erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität assoziiert ist [79,152,161,168]. Experimentell konnten Hypovitaminose D, Hyperphosphatämie und sekundärer Hyperparathyreoidismus mit myokardialen Veränderungen assoziiert werden [111,134,171]. In Querschnittsanalysen waren höhere Phosphat- und Parathormonspiegel mit höherer linksventrikulärer Masse und höhere Vitamin-D-Spiegel mit niedrigerer linksventrikulärer Masse assoziiert [43,106,129]. Diese Untersuchungen legen daher nahe, dass eine Behandlung dieser Störungen eine wichtige Säule in der Therapie chronisch nierenkranker Patienten darstellen könnte, falls eine pharmakologische Intervention in der CKD-MBD über eine Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie in einer Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse resultiert.

Trotzdem erbrachten mehrere randomisiert-kontrollierte Studien, die sich auf die Therapie der Hypovitaminose D, des sekundären Hyperparathyreoidismus oder der Hyperphosphatämie fokussierten, keine kardiovaskuläre Risikoreduktion [12,20,153,162]. Daher sind in den letzten Jahren nicht-traditionelle Komponenten der CKD-MBD, insbesondere das phosphaturische Hormon FGF23, in den Fokus der kardiorenenalen Forschung gerückt.

6.2. Bedeutung von FGF23 und FGFR4 bei urämischer Kardiomyopathie

Mit der Entdeckung des phosphaturisch wirksamen Hormons FGF23 konnte das Verständnis des gestörten Mineral- und Knochenstoffwechsels bei chronisch nierenkranken Patienten substantiell verbessert werden. Die Serumspiegel von FGF23 steigen bereits zu Beginn einer chronischen Nierenerkrankung an [34] und verhindern zumindest in diesen frühen Phasen eine Hyperphosphatämie [71].

Allerdings konnten mehrere prospektive Studien bei chronisch nierenkranken Patienten einen vom Ausmaß der chronischen Nierenerkrankung und anderen Risikofaktoren unabhängigen Zusammenhang zwischen FGF23 und kardiovaskulären Ereignissen nachweisen [74,135,136]. Die bei chronisch nierenkranken Patienten in mehreren Kohortenstudien berichtete Assoziation von FGF23 mit der linksventrikulären Muskelmasse in Querschnittsanalysen [55] und mit inzidenter linksventrikulärer Hypertrophie in Längsschnittanalysen [36] deutet auf eine FGF23-induzierte Myokardhypertrophie als potentielle Erklärung für dieses erhöhte kardiovaskuläre Risiko hin. Prospektive Analysen unserer CARE FOR HOME-Kohorte konnten darüber hinaus FGF23 als unabhängigen Prädiktor von akut dekompensierten Herzinsuffizienzen identifizieren [138], was in der CRIC-Kohorte bestätigt werden konnte [135]. In beiden Studien war dabei die Assoziation mit dekompensierten Herzinsuffizienzen stärker als die mit atherosklerotischen kardiovaskulären Ereignissen.

In Einklang mit diesen klinisch-nephrologischen Studiendaten konnte auch in der Allgemeinbevölkerung und bei kardiovaskulären Risikopatienten eine Assoziation von FGF23-Spiegeln mit linksventrikulärer Hypertrophie in Querschnittsanalysen [105,137] und mit kardiovaskulären Ereignissen in Längsschnittanalysen [69,122] beobachtet werden. Ähnlich wie bei chronisch nierenkranken Menschen wurden auch in diesen Kohorten kardiale Dekompensationen besser als atherosklerotische kardiovaskuläre Ereignisse durch FGF23 vorhergesagt [69,122].

Aufgrund dieser starken Assoziationen sind potentielle Pathomechanismen, über die erhöhte FGF23-Spiegel zur linksventrikulären Hypertrophie beitragen können, Gegenstand der aktuellen Forschung. In diesem Kontext stellten Faul und Mitarb. die Hypothese einer direkten myokardialen Schädigung durch FGF23 über einen FGF-Rezeptor auf [36]. Sie konnten im Mausmodell beobachten, dass eine FGF23-Injektion eine linksventrikuläre Hypertrophie induziert, und dass eine Pan-FGFR-Blockade vor der Entwicklung einer solchen schützt. Di Marco und Mitarb. [27] konnten über diese präventive Wirkung hinaus eine therapeutische Wirkung des Pan-FGFR-Blockers in einem CKD-Mausmodell mit vorbestehender linksventrikulärer Hypertrophie nachweisen. Da jedoch ein Pan-FGFR-Blocker eingesetzt wurde, konnte der für die Hypertrophie maßgebliche Rezeptor zunächst jedoch nicht identifiziert werden. Grabner und Mitarb. spezifizierten in einer rezenten tierexperimentellen Studie [50] diese Hypothese näher, indem sie zeigten, dass FGF23 über die Aktivierung des FGF-Rezeptors 4 eine Myokardhypertrophie auslöst und umgekehrt eine spezifische Blockade von FGFR4 vor einer kardialen Hypertrophie schützt. Dabei wiesen sie nach, dass FGF23 über FGFR4 den PLC γ /Calcineurin/NFAT-Signalweg induziert, welcher als Regulator

pathologischer Myokardhypertrophie beschrieben wird [167]. Im Einklang mit diesen tierexperimentellen Daten konnten Leifheit-Nestler und Mitarb. [89] in einer Obduktionsstudie an 24 chronisch nierenkranken Patienten eine Assoziation zwischen linksventrikulärer Hypertrophie und vermehrter Expression von FGF23, FGFR4 und Calcineurin sowie der Aktivierung von NFAT nachweisen. Ebenfalls konnten Di Marco und Mitarb. [26] zeigen, dass eine systemische Blockade von Calcineurin in Mäusen, bei denen eine Nierenerkrankung induziert wurde, vor Entwicklung einer Hypertrophie schützt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde daher in der vorliegenden Dissertationsschrift die klinische Relevanz der Myokardschädigung durch FGFR4-Aktivierung mit einer Mendelschen Randomisierung überprüft. Demnach müsste eine genetische Variation, welche zu einer lebenslang erhöhten Aktivität von FGFR4 führt, bei einer klinisch relevanten kausalen Rolle von FGFR4 in der Genese der linksventrikulären Hypertrophie ebenso einen Effekt auf die linksventrikuläre Muskelmasse und das Auftreten kardialer Dekompensationen haben. Dieser Effekt sollte bei chronisch nierenkranken Menschen besonders ausgeprägt sein, da diese Patienten gegenüber nierengesunden Menschen durch erhöhte FGF23-Spiegel und eine erhöhte Prävalenz einer linksventrikulären Hypertrophie charakterisiert sind.

Wir untersuchten als Single Nucleotid Polymorphismus (SNP) des FGFR4-Gens die Variante Gly388Arg mit einem Austausch von Glycin zu Arginin an Position 388, die mit einer erhöhten Rezeptorstabilität und einer dauerhaften Aktivierung des FGFR4 assoziiert ist [164]. Sie wurde erstmals von Bange und Mitarb. [9] im Rahmen von Expressionsanalysen von Zelllinien des Mammakarzinoms beschrieben und ist seitdem der am besten untersuchte SNP des FGFR4-Gens. Er wurde unter anderem mit einer verschlechterten Prognose bei Mammakarzinom [9], Weichgewebskarzinom [107], Prostatakarzinom [174], Malignem Melanom [149], Bronchialkarzinom [147] und Kopf-Hals-Tumor [148] in Verbindung gebracht.

Wir überprüften nun daher in der vorgelegten Dissertationsschrift vor diesem Hintergrund die Assoziation verschiedener Genotypen des SNP Gly388Arg des FGF-Rezeptors 4 mit echokardiographischen Parametern der linksventrikulären Hypertrophie in der CARE FOR HOME-Kohorte. Unsere Hypothese lautete, dass bei chronisch nierenkranken Patienten eine Assoziation zwischen dem Trägerstatus für den SNP Gly388Arg, welche mit einer erhöhten Rezeptorstabilität und einer dauerhaften Aktivierung des FGFR4 assoziiert ist, in einem erhöhten LVMI bei Studieneinschluss und in einer stärkeren Zunahme des LVMI und einem erhöhten Risiko für kardiale Dekompensationen bei longitudinaler Nachbeobachtung mündet.

Die Verteilung der einzelnen Genotypen des Gly388Arg-SNPs in der CARE FOR HOME-Studie entspricht der Verteilung in zahlreichen onkologischen Kohorten- und Kontrollstudien aus der nierengesunden Bevölkerung [38,58,61,97,107,163].

Entgegen unserer Hypothese konnten wir in unserer CARE FOR HOME-Kohorte jedoch keine signifikante Assoziation zwischen dem SNP Gly388Arg mit der LVMI bei Studienbeginn, mit Veränderungen der LVMI in der fünfjährigen Nachbeobachtung und im Auftreten kardialer Dekompensationen nachweisen.

Die vorliegenden Daten suggerieren vielmehr, dass der FGF-Rezeptor 4 - und somit präsumtiv auch FGF23 selbst - keinen klinisch relevanten kausalen Effekt in der Genese der linksventrikulären Hypertrophie bei chronisch nierenkranken Menschen hat.

Die nur schwache Korrelation zwischen FGF23 bei Studienbeginn mit LVMI und LAVI sowie die fehlende Korrelation zwischen FGF23 mit Veränderungen von LVMI und LAVI im mehrjährigen Studienverlauf stehen ebenfalls im Gegensatz zu einer pathophysiologisch relevanten Rolle von FGF23 in der Genese der linksventrikulären Hypertrophie bei chronisch nierenkranken Menschen.

6.3. Pathomechanismen einer FGF23-induzierten Myokardschädigung

Die Ergebnisse unserer Mendelschen Randomisierung stehen in scheinbarem Widerspruch zu früheren Untersuchungen bei chronisch nierenkranken Menschen, insbesondere zu früheren Auswertungen von CARE FOR HOME [138] und CRIC [135], bei denen eine von der Nierenfunktion unabhängige Assoziation zwischen FGF23-Spiegeln und einer kardialen Dekompensationen als wichtige Langzeitkomplikation der linksventrikulären Hypertrophie nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse erfordern einen detaillierten Blick auf potentiell pathologische Effekte von FGF23 auf das kardiovaskuläre System und die Frage, inwiefern hohe FGF23-Spiegel eine Myokardhypertrophie bedingen.

Eine mögliche Erklärung dieser diskrepanten Ergebnisse wären kardiotoxische Wirkungen von FGF23, welche nicht über FGFR4 vermittelt werden. So spielt beispielsweise eine gestörte Natriurese in der Pathogenese der Herzinsuffizienz eine zentrale Rolle [103]. Andrukhova und Mitarb. [4] konnten tierexperimentell zeigen, dass FGF23 ein elementarer Regulator der Natrium-Reabsorption durch den Na-Cl-Cotransporter NCC im distalen Tubulus ist. Bei FGF23-Mangel zeigte sich eine reduzierte Natrium-Reabsorption, wohingegen bei Verabreichung von rekombinantem FGF23 eine vermehrte Natrium-Reabsorption auftrat, welche wiederum zu Volumenüberladung, Bluthochdruck und kardialer Hypertrophie führte.

