

Aus der Universitäts-Kinder- und Jugendklinik Rostock

Direktorin : Prof. Dr. M. Wigger (k)

Fetuin-A Spiegel bei gesunden und bei nierenkranken Kindern und Jugendlichen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae
(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Jan Christoph Möller geb. Schaible
geb. am 21.02.1982 in Böblingen

Rostock, im April 2012

Einreichungsdatum: 21.05.2012

Verteidigungsdatum: 26.02.2013

Dekan: Prof. Dr. med. habil. E. C. Reisinger

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. D. Haffner

Direktor des Zentrums Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Klinik für
Pädiatrische Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen an der
Medizinischen Hochschule Hannover

2. Prof. Dr. med. G. Klaus

Ärztlicher Leiter des KfH Kuratorium für Dialyse und Nierentransplantation e.V.
KfH-Nierenzentrum für Kinder und Jugendliche am Universitätsklinikum Gießen-
Marburg

3. Prof. Dr. med. S. Mitzner

Leiter der Sektion Nephrologie der Klinik für Innere Medizin II am
Universitätsklinikum Rostock

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abkürzungen	III
III	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz bei Kindern und Jugendlichen	1
1.2	Ätiologie und Pathogenese der Gefäßverkalkungen bei chronischer Niereninsuffizienz	3
1.3	Vitamin D-Biosynthese	7
1.4	Eigenschaften und Funktionen von Fetuin-A	8
2	Ziel der Arbeit	11
3	Material und Methoden	12
3.1	Patienten und Probanden	12
3.2	Materialien	13
3.3	Methoden	14
3.3.1	Quantitative immunchemische Bestimmung von Fetuin-A in Serum und Urin	14
3.3.2	Qualitativer Nachweis von Fetuin-A durch Elektrophorese und Western-Blot	15
3.3.3	Berechnung abgeleiteter klinischer und krankheits-spezifischer Größen	15
3.3.4	Statistische Verfahren	17
4	Ergebnisse	18
4.1	Konzentration von Fetuin-A im Serum und Urin gesunder Kinder und Jugendlicher	18
4.2	Fetuin-A bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz	20
4.2.1	Charakterisierung der Patienten	20
4.2.2	Fetuin-A Serumkonzentrationen bei allen CNI-Patienten	21

4.2.3	Fetuin-A Serumkonzentrationen bei Dialysepatienten	24
4.2.4	Serumspiegel von Vitamin D und Fetuin-A bei Kindern mit CNI	25
4.3	Untersuchung der Patienten mit einer Proteinurie	27
4.3.1	Charakterisierung der Patienten	27
4.3.2	Fetuin-A Serumkonzentration bei Proteinurie	29
4.3.3	Renaler Fetuin-A Verlust bei Proteinurie	31
4.3.4	Zusammenhang zwischen Fetuin-A Verlust und Fetuin-A Serumkonzentration	32
4.3.5	Vitamin D und Fetuin-A bei Kindern mit Proteinurie	35
5	Diskussion	36
5.1	Konzentration von Fetuin-A in Serum und Urin gesunder Kinder und Jugendlicher	36
5.2	Fetuin-A bei nierenkranken Kindern und Jugendlichen	37
5.2.1	Fetuin-A bei CNI	37
5.2.2	Fetuin-A bei Patienten mit Proteinurie und erhaltener glomerulärer Nierenfunktion	39
5.2.3	Fetuin-A und Vitamin D	40
6	Zusammenfassung	43
7	Thesen	45
8	Literaturverzeichnis	47
9	Danksagung	56
10	Tabellarischer Lebenslauf	57
11	Eidesstattliche Erklärung	58

II Abkürzungen

AHSG	α_2 -Heremans-Schmid Glycoprotein (Fetuin-A)
ANOVA	Analysis of variance
BMI	Body Mass Index
BMP	Bone morphogenetic protein
CAKUT	Congenital Anomalies of the Urinary Tract and Kidney
CaSR	Calcium-sensitiver Rezeptor
CKD-MBD	Chronic Kidney Disease - Mineral Bone Disorder
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FE	Fraktionierte Exkretion
FGF-23	Fibroblast Growth Factor-23
FSGS	Fokal segmentale Glomerulosklerose
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HD	Hämodialyse
HDL	High Density Lipoprotein
IgG	Immunglobulin G
KG	Körpergewicht
KL	Körperlänge
KOF	Körperoberfläche
LDL	Low Density Lipoprotein
MGP	Matrix Gla Protein
NPT	Natrium-abhängiger Phosphat Cotransporter
NTX	Nierentransplantation
OPN	Osteopontin
PD	Peritonealdialyse
P _i	Anorganisches Phosphat
PTH	Parathormon
PTHrp	PTH related peptides
PVDF	Polyvinyliden-Fluorid
RXR	Retinoid-X Rezeptor
SD / SDS	Standard Deviation / Standard Deviation Score
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfat - Polyacrylamid Gel Elektrophorese
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
VDBP	Vitamin D-bindendes Protein
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VDRE	Vitamin D Response Element

III Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

Abb. 1:	Verteilung der Diagnosen, die bei Kindern und Jugendlichen zu einer Nierenersatztherapie führen	1
Abb. 2:	Schematische Darstellung eines Querschnitts durch eine Arterienwand	3
Abb. 3:	Vier Modelle für die Entstehung von Gefäßverkalkungen	4
Abb. 4:	Pathogenese der renalen Osteodystrophie und des gestörten Mineralstoffwechsels bei chronischer Niereninsuffizienz	5
Abb. 5:	Biosynthese von 1,25 Dihydroxycholecalciferol	7
Abb. 6:	Struktur und posttranslationale Modifikationen von Fetuin-A	8
Abb. 7:	Sporadische Gefäßverkalkungen einer Wildtypmaus (+/+) und einer AHSN Knockout-Maus (-/-) mit verkalkungssensitivem DBA/2 Hintergrund unter Phosphat und Vitamin D-reicher Diät	10
Abb. 8:	Anzahl der Probanden pro Alterskohorte, Darstellung der Fetuin-A Serumkonzentrationen und die auf den Serumproteingehalt bzw. auf den Serumalbumingehalt bezogenen Fetuin-A Konzentrationen innerhalb der Alterskohorten und im gesamten Kollektiv	18
Abb.9:	Zusammenhang zwischen den Fetuin-A Serumkonzentrationen und dem BMI-SDS	19
Abb.10:	Fetuin-A Serumkonzentrationen entsprechend den verschiedenen CNI-Stadien vor und nach NTX im Vergleich mit gesunden Kindern (Co)	22
Abb. 11:	Fetuin-A Serumkonzentrationen in Abhängigkeit der Calcium- und Phosphatserumkonzentrationen im Gesamtkollektiv der CNI-Patienten und bei gesunden Kontrollen	23
Abb. 12:	Fetuin-A Serumkonzentrationen als Funktion der CRP und PTH Spiegel bei dialysierten Patienten	25
Abb. 13:	Korrelation der Calcitriol- und Calcidiolspiegel mit der GFR	25
Abb. 14:	Korrelation zwischen den Calcium- und Calcidiolserumkonzentrationen	26

Abb. 15:	Fetuin-A Serumkonzentrationen als Funktion der gewichtsbezogenen Vitamin D ₃ -Jahresdosis im Gesamtkollektiv und die Assoziation zwischen dem Fetuin-A Serumspiegel und der gewichtsbezogenen Calcitriol-Jahresdosis bei dialysierten Patienten.	26
Abb. 16:	Vergleich der Fetuin-A Serumspiegel in den Untergruppen der Proteinuriepatienten miteinander und mit den Referenzwerten	29
Abb. 17:	Fetuin-A Serumkonzentrationen bei Proteinuriepatienten und gesunden Kontrollen als Funktion von Serumalbumin, Gesamtserumcalcium und Albumin-korrigiertem Serumcalcium	30
Abb. 18:	Western Blots korrespondierender Serum- und Urinproben von Kindern mit nephrotischem Syndrom, großer und milder Proteinurie	31
Abb. 19:	Assoziation der Urinkonzentrationen von Fetuin-A und Gesamteiweis bei Proteinuriepatienten	31
Abb. 20:	Fetuin-A Serumkonzentrationen als Funktion von Proteinurie, Albuminurie und Fetuin-A Exkretion im Urin bei Kindern mit Proteinurie	32
Abb. 21:	Zusammenhang zwischen den auf Kreatinin normierten Urinkonzentrationen von Protein und Fetuin-A bzw. von Protein und Albumin	33
Abb. 22:	Serum Fetuin-A als Funktion der fraktionellen Fetuin-A Clearance bei Proteinuriepatienten und gesunden Kontrollen	33
Abb. 23:	Zusammenhang zwischen Calcidiol bzw. Calcitriol und den Serum Fetuin-A Spiegeln bzw. Proteinurie	35
Tabellen		
Tab. 1:	CNI-Klassifikation des K/DOQI-Komitees	1
Tab. 2:	Altersabhängige Werte für den Faktor k zur Abschätzung der GFR	16
Tab. 3:	Demographische und klinische Merkmale der CNI-Patienten	20
Tab. 4:	Anthropometrische und biochemische Daten (Median und Bereich) in Relation zur Nierenfunktion	21
Tab. 5:	Korrelationen der Fetuin-A Serumkonzentration bei allen CNI-Patienten	23

Tab. 6:	Anthropometrische und biochemische Daten der Dialysepatienten	24
Tab. 7:	Korrelationen der Fetuin-A Serumkonzentration bei Dialysepatienten	24
Tab. 8:	Demographische und klinische Merkmale der Proteinuriepatienten	27
Tab. 9:	Anthropometrische und biochemische Daten der Proteinuriepatienten	28
Tab. 10:	Signifikante Assoziationen der Fetuin-A Konzentrationen in Serum und Urin mit den für eine Proteinurie charakteristischen Proteinen und der Kreatininkonzentration	32
Tab. 11:	Serumkonzentrationen von Albumin und Fetuin-A sowie ihre jeweilige fraktionelle Ausscheidung bei Proteinuriepatienten und bei gesunden Kontrollen	34

1 Einleitung

1.1 Ursachen der chronischen Niereninsuffizienz bei Kindern und Jugendlichen

Als chronische Niereninsuffizienz (CNI) wird der über Monate oder Jahre voranschreitende Verlust der Nierenfunktion bezeichnet. Tabelle 1 gibt die entsprechenden Stadien abhängig von der glomerulären Filtrationsrate (GFR) wieder.

Tab. 1: CNI-Klassifikation des K/DOQI-Komitees (National-Kidney-Foundation 2005)

CNI Stadium I	Nierenschädigung, erhaltene oder erhöhte Nierenfunktion (GFR > 90 ml/min/1,73 m ²)
CNI Stadium II	Leichte Niereninsuffizienz (GFR 61-90 ml/min/1,73 m ²)
CNI Stadium III	Mäßige Niereninsuffizienz (GFR 31-60 ml/min/1,73 m ²)
CNI Stadium IV	Fortgeschrittene Niereninsuffizienz (GFR 15-30 ml/min/1,73 m ²)
CNI Stadium V	Terminale Niereninsuffizienz (GFR < 15 ml/min/1,73 m ²)

Sowohl angeborene Fehlbildungen der Nieren und/oder des Harntraktes (CAKUT - Congenital Anomalies of the Urinary Tract and Kidney) als auch erworbene immunologische Erkrankungen können im Kindesalter zu einer CNI führen. Die Nephronoptise, polyzystische Nierenerkrankungen und das Alport-Syndrom sind dabei die häufigsten hereditären Ursachen, während die Glomerulonephritis, die interstitielle Nephritis, das hämolytisch-urämische Syndrom und Systemerkrankungen wie Lupusnephritis, Goodpasture-Syndrom, monoklonale Gammopathien, Amyloidose, Vaskulitiden, Anti-Phospholipid-Syndrom und thrombotisch-thrombozytopenische Purpura zu den erworbenen Ursachen zählen (Abb. 1).

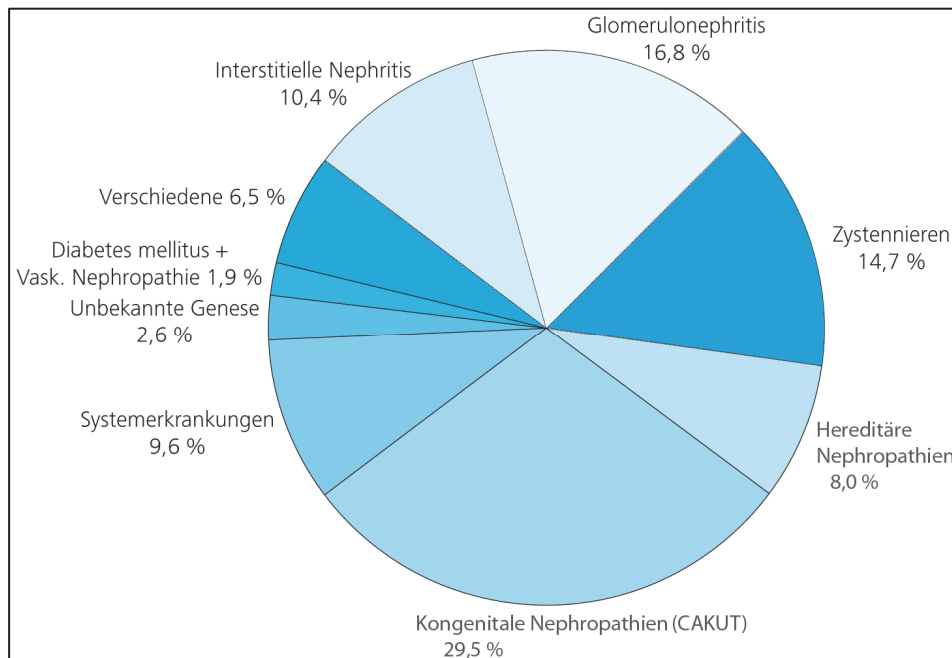


Abb. 1: Verteilung der Diagnosen, die bei Kindern und Jugendlichen (n=584) zu einer Nierenersatztherapie führen (modifiziert nach (Frei, et al. 2006)).

Bei Erwachsenen sind dagegen die diabetische Nephropathie, die vaskuläre Nephropathie und die Glomerulonephritis häufigste Ursache einer CNI (Frei, *et al.* 2006; Harambat, *et al.* 2011).

Bei Kindern und Jugendlichen sind neben dem kongenitalen nephrotischen Syndrom, das aufgrund des chronisch hohen Eiweißverlustes oftmals eine Nephrektomie als „ultimo ratio“ erfordert, auch weniger fulminante Formen der Proteinurie zu der Gruppe der chronischen Nierenerkrankungen zu zählen. Diese Erkrankungen sind dabei weniger durch einen Anstieg der Retentionswerte bzw. dem Verlust der glomerulären Filtration gekennzeichnet, sondern führen vielmehr durch den akuten oder chronischen Proteinverlust zu weitreichenden Konsequenzen.

Je nach Ursache der Proteinurie werden glomeruläre, tubuläre und gemischt glomerulär-tubuläre Proteinurien unterschieden. Zur Klassifizierung einer Proteinurie werden im 24h-Sammelurin α 1-Mikroglobulin (ca. 33 kDa), Albumin (ca. 69 kDa), Transferrin (ca. 80 kDa) und Immunglobulin G (IgG; ca. 150 kDa) quantitativ oder semiquantitativ bestimmt. Die häufigste Form ist eine Proteinurie vom rein glomerulären Typ. Dabei steigt als Folge einer geschädigten glomerulären Basalmembran die Durchlässigkeit für Albumin und für höhermolekulare Serumproteine wie z.B. die Immunglobuline, die unter physiologischen Bedingungen nur in sehr geringen Mengen ausgeschieden werden. Beim selteneren, tubulären Typ sind vor allem die proximalen Tubuluszellen geschädigt und primär ist die Resorption glomerulär filtrierter Proteine, also z.B. von α 1-Mikroglobulin und β 2-Mikroglobulin, beeinträchtigt. Unter physiologischen Bedingungen werden diese niedermolekularen Proteine zu ca. 96% im Tubulus resorbiert. Während bei einer tubulären Proteinurie in der Regel eine normale glomeruläre Filtrationsrate (GFR) vorliegt, ist diese bei einer gemischt glomerulär-tubulären Proteinurie leicht und bei einer glomerulären Proteinurie von ca. 100 mg/min auf mehr als 1 g/min gesteigert.

Wenn bei einer großen Proteinurie (>1 g/d) als Folge der Trias aus Hypalbuminämie (Albumin <25 g/l), Hypoproteinämie (Protein <60 g/l) und Hyperlipoproteinämie (Gesamtcholesterin >6,2 mmol/l, Low Density Lipoprotein (LDL) >3,9 mmol/l, Triglyceride >1,97 mmol/l, High Density Lipoprotein (HDL) <1,45 mmol/l) periphere Ödeme auftreten, spricht man von einem Vollbild des nephrotischen Syndroms.

Patienten mit Proteinurie haben ein erhöhtes Risiko, dass sich parallel zur Progression der renalen Erkrankung eine Niereninsuffizienz bis hin zur Dialysepflichtigkeit entwickelt (van der Velde, *et al.* 2009). Des Weiteren steigen bei gegebener Nierenfunktion mit zunehmender Proteinurie sowohl das Risiko einen Herzinfarkt zu erleiden als auch die Mortalität signifikant an (Hemmelgarn, *et al.* 2010; Matsushita, *et al.* 2010).

1.2 Ätiologie und Pathogenese der Gefäßverkalkungen bei chronischer Niereninsuffizienz

Gefäßverkalkungen können entweder in der Intima im Rahmen einer "klassischen" Atherosklerose oder in der Media vorkommen (Abb. 2).