Weiterhin konnten Dai und Mitarb. [24] in einer tierexperimentellen Studie nachweisen, dass FGF23 die Expression von ACE2 hemmt, einem bekannten negativen Regulator des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) [53]. Dies ist insofern relevant, da die medikamentöse Hemmung dieses Systems eine entscheidende Rolle der pharmakologischen Herzinsuffizienztherapie darstellt [125] und Patienten mit erhöhtem FGF23 mehr von einer Therapie mit ACE-Hemmern profitieren als Patienten mit niedrigerem FGF23 [156].

Schließlich kann FGF23 proinflammatorische Effekte über eine Stimulation von Zytokinen wie den Tumornekrosefaktor alpha (TNF-alpha) [56] ausüben, welche ebenfalls pathogenetisch zur Entstehung und Progredienz der Herzinsuffizienz beitragen können [28]. Insbesondere TNF-alpha vermag zumindest tierexperimentell eine kardiale Hypertrophie zu vermitteln [150].

Es ist somit nicht auszuschließen, dass neben potenziellen direkten FGFR4-vermittelten kardialen Effekten von FGF23 dessen postulierte systemische Effekte auf Volumenregulation, Stimulierung des RAAS oder Inflammation zur urämischen Kardiomyopathie beitragen.

Eine alternative Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse zwischen unserer Mendelschen Randomisationsstudie und früheren epidemiologischen und experimentellen Daten könnte sein, dass FGF23 keine eigenständigen kardiotoxischen Effekte aufweist.

So existieren neben Kohortenstudien, die in Querschnittsanalysen Plasma-FGF23-Spiegel mit der linksventrikulären Masse assoziieren konnten [55,105,137] auch epidemiologische Studien bei nierengesunden Menschen und nierenkranken Patienten, in denen eine Assoziation zwischen FGF23 und Parametern kardialer Hypertrophie gänzlich fehlte. So konnten Agarwal und Mitarb. [2] in einer Kohorte von 887 Patienten der Heart and Soul Study, die an einer koronaren Herzkrankheit leiden, zeigen, dass der Plasma-FGF23-Spiegel weder mit konzentrischer noch mit exzentrischer Hypertrophie assoziiert ist. Es zeigte sich lediglich bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion eine Assoziation zur konzentrischen Hypertrophie. Sinha und Mitarb. [143] konnten in einer Kohorte von 83 Kindern mit vorliegender CKD in den Graden G3 bis G5 zeigen, dass FGF23 nicht mit der LVMI assoziiert ist. Unsal und Mitarb. [159] konnten in einer Kohorte von 185 chronisch nierenkranken Patienten keine Korrelation zwischen FGF23, dem LVMI und der LVH finden. Auch konnten Takashi und Mitarb. [151] bei 24 erwachsenen Patienten mit verschiedenen Arten von hypophosphatämischer Rachitis und erhöhten Plasmaspiegeln von intaktem FGF23 keine vermehrt auftretende linksventrikuläre Hypertrophie beobachten. Chue und Mitarb. [21] zeigten darüber hinaus in einer randomisierten Studie an 120 CKD-Patienten der GFR-Kategorie G3, dass die Gabe von Sevelamer zwar die FGF23-Spiegel senkt, aber keinen Einfluss auf kardiale Hypertrophie oder Funktion hat.

Auch einige tierexperimentelle Studien hinterfragen das Konzept einer FGF23-induzierten kardialen Hypertrophie. Shalhoub und Mitarb. [139] konnten in einem tierexperimentellen Modell der CKD (5/6-Nephrektomie) durch den Einsatz eines inaktivierenden FGF23-Antikörpers keinen Effekt auf die LVH nachweisen. Diese Studie steht im Widerspruch zu den von Faul und Mitarb. [36] und Grabner und Mitarb. [50] beobachteten Effekten, welche allerdings eine unspezifische [36] respektive spezifische [50] Blockade des FGF23-Rezeptors anstelle einer Inaktivierung von FGF23 selbst vornahm. Somit könnten anstelle der Hemmung einer FGF23-Wirkung auch die Inhibition der Interaktion anderer Bindungspartner mit dem FGF23-Rezeptor ursächlich für die beobachtete Kardioprotektion sein.

Maizel und Mitarb. [99] konnten in einer tierexperimentellen Studie zeigen, dass die Behandlung mit dem Phosphatbinder Sevelamer Phosphat- und FGF23-Spiegel senkt und auch der Progression einer LVH vorbeugt. In multiplen Regressionsanalysen zeigte sich jedoch, dass nur die Phosphat-Spiegel, jedoch nicht die FGF23-Spiegel, unabhängig mit der LVMI korrelierten. Diese Daten suggerieren, dass der phosphatsenkende Effekt von Sevelamer stärker als dessen FGF23-senkender Effekt für das kardiovaskuläre Benefit verantwortlich erscheint.

Tierexperimentell konnten Slavic und Mitarb. [145] im Mausmodell nachweisen, dass eine genetische Ablation von FGF23 die Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie in einem Modell einer durch Aortenkonstriktion induzierten Drucküberladung nicht verhindert. Pastor-Arroyo und Mitarb. [123] analysierten weiterhin ein Mausmodell für die x-chromosomale hypophosphatämische Rachitis; die betroffenen Mäuse haben bei einer normalen Nierenfunktion erhöhtes Plasma-FGF23. Dabei wiesen diese Mäuse gegenüber Wildtypmäusen weder eine linksventrikuläre Hypertrophie oder Einschränkungen der Herzfunktion noch eine Aktivierung des Calcineurin-/NFAT-Signalweges auf.

Vielmehr könnten erhöhte FGF23-Spiegel möglicherweise ein bloßer Reflektor einer erhöhten kardiovaskulären Komorbidität von Patienten mit hohem Risiko für linksventrikuläre Hypertrophie und für myokardiale Ereignisse sein. Die eigentlichen pathophysiologischen Signalkaskaden umfassen demnach nicht FGF23, sondern andere Mediatoren, die epidemiologisch - aber nicht kausal - mit erhöhten FGF23-Spiegeln assoziiert sind.

So suggerieren präklinische Daten, dass ein Eisenmangel eine FGF23-Sekretion stimuliert [35], was in einer klinischen Studie von Wolf und Mitarb. an Frauen mit Eisenmangel bestätigt werden konnte [169]. In dieser klinischen Studie zeigte sich allerdings nur ein signifikanter Anstieg von Plasma-cFGF23-Spiegeln bei gleichbleibenden Plasma-iFGF23-Spiegeln, was durch ein vermehrtes intrazelluläres Splicing von iFGF23 zu inaktiven Bruchstücken im Kontext des Eisenmangels erklärt werden kann [170].

Weiterhin legen präklinische Daten nahe, dass auch myokardiale Erkrankungen wie eine linksventrikuläre Hypertrophie [100] oder eine Herzinsuffizienz [128] die FGF23-Sekretion stimuliert. In diesem Kontext konnte auch in klinischen Studien nachgewiesen werden, dass Patienten mit kardiogenem Schock hohe FGF23-Spiegel vorweisen [46,126].

In der Zusammenschau all dieser Studien erscheint uns fraglich, dass FGF23 über die Aktivierung des FGF-Rezeptors 4 klinisch relevante kardiotoxische Effekte ausübt. Unsere Daten suggerieren vielmehr, in Einklang mit mehreren rezenten epidemiologischen und experimentellen Studien, dass erhöhte FGF23-Spiegel bei chronisch nierenkranken Patienten eher eine gesteigerte kardiovaskuläre Komorbidität repräsentieren als einen eigenständigen Schädigungsfaktor darstellen.

6.4. Rolle von sKlotho bei urämischer Kardiomyopathie

Das Transmembranprotein Klotho wird in verschiedenen Organen einschließlich der Niere exprimiert und fungiert als Korezeptor für FGF23, indem es dessen Affinität für FGF-Rezeptoren erhöht und somit dessen physiologische Effekte vermittelt [84]. Bei einer chronischen Nierenerkrankung kommt es zu einer Reduktion der Klotho-exprimierenden Tubulusepithelzellen, welche einen bereits in frühen CKD-Stadien vorliegenden Serum-Klotho-Mangel zur Folge hat [62,77,124]. Mäuse, die homozygot für ein hypomorphes Klotho-Allel sind und dadurch einen Klotho-Mangel aufweisen, entwickeln einen schweren Altersphänotyp mit verkürzter Lebensdauer, Atherosklerose und Osteoporose [81].

Durch alternatives Splicen entsteht die lösliche Form von Klotho (soluble Klotho, sKlotho oder sKL), welche anschließend in die Blutzirkulation freigegeben wird. Eine reduzierte renale Expression von Membran-gebundenem Klotho ist sowohl im Tiermodell als auch in humanen Studien von einer Abnahme von sKlotho-Spiegeln begleitet [10,63–65,130].

Rezente tierexperimentelle Studien legen nahe, dass sKlotho Kardiomyozyten vor Stress-induziertem Calcium-Signaling und dadurch vor einer Hypertrophie schützen kann. So konnten Xie und Mitarb. zunächst zeigen [172], dass Klotho durch die Herabregulierung des Kationenkanals TRPC6 im Herzen kardioprotektive Effekte erzielt, weshalb Mäuse mit einem Klotho-Mangel eine kardiale Hypertrophie entwickeln. In nachfolgenden Tierexperimenten konnten sie diese Ergebnisse erweitern und aufzeigen [173], dass Mäuse mit Klotho-Mangel unabhängig von Plasma-FGF23-Spiegeln eine kardiale Hypertrophie entwickeln. Hu und Mitarb. [64] konnten zeigen, dass im Tiermodell hohe FGF23-Spiegel nur bei gleichzeitigem Klotho-Mangel mit dem Ausmaß kardialer Hypertrophie korrelierten. Sie konnten darüber

hinaus eine Inhibierung der Angiotensin-II- und TGF-beta-induzierten kardialen Hypertrophie durch sKlotho zeigen. Weiterhin haben Yang und Mitarb. [177] einen inhibierenden Effekt von Klotho auf eine durch das Urämietoxin Indoxylsulfat induzierte Hypertrophie in kultivierten Kardiomyozyten beobachtet.

In Anbetracht dieser Studien wurde in der vorliegenden Dissertationsschrift die klinische Relevanz der Myokardschädigung durch einen sKlotho-Mangel mit einer weiteren zweiten Mendelschen Randomisierung überprüft. Wenn die experimentell postulierte Kardioprotektion durch sKlotho klinisch relevant ist, müsste eine genetische Variation, welche zu einer lebenslang verstärkten Aktivität von Klotho führt, einen protektiven Effekt auf die linksventrikuläre Muskelmasse und kardiovaskuläres Überleben haben.