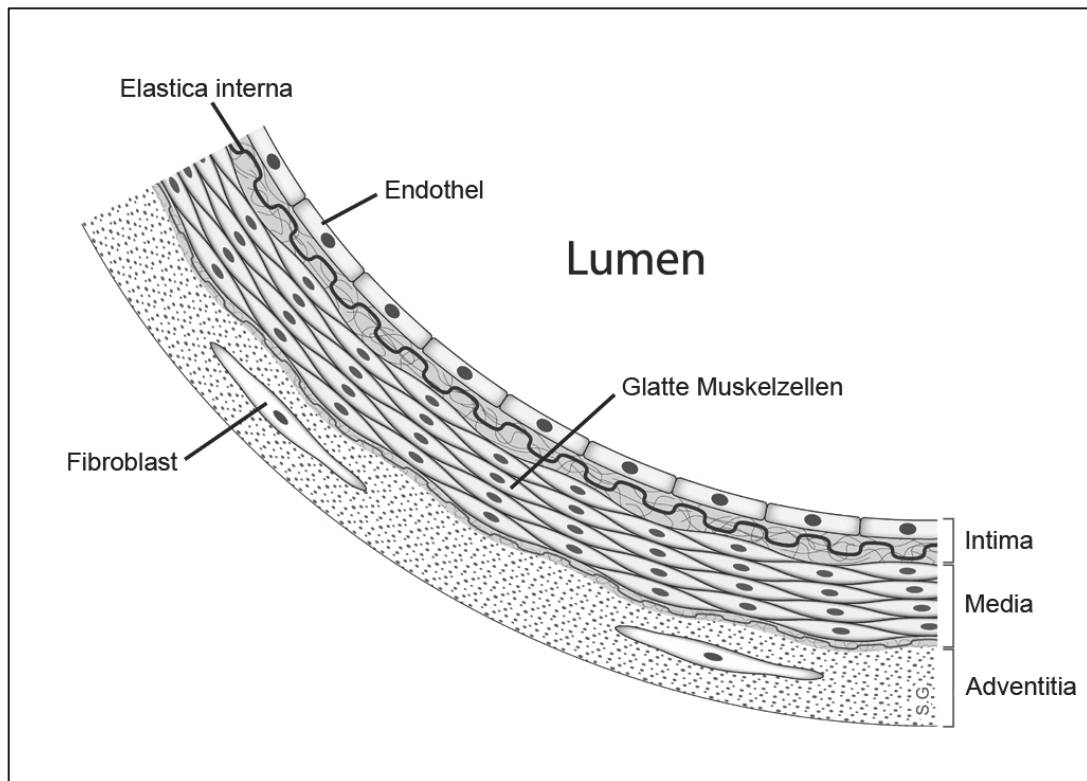


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch eine Arterienwand (Stijn A.I. Ghesquiere www.applesnail.net).

Dabei werden Mediaverkalkungen unabhängig von atherosklerotischen Veränderungen und, obwohl die allgemeine Inzidenz mit dem Alter zunimmt, bevorzugt bei Patienten mit Diabetes mellitus oder chronischer Niereninsuffizienz beobachtet. Die Calcifizierung der Media führt zu einer fortschreitenden Steifigkeit des Gefäßes, welches damit immer schlechter auf Änderungen des Blutdrucks reagieren kann. Der dadurch erhöhte Widerstand im Blutkreislauf führt langfristig zu einer reaktiven Dilatation mit nachfolgender Hypertrophie und Insuffizienz des linken Herzens.

Sowohl die Intima- als auch die Mediaverkalkung stehen nicht nur in engem Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel, sondern weisen sowohl auf molekularer als auch auf zellulärer Ebene Parallelen mit der enchondralen und membranösen Knochenbildung sowie den dazugehörigen Umbauprozessen auf (Hofbauer, *et al.* 2007; Neven, *et al.* 2007; Persy, *et al.* 2009).

Derzeit werden vier Mechanismen diskutiert, die, abhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung, in unterschiedlichem Maß zur Entstehung ektooper Calcifizierung beitragen (Abb.3):

a) Ein relativer Mangel der Calcifizierungsinhibitoren (Fetuin-A, Pyrophosphat, Matrix Gla Protein (MGP), Osteopontin (OPN), u.a.) führt zur Präzipitation von Calciumphosphaten (Ketteler, *et al.* 2005; Schoppet, *et al.* 2008).

b) Die Kombination aus hohen Phosphat- und Lipidkonzentrationen im Serum, inflammatorischen Cytokinen und oxidativem Stress kann die Transformation glatter Gefäßmuskelzellen zu osteoblastenähnlichen Zellen induzieren und/oder die Differenzierung ruhender Adipozyten in Osteoblasten stimulieren (Chen, *et al.* 2009; Demer, *et al.* 2008; Jahnen-Dechent, *et al.* 2008; Murshed, *et al.* 2005).

c) Aktiver Knochenumbau und gestörter Mineralstoffwechsel setzen mineralisierte Zellfragmente frei, die nur unvollständig phagozytiert und abgebaut werden (Price, *et al.* 2002; Price, *et al.* 2001).

d) Die bei natürlichem Zelltod bzw. Nekrose frei gesetzten Apoptosekörperchen dienen als Kristallisationskeime für die Bildung von Calciumphosphaten.

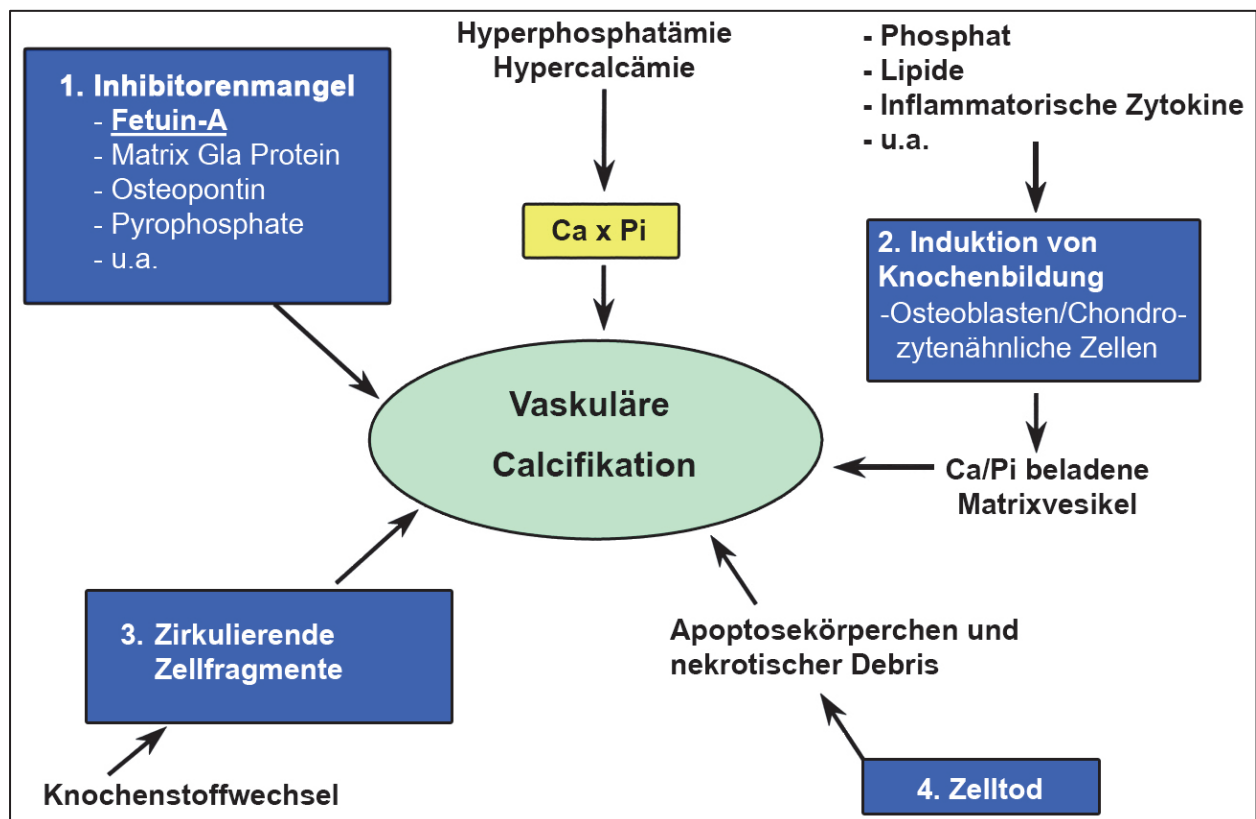


Abb. 3: Vier Modelle für die Entstehung von Gefäßverkalkungen (modifiziert nach (Giachelli 2004)). Ca =Calcium, P_i =Anorganisches Phosphat

In jedem Falle ist die ektope und orthotope Mineralisierung ein aktiver und geregelter Vorgang und keineswegs das Ergebnis einer zufälligen und unregelmäßigen Präzipitation basischer Calciumphosphate.

Bei CNI-Patienten spielt die gestörte Mineralhomöostase eine wichtige, wenn nicht gar ursächliche Rolle für die Pathogenese der Gefäßverkalkungen (Ketteler, *et al.* 2006; London 2003). Auch der kürzlich eingeführte Begriff "Chronic Kidney Disease - Mineral Bone Disorder" (CKD-MBD) spiegelt die enge Verbindung zwischen Nierenfunktion und Mineralstoffwechsel wieder (Moe, *et al.* 2007). Darüberhinaus trägt der Begriff der CKD-MBD der Tatsache Rechnung, dass es bei Patienten mit CNI gleichzeitig sowohl zu einer reduzierten Knochenmineralisierung als auch zu einer verstärkten ektope Calcifizierung, insbesondere der Gefäße, kommt. Letzteres trägt in erheblichem Maße zur kardiovaskulären Morbidität und Mortalität bei und wird unter Umständen auch schon bei Kindern und Jugendlichen mit einer terminalen Niereninsuffizienz (CNI Stadium V) beobachtet (Oh, *et al.* 2002).

Der Mineral- und Knochenstoffwechsel wird wesentlich durch die Interaktion zwischen Parathormon (PTH), dem Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) und Calcitriol reguliert (Abb. 4).

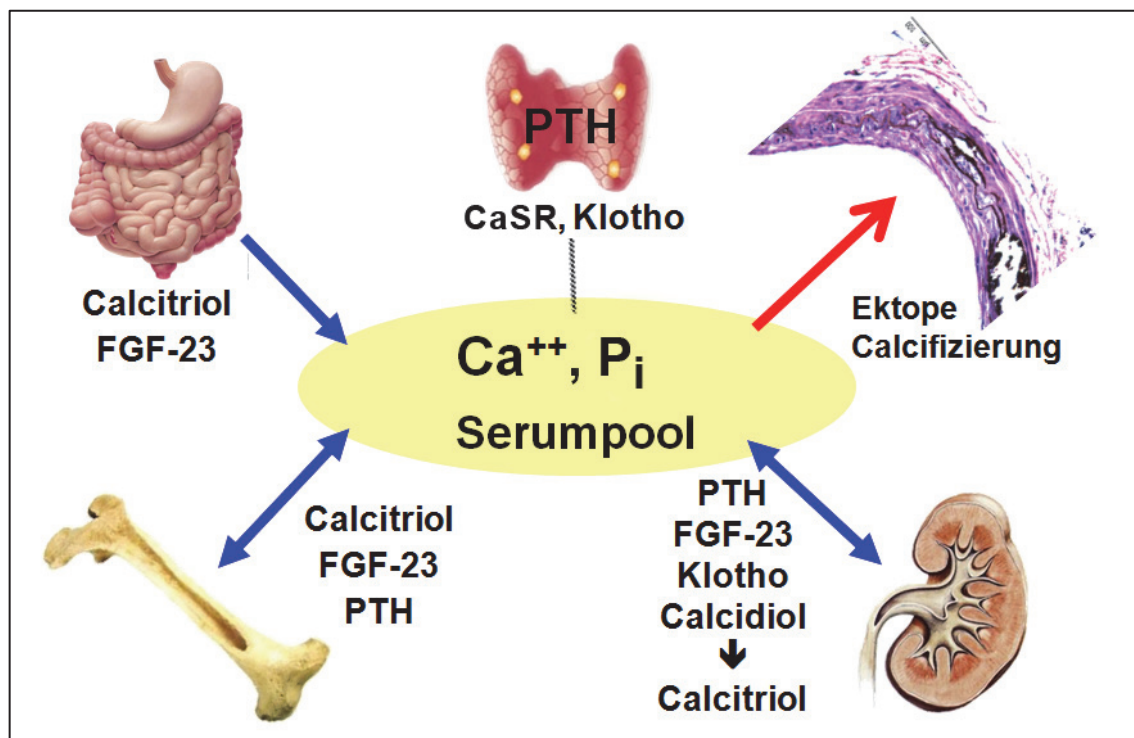


Abb. 4: Pathogenese der renalen Osteodystrophie und des gestörten Mineralstoffwechsels bei chronischer Niereninsuffizienz (modifiziert nach (Haffner, *et al.* 2010)).

FGF-23=Fibroblast Growth Factor-23; Ca=Calcium, P_i =Anorganisches Phosphat; PTH=Parathormon; CaSR=Calcium-sensitiver Rezeptor.

FGF-23 gehört zur Familie der endokrinen FGFs, wird von Osteoblasten sezerniert und ist wesentlich für die Regulation der tubulären Phosphatrückresorption. Bei hohen Serumphosphatspiegeln inhibiert FGF-23 nach Bindung an Klotho und den FGF-Rezeptor in den proximalen Tubuli die Expression der Natrium-abhängigen Phosphat Cotransporter (NPT) 2a und 2c und hemmt dadurch die Phosphatrückresorption. Gleichzeitig hemmt FGF-23 auch die renale 1- α -Hydroxylase und damit die Synthese von aktivem Vitamin D₃ (Calcitriol). Parallel zum Abfall der Nierenfunktion kommt es zu einem Anstieg von FGF-23. Dies trägt einerseits dazu bei, dass zwar die Serumphosphat Spiegel erst in relativ späten Stadien der CKD ansteigen, andererseits aber die gleichzeitige Hemmung der 1 α -Hydroxylase den Calcitriolmangel verstärkt sowie die gastrointestinale Calciumresorption reduziert (Bergwitz, *et al.* 2010; Berndt, *et al.* 2009; Kuro-o 2006, 2010; Nitta 2010; van Husen, *et al.* 2010). Calcium ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff der inter- und intrazellulären Signaltransduktion. Die Interaktion zwischen dem Calcium-Sensing Rezeptor (CaSR) und PTH ist wesentlich für die Calciumhomöostase, wobei die Aktivität des CaSR umgekehrt proportional zu den Calciumspiegeln verläuft. PTH stimuliert die Osteoklasten und damit die Freisetzung von Calcium und Phosphat aus dem Knochen (Komaba, *et al.* 2010; Lee, *et al.* 2009).

Die Therapie der CKD ist darauf gerichtet diesen „Teufelskreis“ zu unterbrechen, indem die gastrointestinale Phosphatausscheidung und Calciumresorption gefördert und die PTH Sekretion gehemmt wird (Kalantar-Zadeh, *et al.* 2010; National-Kidney-Foundation 2005). Dieses wird durch Gabe von Calcitriol, Phosphatbindern und Inhibitoren des CaSR erreicht. Trotz dieser Interventionen haben CKD-Patienten ein 20- bis 30-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Gefäßverkalkungen. Weiterhin sind in dieser Patientengruppe mehr als 50% aller Todesfälle auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückzuführen (Briese, *et al.* 2006; Foley, *et al.* 2005; Foley, *et al.* 1998; Oh, *et al.* 2002). Es gibt zahlreiche Hinweise, dass dem Vitamin D-Spiegel unabhängig von der Nierenfunktion eine besondere Bedeutung für die Entwicklung von Gefäßverkalkungen zukommt (Carrelli, *et al.* 2011; Haffner, *et al.* 2005; Shroff, *et al.* 2008; Zittermann, *et al.* 2007).

1.3 Vitamin D-Biosynthese

Die Vitamin D-Synthese findet zu 80-90% durch endogene Produktion statt (Abb. 5).

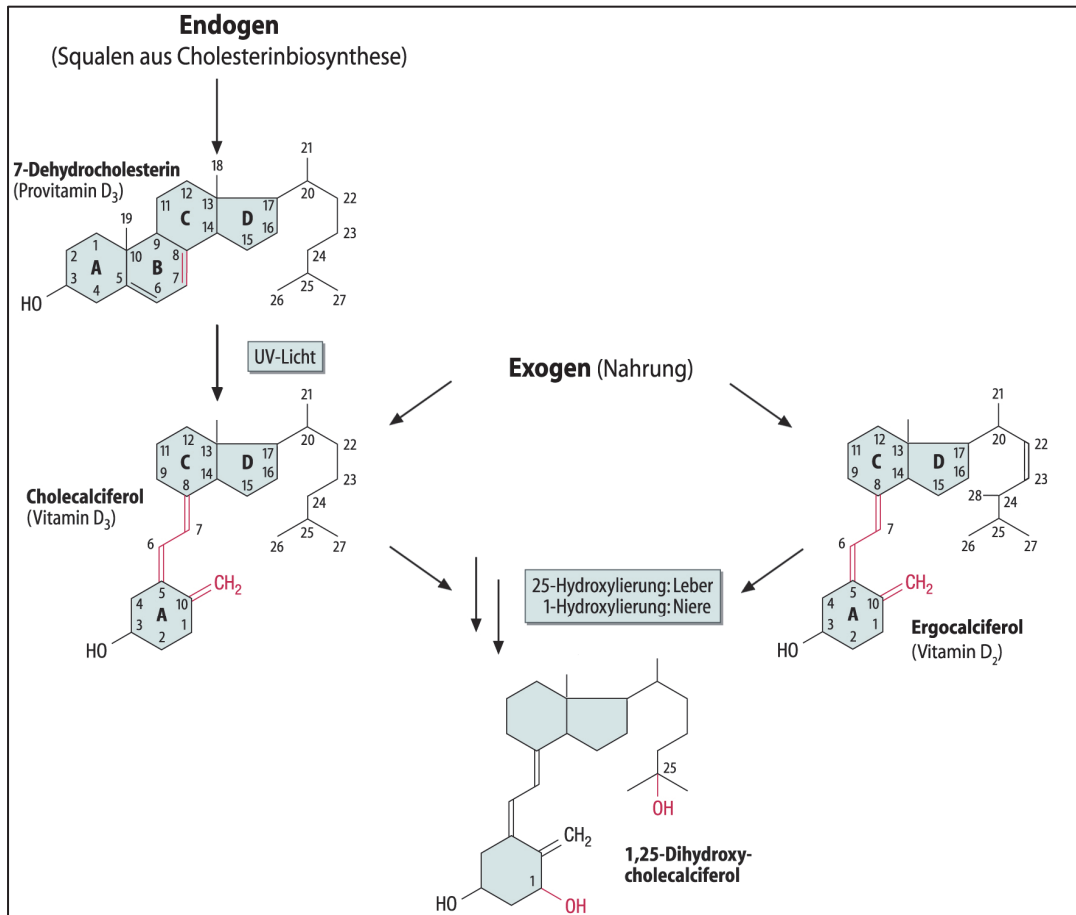


Abb.5: Biosynthese von 1,25 Dihydroxycholecalciferol (modifiziert nach (Löffler, *et al.* 2006)).

Das bei der Cholesterinbiosynthese entstehende Squalen wird zunächst in das Provitamin 7-Dehydrocholesterin überführt und anschließend in der Haut durch Einwirkung von UV-Licht in Vitamin D₃ (Cholecalciferol) umgewandelt. Zusätzlich werden Cholecalciferol und Vitamin D₂ (Ergocalciferol) in geringerem Maße über die Nahrung aufgenommen. Beide Vitamine besitzen die gleiche biologische Wirksamkeit, werden zunächst im Fettgewebe gespeichert und gelangen nach Bindung an das Vitamin D-bindende Protein (VDBP) in den Kreislauf und in die Leber, wo die Hydroxylierung zu 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol) stattfindet. In der Niere wird die Biosynthese von Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) durch die 1 α -Hydroxylase abgeschlossen (Löffler, *et al.* 2006; Makariou, *et al.* 2011). Obwohl zahlreiche Organe und Zelltypen ebenfalls eine 1 α -Hydroxylase besitzen und in der Lage sind Calcitriol zu synthetisieren, hat dieses lokal erzeugte Calcitriol im Wesentlichen autokrine/parakrine Wirkungen (Holick 2007; Querfeld, *et al.* 2010).

Vitamin D kontrolliert in Verbindung mit seinem zur Familie der nukleären Transkriptionsfaktoren gehörenden Rezeptor (VDR) ca. 3% des humanen Genoms und hat daher eine in jeder Hinsicht enorme Bedeutung für den Stoffwechsel (Bouillon, *et al.* 2008; Verstuyf, *et al.* 2010). In groß angelegten Studien wurde festgestellt, dass in der allgemeinen Bevölkerung und auch bei Kindern die Häufigkeit eines Vitamin D-Mangels zunimmt, was unter anderem auf veränderte Nahrungsgewohnheiten, zunehmende Fettleibigkeit und verminderte Sonnenexposition zurückzuführen ist (Hintzpeter, *et al.* 2008; Looker, *et al.* 2002; Makariou, *et al.* 2011).

Während bei einer chronischen Niereninsuffizienz die Pathomechanismen, die zu einer Gefäßverkalkung mit konsekutiver Erhöhung der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität führen, relativ gut bekannt sind, gilt dies für die Rolle der Proteinurie nur mit Einschränkungen. Bei diesen Patienten steht möglicherweise der renale Verlust von Fetuin-A, einem wichtigen Regulator der Mineral-Homöostase, im Vordergrund. Unabhängig von der Ursache des Fetuin-A-Mangels besteht eine Assoziation mit endothelialer Dysfunktion und Gefäßverkalkungen (Cottone, *et al.* 2010; Ketteler, *et al.* 2003; Shroff, *et al.* 2008).

1.4 Eigenschaften und Funktionen von Fetuin-A

Fetuin-A, das auch α_2 -Heremans-Schmid Glykoprotein (AHSG) genannt wird, gehört zur Superfamilie der Cystatin-C Proteine und wird im Wesentlichen von Hepatozyten synthetisiert (Brown, *et al.* 1997; Lee, *et al.* 2009). Das Gen ist auf Chromosom 3q27-q29 lokalisiert, umfasst ca. 8 kb und besteht aus sieben Exonen, die für ein Protein von ca. 35 kDa kodieren (Osawa, *et al.* 1997). Wie alle Mitglieder der Cystatin-C Superfamilie besteht Fetuin-A aus zwei über Disulfidbrücken miteinander verbundenen Polypeptidketten, die zusätzlich sowohl N- als auch O-glykosidisch gebundene Oligosaccharide tragen. Diese Oligosaccharide sind für die Interaktion mit Lektinen verantwortlich. Daneben existieren Bindungsstellen für Apatit und für Mitglieder der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) Superfamilie (Abb. 6).

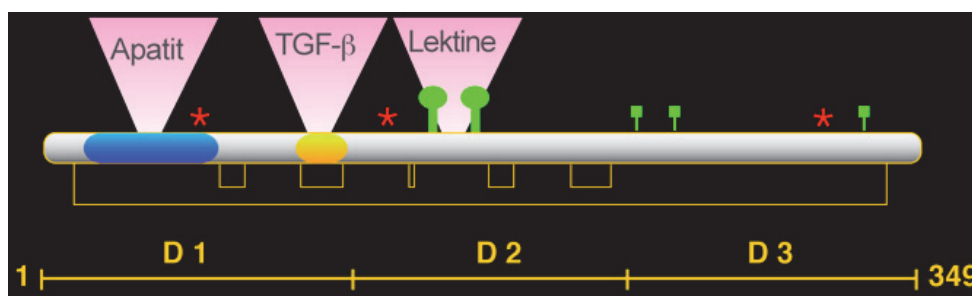


Abb.6: Struktur und posttranslationale Modifikationen von Fetuin-A. Gelbe Verbindungslinien stellen Disulfidbrücken dar, die für die Cystatin-ähnlichen Domänen D1 und D2 charakteristisch sind. Serin-Phosphorylierungsstellen sind mit einem roten Stern versehen [www.biointerface.rwth-aachen.de].

Die zu den Cytokinen gehörende Superfamilie der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) umfasst neben TGF- β_1 und TGF- β_2 auch die Unterfamilie der Bone morphogenetic proteins (BMP). Sowohl TGF- β als auch die BMPs sind für die Entwicklung von Knorpel und Knochen entscheidend. BMP-2 kann in Abhängigkeit von den lokalen Bedingungen die Umwandlung von mesenchymalen Zellen in Osteoblasten und Adipocyten induzieren. Fetuin-A blockiert durch Bindung an TGF- β die TGF- β -abhängigen Signalkaskaden in Osteoblasten und vermutlich reguliert das Verhältnis zwischen Fetuin-A und Cytokinen der TGF- β_2 -Familie die Auf- und Abbauvorgänge im Knochen (Szwera, *et al.* 2002).

Darüber hinaus sind noch die Beteiligung von Fetuin-A am Calpain-vermittelten Remodelling der Extrazellulär-Matrix im Rahmen der Wundheilung und die Interaktion zwischen Fetuin-A und dem Insulin-Rezeptor zu nennen (Auberger, *et al.* 1989; Lebreton, *et al.* 1979; Mellgren, *et al.* 2007; Srinivas, *et al.* 1993). Unter physiologischen Bedingungen hat zirkulierendes Fetuin-A eine Halbwertszeit von einigen Tagen und wird nach Bindung an den Asialoglykoprotein-Rezeptor über die Leber eliminiert (Tolleshaug 1984).

Obwohl Fetuin-A an zahlreichen physiologischen Vorgängen beteiligt ist, steht die Funktion als Verkalkungsinhibitor zunehmend im Mittelpunkt des Interesses. Fetuin-A ist ein Serumprotein und zusätzlich vorrangig in mineralisierten Geweben lokalisiert (Jahnen-Dechent, *et al.* 2011; Triffitt, *et al.* 1976). Untersuchungen an der Fetuin-A Knockout-Maus (AHSG^{-/-} Maus) haben wesentlich zum Verständnis der Funktion von Fetuin-A als zirkulierender Inhibitor der Verkalkung beigetragen (Jahnen-Dechent, *et al.* 1997; Schäfer, *et al.* 2003). Der Phänotyp der zunächst erzeugten C57BL6^{AHSG^{-/-}} Maus war deutlich milder als erwartet und es fanden sich neben einer nahezu normalen Knochenmineralisierung nur gelegentliche Weichteilverkalkungen bei älteren Tieren (Jahnen-Dechent, *et al.* 1997). Erst nach Rückkreuzung dieser Mäuse auf den verkalkungssensitiven DBA/2 Hintergrund und der Umstellung auf ein mit Phosphat und Vitamin D angereichertes Futter entwickelten sich ausgedehnte systemische Verkalkungen (Abb. 7) (Schäfer, *et al.* 2003).

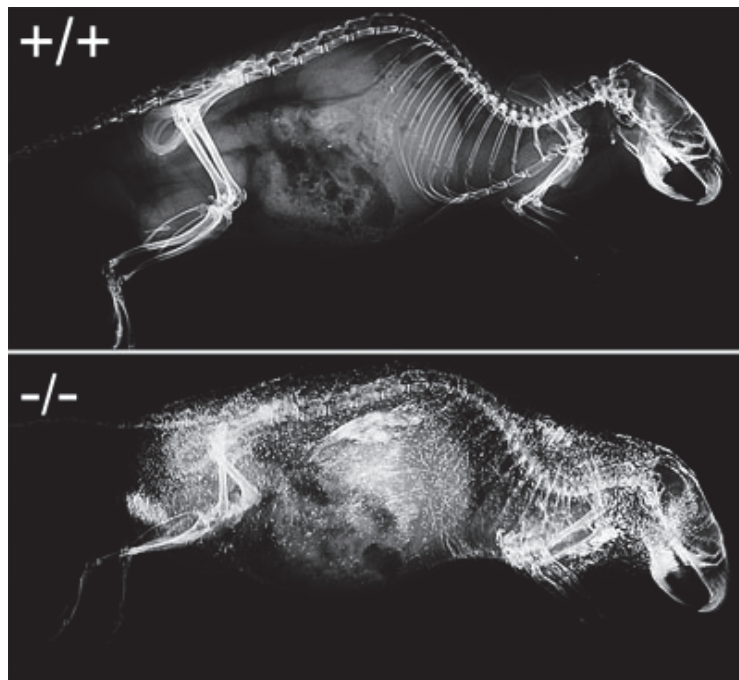


Abb. 7: Sporadische Gefäßverkalkungen einer Wildtypmaus (+/+) und einer AHSG Knockout-Maus (-/-) mit verkalkungssensitivem DBA/2 Hintergrund unter Phosphat und Vitamin D-reicher Diät (Schäfer, *et al.* 2003).

Fetuin-A bindet sowohl freie Calcium- und Phosphationen als auch bereits gebildete Calciumphosphatnanokristalle, verhindert die Aggregation der Nanokristalle und sorgt für den Transport zu den Orten der Mineralisierung (Jahnen-Dechent, *et al.* 2011). Damit ist Fetuin-A Inhibitor der ektopen Verkalkung und gleichzeitig als Transportprotein maßgeblich an der orthotopen Mineralisierung beteiligt (Heiss, *et al.* 2010; Jahnen-Dechent, *et al.* 2008). Während Fetuin-A in der gesunden Gefäßwand in der Regel nicht nachweisbar ist, wird es in atherosklerotisch veränderten Gefäßen nahezu unabhängig vom Ausmaß der Verkalkung und den Begleiterkrankungen gefunden. In den frühen Phasen einer Gefäßerkrankung dient die Akkumulation von Fetuin-A in glatten Muskelzellen mit großer Wahrscheinlichkeit dazu, die Mineralisierung zu verhindern (Chen, *et al.* 2007; Shroff, *et al.* 2008; Voigt, *et al.* 2010). Demgegenüber reflektiert der Nachweis von Fetuin-A in fortgeschritten calcifizierten Läsionen wohl eher die ossäre Transformation des betroffenen Gewebes und die Umwandlung einer primär nichtmineralisierbaren zu einer mineralisierbaren Matrix.

2 Ziel der Arbeit

Fetuin-A spielt als multifunktionelles Protein sowohl für die Hemmung ektopter als auch für die Gewährleistung orthotoper Mineralisierung eine wichtige Rolle. Neben Albumin ist zirkulierendes Fetuin-A ganz wesentlich für die Komplexierung unlöslicher Calciumphosphate verantwortlich. Bislang wurden Fetuin-A Serumspiegel überwiegend bei erwachsenen Patienten in Relation zur Grunderkrankung beurteilt, es ist aber nur wenig über die Veränderungen der Fetuin-A Serumspiegel im Rahmen von Wachstum und Entwicklung bekannt.

Immunochemische Verfahren sind sehr gut geeignet, um z. B. im Serum die Konzentration eines definierten Proteins ohne aufwendige Probenvorbereitung relativ zu einem internen Standard quantitativ zu bestimmen. Allerdings hängt das Ergebnis eines solchen immunochemischen Tests immer von den Eigenschaften der Antikörper, dem für die Kalibration verwendeten Standard (natives Protein, rekombinantes Protein, konjugierte Peptide etc.), von der Geometrie des Assays (z.B. Sandwich-Assay, Inhibitionsassay) und dem gewählten Detektionssystem ab. Diese Einschränkungen erschweren den direkten Vergleich von Ergebnissen, die mit verschiedenen Assays erzielt wurden. Daher ist es erforderlich, für jeden Assay Referenzwerte zu erstellen. Auch für die quantitative Bestimmung von Fetuin-A in Serum und/oder Urin sind Assays verschiedener Hersteller kommerziell verfügbar.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden:

1. Ob die Fetuin-A Spiegel bei gesunden Kindern und Jugendlichen mit dem Alter bzw. Wachstum und Entwicklung assoziiert sind.
2. Ob die Fetuin-A Serumspiegel bei Proteinurie oder nephrotischem Syndrom und erhaltener glomerulärer Filtrationsrate abnehmen und ob der renale Verlust von Fetuin-A diesen Abfall erklären kann.
3. Wie sich Fetuin-A Serumspiegel relativ zur Einschränkung der glomerulären Nierenfunktion bei Kindern und Jugendlichen verhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Patienten und Probanden

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurden im Rahmen der Studien „Fetuin-A im Blut und Urin bei gesunden Kindern und Kindern mit Nierenerkrankungen“ (Geschäftszeichen der Ethikkommission: II HV04/2006) und „Konzentration löslicher Calcifizierungsinhibitoren im Serum von Kindern und Jugendlichen mit physiologischer Nierenfunktion: Erstellung altersabhängiger Normwerte“ (Zeichen der Ethikkommission: A 002/2008) durchgeführt. In beiden Studien wurden Kinder und Jugendliche nach altersgerechter Aufklärung und Zustimmung sowohl durch die Probanden selbst als auch durch die Eltern eingeschlossen. Von allen Studienteilnehmern wurden Alter, Gewicht und Körperhöhe zum Zeitpunkt der Probenentnahme erfasst. Probanden mit chronisch inflammatorischen Erkrankungen wurden grundsätzlich von der Teilnahme ausgeschlossen.

Darüber hinaus galten je nach Fragestellung weitere spezifische Ein- und Ausschlusskriterien:

a) für Kinder und Jugendliche der Kontrollgruppen:

Einschlusskriterien: Gesunde Kinder und Jugendliche.

Ausschlusskriterien: Renale oder andere chronische Erkrankungen, regelmäßige Medikamenteneinnahmen, akute oder chronische Infektionen mit Serumspiegeln des C-reaktiven Proteins (CRP) von mehr als 5 mg/l, erhöhte Serumwerte von Kreatinin (≥ 2 SD) bzw. eine erniedrigte GFR (< 80 ml/min/1,73m²), metabolische Störungen, Hypertonie, schwere Dystrophien (BMI-SDS < -2 SDS) und Adipositas (BMI-SDS > 2 SDS).

b) für Kinder und Jugendliche mit einer CNI:

Einschlusskriterien: CNI Stadien 1-5 und Nierentransplantation.

Ausschlusskriterium: Akute Infektionen.

c) für Kinder und Jugendliche mit einer Proteinurie:

Einschlusskriterium: Eine Proteinurie von mehr als 100 mg/m²/Tag.

Ausschlusskriterien: Akute Infektionen, erhöhte Serumwerte von CRP (≥ 5 mg/l) und Kreatinin (≥ 2 SD) und erniedrigte GFR (< 80 ml/min/1,73m²).

Die Entnahme der Blut- und Urinproben erfolgte stets morgens in nüchternem Zustand im Rahmen der anstehenden ambulanten bzw. stationären Behandlung. Bei dialysepflichtigen Patienten erfolgte die Entnahme vor der Dialysebehandlung. Die Proben wurden in das Forschungslabor der Kinder- und Jugendklinik gebracht und dort zur Isolierung von Serum mit 2500 U/min (980g) für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Danach erfolgte die Aliquotierung der Serum- und/oder Urinproben in Polypropylenröhrchen und die anschließende Einlagerung bei -80°C bis zur weiteren Analyse.