Dazu wurde die Assoziation verschiedener Genotypen des SNPs Phe352Val in der CARE FOR HOME-Kohorte überprüft. Arking und Mitarb. [5] konnten 2002 ein Allel auf dem Klotho-Gen mit dem Namen „Klotho-VS“ (KL-VS) identifizieren, welches aus sechs aufeinanderfolgenden SNPs in einem kompletten Linkage Disequilibrium besteht. Zwei dieser SNPs resultieren in Aminosäure-Austauschen: F352V / Phe352Val (rs9536314) und C370S / Cys370Ser (rs9527025). Die Phe352Val-Mutation ist experimentell mit einer veränderten Dimerisierung [154] und in klinischen Studien erhöhten extrazellulären Spiegeln von Klotho [5,32] assoziiert. Aufgrund des kompletten Linkage Disequilibriums der sechs aufeinanderfolgenden SNPs kann durch die Bestimmung des SNP Phe352Val (Phenylalanin zu Valin an Pos. 352) das Allel KL-VS identifiziert werden.

Arking und Mitarb. [5,7] konnten das KL-VS-Allel als Variante identifizieren, die bei heterozygotem Vorliegen in Querschnittsanalysen mit höheren Plasma-HDL-Cholesterin und niedrigerem arteriellen Blutdruck assoziiert und in retrospektiven Analysen mit niedrigerer Schlaganfallsrate und höherem Gesamtüberleben assoziiert ist. In prospektiven Analysen hatten Träger der heterozygoten Variante ein verlängertes Gesamtüberleben [7]. Epidemiologische Studien suggerieren weiterhin, dass die homozygote Variante von KL-VS erstaunlicherweise ein verfrühtes Auftreten von atherosklerotischen Erkrankungen wie der koronaren Herzkrankheit prädiziert [6,30].

Ähnlich wie für den SNP Gly388Arg, entspricht auch die Verteilung der einzelnen Genotypen des SNP Phe352Val in CARE FOR relativ genau dessen Verteilung in mehreren Kohorten- und Kontrollstudien aus der nierengesunden Allgemeinbevölkerung [6,112,113].

Allerdings waren in der vorliegenden Dissertationsschrift - anders als bei Arking und Mitarb. [5] und Dubal und Mitarb. [32] - die verschiedenen Genotypen des Phe352Val-SNPs nicht mit veränderten Plasma-sKlotho-Spiegeln assoziiert, welches potentiell auf die im Folgenden

diskutierten technischen Limitationen des ELISA zur Bestimmung von Plasma Klotho erklärt werden könnte.

Entgegen unseren Studienhypothesen konnten wir in unserer CARE FOR HOME-Kohorte keine signifikante Assoziation der Genotypen FF, FV oder VV des SNPs Phe352Val mit dem LVMI bei Studienbeginn, mit Veränderungen der LVMI im Studienverlauf oder mit dem Auftreten kardialer Dekompensationen finden. Auch war Plasma-sKlotho- zwar invers mit LVMI und LAVI korreliert, allerdings dürfen diese Korrelationskoeffizienten allenfalls als schwach betrachtet werden ($r = -0,134$ und $r = -0,119$). Darüber hinaus zeigte sKlotho keine signifikante Korrelation mit Veränderungen von LVMI und LAVI im zeitlichen Verlauf.

6.5. Protektive Effekte von Klotho und sKlotho

Ähnlich wie bei der Mendelschen Randomisierung mit dem FGFR4-SNP Gly388Arg stehen unsere Daten zum Klotho-SNP Phe352Val in vermeintlichem Widerspruch zur Evidenz aus den tierexperimentellen Studien, die kardioprotektive Effekte von sKlotho suggerieren.

Allerdings konnte in mehreren epidemiologischen Studien ebenso wenig eine prognostische Bedeutung von Plasma-sKlotho-Spiegeln erkannt werden.

So fanden weder Buiten und Mitarb. [16] in einer Kohorte von 127 Dialysepatienten noch Brandenburg und Mitarb. [14] in der LURIC-Kohorte mit 2948 kardiovaskulären Risikopatienten oder Shibata und Mitarb. [140] in einer Kohorte von 100 kardiologischen Patienten eine Assoziation zwischen Plasma-sKlotho-Spiegeln und linksventrikulärer Masse oder Funktion.

In vorherigen Analysen aus CARE FOR HOME mit deutlich kürzerer Nachbeobachtungszeit konnten Seiler und Mitarb. keine unabhängige Assoziation von sKlotho-Spiegeln zu Studienbeginn und kardialen Dekompensationen nachweisen [138]. In der vorliegenden Promotionsschrift wurden diese Überlebensanalysen erneut durchgeführt, wobei die Nachbeobachtungszeit nun auf 5,1 Jahre erhöht werden konnte. Dabei konnte nun eine signifikante Assoziation zwischen sKlotho-Spiegeln und kardialen Dekompensationen gezeigt werden. Im Vergleich zu Patienten in der niedrigsten sKlotho-Tertile haben Patienten in der mittleren sKlotho-Tertile ein signifikant vermindertes Risiko für kardiale Dekompensationen in der univariaten Analyse (HR 0,5; 95 % KI 0,3 - 0,9) und im volladjustierten Modell (HR 0,4; 95 % KI 0,3 - 0,7). Allerdings unterschieden sich die Patienten in der ersten und dritten sKlotho-Tertile nicht, und bei Betrachtungen als kontinuierliche Variable anstatt als kategorisierte Variable ist sKlotho weder in univariater noch in multivariater Analyse Prädiktor

von kardialen Dekompensationen. Somit können wir nicht ausschließen, dass die signifikante Prognoseverbesserung in der zweiten sKlotho-Tertile bloßer Ausdruck eines statistischen Zufalls ist, welcher bei dem von uns gewählten Studienmodell ohne Korrektur der Signifikanz für multiples Testen bedacht werden muss.

Diese Diskrepanz zwischen humanen und experimentellen Studien zur Bedeutung von sKlotho kann zu einem gewissen Teil durch technische Limitationen des Klotho-Assays erklärt werden. So ist beschrieben, dass die kommerziell verfügbaren Antikörper gegen Klotho relativ unspezifisch sind und mit anderen Proteinen kreuzreagieren können [10] und dass sich die verfügbaren Assays stark in ihrer Qualität [57] unterscheiden. Weiterhin ist beschrieben, dass das sKlotho-Protein im urämischen Blut höchstgradig instabil zu sein scheint [65]. Ein neuer Antikörper, genannt *sb106*, könnte bezüglich dieses Problems in Zukunft Abhilfe schaffen [10] und eine genauere Analyse ermöglichen.

Kuro-O und Mitarb. stellten bei der Erstbeschreibung des Klotho-Proteins [81] fest, dass Klotho zwar in der Niere und anderen Organen exprimiert wird, jedoch nicht im Herzen. Ohyama und Mitarb. [116] sowie Faul und Mitarb. [36] konnten dies in ihren Tiermodellen bestätigen. Demzufolge kann ein Mangel der membrangebundenen Form von Klotho auch nicht auf direktem Weg zu einer Hypertrophie von Kardiomyozyten führen. Vielmehr könnte sKlotho ähnlich wie Erythropoetin und 1,25-OH Vitamin D ein vorwiegend von den Nieren produzierte Hormon darstellen und eine verminderte renale Klotho-Expression trüge über vermindertes Splicing und konsekutiv verminderte Plasma-sKlotho-Spiegel indirekt zu einer Induktion linksventrikulärer Hypertrophie bei. Dennoch ist es bis heute nicht gelungen, einen eigenständigen Rezeptor für sKlotho zu identifizieren. Es konnte gezeigt werden, dass sKlotho an den TGF- β Typ II-Rezeptor [29] sowie an den FGF-Rezeptor 1 [52] binden kann und diese auch blocken kann, wodurch fibrotische Effekte von TGF- β und FGF2 kompetitiv gehemmt werden.

In neueren Studien wurde nun das Konzept aufgegriffen, dass sKlotho als zirkulierender Inhibitor für FGF23 fungiert. So konnten Six und Mitarb. [144] in tierexperimentellen Studien nachweisen, dass sKlotho schädliche Effekte von FGF23 auf das Endothel lindert.

In Gesamtschau besteht dennoch bei kritischer Betrachtung der vorhandenen Studienlage weiterhin Unklarheit darüber, ob sKlotho tatsächlich klinisch relevante kardioprotektive Effekte bei chronisch nierenkranken Patienten bewirkt.

6.6. Limitationen

Gegenüber der Echokardiographie stellt die kardiale Magnetresonanztomographie eine akkuratere und besser reproduzierbare Untersuchungsmethode zur Bestimmung der Herzmasse dar [8]. Dennoch erfolgte die Bestimmung der linksventrikulären Masse in CARE FOR HOME echokardiographisch. Die Echokardiographie ist eine kostengünstige, organisatorisch einfach durchführbare und gut tolerierte Untersuchung. Zudem wurden die Untersuchungen nur durch einen einzigen Untersucher nach den Empfehlungen der American Society of Echocardiography durchgeführt, um eine möglichst gute Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Weiterhin weist CARE FOR HOME für eine Mendelsche Randomisierung eine geringe Patientenzahl auf und es erfolgte keine Poweranalyse durch Bestimmung der Kohortengröße. Da Polymorphismen häufig nur einen vergleichsweise kleinen Effekt auf die betreffende Exposition haben, sollten präferenziell sehr große Kohorten rekrutiert werden, um eine Kausalität aufzudecken [87]. Allerdings müssen solche großen Kohorten meist multizentrisch rekrutiert werden, was aus studienorganisatorischen Gründen eine parallele repetitive Erhebung echokardiographischer Daten erschwert. CARE FOR HOME ist unseres Wissens nach die größte monozentrische prospektive Studie bei nicht-dialysepflichtigen Patienten mit chronischer Nierenerkrankung, so dass unsere Studienhypothesen momentan nicht in einem deutlich größeren Studienkollektiv überprüft werden können. Größere Kohorten aus der Allgemeinbevölkerung erscheinen zur Beantwortung der Fragestellung ebenfalls nicht zwingend überlegen, da Plasma-FGF23 in der Allgemeinbevölkerung deutlich niedriger als bei chronisch nierenkranken Menschen ist und somit auch bei aktiveren FGF-Rezeptoren weniger zur Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie beizutragen vermag.

Weiterhin wurde in CARE FOR HOME erst ab Februar 2010 Vollblut zur DNA-Analyse asserviert. Daher erfolgte bei 199 Patienten, die zuvor rekrutiert wurden, die Asservierung von Vollblut erst bei einer Nachuntersuchung; Patienten, die sich nicht zur Nachuntersuchung einfanden konnten, wurden somit nicht in die Genotypisierungsuntersuchungen von CARE FOR HOME eingeschlossen, weshalb besonders kranke Patienten unterrepräsentiert wurden. Weiterhin erfolgte aus logistischen Gründen weder bei Studieneinschluss noch zum Zeitpunkt von 5 Jahren nach Einschluss bei allen Studienteilnehmern eine Echokardiographie.