3.2 Materialien

Bayer Vital GmbH, D-51373 Leverkusen
Albustix™ Teststreifen für Urin

DIANOVA GmbH, D-20354 Hamburg
Meerrettichperoxidase-konjugierter Esel-Anti-Ziegen-Antikörper

Epitope Diagnostics Inc., USA 92126 San Diego
Fetuin-A ELISA Kit (Katalognummer KT 800)

Merck KGaA, D-64293 Darmstadt
Grundchemikalien (mindestens p.a.- Qualität)

R&D Systems, Inc., USA-55413 Minneapolis
Polyklonaler Ziegen-Anti-Fetuin-A Antikörper

Sarstedt AG & Co, D-51588 Nümbrecht
Blutentnahmesysteme, Serum-Monovetten, Urin-Monovetten

Tecan Group Ltd., CH-8708 Männedorf
Infinite M200 PRO Mikroplattenleser, Magellan™ Standard Data Analysis Software

Thermo Fisher Scientific Inc., USA-61101 Rockford
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate

Whatman inc., USA-07932 New Jersey
Westran Polyvinyliden-Fluorid Membran

3.3 Methoden

Die im Rahmen der stationären bzw. ambulanten Patientenversorgung durchgeführten Blutuntersuchungen wurden im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (Kommissarische Leitung: Dr. med. P. Kohlschein) des Universitätsklinikums Rostock durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden aus den Patientenakten übernommen. Abhängig von der Fragestellung wurden die Konzentrationen von CRP, Protein, Albumin, Kreatinin, Gesamt-Calcium, Phosphat, PTH, Calcitriol und Calcidiol bestimmt. Sofern die oben genannten Analysen nicht im Rahmen der Patientenversorgung durchgeführt wurden, erfolgte die Bestimmung im selben Labor zu einem späteren Zeitpunkt aus einem der asservierten und bei -80 °C gelagerten Aliquote. In den Seren gesunder Probanden wurden neben Calcium und Phosphat auch die Gesamteiweiß- und die Albumin-Konzentration im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Rostock bestimmt. Die Ergebnisse quantitativer Analysen des Spontanurins wurden auf die Kreatinin-Konzentration im Urin normiert. Bei Patienten mit einer Proteinurie wurden im 24h-Sammelurin die Konzentrationen von Protein, Albumin, α_1 -Mikroglobulin, α_2 -Makroglobulin, Immunglobulin G (IgG) und Transferrin im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin bestimmt. Die Ergebnisse wurden anhand der Referenzbereiche, die im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin verwendet wurden, beurteilt.

Informationen zum Krankheitsverlauf und Medikation wurden durch Anamnese erhoben und/oder aus den Akten entnommen.

3.3.1 Quantitative immunchemische Bestimmung von Fetuin-A in Serum und Urin

Die Fetuin-A Spiegel in Serum und Urin wurden mit einem kommerziellen ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Epitope Diagnostics, San Diego, USA) entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Da es sich um einen manuell durchgeführten Test handelt, wurden alle Analysen als Doppelbestimmungen angesetzt. Das Ergebnis wurde verworfen und die Messung wiederholt, wenn die Abweichung zwischen beiden Bestimmungen mehr als 10% betrug. Die Serum- und Urinproben wurden für die Bestimmung von Fetuin-A mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer 1:10.000 bzw. 1:300 verdünnt. Die untere Nachweisgrenze des Assays lag bei 0,005 mg/l.

3.3.2 Qualitativer Nachweis von Fetuin-A durch Elektrophorese und Western-Blot

Serum und Urin wurde auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/l eingestellt und durch Natrium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-Page) in einem 10% Gel unter nicht reduzierenden Bedingungen getrennt. Die getrennten Proteine wurden zum Nachweis von Fetuin-A auf eine Polyvinyliden-Fluorid-Membran (PVDF; Whatman Westran PVDF, Dassel, Germany) überführt (Semi Dry Blot nach Towbin (Towbin, *et al.* 1979)). Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Inkubation mit Blotto (5% Magermilchpulver in 20 mM Tris, 0,3 M NaCl; pH 7,5; 2h Raumtemperatur) blockiert, bevor mit dem polyklonalen Ziegen-Anti-Fetuin-A-Antiserum (1:300 in Blotto, 4 °C über Nacht) inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran gewaschen (3 x 5 min 20 mM Tris, 0,3 M NaCl, 0,25% (v/v) Tween 20; pH 7,5) und mit einem Meerrettichperoxidase-konjugiertem Esel-Anti-Ziegen-Antikörper (1:1000, 1,5h Raumtemperatur) inkubiert. Gebundene Antikörper wurden durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht (Fischer, *et al.* 2011).

3.3.3 Berechnung abgeleiteter klinischer und krankheitsspezifischer Größen

a) Daten zum Patienten:

- Bei allen Patienten und Kontrollpersonen wurden Körperlänge (KL; [m]) und Körpergewicht (KG; [kg]) erfasst. Daraus wurde der Body Mass Index (BMI; [kg/m²]) nach Formel (1) berechnet (Keys, *et al.* 1972).

$$(1): BMI = \frac{KG}{(KL)^2}$$

- Für die Berechnung von individuellen alters- und geschlechtsspezifischen Standardabweichungen (SDS) für Körperlänge (KL-SDS), Körpergewicht (KG-SDS) und BMI (BMI-SDS) wurden die von Prader, *et al.* und Kromeyer-Hauschild, *et al.* publizierten Daten verwendet (Kromeyer-Hauschild, *et al.* 2001; Prader, *et al.* 1989). Die SDS für den BMI basieren auf der LMS-Methode und wurden nach Formel (2) berechnet, wobei BMI den Individualwert des Kindes und M(t), L(t) und S(t) die alters- und geschlechtsspezifischen Werte für M, L und S darstellen.

$$(2): SDS_{LMS} = \frac{[BMI / M(t)]^{L(t)} - 1}{L(t) \cdot S(t)}$$

- Die Körperoberfläche (KOF; [m²]) ergab sich nach Formel (3) (Mosteller 1987).

$$(3): KOF = \sqrt{\frac{KG \cdot KL}{3600}}$$

- b) Bei Vorliegen einer Hypalbuminämie (C_{Alb} , gemessen in g/l) wurden die gemessenen Calciumkonzentrationen (Ca_{ges} , gemessen in mmol/l) gemäß Formel (4) korrigiert (Payne, *et al.* 1973).

$$(4): Ca_{kor} = Ca_{ges} - (0,025 \cdot c_{Alb}) + 1$$

- c) Die geschätzte glomeruläre Filtrationsrate (GFR; [ml/min/1,73m²]) wurde anhand Formel (5) aus der Kreatininkonzentration im Serum (C_{Krea} , gemessen in mg/dl), der Körperlänge (KL, gemessen in cm) und einem von Alter und Geschlecht abhängigen Faktor k (Tabelle 2) berechnet (Schwartz, *et al.* 1976).

$$(5): GFR = k \cdot \frac{KL}{C_{Krea}}$$

Tab. 2: Altersabhängige Werte für den Faktor k zur Abschätzung der GFR

Alter [Jahre]	Faktor k	
	männlich	weiblich
<1 frühgeboren	0,33	
<1 neugeboren	0,45	
1-13	0,55	
>13	0,70	0,50

- d) Die prozentuale fraktionierte Exkretion (FE_{prot}) von Fetuin-A oder Albumin wurde anhand Formel (6) berechnet (Bazzi, *et al.* 2000; Deegens, *et al.* 2007).

$$(6): FE_{prot} = \frac{U_{prot}}{S_{prot}} \times \frac{S_{crea}}{U_{crea}} \times 100\%$$

U_{crea} und U_{prot} sowie S_{crea} und S_{prot} symbolisieren die Urin- und Serumkonzentrationen von Kreatinin und Fetuin-A bzw. Albumin.

- e) Die Krankheitsdauer ergab sich als Differenz zwischen dem Datum der Probenentnahme und dem Datum des erstmaligen Auftretens klinischer Symptome, d.h. einer Erhöhung der Retentionswerte oder einer Proteinurie von mehr als 100 mg/m²/Tag. Die Dauer der Proteinurie wurde aus der Differenz zwischen dem Datum der Probenentnahme und dem Beginn der akuten oder der chronischen Proteinurie errechnet.
- f) Die kumulative Dauer der Dialysebehandlung wurde als Summe aller Zeiträume bis Probenentnahme definiert, in denen eine Dialyse stattgefunden hat.
- g) Die Dauer der Behandlung mit einem Nierentransplantat ergab sich aus der Differenz zwischen dem Datum der Probenentnahme und dem Datum der Nierentransplantation.

3.3.4 Statistische Verfahren

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Softwarepaket SPSS Version 17.0 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) und SigmaPlot Version 10.0 (Systat Software Inc. San Jose, California, USA). Ein Kolmogorov-Smirnov-Test wurde für die Prüfung der Normalverteilung durchgeführt. Für normal verteilte Parameter sind Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Für Gruppenvergleiche wurde der ungepaarte Student t-Test verwendet und Korrelationen wurden nach Pearson berechnet. Varianzanalysen wurden mit der einfaktoriellen ANOVA (analysis of variance) durchgeführt. Bei nicht normal verteilten Daten sind Median und Bereich angegeben. Der parameterfreie Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde für Gruppenvergleiche benutzt. Zur Beurteilung der Assoziationen zwischen verschiedenen Variablen wurde der Spearman Test herangezogen. Alle Variablen, die signifikant mit den Fetuin-A Serumkonzentrationen assoziiert waren ($p < 0,1$), wurden in die multiple Regressionsanalyse eingeschlossen. Bei CNI-Patienten waren dies die gewichtsbezogene Vitamin D₃-Jahresdosis, die Serumkonzentration von Calcium und das CNI Stadium. In der Gruppe der Proteinurie-Patienten waren dies die Serumkonzentrationen von Protein, Albumin, Albumin-korrigiertem Calcium und die auf Kreatinin bezogenen Urinkonzentrationen von Protein, Albumin und Fetuin-A.

Grundsätzlich wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p < 0,05$) als statistisch signifikant akzeptiert.

4 Ergebnisse

4.1 Konzentration von Fetuin-A im Serum und Urin gesunder Kinder und Jugendlicher

Für die Bestimmung der Fetuin-A Referenzwerte standen Seren von 246 gesunden Kindern und Jugendlichen (133 männlich / 113 weiblich) mit einem mittleren Alter von 9,7 Jahren (9 Tage – 18 Jahre) zur Verfügung. Die Probanden wurden in fünf Altersgruppen aufgeteilt. Dabei war die Anzahl der Probanden pro Altersgruppe relativ ähnlich. Sowohl innerhalb dieser Altersklassen als auch über alle Altersklassen hinweg waren die Fetuin-A Serumkonzentrationen normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test $p = 0,302$). Des Weiteren zeigte sich keine Assoziation mit dem Alter ($p = 0,300$) oder Geschlecht ($p > 0,05$). Auch nach Normierung der Fetuin-A Konzentrationen auf den Protein- bzw. Albumingehalt im Serum zeigte sich keine Assoziation mit dem Alter oder Geschlecht (Abb. 8). Damit ergab sich für das Referenzintervall (Mittelwert $\pm 1,96$ SD) für Fetuin-A im Serum ein Bereich von 0,22 g/l bis 0,70 g/l ($0,46 \pm 0,24$ g/l).

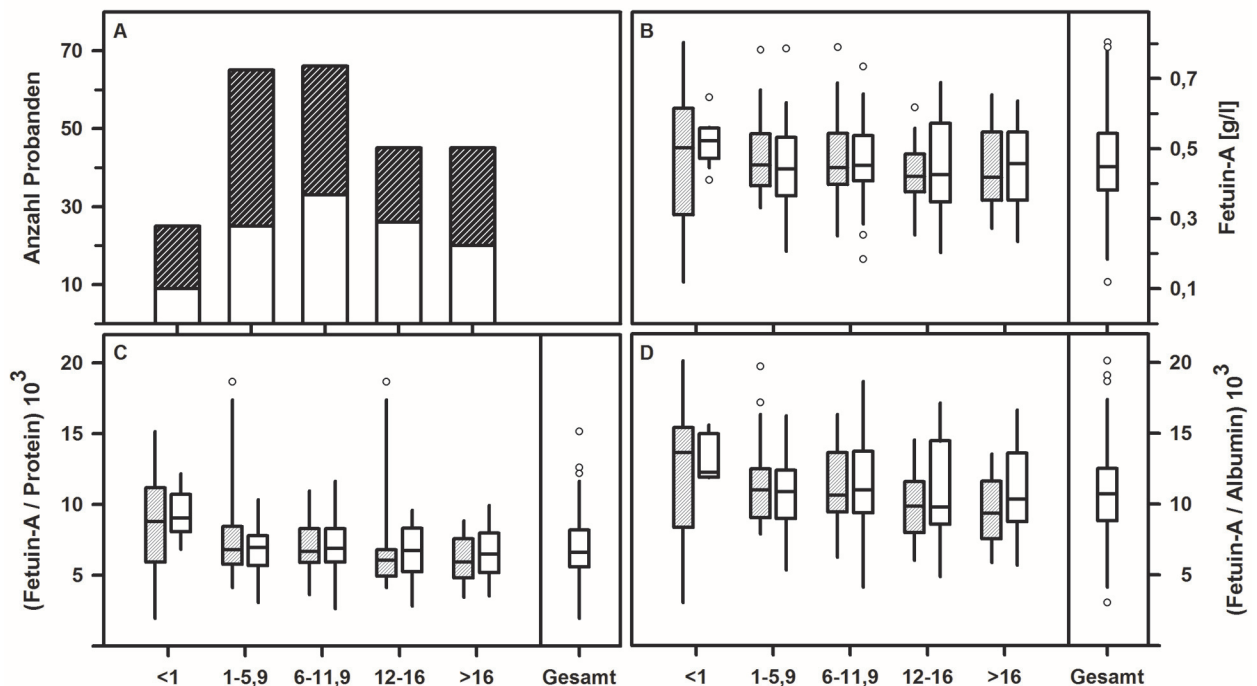


Abb. 8: Anzahl der Probanden pro Alterskohorte (A), Darstellung der Fetuin-A Serumkonzentrationen (B) und die auf den Serumproteingehalt (C) bzw. auf den Serumalbumingehalt (D) bezogenen Fetuin-A Konzentrationen innerhalb der Alterskohorten und im gesamten Kollektiv.

Weiße bzw. schraffierte Säulen symbolisieren die Anzahl der weiblichen bzw. männlichen Probanden. Die Boxplots stellen Median, 25. und 75. Perzentile dar. Ausreißer sind als offene Kreise dargestellt.

Darüber hinaus waren die Fetuin-A Serumspiegel bei gesunden, normalgewichtigen Probanden (alterskorrigierter BMI-SDS) nicht mit dem BMI assoziiert (Abb. 9).

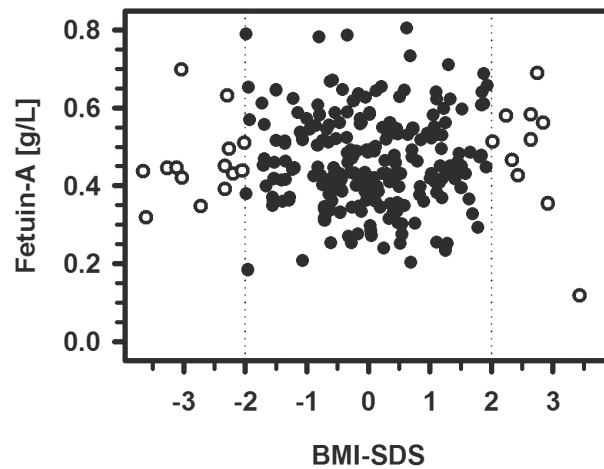


Abb. 9: Zusammenhang zwischen den Fetuin-A Serumkonzentrationen und dem BMI-SDS. Weiße offene Kreise geben die von der Studie ausgeschlossenen Probanden wieder, schwarze Kreise zeigen die Probanden, die im Bereich von zwei Standardabweichungen von BMI-SDS liegen.

Von insgesamt 50 Kindern und Jugendlichen (22 männlich / 28 weiblich) mit einem mittleren Alter von 14,2 Jahren (7,6 – 17,6 Jahre), die für eine andere themenverwandte Studie rekrutiert wurden, standen Spontanurine für die Bestimmung von Fetuin-A zur Verfügung. Bei elf dieser Probanden lagen die Fetuin-A Konzentrationen im Urin unterhalb der Nachweisgrenze, in den restlichen 34 Proben ergab sich eine auf Kreatinin normierte mittlere Konzentration von $0,37 \pm 0,2$ mg/g. Die Fetuin-A Konzentration im Urin war weder mit dem Alter (Spearman $r = -0,171$, $p = 0,30$) noch mit dem Geschlecht (Mann-Whitney-Test $p = 0,899$) assoziiert.

4.2 Fetuin-A bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz

4.2.1 Charakterisierung der Patienten

Es wurden 112 Patienten mit einem Alter zwischen 0,3 und 20 Jahren (Median 12,6 Jahre) untersucht. In Tabelle 3 sind die renalen Grunderkrankungen und die medikamentöse Therapie zusammengefasst.