Schließlich kann die Auswahl der untersuchten Polymorphismen kritisch diskutiert werden: So können wir keinen Beweis erbringen, dass die untersuchten SNPs mit einer erhöhten Aktivität des FGF-Rezeptors 4 respektive einer vermehrten Expression von sKlotho assoziiert sind. Der in CARE FOR HOME untersuchte SNP Gly388Arg ist jedoch der am besten erforschte SNP

auf dem FGFR4-Gen und in anderen Kohortenstudien mit erhöhter Rezeptorstabilität und vermindertem Überleben bei malignen Erkrankungen assoziiert. Ebenso ist der untersuchte SNP Phe352Val respektive die KL-VS-Variante in vorherigen Studien mit erhöhten Spiegeln von sKlotho sowie mit erhöhtem Gesamtüberleben assoziiert. Erstaunlicherweise war KL-VS in unserer Studie - anders als bei Arking und Mitarb. [5] und Dubal und Mitarb. [32] - nicht mit erhöhtem Plasma Klotho assoziiert. Wir postulieren allerdings, dass diese Unterschiede mit der bereits oben erläuterten Schwierigkeit einer zuverlässigen Bestimmung von sKlotho mit konventionellen ELISA erklärt werden könnte.

Wang und Mitarb. [164] konnten für den FGF-Rezeptor 4 bei homozygotem Gly388Arg-SNP eine erhöhte Rezeptorstabilität und eine dauerhafte Aktivierung feststellen. Bange und Mitarb. [9] konnten jedoch für den FGF-Rezeptor 4 bei homozygotem Gly388Arg-SNP keine vermehrte Tyrosinkinase-Aktivität zeigen, was darauf hindeutet, dass die Eigenschaften dieser Variante als Rezeptortyrosinkinase nur geringfügig verändert sind und daher die erhöhte Rezeptoraktivität nicht davon stammt. Ulaganathan und Mitarb. [157] konnten in einer rezenten Studie jedoch einen Gain-of-Function-Effekt des FGF-Rezeptors 4 bei homozygotem Gly388Arg-SNP durch eine freigelegte Bindungsstelle für STAT3 nachweisen, die indirekt eine Zellproliferation stimuliert [158]. STAT3 hat am Herzen sowohl experimentell nachgewiesene prohypertrophische [80] als auch erstaunlicherweise protektive Effekte [60,117]. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass das homozygote Vorliegen des SNPs Gly388Arg zwar eine vermehrte Schädigung des Herzens durch eine vermehrte Aktivität des FGF-Rezeptors 4 bewirkt, diese verstärkte Schädigung sich jedoch durch potentiell kardioprotektive Eigenschaften von STAT3 nicht in klinisch messbaren Parametern zeigt. Ein anderer SNP, eventuell mit experimentell nachgewiesener Änderung der Rezeptortyrosinkinase-Aktivität, könnte diese Limitation beheben.

6.7. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorgelegten Dissertationsschrift konnte aufgezeigt werden, dass genetische Varianten von FGFR4 und Klotho bei chronisch nierenkranken Patienten nicht mit einem erhöhtem linksventrikulären Muskelmassenindex und nicht mit einem erhöhten Risiko für kardiale Dekompensationen assoziiert sind. Diese Ergebnisse widersprechen der Hypothese, dass FGFR4 und sKlotho kausal an der Entstehung einer linksventrikulären Hypertrophie beteiligt sind.

Diese Beobachtung unterstreicht, dass Ergebnisse präklinischer Studien nicht unkritisch Einzug in die klinische Nephrologie halten sollten. Insbesondere sollten auf Basis solcher experimentellen Untersuchungen nicht vorschnell pharmakologische Interventionen mit präsumtiv kardioprotektiven Effekten definiert werden. Vielmehr müssen zunächst die Zusammenhänge zwischen FGF23, Klotho und kardialer Hypertrophie bei chronisch nierenkranken Patienten in Beobachtungsstudien in weiteren Kohorten präzise und detailliert untersucht werden. Dazu erscheint es sinnvoll, zunächst Mendelsche Randomisierungen in noch deutlich größeren Kohorten chronisch nierenkranker Menschen durchzuführen, idealerweise mit kardialen Magnetresonanz-Untersuchungen anstelle von echokardiographischen Untersuchungen zur Bestimmung der linksventrikulären Muskelmasse. Auch bieten sich für künftige Studien die Bestimmung weiterer SNPs an, die im Verdacht stehen, eine Aktivitäts- oder Expressionsänderung von FGFR4 und Klotho zu bewirken. So existiert mit der Variante G395A in der Promotorregion von Klotho ein SNP, für den eine Assoziation mit der Klotho-Expression in Gefäßgewebe nachgewiesen werden konnte [30]. Weiterführend kann auch das Erstellen eines genetischen Risikoscores hilfreich sein [118].

Erst wenn hierbei eine direkte pathophysiologische Bedeutung von sKlotho oder FGF23 evident wird, sollten Interventionsstudien in der klinischen Nephrologie definiert werden. Hierbei erscheint eine randomisierte Doppelblindstudie, die den Effekt von FGFR4-Blockern oder rekombinantem sKlotho auf das kardiovaskuläre Überleben untersucht, als beste Methode, um die Hypothese der Induktion einer linksventrikulären Hypertrophie durch FGFR4-Aktivierung bzw. sKlotho-Mangel zu überprüfen.

7. Literaturverzeichnis

1. ADHR Consortium (2000) Autosomal dominant hypophosphataemic rickets is associated with mutations in FGF23. *Nat Genet* 26:345–348
2. Agarwal I, Ide N, Ix JH, Kestenbaum B, Lanske B, Schiller NB, Whooley MA, Mukamal KJ (2014) Fibroblast growth factor-23 and cardiac structure and function. *J Am Heart Assoc* 3:e000584
3. Alonso A, Lopez FL, Matsushita K, Loehr LR, Agarwal SK, Chen LY, Soliman EZ, Astor BC, Coresh J (2011) Chronic kidney disease is associated with the incidence of atrial fibrillation: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 123:2946–2953
4. Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, Zeitz U, Shalhoub V, Lanske B, Pohl EE, Erben RG (2014) FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Mol Med* 6:744–759
5. Arking DE, Krebsova A, Macek MS, Macek MJ, Arking A, Mian IS, Fried L, Hamosh A, Dey S, McIntosh I, Dietz HC (2002) Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:856–861
6. Arking DE, Becker DM, Yanek LR, Fallin D, Judge DP, Moy TF, Becker LC, Dietz HC (2003) KLOTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 72:1154–1161
7. Arking DE, Atzmon G, Arking A, Barzilai N, Dietz HC (2005) Association between a functional variant of the KLOTHO gene and high-density lipoprotein cholesterol, blood pressure, stroke, and longevity. *Circ Res* 96:412–418
8. Armstrong AC, Gidding S, Gjesdal O, Wu C, Bluemke DA, Lima JAC (2012) LV mass assessed by echocardiography and CMR, cardiovascular outcomes, and medical practice. *JACC Cardiovasc Imaging* 5:837–848
9. Bange J, Prechtel D, Cheburkin Y, Specht K, Harbeck N, Schmitt M, Knyazeva T, Muller S, Gartner S, Sures I, Wang H, Imyanitov E, Haring H-U, Knayzev P, Iacobelli S, Hofler H, Ullrich A (2002) Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res* 62:840–847
10. Barker SL, Pastor J, Carranza D, Quinones H, Griffith C, Goetz R, Mohammadi M, Ye J, Zhang J, Hu MC, Kuro-o M, Moe OW, Sidhu SS (2015) The demonstration of

- alphaKlotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody. *Nephrol Dial Transplant* 30:223–233
11. Bennett DA, Holmes M V (2017) Mendelian randomisation in cardiovascular research: an introduction for clinicians. *Heart* 103:1400–1407
 12. Block GA, Wheeler DC, Persky MS, Kestenbaum B, Ketteler M, Spiegel DM, Allison MA, Asplin J, Smits G, Hoofnagle AN, Kooienga L, Thadhani R, Mannstadt M, Wolf M, Chertow GM (2012) Effects of phosphate binders in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol* 23:1407–1415
 13. Brandenburg VM, Kleber ME, Vervloet MG, Tomaschitz A, Pilz S, Stojakovic T, Delgado G, Grammer TB, Marx N, Marz W, Scharnagl H (2014) Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis* 237:53–59
 14. Brandenburg VM, Kleber ME, Vervloet MG, Larsson TE, Tomaschitz A, Pilz S, Stojakovic T, Delgado G, Grammer TB, Marx N, Marz W, Scharnagl H (2015) Soluble klotho and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis* 242:483–489
 15. Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene* 234:177–186
 16. Buiten MS, de Bie MK, Bouma-de Krijger A, van Dam B, Dekker FW, Jukema JW, Rabelink TJ, Rotmans JI (2014) Soluble Klotho is not independently associated with cardiovascular disease in a population of dialysis patients. *BMC Nephrol* 15:197
 17. Cha S-K, Hu M-C, Kurosu H, Kuro-o M, Moe O, Huang C-L (2009) Regulation of renal outer medullary potassium channel and renal K(+) excretion by Klotho. *Mol Pharmacol* 76:38–46
 18. Chang Q, Hoefs S, van der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG (2005) The beta-glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science* 310:490–493
 19. Chatterjee S, Bavishi C, Sardar P, Agarwal V, Krishnamoorthy P, Grodzicki T, Messerli FH (2014) Meta-analysis of left ventricular hypertrophy and sustained arrhythmias. *Am J Cardiol* 114:1049–1052
 20. Chertow GM, Block GA, Correa-Rotter R, Drueke TB, Floege J, Goodman WG, Herzog CA, Kubo Y, London GM, Mahaffey KW, Mix TCH, Moe SM, Trotman M-L, Wheeler DC, Parfrey PS (2012) Effect of cinacalcet on cardiovascular disease in patients undergoing dialysis. *N Engl J Med* 367:2482–2494
 21. Chue CD, Townend JN, Moody WE, Zehnder D, Wall NA, Harper L, Edwards NC,

- Steeds RP, Ferro CJ (2013) Cardiovascular effects of sevelamer in stage 3 CKD. *J Am Soc Nephrol* 24:842–852
22. Collins AJ, Foley RN, Herzog C, Chavers B, Gilbertson D, Ishani A, Kasiske B, Liu J, Mau L-W, McBean M, Murray A, St Peter W, Guo H, Li Q, Li S, Li S, Peng Y, Qiu Y, Roberts T, Skeans M, Snyder J, Solid C, Wang C, Weinhandl E, Zaun D, Arko C, Chen S-C, Dalleska F, Daniels F, Dunning S, Ebben J, Frazier E, Hanzlik C, Johnson R, Sheets D, Wang X, Forrest B, Constantini E, Everson S, Eggers P, Agodoa L (2009) United States Renal Data System 2008 Annual Data Report. *Am J Kidney Dis* 53:S1-374
23. Collins R, Reith C, Emberson J, Armitage J, Baigent C, Blackwell L, Blumenthal R, Danesh J, Smith GD, DeMets D, Evans S, Law M, MacMahon S, Martin S, Neal B, Poulter N, Preiss D, Ridker P, Roberts I, Rodgers A, Sandercock P, Schulz K, Sever P, Simes J, Smeeth L, Wald N, Yusuf S, Peto R (2016) Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *Lancet (London, England)* 388:2532–2561
24. Dai B, David V, Martin A, Huang J, Li H, Jiao Y, Gu W, Quarles LD (2012) A comparative transcriptome analysis identifying FGF23 regulated genes in the kidney of a mouse CKD model. *PLoS One* 7:e44161
25. Dalrymple LS, Katz R, Kestenbaum B, Shlipak MG, Sarnak MJ, Stehman-Breen C, Seliger S, Siscovick D, Newman AB, Fried L (2011) Chronic kidney disease and the risk of end-stage renal disease versus death. *J Gen Intern Med* 26:379–385
26. Di Marco GS, Reuter S, Kentrup D, Ting L, Ting L, Grabner A, Jacobi AM, Pavenstädt H, Baba HA, Tiemann K, Brand M (2011) Cardioprotective effect of calcineurin inhibition in an animal model of renal disease. *Eur Heart J* 32:1935–1945
27. Di Marco GS, Reuter S, Kentrup D, Grabner A, Amaral AP, Fobker M, Stypmann J, Pavenstadt H, Wolf M, Faul C, Brand M (2014) Treatment of established left ventricular hypertrophy with fibroblast growth factor receptor blockade in an animal model of CKD. *Nephrol Dial Transplant* 29:2028–2035
28. Dick SA, Epelman S (2016) Chronic Heart Failure and Inflammation: What Do We Really Know? *Circ Res* 119:159–176
29. Doi S, Zou Y, Togao O, Pastor J V, John GB, Wang L, Shiizaki K, Gotschall R, Schiavi S, Yorioka N, Takahashi M, Boothman DA, Kuro-o M (2011) Klotho inhibits transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice. *J Biol Chem* 286:8655–8665
30. Donate-Correa J, Martin-Nunez E, Martinez-Sanz R, Muros-de-Fuentes M, Mora-Fernandez C, Perez-Delgado N, Navarro-Gonzalez JF (2016) Influence of Klotho gene

- polymorphisms on vascular gene expression and its relationship to cardiovascular disease. *J Cell Mol Med* 20:128–133
31. Drazner MH, Rame JE, Marino EK, Gottdiener JS, Kitzman DW, Gardin JM, Manolio TA, Dries DL, Siscovick DS (2004) Increased left ventricular mass is a risk factor for the development of a depressed left ventricular ejection fraction within five years: the Cardiovascular Health Study. *J Am Coll Cardiol* 43:2207–2215
 32. Dubal DB, Yokoyama JS, Zhu L, Broestl L, Worden K, Wang D, Sturm VE, Kim D, Klein E, Yu G-Q, Ho K, Eilertson KE, Yu L, Kuro-o M, De Jager PL, Coppola G, Small GW, Bennett DA, Kramer JH, Abraham CR, Miller BL, Mucke L (2014) Life extension factor klotho enhances cognition. *Cell Rep* 7:1065–1076
 33. Eckardt K-U, Coresh J, Devuyst O, Johnson RJ, Kottgen A, Levey AS, Levin A (2013) Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet* (London, England) 382:158–169
 34. Evenepoel P, Meijers B, Viaene L, Bammens B, Claes K, Kuypers D, Vanderschueren D, Vanrenterghem Y (2010) Fibroblast growth factor-23 in early chronic kidney disease: additional support in favor of a phosphate-centric paradigm for the pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol* 5:1268–1276
 35. Farrow EG, Yu X, Summers LJ, Davis SI, Fleet JC, Allen MR, Robling AG, Stayrook KR, Jideonwo V, Magers MJ, Garringer HJ, Vidal R, Chan RJ, Goodwin CB, Hui SL, Peacock M, White KE (2011) Iron deficiency drives an autosomal dominant hypophosphatemic rickets (ADHR) phenotype in fibroblast growth factor-23 (Fgf23) knock-in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:E1146-55
 36. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu M-C, Sloan A, Isakova T, Gutierrez OM, Aguillon-Prada R, Lincoln J, Hare JM, Mundel P, Morales A, Scialla J, Fischer M, Soliman EZ, Chen J, Go AS, Rosas SE, Nessel L, Townsend RR, Feldman HI, St John Sutton M, Ojo A, Gadegbeku C, Di Marco GS, Reuter S, Kentrup D, Tiemann K, Brand M, Hill JA, Moe OW, Kuro-O M, Kusek JW, Keane MG, Wolf M (2011) FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 121:4393–4408
 37. Fellstrom BC, Jardine AG, Schmieder RE, Holdaas H, Bannister K, Beutler J, Chae D-W, Chevaile A, Cobbe SM, Gronhagen-Riska C, De Lima JJ, Lins R, Mayer G, McMahon AW, Parving H-H, Remuzzi G, Samuelsson O, Sonkodi S, Sci D, Suleymanlar G, Tsakiris D, Tesar V, Todorov V, Wiecek A, Wuthrich RP, Gottlow M, Johnsson E, Zannad F (2009) Rosuvastatin and cardiovascular events in patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 360:1395–1407

38. FitzGerald LM, Karlins E, Karyadi DM, Kwon EM, Koopmeiners JS, Stanford JL, Ostrander EA (2009) Association of FGFR4 genetic polymorphisms with prostate cancer risk and prognosis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 12:192–197
39. Fliser D, Kollerits B, Neyer U, Ankerst DP, Lhotta K, Lingenhel A, Ritz E, Kronenberg F, Kuen E, Konig P, Kraatz G, Mann JFE, Muller GA, Kohler H, Riegler P (2007) Fibroblast growth factor 23 (FGF23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) Study. *J Am Soc Nephrol* 18:2600–2608
40. Flügge F (2011) Adiponektin-Subfraktionen und kardiovaskuläre Morbidität bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung.
41. Foley RN, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Martin CJ, Murray DC, Barre PE (1995) Clinical and echocardiographic disease in patients starting end-stage renal disease therapy. *Kidney Int* 47:186–192
42. Foley RN, Parfrey PS, Kent GM, Harnett JD, Murray DC, Barre PE (2000) Serial change in echocardiographic parameters and cardiac failure in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 11:912–916
43. Foley RN, Collins AJ, Herzog CA, Ishani A, Kalra PA (2009) Serum phosphate and left ventricular hypertrophy in young adults: the coronary artery risk development in young adults study. *Kidney Blood Press Res* 32:37–44
44. Fox CS, Matsushita K, Woodward M, Bilo HJG, Chalmers J, Heerspink HJL, Lee BJ, Perkins RM, Rossing P, Sairenchi T, Tonelli M, Vassalotti JA, Yamagishi K, Coresh J, de Jong PE, Wen C-P, Nelson RG (2012) Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without diabetes: a meta-analysis. *Lancet (London, England)* 380:1662–1673
45. Frei U, Schober-Halstenbeck H-J (2008) Nierenersatztherapie in Deutschland. Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007 QuaSi-Niere.
46. Fuernau G, Poss J, Denks D, Desch S, Heine GH, Eitel I, Seiler S, de Waha S, Ewen S, Link A, Schuler G, Adams V, Bohm M, Thiele H (2014) Fibroblast growth factor 23 in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock: a biomarker substudy of the Intraaortic Balloon Pump in Cardiogenic Shock II (IABP-SHOCK II) trial. *Crit Care* 18:713
47. Girndt M, Trocchi P, Scheidt-Nave C, Markau S, Stang A (2016) The Prevalence of Renal Failure. Results from the German Health Interview and Examination Survey for Adults, 2008-2011 (DEGS1). *Dtsch Arztebl Int* 113:85–91

48. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C (2004) Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351:1296–1305
49. Goetz R, Beenken A, Ibrahimi OA, Kalinina J, Olsen SK, Eliseenkova A V, Xu C, Neubert TA, Zhang F, Linhardt RJ, Yu X, White KE, Inagaki T, Kliewer SA, Yamamoto M, Kurosu H, Ogawa Y, Kuro-o M, Lanske B, Razzaque MS, Mohammadi M (2007) Molecular insights into the klotho-dependent, endocrine mode of action of fibroblast growth factor 19 subfamily members. *Mol Cell Biol* 27:3417–3428
50. Grabner A, Amaral AP, Schramm K, Singh S, Sloan A, Yanucil C, Li J, Shehadeh LA, Hare JM, David V, Martin A, Fornoni A, Di Marco GS, Kentrup D, Reuter S, Mayer AB, Pavenstadt H, Stypmann J, Kuhn C, Hille S, Frey N, Leifheit-Nestler M, Richter B, Haffner D, Abraham R, Bange J, Sperl B, Ullrich A, Brand M, Wolf M, Faul C (2015) Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab* 22:1020–1032
51. Grabner A, Faul C (2016) The role of fibroblast growth factor 23 and Klotho in uremic cardiomyopathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 25:314–324
52. Guan X, Nie L, He T, Yang K, Xiao T, Wang S, Huang Y, Zhang J, Wang J, Sharma K, Liu Y, Zhao J (2014) Klotho suppresses renal tubulo-interstitial fibrosis by controlling basic fibroblast growth factor-2 signalling. *J Pathol* 234:560–572
53. Gurley SB, Allred A, Le TH, Griffiths R, Mao L, Philip N, Haystead TA, Donoghue M, Breitbart RE, Acton SL, Rockman HA, Coffman TM (2006) Altered blood pressure responses and normal cardiac phenotype in ACE2-null mice. *J Clin Invest* 116:2218–2225
54. Gutierrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Juppner H, Wolf M (2008) Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 359:584–592
55. Gutierrez OM, Januzzi JL, Isakova T, Laliberte K, Smith K, Collerone G, Sarwar A, Hoffmann U, Coglianese E, Christenson R, Wang TJ, deFilippi C, Wolf M (2009) Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation* 119:2545–2552
56. Han X, Li L, Yang J, King G, Xiao Z, Quarles LD (2016) Counter-regulatory paracrine actions of FGF-23 and 1,25(OH)₂D in macrophages. *FEBS Lett* 590:53–67
57. Heijboer AC, Blankenstein MA, Hoenderop J, de Borst MH, Vervloet MG (2013) Laboratory aspects of circulating α -Klotho. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial*

- Transpl Assoc - Eur Ren Assoc 28:2283–2287
58. Heinzle C, Gsur A, Hunjadi M, Erdem Z, Gauglhofer C, Stättner S, Karner J, Klimpfnger M, Wrba F, Reti A, Hegedus B, Baierl A, Grasl-Kraupp B, Holzmann K, Grusch M, Berger W, Marian B (2012) Differential effects of polymorphic alleles of FGF receptor 4 on colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res* 72:5767–5777
 59. Herath E (2011) Ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung renaler und lienaler Widerstandsindices eine selektive Beurteilung der chronischen Nierenschädigung?
 60. Heusch G, Musiolik J, Gedik N, Skyschally A (2011) Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circ Res* 109:1302–1308
 61. Ho CKM, Anwar S, Nanda J, Habib FK (2010) FGFR4 Gly388Arg polymorphism and prostate cancer risk in Scottish men. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 13:94–96
 62. Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-o M, Moe OW (2010) Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 24:3438–3450
 63. Hu MC, Shi M, Zhang J, Quiñones H, Griffith C, Kuro-o M, Moe OW (2011) Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 22:124–136
 64. Hu MC, Shi M, Cho HJ, Adams-Huet B, Paek J, Hill K, Shelton J, Amaral AP, Faul C, Taniguchi M, Wolf M, Brand M, Takahashi M, Kuro-O M, Hill JA, Moe OW (2015) Klotho and phosphate are modulators of pathologic uremic cardiac remodeling. *J Am Soc Nephrol* 26:1290–1302
 65. Hu MC, Shi M, Zhang J, Addo T, Cho HJ, Barker SL, Ravikumar P, Gillings N, Bian A, Sidhu SS, Kuro-o M, Moe OW (2016) Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating α Klotho. *J Am Soc Nephrol* 27:79–90
 66. Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutierrez OM, Scialla J, Xie H, Appleby D, Nessel L, Bellovich K, Chen J, Hamm L, Gadegbeku C, Horwitz E, Townsend RR, Anderson CAM, Lash JP, Hsu C-Y, Leonard MB, Wolf M (2011) Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int* 79:1370–1378
 67. Isakova T, Xie H, Yang W, Xie D, Anderson AH, Scialla J, Wahl P, Gutierrez OM, Steigerwalt S, He J, Schwartz S, Lo J, Ojo A, Sondheim J, Hsu C, Lash J, Leonard M, Kusek JW, Feldman HI, Wolf M (2011) Fibroblast growth factor 23 and risks of