Tab. 3: Demographische und klinische Merkmale der CNI-Patienten

	<i>N</i>	%
Geschlecht		
männlich	65	58
weiblich	47	42
Renale Grunderkrankung		
Kongenitale Anomalien von Niere und Harntrakt	47	42
Hereditäre Nephropathien	26	23
Glomeruläre Erkrankungen	19	17
Andere	20	18
Medikation		
Antihypertensiva	101	90
ACE-Inhibitoren	72	
AT1-Blocker	29	
Beta-Blocker	63	
Calciumkanal-Blocker	42	
Furosemid	82	
Vasodilatoren	18	
Phosphatbinder		
Calcium-haltige Phosphatbinder	26	23
Sevelamer	17	15
Vitamin D und Hormonbehandlung		
Vitamin D ₃	72	64
Calcitriol	52	46
Erythropoietin	38	34
Wachstumshormon	44	39
Immunsuppression nach Nierentransplantation	19	17
Cyclosporin A	15	
Tacrolimus	4	
Mycophenolat Mofetil	19	
Prednisolon	9	

Die mittlere Dialysezeit betrug 1,2 Jahre (Bereich 0,3 – 16,5 Jahre). Die mittlere Dialyseeffizienz, ausgedrückt als die Harnstoff Clearance pro Zeit und Verteilungsvolumen (Kt/V), belief sich bei Hämodialyse (HD) auf 1,68 (Bereich: 1,4 – 2,5) und bei Peritonealdialyse (PD) auf 1,85 (Bereich: 1,7 – 2,6). Die Dialysatlösungen hatten eine Calciumkonzentration von 1,25 mmol/l. Die mittlere Zeit seit Nierentransplantation betrug 5,6 Jahre (Bereich 0,1 – 15,6 Jahre). Bei allen Patienten handelte es sich um die erste Nierentransplantation, wobei sieben Patienten die Niere eines verstorbenen und zwölf Patienten die Niere eines lebenden Spenders erhalten hatten.

4.2.2 Fetuin-A Serumkonzentrationen bei allen CNI-Patienten

Die anthropometrischen und biochemischen Daten der Patienten mit konservativer Behandlung und nach Nierentransplantation (NTX) sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tab. 4: Anthropometrische und biochemische Daten (Median und Bereich) in Relation zur Nierenfunktion

	CNI 1 (n=10)	CNI 2 (n=20)	CNI 3 (n=18)	CNI 4 (n=19)	NTX (n=19)
GFR [ml/min/1.73m ²]	96 ^a (92-125)	72 ^{a, b} (64-89)	48 ^{a, b, c} (30-59)	24 ^{a, b, c, d} (15-30)	57 ^{a, c, d} (19-158)
Alter [Jahre]	8.0 ^a (0.3-16.8)	11.9 (0.9 - 20.7)	14.8 (0.8-18.3)	10.5 (0.3-20.3)	13.2 ^a (5.4-20.3)
KL-SDS	-1.18 (-3.00-0.85)	-0.93 (-4.4-1.27)	-1.29 (-3.88-0.83)	-1.05 (-5.21-0.92)	-1.24 (-3.62-1.06)
BMI-SDS	0.49 (-4.83-1.94)	2.96 (-3.69-1.59)	-0.78 ^a (-4.06-2.21)	-0.21 (-2.60-2.42)	0.22 ^a (-2.11-2.75)
Albumin [g/l]	40.0 (37.4-57.4)	39.4 (28.5-43.4)	39.6 (14.6-4.9)	40.9 (14.4-46.4)	40.1 (30.1-47.5)
CRP [mg/l]	1.00 (1-23)	1.48 (1-16)	1.18 (1-30)	1.00 (1-10)	3.29 (1-44)
Calcium [mmol/l]	2.43 (2.30-2.70)	2.41 ^a (1.87-2.62)	2.42 (2.33-2.72)	2.54 ^a (1.60-2.70)	2.44 (2.10-2.74)
Phosphat [mmol/l]	1.48 (0.91-1.97)	1.53 (0.86-2.78)	1.51 (0.91-2.15)	1.65 (1.09-2.67)	1.49 (0.69-1.82)
PTH [ng/l]	55 ^a (29-80)	52 ^b (20-172)	104 ^c (17-208)	137 ^{a, b, c} (60-944)	128 (29-285)
Calcidiol [nmol/l]	77.8 (40.7-120)	74.9 (15.2-130)	78.4 (14.1-133)	76.8 (12.6-215)	77.1 (27-142)
Calcitriol [pmol/l]	135 ^a (79-278)	113 (55-210)	92 (29-247)	77 ^a (12-307)	84 (12-225)
Fetuin-A [g/l]	0.48 (0.15-0.64)	0.37 ^{*, a} (0.16-0.53)	0.40 (0.24-0.84)	0.45 ^a (0.30-0.78)	0.43 (0.15-0.62)

NTX=Nierentransplantation; KL=Körperlänge; Signifikante Unterschiede ($p<0,05$) zwischen Gruppen (gleiche Buchstaben) und gegenüber gesunden Kontrollen (*).

Innerhalb der Gruppe aller CNI-Patienten waren die Fetuin-A Spiegel normalverteilt und unabhängig vom Geschlecht (Kolmogorov-Smirnov-Test: $p = 0,507$; Student t-Test $p = 0,276$).

Im Gegensatz zu gesunden Probanden war die Fetuin-A Serumkonzentration bei Kindern mit einer chronischen Niereninsuffizienz signifikant niedriger. Bei Klassifizierung entsprechend dem Stadium der Niereninsuffizienz zeigte sich, dass Kinder und Jugendliche mit mäßigem Funktionsverlust (CNI Stadium 2) (Mann-Whitney-Test $p = 0,004$) und solche mit chronischer Dialysebehandlung (CNI Stadium 5) (Mann-Whitney-Test $p < 0,001$) gegenüber gesunden Kontrollen signifikant niedrigere Fetuin-A Spiegel aufwiesen. Demgegenüber lagen die Fetuin-A Spiegel bei Patienten in den CNI Stadien 1, 3 und 4 sowie nach Nierentransplantation im Referenzbereich (Abb. 10).

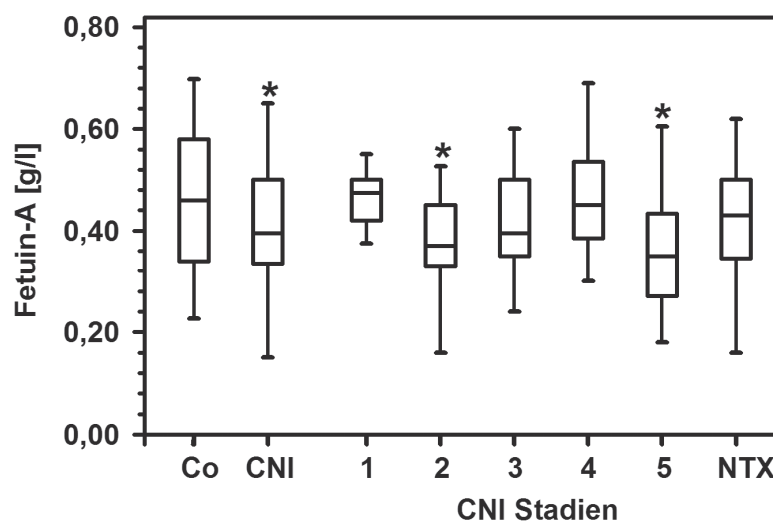


Abb. 10: Fetuin-A Serumkonzentrationen entsprechend den verschiedenen CNI Stadien vor und nach NTX im Vergleich mit gesunden Kindern (Co). * = $p < 0,01$ gegenüber Gesunden.

Unabhängig vom Grad der Niereninsuffizienz waren die Serumspiegel von Fetuin-A und Calcium ($r = 0,296$, $p < 0,01$) sowie von Fetuin-A und Albumin ($r = 0,303$, $p < 0,01$) miteinander assoziiert. Allerdings war zwischen Fetuin-A und der Albumin-korrigierten Calciumkonzentration bzw. zwischen Fetuin-A und der Phosphatkonzentration keine Assoziation vorhanden (Abb. 11). Aufgrund der beobachteten Assoziation zwischen Fetuin-A und Calcium wurden auch die Vitamin D-Spiegel sowie die Behandlung mit Vitamin D₃ (CNI Stadien 1-4 und NTX) bzw. Calcitriol (CNI Stadium 5) in die Betrachtungen mit aufgenommen. In beiden Fällen wurden die auf das Gewicht bezogenen kumulativen Jahresdosen berechnet. In Tabelle 5 sind signifikante Korrelationen der Fetuin-A Serumkonzentration bei Kindern und Jugendlichen mit einer CNI zusammengefasst.

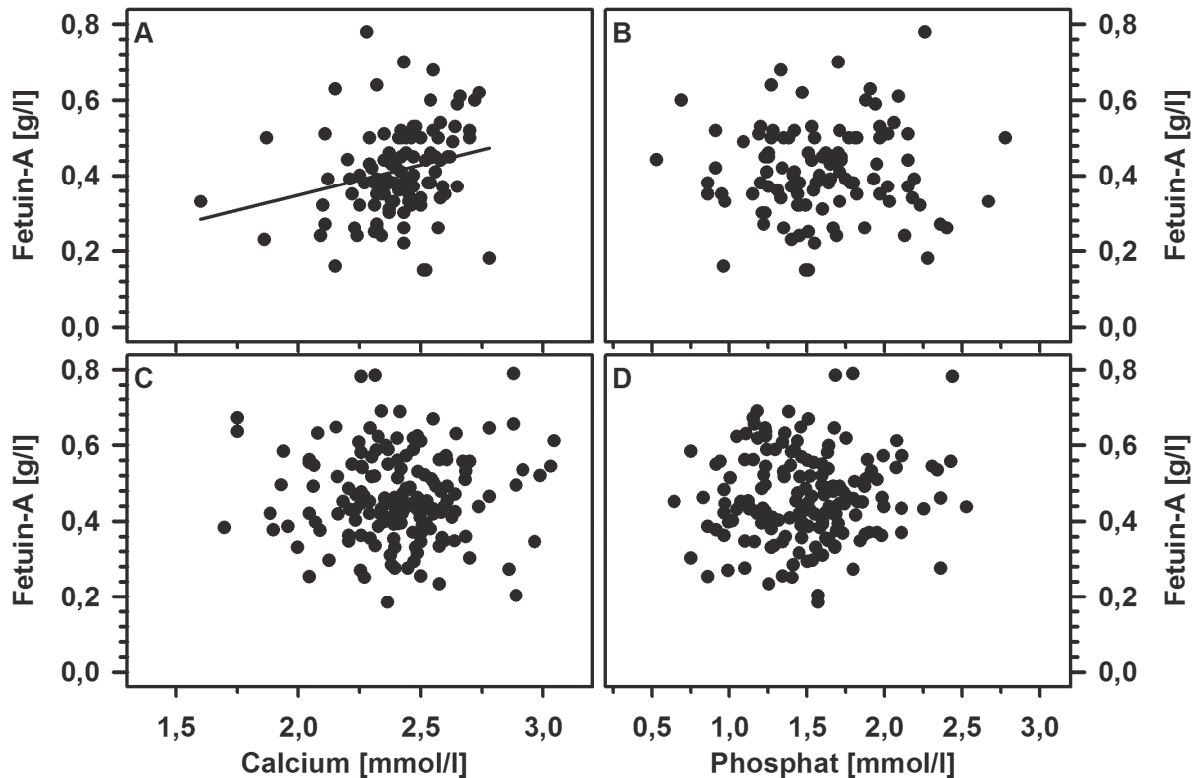


Abb. 11: Fetuin-A Serumkonzentrationen in Abhängigkeit der Calcium- (A und C) und Phosphatserumkonzentrationen (B und D) im Gesamtkollektiv der CNI-Patienten (A und B) und bei gesunden Kontrollen (C und D). (A, $r = 0,30$, $p < 0,01$).

Tab. 5: Korrelationen der Fetuin-A Serumkonzentration bei allen CNI-Patienten

	r	P
Alter [Jahre]	-0,334	<0,01
Protein [g/l]	0,203	<0,05
Albumin [g/l]	0,303	<0,01
CRP [mg/l]	-0,212	<0,05
Kreatinin [$\mu\text{mol/l}$]	-0,200	<0,05
Calcium [mmol/l]	0,296	<0,01
Vitamin D ₃ -Jahresdosis [$\mu\text{g/kg/Jahr}$]	0,263	<0,01

Die multiple lineare Regressionsanalyse ergab, dass sowohl ein CNI Stadium 5 (Dialysebehandlung; $\beta = -0,20$) als auch die gewichtsbezogene Vitamin D₃-Jahresdosis ($\beta = 0,24$) unabhängige Prädiktoren für die Fetuin-A Spiegel sind (kumulatives $r^2 = 0,17$; $p < 0,01$). Dahingegen wurden das Serumcalcium und alle weiteren Faktoren, die zuvor als signifikante Korrelate von Fetuin-A identifiziert wurden, vom endgültigen Modell ausgeschlossen.

4.2.3 Fetuin-A Serumkonzentrationen bei Dialysepatienten

Die anthropometrischen und biochemischen Daten der Dialysepatienten sind in Tabelle 6 wiedergegeben.

Hämodialysierte Patienten wiesen signifikant niedrigere Fetuin-A Spiegel als Kontrollen auf ($0,33 \pm 0,08$ g/l vs. $0,46 \pm 0,24$ g/l, $p < 0,01$), während bei Patienten mit Peritonealdialyse keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Kontrollen bestanden ($0,44 \pm 0,15$ g/l vs. $0,46 \pm 0,24$ g/l). Bei dialysierten Patienten fand sich eine signifikant negative Abhängigkeit zwischen Fetuin-A und CRP sowie eine positive Assoziation zwischen Fetuin-A und Parathormon (Abb. 12).

Signifikante Korrelationen der Fetuin-A Serumkonzentration bei Kindern mit Dialysebehandlung sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tab. 6: Anthropometrische und biochemische Daten der Dialysepatienten

	CNI 5 (n=26)	HD (n=16)	PD (n=10)	p
Alter [Jahre]	15,3 ± 6,5	16,9 ± 2,2	10,5 ± 7,0	< 0,001
KL-SDS	-1,13 ± 1,40	-1,5 ± 1,55	-0,51 ± 0,88	0,077
BMI-SDS	-0,02 ± 1,48	0,07 ± 1,37	-0,16 ± 1,69	0,697
Dialysedauer [Monate]	41 ± 58	52 ± 71	24 ± 20	0,252
Serumspiegel von				
Kreatinin [μ mol/l]	781 ± 231	786 ± 212	775 ± 269	0,912
Albumin [g/l]	32,8 ± 6,4	33,4 ± 7,2	31,9 ± 5,3	0,600
CRP [mg/l]	9,6 ± 22,9	14,43 ± 28,4	1,96 ± 1,57	0,484
Calcium [mmol/l]	2,33 ± 0,20	2,35 ± 0,22	2,29 ± 0,16	0,542
Phosphat [mmol/l]	1,76 ± 0,45	1,78 ± 0,42	1,84 ± 0,52	0,759
PTH [ng/l]	303 ± 175	243 ± 106	395 ± 226	0,066
Calcidiol [nmol/l]	74,1 ± 29,6	77,4 ± 34,0	69,6 ± 23,6	0,587
Calcitriol [pmol/l]	48 ± 60	51,6 ± 70,3	42,9 ± 41,5	0,773
Fetuin-A [g/l]	0,37 ± 0,12	0,33 ± 0,08	0,44 ± 0,15	0,022

Tab. 7: Korrelationen der Fetuin-A Serumkonzentration bei Dialysepatienten

	r	P
Alter [Jahre]	-0,399	<0,05
KL-SDS	0,532	<0,01
CRP [mg/l]	-0,495	<0,05
PTH [pg/ml]	0,734	<0,01
Calcitriol-Jahresdosis [μ g/kg/Jahr]	0,388	<0,05

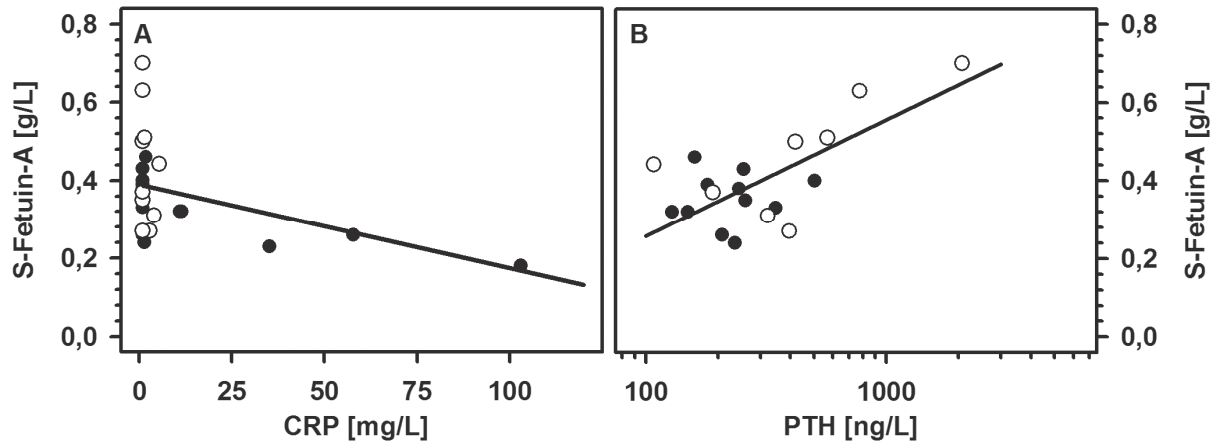


Abb. 12: Fetuin-A Serumkonzentrationen als Funktion der CRP (A) und PTH (B) Spiegel bei dialysierten Patienten. A, $r = -0,495$, $p < 0,05$; B, $r = 0,734$, $p < 0,001$. Offene Kreise zeigen peritonealdialysierte und geschlossene Kreise hämodialysierte Patienten.

4.2.4 Serumspiegel von Vitamin D und Fetuin-A bei Kindern mit CNI

Bei 101 CNI-Patienten wurden die Calcidiolspiegel bestimmt. Es zeigte sich bei 53 Patienten eine Suffizienz ($25\text{OHD} > 75 \text{ nmol/l}$), wohingegen 27 Patienten insuffiziente Calcidiolspiegel ($40 - 75 \text{ nmol/l}$), 18 einen Calcidiolmangel ($25 - 40 \text{ nmol/l}$) und drei einen gravierenden Calcidiolmangel ($< 25 \text{ nmol/l}$) aufwiesen.

Von 97 CNI-Patienten waren die Calcitriolspiegel bekannt. 19 Patienten wiesen zu hohe und 19 Patienten zu niedrige Calcitriolspiegel auf (Mangel $< 43 \text{ pmol/l}$). Die Calcitriolspiegel im Serum waren positiv mit der GFR assoziiert, wohingegen sich für Calcidiol kein solcher Zusammenhang zeigte (Abb. 13).

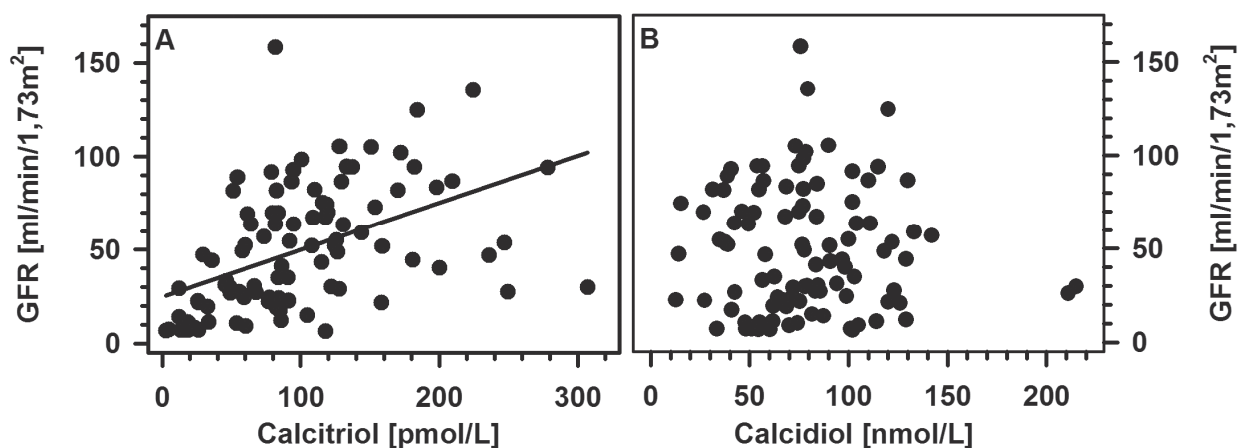


Abb. 13: Korrelation der Calcitriol- (A) und Calcidiolspiegel (B) mit der GFR. (A, $r = 0,60$, $p < 0,001$).

Des Weiteren bestand eine Assoziation zwischen den Serumspiegeln von Calcium und Calcidiol (Abb. 14).

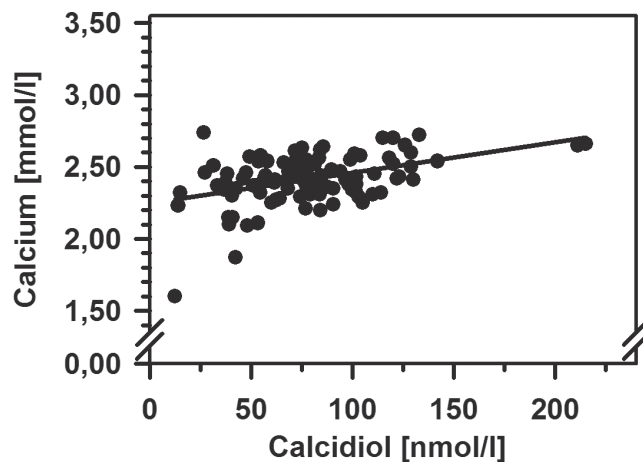


Abb. 14: Korrelation zwischen den Calcium- und der Calcidiolserumkonzentrationen.
($r = 0,44$, $p < 0,0001$).

Unabhängig vom Grad der Niereninsuffizienz zeigte sich bei den mit Vitamin D₃ behandelten Patienten eine positive Korrelation zwischen der gewichtsbezogenen Vitamin D₃-Jahresdosis und dem Fetuin-A Serumspiegel (Abb. 15A). Analog bestand bei dialysierten Patienten (CNI 5) eine signifikante Korrelation zwischen der gewichtsbezogenen Jahresdosis von Calcitriol und der Fetuin-A Serumkonzentration (Abb. 15B).

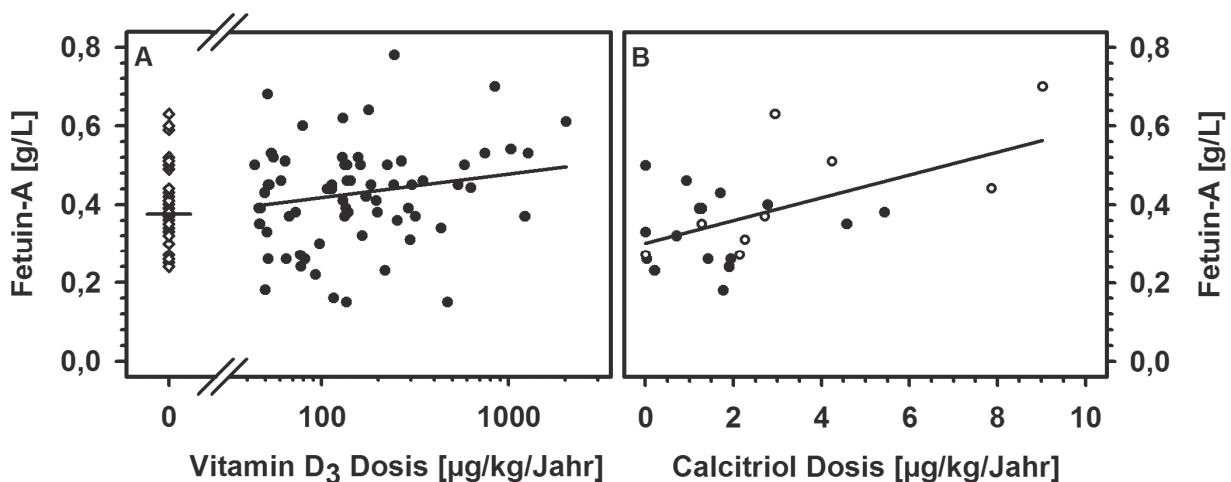


Abb. 15: Fetuin-A Serumkonzentrationen als Funktion der gewichtsbezogenen Vitamin D₃-Jahresdosis im Gesamtkollektiv (A) und die Assoziation zwischen dem Fetuin-A Serumspiegel und der gewichtsbezogenen Calcitriol-Jahresdosis bei dialysierten Patienten (B). Offene Kreise zeigen peritonealdialysierte und geschlossene Kreise hämodialysierte Patienten.
(A, $r = 0,263$, $p < 0,01$; B, $r = 0,388$, $p < 0,05$).

4.3 Untersuchung der Patienten mit einer Proteinurie

4.3.1 Charakterisierung der Patienten

Insgesamt wurden 58 Patienten (34 männlich / 24 weiblich) mit einem mittleren Alter von $10,8 \pm 5,81$ Jahren untersucht und in Abhängigkeit von den Albuminkonzentrationen im Serum und dem Ausmaß der Proteinurie kategorisiert. Jeweils 14 Patienten litten an einem nephrotischen Syndrom (tägliche Proteinausscheidung im Urin von mehr als 1 g/m^2 und Albumin im Serum $< 25 \text{ g/l}$), oder einer großen Proteinurie (tägliche Proteinausscheidung im Urin von mehr als 1 g/m^2 und Albumin im Serum $> 25 \text{ g/l}$). 30 Patienten wiesen eine milde Proteinurie (tägliche Proteinausscheidung im Urin von weniger als 1 g/m^2 und Albumin im Serum $> 25 \text{ g/l}$) auf. Unabhängig vom Grad der Proteinurie wurde bei 14 der 58 Patienten eine Proteinurie des gemischten Typs und bei den übrigen Patienten eine Proteinurie vom glomerulären Typ diagnostiziert. Eine Übersicht der renalen Grunderkrankungen und Medikationen der Patienten gibt Tabelle 8.

Tab. 8: Demographische und klinische Merkmale der Proteinuriepatienten

	N	%
Patientenzahl	58	
Männlich	34	59
Weiblich	24	41
Renale Grunderkrankung		
Minimal change Nephropathie *	31	54
IgA-Nephropathie	7	12
Fokale segmentale Glomerulosklerose	4	7
Postinfektiöse Glomerulonephritis	4	7
Lupusnephritis	4	7
Purpura Schönlein-Henoch Nephritis	3	5
Alport-Syndrom	3	5
Unbekannt	2	3
Medikation		
Antihypertensiva	30	
ACE-Inhibitoren	29	
AT1-Blocker	5	
Beta-Blocker	4	
Calciumkanal-Blocker	2	
Furosemid	7	
Immunsuppressive Therapie	23	
Azathioprin	1	
Cyclosporin-A	5	
Methylprednisolon	3	
Mycophenolat Mofetil	3	
Prednisolon	22	

* =steroid-sensibles idiopathisches nephrotisches Syndrom

Die anthropometrischen und biochemischen Charakteristika (Mittelwert \pm SD) der Patienten sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Weder im Gesamtkollektiv noch in den Untergruppen zeigten sich geschlechtsabhängige Unterschiede für die Fetuin-A Spiegel in Serum und Urin (Student t-Test $p = 0,738$ und $p = 0,301$).

Tab. 9: Anthropometrische und biochemische Daten der Proteinuriepatienten

Alter [Jahre]	10,8 \pm 5,81
Körperlängen SDS	0,43 \pm 1,47
BMI SDS	0,20 \pm 1,39
Krankheitsdauer [Monate]	36,5 \pm 51
Grad der Proteinurie [g/m ² /d]	2,70 \pm 5,0
GFR (ml/min/1,73m ²)	151 \pm 37
Serumkonzentration von	
Protein [g/l]	59,3 \pm 11,5
Albumin [g/l]	31,3 \pm 11,0
CRP [mg/l]	3,0 \pm 4,8
Calcium [mmol/l]	2,25 \pm 0,17
Korrigiertes Calcium [mmol/l]	2,47 \pm 0,15

4.3.2 Fetuin-A Serumkonzentration bei Proteinurie

In allen Patientengruppen war die mittlere Fetuin-A Konzentration im Serum gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erniedrigt ($0,39 \pm 0,16$ g/l vs. $0,46 \pm 0,12$; $p < 0,01$), während gleichzeitig die auf Kreatinin bezogene Ausscheidung mit dem Urin signifikant erhöht war ($7,38 \pm 10,88$ mg/g vs. $0,37 \pm 0,2$ mg/g; $p < 0,05$) (Abb. 16).

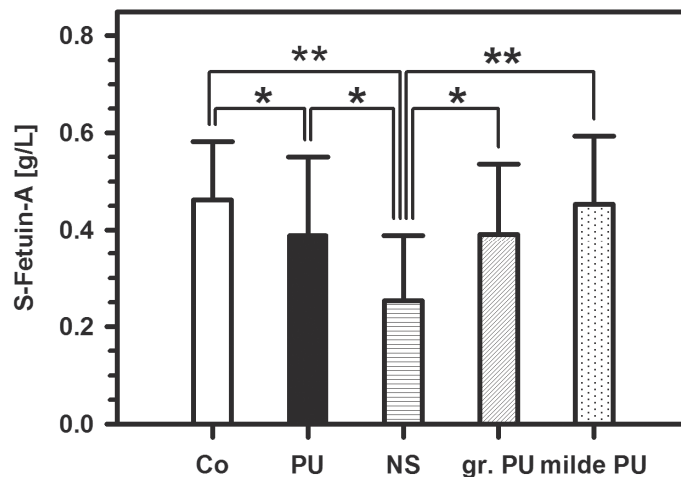


Abb. 16: Vergleich der Fetuin-A Serumspiegel in den Untergruppen der Proteinurien Patienten miteinander und mit den Referenzwerten. Weiße Balken: Gesunde Kontrollen; schwarze Balken: Gesamtkollektiv der Proteinurien Patienten; quergestreifte Balken: Nephrotisches Syndrom; schraffierte Balken: Große Proteinurie; gepunktete Balken: Milde Proteinurie. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

Im Gesamtkollektiv korrelierte der Fetuin-A Serumspiegel positiv mit dem Protein- ($r = 0,58$, $p < 0,0001$) und dem Albumingehalt im Serum. Auch zwischen Calcium und Fetuin-A im Serum gab es eine positive Korrelation, die sich nach Korrektur um das albumingebundene Calcium ins Negative änderte (Abb. 17).

Bei Patienten mit steroidsensiblen idiopathischen nephrotischen Syndrom war nach Remission ein deutlicher Anstieg des Fetuin-A Serumspiegels ($0,18 \pm 0,13$ g/l vs. $0,39 \pm 0,08$; $p < 0,05$; $n = 7$) zu beobachten.

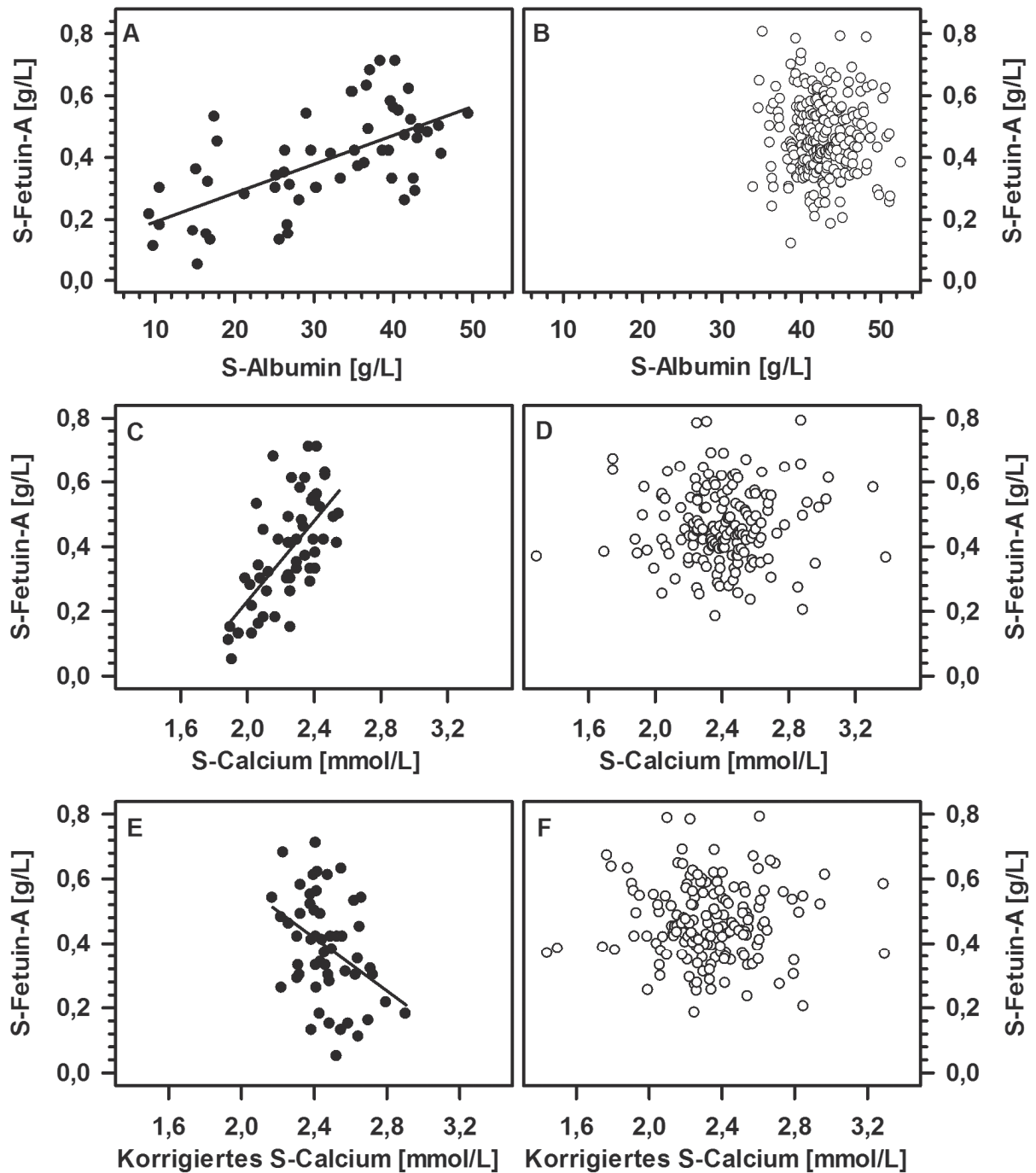


Abb. 17: Fetuin-A Serumkonzentrationen bei Proteinuriepatienten (A, C, E) und gesunden Kontrollen (B, D, F) als Funktion von Serumalbumin (A, B), Gesamtserumcalcium (C, D) und Albumin-korrigiertem Serumcalcium (E, F). A, $r = 0,604$, $p < 0,001$; C, $r = 0,623$, $p < 0,001$; E, $r = -0,327$, $p < 0,05$.

4.3.3 Renaler Fetuin-A Verlust bei Proteinurie

Western Blot Untersuchungen bestätigten den renalen Fetuin-A Verlust. Die Intensität der Fetuin-A Bande war mit dem Ausmaß der Proteinurie assoziiert. Während ein intensives Signal im Urin von Kindern mit nephrotischem Syndrom und ein schwächeres, aber immer noch klar erkennbares Signal im Urin von Kindern mit einer großen Proteinurie beobachtet wurde, war bei Kindern mit milder Proteinurie und bei gesunden Kontrollen kaum ein Signal festzustellen (Abb. 18).