- mortality and end-stage renal disease in patients with chronic kidney disease. *JAMA* 305:2432–2439
68. Itoh N, Ornitz DM (2004) Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20:563–569
69. Ix JH, Katz R, Kestenbaum BR, de Boer IH, Chonchol M, Mukamal KJ, Rifkin D, Siscovick DS, Sarnak MJ, Shlipak MG (2012) Fibroblast growth factor-23 and death, heart failure, and cardiovascular events in community-living individuals: CHS (Cardiovascular Health Study). *J Am Coll Cardiol* 60:200–207
70. Jansen H, Samani NJ, Schunkert H (2014) Mendelian randomization studies in coronary artery disease. *Eur Heart J* 35:1917–1924
71. Juppner H, Wolf M, Salusky IB (2010) FGF-23: More than a regulator of renal phosphate handling? *J Bone Miner Res* 25:2091–2097
72. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG (2009) Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial infarction. *JAMA* 301:2331–2339
73. Katan MB (1986) Apolipoprotein E isoforms, serum cholesterol, and cancer. *Lancet (London, England)* 1:507–508
74. Kendrick J, Cheung AK, Kaufman JS, Greene T, Roberts WL, Smits G, Chonchol M (2011) FGF-23 associates with death, cardiovascular events, and initiation of chronic dialysis. *J Am Soc Nephrol* 22:1913–1922
75. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Work Group (2009) KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* S1-130
76. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group (2013) KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* 3:1–150
77. Kitagawa M, Sugiyama H, Morinaga H, Inoue T, Takiue K, Ogawa A, Yamanari T, Kikumoto Y, Uchida HA, Kitamura S, Maeshima Y, Nakamura K, Ito H, Makino H (2013) A decreased level of serum soluble Klotho is an independent biomarker associated with arterial stiffness in patients with chronic kidney disease. *PLoS One* 8:e56695
78. Kottgen A, Russell SD, Loehr LR, Crainiceanu CM, Rosamond WD, Chang PP, Chambless LE, Coresh J (2007) Reduced kidney function as a risk factor for incident

- heart failure: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *J Am Soc Nephrol* 18:1307–1315
79. Kovesdy CP, Ahmadzadeh S, Anderson JE, Kalantar-Zadeh K (2008) Secondary hyperparathyroidism is associated with higher mortality in men with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 73:1296–1302
80. Kunisada K, Negoro S, Tone E, Funamoto M, Osugi T, Yamada S, Okabe M, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K (2000) Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:315–319
81. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI (1997) Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390:45–51
82. Kuro-o M (2006) *Klotho* as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15:437–441
83. Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor J V, Nandi A, Gurnani P, McGuinness OP, Chikuda H, Yamaguchi M, Kawaguchi H, Shimomura I, Takayama Y, Herz J, Kahn CR, Rosenblatt KP, Kuro-o M (2005) Suppression of aging in mice by the hormone *Klotho*. *Science* 309:1829–1833
84. Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu M-C, Moe OW, Kuro-o M (2006) Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by *klotho*. *J Biol Chem* 281:6120–6123
85. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MSJ, Stewart WJ (2005) Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 18:1440–1463
86. Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren O, Juppner H, Jonsson KB (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* 64:2272–2279
87. Lawlor DA, Harbord RM, Sterne JAC, Timpson N, Davey Smith G (2008) Mendelian randomization: using genes as instruments for making causal inferences in

- epidemiology. *Stat Med* 27:1133–1163
88. Lee M, Saver JL, Chang K-H, Liao H-W, Chang S-C, Ovbiagele B (2010) Low glomerular filtration rate and risk of stroke: meta-analysis. *BMJ* 341:c4249
 89. Leifheit-Nestler M, Grosse Siemer R, Flasbart K, Richter B, Kirchhoff F, Ziegler WH, Klintschar M, Becker JU, Erbersdobler A, Aufricht C, Seeman T, Fischer D-C, Faul C, Haffner D (2016) Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 31:1088–1099
 90. Levey AS, Atkins R, Coresh J, Cohen EP, Collins AJ, Eckardt K-U, Nahas ME, Jaber BL, Jadoul M, Levin A, Powe NR, Rossert J, Wheeler DC, Lameire N, Eknoyan G (2007) Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int* 72:247–259
 91. Levin A, Bakris GL, Molitch M, Smulders M, Tian J, Williams LA, Andress DL (2007) Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int* 71:31–38
 92. Lindner A, Charra B, Sherrard DJ, Scribner BH (1974) Accelerated atherosclerosis in prolonged maintenance hemodialysis. *N Engl J Med* 290:697–701
 93. Liu S, Guo R, Simpson LG, Xiao Z-S, Burnham CE, Quarles LD (2003) Regulation of fibroblastic growth factor 23 expression but not degradation by PHEX. *J Biol Chem* 278:37419–37426
 94. Liu S, Vierthaler L, Tang W, Zhou J, Quarles LD (2008) FGFR3 and FGFR4 do not mediate renal effects of FGF23. *J Am Soc Nephrol* 19:2342–2350
 95. London GM, Pannier B, Guerin AP, Blacher J, Marchais SJ, Darne B, Metivier F, Adda H, Safar ME (2001) Alterations of left ventricular hypertrophy in and survival of patients receiving hemodialysis: follow-up of an interventional study. *J Am Soc Nephrol* 12:2759–2767
 96. Longenecker JC, Coresh J, Powe NR, Levey AS, Fink NE, Martin A, Klag MJ (2002) Traditional cardiovascular disease risk factors in dialysis patients compared with the general population: the CHOICE Study. *J Am Soc Nephrol* 13:1918–1927
 97. Ma Z, Tsuchiya N, Yuasa T, Inoue T, Kumazawa T, Narita S, Horikawa Y, Tsuruta H, Obara T, Saito M, Satoh S, Ogawa O, Habuchi T (2008) Polymorphisms of fibroblast growth factor receptor 4 have association with the development of prostate cancer and

- benign prostatic hyperplasia and the progression of prostate cancer in a Japanese population. *Int J cancer* 123:2574–2579
98. Mahmoodi BK, Matsushita K, Woodward M, Blankestijn PJ, Cirillo M, Ohkubo T, Rossing P, Sarnak MJ, Stengel B, Yamagishi K, Yamashita K, Zhang L, Coresh J, de Jong PE, Astor BC (2012) Associations of kidney disease measures with mortality and end-stage renal disease in individuals with and without hypertension: a meta-analysis. *Lancet* (London, England) 380:1649–1661
 99. Maizel J, Six I, Dupont S, Secq E, Dehedin B, Barreto FC, Benchitrit J, Poirot S, Slama M, Tribouilloy C, Choukroun G, Mazière JC, Drueke TB, Massy ZA (2013) Effects of sevelamer treatment on cardiovascular abnormalities in mice with chronic renal failure. *Kidney Int* 84:491–500
 100. Matsui I, Oka T, Kusunoki Y, Mori D, Hashimoto N, Matsumoto A, Shimada K, Yamaguchi S, Kubota K, Yonemoto S, Higo T, Sakaguchi Y, Takabatake Y, Hamano T, Isaka Y (2018) Cardiac hypertrophy elevates serum levels of fibroblast growth factor 23. *Kidney Int* 94:60–71
 101. Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-o M, Nabeshima Y (1998) Identification of the human klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted klotho protein. *Biochem Biophys Res Commun* 242:626–630
 102. Matsushita K, Coresh J, Sang Y, Chalmers J, Fox C, Guallar E, Jafar T, Jassal SK, Landman GWD, Muntner P, Roderick P, Sairenchi T, Schottker B, Shankar A, Shlipak M, Tonelli M, Townend J, van Zuilen A, Yamagishi K, Yamashita K, Gansevoort R, Sarnak M, Warnock DG, Woodward M, Arnlov J (2015) Estimated glomerular filtration rate and albuminuria for prediction of cardiovascular outcomes: a collaborative meta-analysis of individual participant data. *lancet Diabetes Endocrinol* 3:514–525
 103. McKie PM, Schirger JA, Costello-Boerrigter LC, Benike SL, Harstad LK, Bailey KR, Hodge DO, Redfield MM, Simari RD, Burnett JCJ, Chen HH (2011) Impaired natriuretic and renal endocrine response to acute volume expansion in pre-clinical systolic and diastolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 58:2095–2103
 104. Meisinger C, Doring A, Lowel H (2006) Chronic kidney disease and risk of incident myocardial infarction and all-cause and cardiovascular disease mortality in middle-aged men and women from the general population. *Eur Heart J* 27:1245–1250
 105. Mirza MAI, Larsson A, Melhus H, Lind L, Larsson TE (2009) Serum intact FGF23 associate with left ventricular mass, hypertrophy and geometry in an elderly population. *Atherosclerosis* 207:546–551

106. Mitsnefes MM, Betoko A, Schneider MF, Salusky IB, Wolf MS, Juppner H, Warady BA, Furth SL, Portale AA (2018) FGF23 and Left Ventricular Hypertrophy in Children with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 13:45–52
107. Morimoto Y, Ozaki T, Ouchida M, Umehara N, Ohata N, Yoshida A, Shimizu K, Inoue H (2003) Single nucleotide polymorphism in fibroblast growth factor receptor 4 at codon 388 is associated with prognosis in high-grade soft tissue sarcoma. *Cancer* 98:2245–2250
108. Mosteller RD (1987) Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* 317:1098
109. Murphy D, McCulloch CE, Lin F, Banerjee T, Bragg-Gresham JL, Eberhardt MS, Morgenstern H, Pavkov ME, Saran R, Powe NR, Hsu C-Y (2016) Trends in Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *Ann Intern Med* 165:473–481
110. Nakatani T, Sarraj B, Ohnishi M, Densmore MJ, Taguchi T, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Razzaque MS (2009) In vivo genetic evidence for klotho-dependent, fibroblast growth factor 23 (Fgf23) -mediated regulation of systemic phosphate homeostasis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 23:433–441
111. Neves KR, Graciolli FG, dos Reis LM, Pasqualucci CA, Moyses RMA, Jorgetti V (2004) Adverse effects of hyperphosphatemia on myocardial hypertrophy, renal function, and bone in rats with renal failure. *Kidney Int* 66:2237–2244
112. Novelli V, Viviani Anselmi C, Roncarati R, Guffanti G, Malovini A, Piluso G, Puca AA (2008) Lack of replication of genetic associations with human longevity. *Biogerontology* 9:85–92
113. Nzietchueng R, El Shamieh S, Benachour H, Labat C, Herbeth B, Ndiaye NC, Masson C, Visvikis-Siest S, Benetos A (2011) Klotho KL-VS genotype is involved in blood pressure regulation. *Clin Chim Acta* 412:1773–1777
114. O'Hare AM, Glidden D V, Fox CS, Hsu C-Y (2004) High prevalence of peripheral arterial disease in persons with renal insufficiency: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000. *Circulation* 109:320–323
115. O'Hare AM, Vittinghoff E, Hsia J, Shlipak MG (2004) Renal insufficiency and the risk of lower extremity peripheral arterial disease: results from the Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS). *J Am Soc Nephrol* 15:1046–1051
116. Ohyama Y, Kurabayashi M, Masuda H, Nakamura T, Aihara Y, Kaname T, Suga T, Arai M, Aizawa H, Matsumura Y, Kuro-o M, Nabeshima Y i, Nagail R (1998) Molecular cloning of rat klotho cDNA: markedly decreased expression of klotho by acute inflammatory stress. *Biochem Biophys Res Commun* 251:920–925