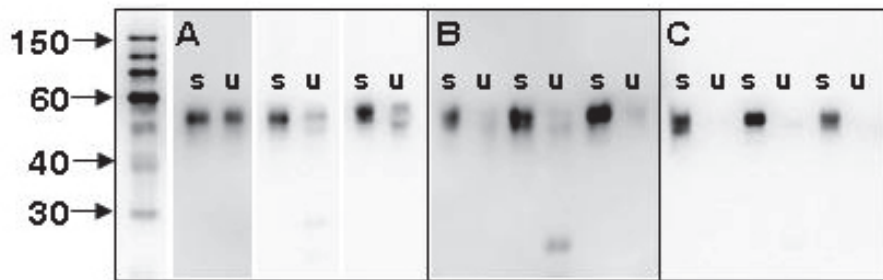


Abb. 18: Western Blots korrespondierender Serum- und Urinproben von Kindern mit nephrotischem Syndrom (A), großer (B) und milder Proteinurie (C). Alle Proben wurden auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/l eingestellt. Die relative Größe der Markerproteine ist angegeben. S = Serum; U = Urin.

Bei 13 von 25 Patienten mit milder Proteinurie und bei 11 von 50 Kontrollpersonen lagen die quantitativ bestimmten Fetuin-A Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Bei den übrigen Proben bestätigte sich eine signifikante Assoziation zwischen dem Grad der Proteinurie und der Fetuin-A Konzentration im Urin (Abb. 19).

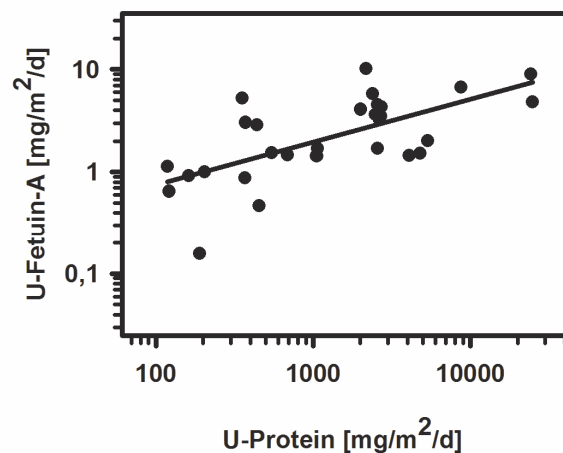


Abb. 19: Assoziation der Urinkonzentrationen von Fetuin-A und Gesamteiweiß bei Proteinurienpatienten. $r = 0,604$, $p < 0,001$.

Auch zwischen den Konzentrationen von Fetuin-A und anderen in den Urin ausgeschiedenen Proteinen bestanden signifikante Korrelationen (Tabelle 9).

Tab. 10: Signifikante Assoziationen der Fetuin-A Konzentrationen in Serum und Urin mit den für eine Proteinurie charakteristischen Proteinen und der Kreatininkonzentration

Sammelurinparameter	Fetuin-A Konzentrationen im			
	Serum [g/l]		Sammelurin [mg/d*m ²]	
	r	P	r	P
Fetuin-A [mg/d*m ²]	-0,42	<0,05		
Protein [mg/d*m ²]	-0,43	<0,01	0,62	<0,01
Albumin [mg/d*m ²]	-0,49	<0,01	0,67	<0,01
α1-Globulin [mg/d*m ²]	-0,49	<0,01	0,70	<0,01
Immunglobulin G [mg/d*m ²]	-0,36	<0,05	0,73	<0,01
Transferrin [mg/d*m ²]	-0,48	<0,01	0,67	<0,01
Kreatinin [mmol/l]	0,38	<0,01	-0,56	<0,01

4.3.4 Zusammenhang zwischen Fetuin-A Verlust und Fetuin-A Serumkonzentration

Die Fetuin-A Serumkonzentration hängt linear vom Grad der Proteinurie, der Albuminurie und dem renalen Fetuin-A Verlust ab (Abb. 20). Allerdings trägt Fetuin-A deutlich weniger als Albumin zur Gesamteiproteinausscheidung bei. Dieser Befund tritt nach Normierung auf die Kreatininkonzentration im Urin noch deutlicher hervor. Der Vergleich mit der ebenfalls auf Kreatinin normierten Albuminausscheidung unterstreicht, dass der relative renale Fetuin-A Verlust um zwei bis drei Größenordnungen kleiner ist (Abb. 21).

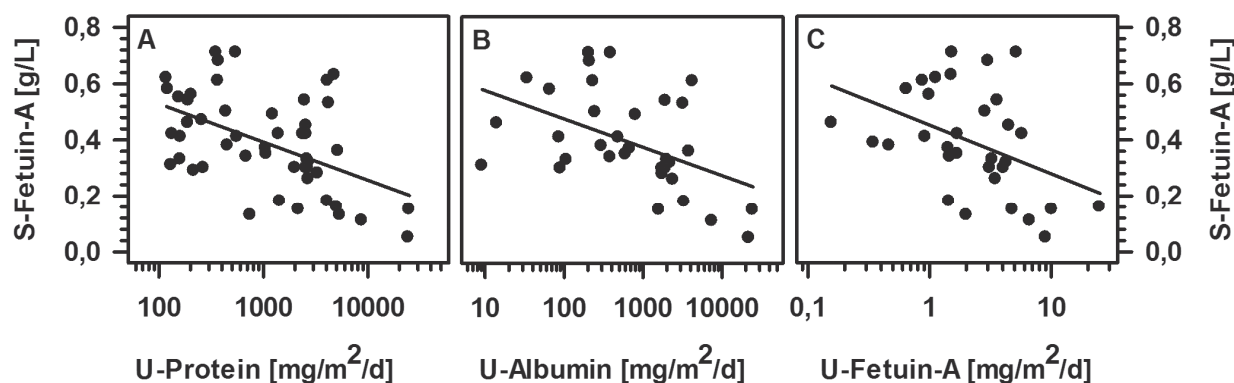


Abb. 20: Fetuin-A Serumkonzentrationen als Funktion von Proteinurie (A), Albuminurie (B) und Fetuin-A Exkretion im Urin bei Kindern mit Proteinurie. A, n = 58, r = -0,407, p < 0,005; B, n = 36, r = -0,462, p < 0,01; C, n = 34, r = -0,484, p < 0,005.

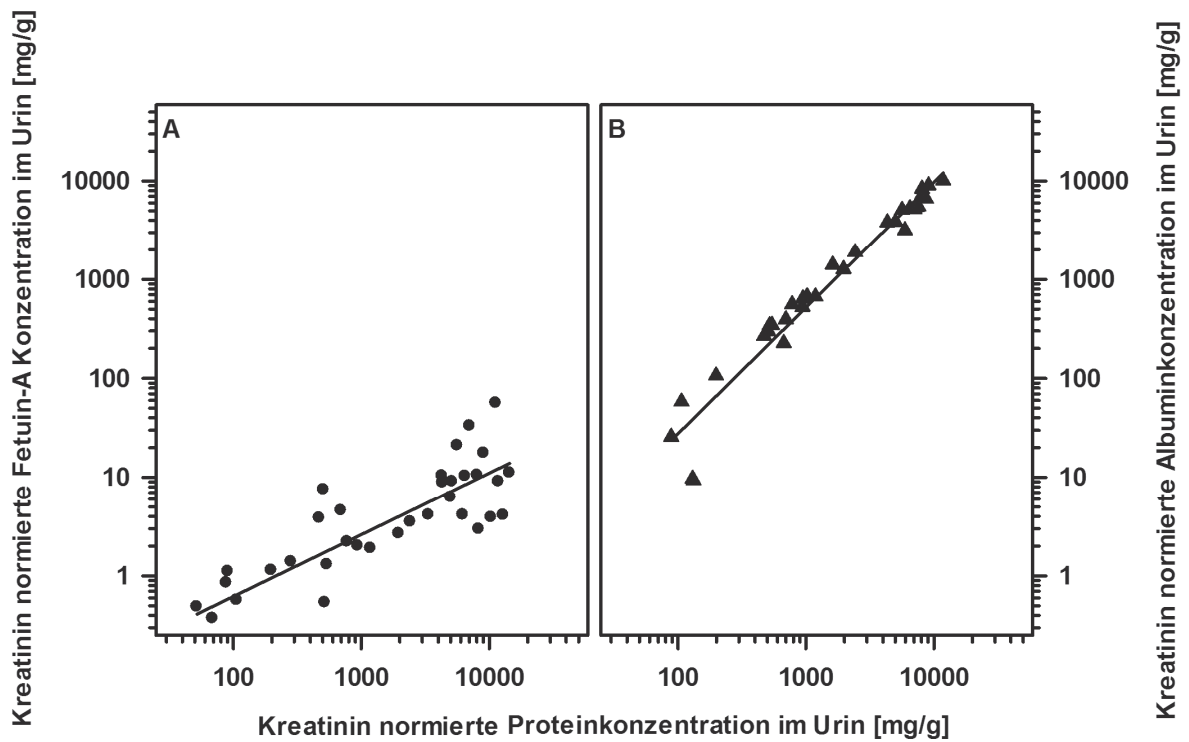


Abb. 21: Zusammenhang zwischen den auf Kreatinin normierten Urinkonzentrationen von Protein und Fetuin-A (A, n = 35) bzw. von Protein und Albumin (B, n = 33).

A, r = 0,901, p < 0,001; B, r = 0,978, p < 0,0001.

Bei Patienten mit einem nephrotischem Syndrom liegen die Albuminkonzentrationen in Serum und Urin in vergleichbarer Größenordnung. Ebenso ist ein kausaler Zusammenhang zwischen renalem Albuminverlust und Hypalbuminämie offensichtlich. Dagegen sind die im Urin gemessenen Fetuin-A Konzentrationen deutlich geringer als im Serum. Daher wurde sowohl für Albumin als auch für Fetuin-A die fraktionelle Exkretion berechnet (Abb. 22, Tabelle 10).

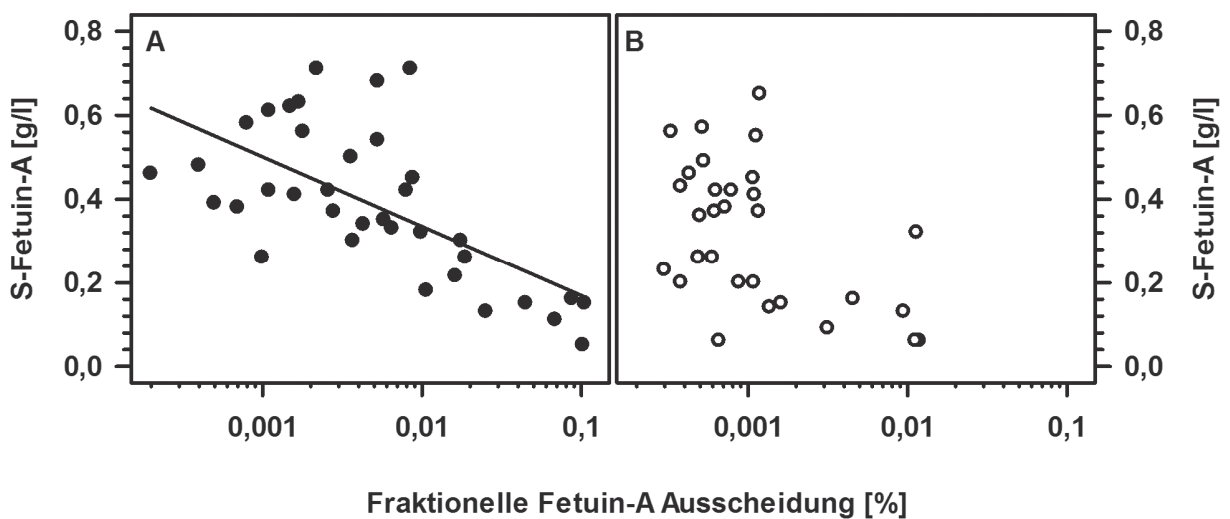


Abb. 22: Serum Fetuin-A als Funktion der fraktionellen Fetuin-A Clearance bei Proteinuriepatienten (A) und gesunden Kontrollen (B). *A, n = 36, r = -0,616, p < 0,01.*

Tab. 11: Serumkonzentrationen von Albumin und Fetuin-A sowie ihre jeweilige fraktionelle Ausscheidung (FE) bei Proteinuriepatienten und bei gesunden Kontrollen.

	Nephrotisches Syndrom	Große Proteinurie	Milde Proteinurie	Kontrollen
Albumin Serumkonzentration [g/l]	15,85 ± 5,43 ^a	31,16 ± 4,10 ^a	38,87 ± 6,32 ^a	42,67 ± 2,84 ^a
Albumin/Kreatinin [g/g] im Urin	22,2 ± 31,8 ^{a, b}	3,98 ± 2,85 ^a	0,35 ± 0,36 ^b	---
FE von Albumin [%]	0,566 ± 0,698 ^{a, b}	0,069 ± 0,049 ^a	0,007 ± 0,01 ^b	---
Fetuin-A Serumkonzentration [g/l]	0,25 ± 0,14 ^{a, b, c}	0,39 ± 0,15 ^a	0,45 ± 0,14 ^b	0,46 ± 0,12 ^c
Fetuin-A/Kreatinin [mg/g] im Urin	15,80 ± 16,2 ^{a, b, c}	8,01 ± 8,9 ^{a, d, e}	1,86 ± 2,0 ^{b, d}	0,37 ± 0,2 ^{c, e}
FE von Fetuin-A [%]	0,0408 ± 0,037 ^{a, b, c}	0,0168 ± 0,029 ^{a, d, e}	0,0022 ± 0,002 ^{b, d}	0,0017 ± 0,003 ^{c, e}

Identische Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an (jeweils $p < 0,05$).

Die multiple Regressionsanalyse ergab, dass die Serum Fetuin-A Spiegel von der Konzentration des Serumproteins determiniert werden, während die ursächliche Nierenkrankheit, die Dauer der Proteinurie, die CRP Serumspiegel, sowie die Anzahl und Anwendung von Immunsuppressiva/Antihypertensiva keine signifikanten Korrelate der Fetuin-A Serumkonzentration oder der Fetuin-A Ausscheidung im Urin waren ($\beta = 0,832$; $p < 0,001$; Modell $r^2 = 0,693$).

4.3.5 Vitamin D und Fetuin-A bei Kindern mit Proteinurie

Von 38 Patienten mit unterschiedlich ausgeprägter Proteinurie lagen Angaben zu den Serumspiegeln von Vitamin D₃ und von 36 Patienten Angaben zu den Calcitriolserumspiegeln vor. Es zeigte sich, dass nur drei Patienten ausreichend mit Vitamin D₃ (Calcidiol > 75 nmol/l) versorgt waren, wohingegen 32 Patienten eine ausreichende Versorgung mit Calcitriol aufwiesen. Bei sieben Patienten musste eine insuffiziente Versorgung mit Vitamin D₃ (Calcidiol 40 – 75 nmol/l) diagnostiziert werden. Bei 20 Patienten lag ein leichter Calcidiolmangel (12,5 – 40 nmol/l) und bei acht Patienten ein gravierender Calcidiolmangel (< 12,5 nmol/l) vor. Sowohl Calcitriol als auch Calcidiol waren signifikant positiv mit den Fetuin-A Spiegeln im Serum assoziiert. Während sich zwischen Calcidiol und dem Ausmaß der Proteinurie eine negative Korrelation zeigte, konnte ein solcher Zusammenhang zwischen der Proteinurie und Calcitriol nicht festgestellt werden.

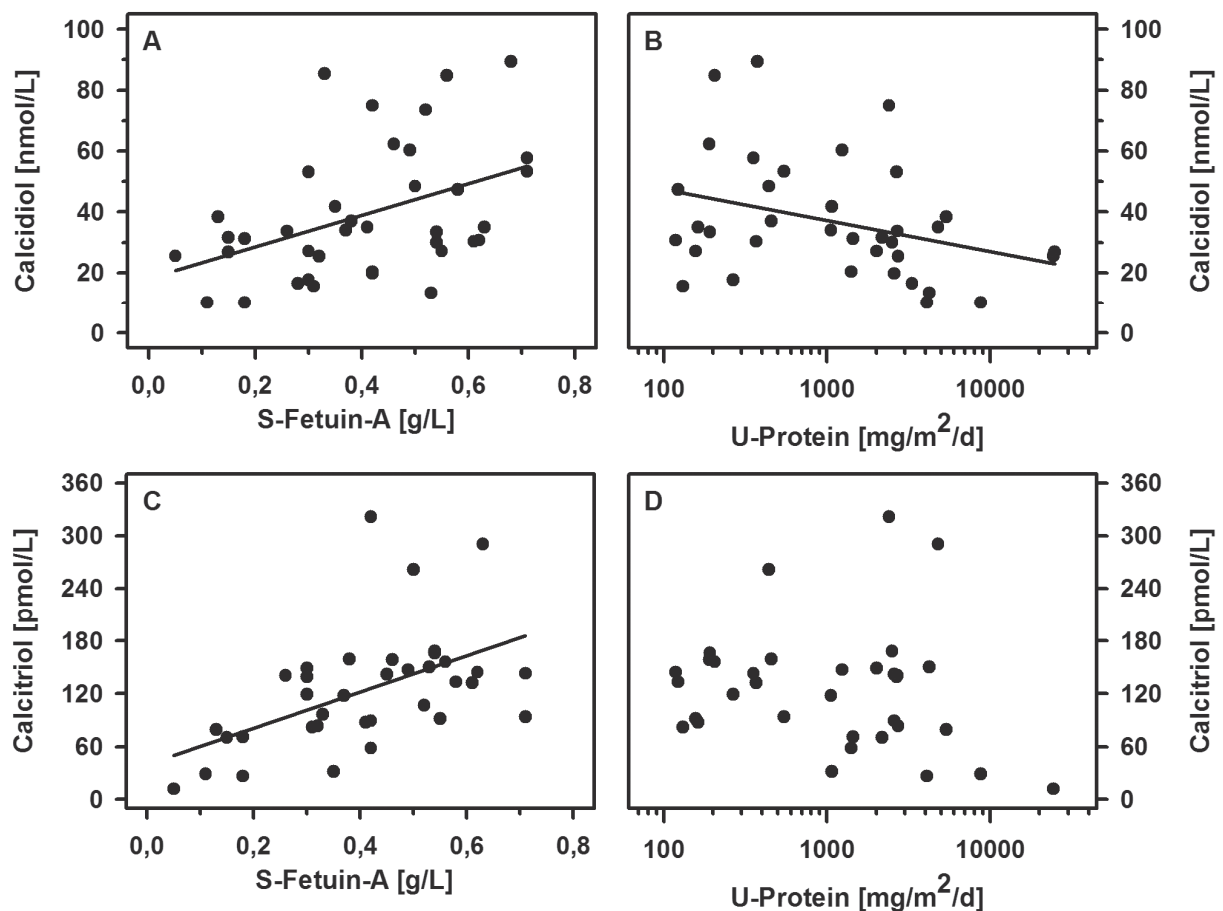


Abb. 23: Zusammenhang zwischen Calcidiol (A, B) bzw. Calcitriol (C, D) und den Serum Fetuin-A Spiegeln (linke Reihe) bzw. Proteinurie (rechte Reihe).