117. Oshima Y, Fujio Y, Nakanishi T, Itoh N, Yamamoto Y, Negoro S, Tanaka K, Kishimoto T, Kawase I, Azuma J (2005) STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovasc Res* 65:428–435
118. Palmer TM, Lawlor DA, Harbord RM, Sheehan NA, Tobias JH, Timpson NJ, Davey Smith G, Sterne JAC (2012) Using multiple genetic variants as instrumental variables for modifiable risk factors. *Stat Methods Med Res* 21:223–242
119. Paoletti E, Bellino D, Cassottana P, Rolla D, Cannella G (2005) Left ventricular hypertrophy in nondiabetic predialysis CKD. *Am J Kidney Dis* 46:320–327
120. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE (1996) Outcome and risk factors for left ventricular disorders in chronic uraemia. *Nephrol Dial Transplant* 11:1277–1285
121. Parikh NI, Hwang S-J, Larson MG, Meigs JB, Levy D, Fox CS (2006) Cardiovascular disease risk factors in chronic kidney disease: overall burden and rates of treatment and control. *Arch Intern Med* 166:1884–1891
122. Parker BD, Schurgers LJ, Brandenburg VM, Christenson RH, Vermeer C, Ketteler M, Shlipak MG, Whooley MA, Ix JH (2010) The associations of fibroblast growth factor 23 and uncarboxylated matrix Gla protein with mortality in coronary artery disease: the Heart and Soul Study. *Ann Intern Med* 152:640–648
123. Pastor-Arroyo E-M, Gehring N, Krudewig C, Costantino S, Bettoni C, Knöpfel T, Sabrautzki S, Lorenz-Depiereux B, Pastor J, Strom TM, Hrabě de Angelis M, Camici GG, Paneni F, Wagner CA, Rubio-Aliaga I (2018) The elevation of circulating fibroblast growth factor 23 without kidney disease does not increase cardiovascular disease risk. *Kidney Int* 94:49–59
124. Pavik I, Jaeger P, Ebner L, Wagner CA, Petzold K, Spichtig D, Poster D, Wüthrich RP, Russmann S, Serra AL (2013) Secreted Klotho and FGF23 in chronic kidney disease Stage 1 to 5: a sequence suggested from a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 28:352–359
125. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, Falk V, González-Juanatey JR, Harjola V-P, Jankowska EA, Jessup M, Linde C, Nihoyannopoulos P, Parissis JT, Pieske B, Riley JP, Rosano GMC, Ruilope LM, Ruschitzka F, Rutten FH, van der Meer P (2016) 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology

- (ESC) Developed with the special contribution of. *Eur Heart J* 37:2129–2200
126. Pöss J, Mahfoud F, Seiler S, Heine GH, Fliser D, Böhm M, Link A (2013) FGF-23 is associated with increased disease severity and early mortality in cardiogenic shock. *Eur Heart J* 34:211–218
 127. Razzaque MS (2009) The FGF23-Klotho axis: endocrine regulation of phosphate homeostasis. *Nat Rev Endocrinol* 5:611–619
 128. Richter M, Lautze H-J, Walther T, Braun T, Kostin S, Kubin T (2015) The failing heart is a major source of circulating FGF23 via oncostatin M receptor activation. *J Heart Lung Transplant* 34:1211–1214
 129. Saab G, Whooley MA, Schiller NB, Ix JH (2010) Association of serum phosphorus with left ventricular mass in men and women with stable cardiovascular disease: data from the Heart and Soul Study. *Am J Kidney Dis* 56:496–505
 130. Sakan H, Nakatani K, Asai O, Imura A, Tanaka T, Yoshimoto S, Iwamoto N, Kurumatani N, Iwano M, Nabeshima Y-I, Konishi N, Saito Y (2014) Reduced renal α -Klotho expression in CKD patients and its effect on renal phosphate handling and vitamin D metabolism. *PLoS One* 9:e86301
 131. Saran R, Li Y, Robinson B, Ayanian J, Balkrishnan R, Bragg-Gresham J, Chen JTL, Cope E, Gipson D, He K, Herman W, Heung M, Hirth RA, Jacobsen SS, Kalantar-Zadeh K, Kovesdy CP, Leichtman AB, Lu Y, Molnar MZ, Morgenstern H, Nallamothu B, O'Hare AM, Pisoni R, Plattner B, Port FK, Rao P, Rhee CM, Schaubel DE, Selewski DT, Shahinian V, Sim JJ, Song P, Streja E, Kurella Tamura M, Tentori F, Eggers PW, Agodoa LYC, Abbott KC (2015) US Renal Data System 2014 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States. *Am J Kidney Dis* 66:Svii, S1-305
 132. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Cullerton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW (2003) Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 108:2154–2169
 133. Schauerte J (2020) iFGF-23-ELISA versus cFGF-23-ELISA als kardiovaskuläre Prädiktoren bei chronischer Nierenerkrankung.
 134. Schluter KD, Piper HM (1992) Trophic effects of catecholamines and parathyroid hormone on adult ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 263:H1739-46
 135. Scialla JJ, Xie H, Rahman M, Anderson AH, Isakova T, Ojo A, Zhang X, Nessel L,

- Hamano T, Grunwald JE, Raj DS, Yang W, He J, Lash JP, Go AS, Kusek JW, Feldman H, Wolf M (2014) Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD. *J Am Soc Nephrol* 25:349–360
136. Seiler S, Reichart B, Roth D, Seibert E, Fliser D, Heine GH (2010) FGF-23 and future cardiovascular events in patients with chronic kidney disease before initiation of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant* 25:3983–3989
137. Seiler S, Cremers B, Rebling NM, Hornof F, Jeken J, Kersting S, Steimle C, Ege P, Fehrenz M, Rogacev KS, Scheller B, Bohm M, Fliser D, Heine GH (2011) The phosphatonin fibroblast growth factor 23 links calcium-phosphate metabolism with left-ventricular dysfunction and atrial fibrillation. *Eur Heart J* 32:2688–2696
138. Seiler S, Rogacev KS, Roth HJ, Shafein P, Emrich I, Neuhaus S, Floege J, Fliser D, Heine GH (2014) Associations of FGF-23 and sKlotho with cardiovascular outcomes among patients with CKD stages 2-4. *Clin J Am Soc Nephrol* 9:1049–1058
139. Shalhoub V, Shatzem EM, Ward SC, Davis J, Stevens J, Bi V, Renshaw L, Hawkins N, Wang W, Chen C, Tsai M-M, Cattley RC, Wronski TJ, Xia X, Li X, Henley C, Eschenberg M, Richards WG (2012) FGF23 neutralization improves chronic kidney disease-associated hyperparathyroidism yet increases mortality. *J Clin Invest* 122:2543–2553
140. Shibata K, Fujita S-I, Morita H, Okamoto Y, Sohmiya K, Hoshiga M, Ishizaka N (2013) Association between circulating fibroblast growth factor 23, α -Klotho, and the left ventricular ejection fraction and left ventricular mass in cardiology inpatients. *PLoS One* 8:e73184
141. Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T (2001) Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:6500–6505
142. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T (2004) FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res* 19:429–435
143. Sinha MD, Turner C, Booth CJ, Waller S, Rasmussen P, Goldsmith DJA, Simpson JM (2015) Relationship of FGF23 to indexed left ventricular mass in children with non-dialysis stages of chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 30:1843–1852
144. Six I, Okazaki H, Gross P, Cagnard J, Boudot C, Maizel J, Drueke TB, Massy ZA (2014) Direct, acute effects of Klotho and FGF23 on vascular smooth muscle and endothelium. *PLoS One* 9:e93423

145. Slavic S, Ford K, Modert M, Becirovic A, Handschuh S, Baierl A, Katica N, Zeitz U, Erben RG, Andrukhova O (2017) Genetic Ablation of Fgf23 or Klotho Does not Modulate Experimental Heart Hypertrophy Induced by Pressure Overload. *Sci Rep* 7:11298
146. Soliman EZ, Prineas RJ, Go AS, Xie D, Lash JP, Rahman M, Ojo A, Teal VL, Jensvold NG, Robinson NL, Dries DL, Bazzano L, Mohler ER, Wright JT, Feldman HI (2010) Chronic kidney disease and prevalent atrial fibrillation: the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC). *Am Heart J* 159:1102–1107
147. Spinola M, Leoni V, Pignatiello C, Conti B, Ravagnani F, Pastorino U, Dragani TA (2005) Functional FGFR4 Gly388Arg polymorphism predicts prognosis in lung adenocarcinoma patients. *J Clin Oncol* 23:7307–7311
148. Streit S, Bange J, Fichtner A, Ihrler S, Issing W, Ullrich A (2004) Involvement of the FGFR4 Arg388 allele in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J cancer* 111:213–217
149. Streit S, Mestel DS, Schmidt M, Ullrich A, Berking C (2006) FGFR4 Arg388 allele correlates with tumour thickness and FGFR4 protein expression with survival of melanoma patients. *Br J Cancer* 94:1879–1886
150. Sun M, Chen M, Dawood F, Zurawska U, Li JY, Parker T, Kassiri Z, Kirshenbaum LA, Arnold M, Khokha R, Liu PP (2007) Tumor necrosis factor- α mediates cardiac remodeling and ventricular dysfunction after pressure overload state. *Circulation* 115:1398–1407
151. Takashi Y, Kinoshita Y, Hori M, Ito N, Taguchi M, Fukumoto S (2017) Patients with FGF23-related hypophosphatemic rickets/osteomalacia do not present with left ventricular hypertrophy. *Endocr Res* 42:132–137
152. Tentori F, Blayney MJ, Albert JM, Gillespie BW, Kerr PG, Bommer J, Young EW, Akizawa T, Akiba T, Pisoni RL, Robinson BM, Port FK (2008) Mortality risk for dialysis patients with different levels of serum calcium, phosphorus, and PTH: the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *Am J Kidney Dis* 52:519–530
153. Thadhani R, Appelbaum E, Pritchett Y, Chang Y, Wenger J, Tamez H, Bhan I, Agarwal R, Zoccali C, Wanner C, Lloyd-Jones D, Cannata J, Thompson BT, Andress D, Zhang W, Packham D, Singh B, Zehnder D, Shah A, Pachika A, Manning WJ, Solomon SD (2012) Vitamin D therapy and cardiac structure and function in patients with chronic kidney disease: the PRIMO randomized controlled trial. *JAMA* 307:674–684
154. Tucker Zhou TB, King GD, Chen C, Abraham CR (2013) Biochemical and functional

- characterization of the klotho-VS polymorphism implicated in aging and disease risk. *J Biol Chem* 288:36302–36311
155. Ubaidus S, Li M, Sultana S, de Freitas PHL, Oda K, Maeda T, Takagi R, Amizuka N (2009) FGF23 is mainly synthesized by osteocytes in the regularly distributed osteocytic lacunar canalicular system established after physiological bone remodeling. *J Electron Microsc (Tokyo)* 58:381–392
156. Udell JA, Morrow DA, Jarolim P, Sloan S, Hoffman EB, O'Donnell TF, Vora AN, Omland T, Solomon SD, Pfeffer MA, Braunwald E, Sabatine MS (2014) Fibroblast growth factor-23, cardiovascular prognosis, and benefit of angiotensin-converting enzyme inhibition in stable ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol* 63:2421–2428
157. Ulaganathan VK, Sperl B, Rapp UR, Ullrich A (2015) Germline variant FGFR4 p.G388R exposes a membrane-proximal STAT3 binding site. *Nature* 528:570–574
158. Ulaganathan VK, Ullrich A (2016) Membrane-proximal binding of STAT3 revealed by cancer-associated receptor variants. *Mol Cell Oncol* 3:e1145176
159. Unsal A, Kose Budak S, Koc Y, Basturk T, Sakaci T, Ahbap E, Sinangil A (2012) Relationship of fibroblast growth factor 23 with left ventricle mass index and coronary calcificaton in chronic renal disease. *Kidney Blood Press Res* 36:55–64
160. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T (2006) Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature* 444:770–774
161. Wald R, Sarnak MJ, Tighiouart H, Cheung AK, Levey AS, Eknoyan G, Miskulin DC (2008) Disordered mineral metabolism in hemodialysis patients: an analysis of cumulative effects in the Hemodialysis (HEMO) Study. *Am J Kidney Dis* 52:531–540
162. Wang AY-M, Fang F, Chan J, Wen Y-Y, Qing S, Chan IH-S, Lo G, Lai K-N, Lo W-K, Lam CW-K, Yu C-M (2014) Effect of paricalcitol on left ventricular mass and function in CKD--the OPERA trial. *J Am Soc Nephrol* 25:175–186
163. Wang J, Stockton DW, Ittmann M (2004) The fibroblast growth factor receptor-4 Arg388 allele is associated with prostate cancer initiation and progression. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res* 10:6169–6178
164. Wang J, Yu W, Cai Y, Ren C, Ittmann MM (2008) Altered fibroblast growth factor receptor 4 stability promotes prostate cancer progression. *Neoplasia* 10:847–856
165. Wanner C, Krane V, Marz W, Olschewski M, Mann JFE, Ruf G, Ritz E (2005) Atorvastatin in patients with type 2 diabetes mellitus undergoing hemodialysis. *N Engl J Med* 353:238–248

166. Weihrauch A (2011) Sind renale Widerstandsindices nierenspezifische Ultraschallparameter? – Detektion der linksventrikulären diastolischen Dysfunktion als weiteren extrarenalen Einflussfaktor.
167. Wilkins BJ, Dai Y-S, Bueno OF, Parsons SA, Xu J, Plank DM, Jones F, Kimball TR, Molkenin JD (2004) Calcineurin/NFAT coupling participates in pathological, but not physiological, cardiac hypertrophy. *Circ Res* 94:110–118
168. Wolf M, Shah A, Gutierrez O, Ankers E, Monroy M, Tamez H, Steele D, Chang Y, Camargo CAJ, Tonelli M, Thadhani R (2007) Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. *Kidney Int* 72:1004–1013
169. Wolf M, Koch TA, Bregman DB (2013) Effects of iron deficiency anemia and its treatment on fibroblast growth factor 23 and phosphate homeostasis in women. *J Bone Miner Res* 28:1793–1803
170. Wolf M, White KE (2014) Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: iron deficiency, rickets, and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 23:411–419
171. Xiang W, Kong J, Chen S, Cao L-P, Qiao G, Zheng W, Liu W, Li X, Gardner DG, Li YC (2005) Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E125-32
172. Xie J, Cha S-K, An S-W, Kuro-O M, Birnbaumer L, Huang C-L (2012) Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart. *Nat Commun* 3:1238
173. Xie J, Yoon J, An S-W, Kuro-o M, Huang C-L (2015) Soluble Klotho Protects against Uremic Cardiomyopathy Independently of Fibroblast Growth Factor 23 and Phosphate. *J Am Soc Nephrol* 26:1150–1160
174. Xu B, Tong N, Chen SQ, Hua LX, Wang ZJ, Zhang ZD, Chen M (2011) FGFR4 Gly388Arg polymorphism contributes to prostate cancer development and progression: a meta-analysis of 2618 cases and 2305 controls. *BMC Cancer* 11:84
175. Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N (2000) Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochem Biophys Res Commun* 277:494–498
176. Yamashita T (2005) Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor 23. *Ther Apher Dial* 9:313–318
177. Yang K, Wang C, Nie L, Zhao X, Gu J, Guan X, Wang S, Xiao T, Xu X, He T, Xia X,

- Wang J, Zhao J (2015) Klotho Protects Against Indoxyl Sulphate-Induced Myocardial Hypertrophy. *J Am Soc Nephrol* 26:2434–2446
178. Yu X, White KE (2005) Fibroblast growth factor 23 and its receptors. *Ther Apher Dial* 9:308–312
179. Zannad F, Kessler M, Leheret P, Grunfeld JP, Thuilliez C, Leizorovicz A, Lechat P (2006) Prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease: results of a randomized trial of fosinopril and implications for future studies. *Kidney Int* 70:1318–1324
180. Zoccali C, Benedetto FA, Mallamaci F, Tripepi G, Giaccone G, Cataliotti A, Seminara G, Stancanelli B, Malatino LS (2004) Prognostic value of echocardiographic indicators of left ventricular systolic function in asymptomatic dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 15:1029–1037

8. Publikationen / Danksagung

8.1. Publikationen

8.1.1. Originalarbeiten

Alexander B. Sellier; Sarah Seiler-Mußler; Insa E. Emrich; Michael Boehm; Danilo Fliser; Adam M. Zawada; Gunnar H. Heine. FGFR4 and Klotho Polymorphisms Are Not Associated with Cardiovascular Outcomes in Chronic Kidney Disease. Am J Nephrol. 2021; 52: 808 - 816

8.1.2. Präsentationen und Vorträge

Alexander B. Sellier; Sarah Seiler-Mußler; Insa E. Emrich; Danilo Fliser; Adam M. Zawada; Gunnar H. Heine. Einfluss genetischer Varianten von FGFR4 und Klotho auf linksventrikuläre Hypertrophie bei chronisch nierenkranken Patienten.

Posterpräsentation, Kongress für Nephrologie 2016 - 8. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 10. - 13. September 2016, Berlin

Alexander B. Sellier; Sarah Seiler-Mußler; Insa E. Emrich; Danilo Fliser; Adam M. Zawada; Gunnar H. Heine. Bedeutung von FGFR4- und Klotho-Polymorphismen für linksventrikuläre Hypertrophie bei chronisch nierenkranken Patienten.

Posterpräsentation, 61. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internisten Gesellschaft, 9. - 11. März 2017, Neustadt an der Weinstraße

Alexander B. Sellier; Sarah Seiler-Mußler; Insa E. Emrich; Danilo Fliser; Adam M. Zawada; Gunnar H. Heine. Assoziation von Single Nucleotid Polymorphismen im FGFR4- und Klotho-Gen mit linksventrikulärer Hypertrophie bei chronisch nierenkranken Patienten - eine Mendalian Randomisation Studie.

Posterpräsentation, 123. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 29. April - 2. Mai 2017, Mannheim

Alexander B. Sellier; Sarah Seiler-Mußler; Insa E. Emrich; Danilo Fliser; Adam M. Zawada; Gunnar H. Heine. Association of SNPs on FGFR4 and Klotho Genes with LVH and Cardiovascular Outcome in CKD Patients.

Posterpräsentation, Kidney Week 2017 der American Society of Nephrology, 31. Oktober - 5. November 2017, New Orleans, Louisiana

Alexander B. Sellier; Sarah Seiler-Mußler; Insa E. Emrich; Danilo Fliser; Adam M. Zawada; Gunnar H. Heine. Einfluss genetischer Varianten von FGFR4 und Klotho auf die linksventrikuläre Hypertrophie im zeitlichen Verlauf einer chronischen Nierenerkrankung.

Posterpräsentation, 124. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin, 14. - 17. April 2018, Mannheim

Alexander B. Sellier; Sarah Seiler-Mußler; Insa E. Emrich; Danilo Fliser; Adam M. Zawada; Gunnar H. Heine. Beeinflussen genetische Varianten von FGFR4 und Klotho Veränderungen der linksventrikulären Muskelmasse bei CKD-Patienten? - Eine Mendelian Randomization Studie.

Freier Vortrag, Kongress für Nephrologie 2018 - 10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, 27. - 30. September 2018, Berlin

8.2. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Danilo Fliser für die Möglichkeit der Promotion in seiner Klinik sowie für die wertvollen Anregungen und Hilfestellungen bei der Fertigstellung der Arbeit.

Weiterhin danke ich Herrn Professor Dr. Gunnar Heine für die Überlassung des Themas, die Motivation für das wissenschaftliche Arbeiten und nicht zuletzt für die unermüdliche und kompetente Betreuung sowie für die wegweisenden Diskussionen, die meine Promotion wesentlich bereicherten.

Herrn Dr. Adam Zawada danke ich für die geduldige Einarbeitung in die Arbeit im Labor, für die außergewöhnliche Betreuung während der Untersuchungen und für die ständige Bereitschaft, mir bei jeglichen Problemen mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Darüber hinaus danke ich Frau Privatdozentin Dr. Sarah Seiler-Mußler und Frau Dr. Insa Emrich für die uneingeschränkte und stets fachkundige Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion.

Martina Wagner, Marie-Theres Blinn und den Doktorandinnen und Doktoranden der Arbeitsgruppe 1 der Klinik für Innere Medizin IV danke ich für die freundliche Aufnahme in das Team sowie für die kollegiale Zusammenarbeit und den freundschaftlichen Zusammenhalt untereinander.

Ferner möchte ich allen Teilnehmern von CARE FOR HOME für die Bereitschaft, an der Studie teilzunehmen, sowie für die aufgebrauchte Zeit danken.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie, allen voran bei meinen Eltern, für die beharrliche, ausdauernde und bedingungslose Unterstützung während der Promotion bedanken, ohne die die Fertigstellung sicher nicht möglich gewesen wäre.

9. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