A, $n = 38$, $r = 0,438$, $p < 0,01$; B, $n = 38$, $r = -0,357$, $p < 0,05$; C, $r = 0,582$, $p < 0,001$.

5 Diskussion

Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Hypertonie zählen zu den klassischen Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen, die sich in der Regel schleichend aus Dyslipidämie und endothelialer Dysfunktion entwickeln und sich als Atherosklerose mit und ohne Verkalkungen manifestieren. Endotheliale Dysfunktion, Hypertonus und Dyslipidämie treten bei Kindern und Jugendlichen einerseits als Folge des Lebensstils, z.B. in Verbindung mit einer Adipositas, und andererseits als Folge chronischer Systemerkrankungen wie z. B. Diabetes mellitus Typ I oder Nierenerkrankungen auf. Daher werden Biomarker, die neben der funktionellen und morphologischen Beurteilung des kardiovaskulären Systems eine Abschätzung des Risikos kardiovaskulärer Morbidität erlauben, auch für die Pädiatrie zunehmend interessant. In diesem Zusammenhang ist das multifunktionelle Serumprotein Fetuin-A in den letzten Jahren in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Breit angelegte Studien haben gezeigt, dass bei Erwachsenen sowohl erhöhte als auch erniedrigte Fetuin-A Serumspiegel mit kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität assoziiert sind (Ix, *et al.* 2006; Ketteler, *et al.* 2003; Stefan, *et al.* 2008; Stenvinkel, *et al.* 2005; Weikert, *et al.* 2008).

5.1 Konzentration von Fetuin-A in Serum und Urin gesunder Kinder und Jugendlicher

Während es relativ einfach ist für gesunde Erwachsene Referenzwerte zu erstellen, muss bei pädiatrischen Referenzwerten immer der mögliche Einfluß von Wachstum und Entwicklung berücksichtigt werden. Als mit dieser Arbeit begonnen wurde gab es in der Literatur keine Angaben darüber wie bzw. ob sich die Fetuin-A Serumspiegel mit dem Alter verändern. Eine solche Abhängigkeit würde aufgrund der zahlreichen Interaktionen, die zwischen Fetuin-A und Wachstumsfaktoren beschrieben wurden und den hohen Fetuin-A Konzentrationen im fetalen Kälberserum nicht überraschen (Jahnen-Dechent, *et al.* 2011).

Voraussetzung für die Erstellung von Referenzwerten ist erstens die Definition von „normal“ bzw. „gesund“ und zweitens eine ausreichend große Anzahl von männlichen und weiblichen Probanden aller Altersstufen. Zur Teilnahme an dieser Studie wurden Kinder und Jugendliche mit einer altersgerechten körperlichen Entwicklung (Größe, Gewicht und BMI jeweils zwischen der 3. und 97. Perzentile bzw. nicht mehr als zwei SD vom altersentsprechenden Mittelwert abweichend) und ohne pathologischen Befund in der klinisch-chemischen Basisanalyse eingeladen. Hierbei wurden sowohl solche Probanden berücksichtigt, die zu elektiven Eingriffen oder aufgrund akuter Beschwerden stationär aufgenommen wurden als auch solche, die zur Abklärung oder zur Nachsorge von Erkrankungen ambulant behandelt wurden. Zusätzlich rekrutierten wir auch gesunde Geschwisterkinder und Freunde der Probanden. Wir konnten in unserer Klinik in einem Zeitraum von drei Jahren ein Kollektiv aus 246 gesunden Kindern und Jugendlichen zusammenstellen und die Fetuin-A Spiegel in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht

und körperlicher Entwicklung (Körperhöhe, BMI) bestimmen. Wir konnten zeigen, dass bei gesunden Kindern mit normaler Körperhöhe und normalem BMI die Fetuin-A Serumspiegel unabhängig von Alter, Geschlecht und den Körpermassen (Höhe, Gewicht, BMI) sind (Wigger, *et al.* 2009). Der von Reinehr *et al.* für adipöse Kinder beschriebene Zusammenhang zwischen Fetuin-A und dem BMI-SDS bestätigte sich nicht (Reinehr, *et al.* 2008).

Neben unserer Studie sind noch zwei weitere Untersuchungen zu Fetuin-A Serumspiegeln bei gesunden Kindern und Jugendlichen publiziert worden (Häusler, *et al.* 2009; Shroff, *et al.* 2008). Diese Studien basieren auf kleineren Untersuchungskollektiven (133 bzw. 75 Probanden), wobei in der Studie von Häusler *et al.* auch frühgeborene Kinder und solche mit sehr niedrigem Geburtsgewicht eingeschlossen wurden (Häusler, *et al.* 2009; Shroff, *et al.* 2008). Dabei zeigte sich, dass die Fetuin-A Spiegel bei Geburt nach der 37. Schwangerschaftswoche konstant blieben, also de facto nicht mit dem Alter assoziiert sind. Dieser Befund stimmt also sehr gut mit unseren Ergebnissen überein (Wigger, *et al.* 2009). Demgegenüber beschreibt die Londoner Arbeitsgruppe bei 75 Kindern und Jugendlichen eine lineare Assoziation zwischen den Fetuin-A Serumwerten und dem Alter (Shroff, *et al.* 2008). Diese Probandenzahl ist sicherlich nicht ausreichend, um eine gleichmäßige Besetzung aller Altersstufen zu gewährleisten. Dieser Einwand gilt umso mehr, weil bei einem manuell durchgeführten ELISA die Reproduzierbarkeit per se etwas schlechter ausfällt als es bei einer vollständig automatisierten Methode wie z. B. der Nephelometrie der Fall ist. Daher sind für die Erstellung von Referenzwerten für manuelle Tests zwei oder drei Probanden pro Altersstufe sicher nicht ausreichend. Unabhängig vom Alter der Probanden stimmen die mittleren Fetuin-A Serumkonzentrationen in den beiden Studien, die den ELISA von Epitope Diagnostics verwenden, sehr gut überein ($0,46 \text{ g/l} \pm 0,12 \text{ g/l}$; (Wigger, *et al.* 2009) vs. $0,41 \text{ g/l} \pm 0,13 \text{ g/L}$; (Shroff, *et al.* 2008)), während mit der Nephelometrie etwas höhere Serumkonzentrationen ermittelt wurden ($0,58 \text{ g/l} \pm 0,12 \text{ g/l}$; (Häusler, *et al.* 2009)).

5.2 Fetuin-A bei nierenkranken Kindern und Jugendlichen

5.2.1 Fetuin-A bei CNI

Die Fetuin-A Serumkonzentrationen waren bei Kindern und Jugendlichen mit einer großen Proteinurie und bei Kindern mit terminaler Niereninsuffizienz signifikant niedriger als der Referenzbereich bei gesunden Kindern und Jugendlichen. Im Gegensatz dazu wiesen nierentransplantierte Kinder normale Fetuin-A Serumspiegel auf.

Dabei war auffällig, dass in unserer Studie nur hämodialysierte Kinder erniedrigte Fetuin-A Serumspiegel aufwiesen, während sich bei solchen, die peritonealdialysiert wurden im Vergleich zu den Referenzwerten eher normale Fetuin-A Serumkonzentrationen zeigten (Schaible, *et al.* 2011). Dieses Phänomen wurde auch in anderen Studien beschrieben (Shroff, *et al.* 2008).

Möglicherweise beruht dies weniger auf der Dialyseform als vielmehr auf dem Ernährungs- und Allgemeinzustand der Patienten. So zeigten Erwachsene, die mit Peritonealdialyse behandelt wurden bei gleichzeitiger Malnutrition, Inflammation und deutlicher vaskulärer Calcifizierung die niedrigsten Fetuin-A Serumspiegel (Wang, *et al.* 2005). Diese Begleiterscheinungen treten allerdings bei Kindern und Jugendlichen, die mit Peritonealdialyse behandelt werden, deutlich seltener auf. Auch bei unseren Patienten gab es keine Anzeichen für eine Malnutrition oder chronische Entzündung. Ein ganz anderes Bild zeigte sich bei Kindern und Jugendlichen, die eine Hämodialyse benötigten. Hier wurde die negative Assoziation zwischen Fetuin-A und CRP sehr deutlich.

Interessanterweise waren die Fetuin-A Serumspiegel nicht nur bei Dialysepatienten, sondern auch bei Patienten mit einer beginnenden Niereninsuffizienz (CNI Stadium 2) signifikant reduziert, während sich bei moderater Niereninsuffizienz (CNI Stadium 3 und 4) normale Fetuin-A Konzentrationen zeigten. Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass es nach einem initialen Abfall der Fetuin-A Spiegel zunächst zu einer Anpassung der Fetuin-A Spiegel an die geänderte Stoffwechselsituation kommt, sich dieser Mechanismus aber bei zunehmender Niereninsuffizienz erschöpft. Obwohl wir in unserer Studie ausschließlich den ELISA der Firma Epitope Diagnostics verwendet haben sowie durch stets mitgeführte Präzisions- und Richtigkeitskontrollen relativ sicher sind, dass dieser Anpassungseffekt tatsächlich existiert, sind longitudinale Beobachtungen, wie sie in der kürzlich angelaufenen 4C-Studie (Cardiovascular Comorbidity in Children with Chronic Kidney Disease) geplant sind, für die Klärung dieser Frage unentbehrlich (www.4c-study.org).

Die Übertragung der Befunde, die bei erwachsenen Patienten mit milder bis moderater CNI erhoben wurden, ist nur eingeschränkt möglich, da in diesen Studien unterschiedliche Assays verwendet wurden (Cottone, *et al.* 2010; Manghat, *et al.* 2011). Zusätzlich spielen auch posttranslationale Modifikationen wie z. B. Glykosylierung oder Phosphorylierung eine Rolle, da diese Isoformen je nach Assay in unterschiedlichem Ausmaß erfasst werden (Smith, *et al.* 2010). Darüber hinaus gibt es zwei Studien, in denen der relative Anteil des mit Calciumphosphat beladenen Fetuin-A bestimmt und als geeigneter Marker für den Calcifizierungsstress identifiziert wurde (Hamano, *et al.* 2010; Smith, *et al.* 2011).

5.2.2 Fetuin-A bei Patienten mit Proteinurie und erhaltener glomerulärer Nierenfunktion

Während davon ausgegangen wird, dass niedrige Fetuin-A Spiegel bei dialysierten Patienten im Wesentlichen eine Folge der Mikroinflammationen sind, ist bei Patienten mit nephrotischem Syndrom bzw. großer Proteinurie möglicherweise der renale Verlust von Fetuin-A deutlich relevanter als eine entzündungsbedingte Reduktion der Synthese (Ketteler, *et al.* 2005). Wir haben daher geprüft, ob es *i)* eine Assoziation zwischen dem Ausmaß der Proteinurie und der Fetuin-A Serumkonzentration gibt und ob *ii)* die renalen Fetuin-A Verluste zur Erklärung niedriger Fetuin-A Serumspiegel ausreichen.

Hierfür wurde Fetuin-A im Urin zunächst semiquantitativ (Western Blot) sowie bei großer Proteinurie auch quantitativ bestimmt und zu den Fetuin-A Serumwerten in Relation gesetzt. In Übereinstimmung mit einer vor knapp 20 Jahren von Kishore *et al* durchgeführten Untersuchung konnten wir zeigen, dass die Fetuin-A Serumkonzentration parallel zum Ausmaß der Hypoproteinämie, der Hypoalbuminämie und der Proteinurie abnimmt (Kishore, *et al.* 1983). Während wir sowohl zwischen der Fetuin-A Konzentration im Urin und der Proteinurie als auch zwischen der Fetuin-A Serum- und Urinkonzentration eine eindeutige Assoziation nachweisen konnten, wurden diese Zusammenhänge von Kishore *et al* nicht beobachtet (Kishore, *et al.* 1983). Diese Diskrepanz zwischen den Studien könnte durchaus auf methodische Probleme zurückzuführen sein. Die früheren Ergebnisse von Kishore *et al* basieren auf der Technik der radialen Immunodiffusion, einem aufwendigen und aus mehreren Teilschritten bestehendem Verfahren, das nicht nur unempfindlicher als ein direkter ELISA, sondern auch deutlich schlechter zu standardisieren ist. Darüber hinaus sind die mit der radialen Immunodiffusion bestimmten absoluten Konzentrationen von Fetuin-A im Urin nur schwierig mit den aktuellen Daten zu vergleichen. Denn es ist nicht nur unklar, ob damals Sammelurin oder Spontanurin eingesetzt wurde, sondern es fehlt auch eine Normierung auf die Protein- oder die Kreatininkonzentration im Urin.

Es ist jedoch zu bezweifeln, ob die niedrigen Fetuin-A Serumspiegel tatsächlich auf den renalen Fetuin-A Verlust zurückzuführen sind, da die Serum- und Urinkonzentrationen von Fetuin-A um ca. zwei Größenordnungen differieren. Diese Diskrepanz wird noch deutlicher, wenn man die Fetuin-A und Albumin Konzentrationen in Serum und Urin betrachtet: Die Serumkonzentrationen von Fetuin-A und Albumin unterscheiden sich um ca. zwei Größenordnungen (Albumin ~30 g/l, Fetuin-A 0,4 g/l), die Urinkonzentrationen allerdings um drei Größenordnungen. Anders ausgedrückt beträgt die durchschnittliche fraktionelle Fetuin-A Ausscheidung nur ca. 1/10 der fraktionellen Albuminausscheidung ($0,016 \pm 0,029\%$ vs. $0,162 \pm 0,403\%$; $p < 0,001$) (Tabelle 11). Diese Diskrepanz ist umso erstaunlicher, weil sich beide Proteine sowohl in ihrer Funktion als Transportmolekül für niedermolekulare Proteine und insbesondere für Calcium als auch in den biochemischen und physikochemischen Eigenschaften (Molekulargewicht: 60-65 kDa vs. 52-57 kDa; isoelektrischer Punkt zwischen pH 4 und 5) stark ähneln. Daher würde man auch

eine vergleichbare renale Ausscheidung und tubuläre Reabsorption erwarten. Der starke lineare Zusammenhang zwischen Serum- und Urinkonzentrationen beider genannten Proteine lässt den Schluss zu, dass beide ihre tubuläre Reabsorptionskapazität überschreiten, welche wiederum für Albumin im Vergleich zu Fetuin-A niedriger ausfällt. Somit können die niedrigen Fetuin-A Serumspiegel bei Proteinuriepatienten mit nephrotischem Syndrom bzw. großer Proteinurie nur zu einem gewissen Teil durch den Verlust von Fetuin-A über den Urin erklärt werden und es müssen auch andere Faktoren in Betracht gezogen werden. Hier ist aufgrund der von uns durchgeführten Western Blot Untersuchungen primär an eine proteolytische Degradation zu denken. Solche niedermolekularen Fetuin-A Fragmente entgehen möglicherweise der immunochemischen Bestimmung und führen zu falsch niedrigen Fetuin-A Konzentrationen im Urin. Weiterhin könnte natürlich auch die hepatische Synthese reduziert und/oder die Clearance von Fetuin-A erhöht sein und dadurch bei relativ geringer Ausscheidung in den Urin trotzdem eine deutliche Erniedrigung der Serumspiegel bedingt sein. Eine solche reduzierte hepatische Synthese ist besonders wahrscheinlich, wenn die CRP Spiegel als Ausdruck einer Inflammation oder allgemeiner einer Akut-Phase Antwort erhöht sind. Eine solche CRP-Erhöhung war bei Proteinuriepatienten nicht nachweisbar und man kann daher spekulieren, ob das nephrotische Stadium auch die Proteinsynthese, z.B. durch Beeinträchtigung der metabolischen Kontrolle des Proteinumsatzes, beeinflusst. So wurde kürzlich gezeigt, dass die Gammaglobulinsynthese durch Transferrin reguliert wird und ein renaler Transferrinverlust sekundär zu einer Hypogammaglobulinämie führt, wohingegen der renale Verlust der Gammaglobuline zu vernachlässigen ist (Kemper, *et al.* 2002; Warsaw, *et al.* 1984).

5.2.3 Fetuin-A und Vitamin D

Während die Korrelationen zwischen Fetuin-A und der renalen Funktion bzw. zwischen Fetuin-A und CRP nicht ganz neu sind, ist die Assoziation zwischen Fetuin-A und den Calcidiol/Calcitriol Serumspiegeln bzw. zwischen Fetuin-A und einer Behandlung mit Vitamin D₃ von uns erstmalig beschrieben worden. Auch wenn die hier durchgeführten Untersuchungen nicht erklären können wie sich Calcidiol und/oder Calcitriol auf die hepatische Synthese und Sekretion von Fetuin-A auswirken, so weisen unsere Ergebnisse doch auf die Existenz eines solchen Mechanismus hin. Dieses gilt insbesondere deshalb, weil Calcitriol nicht nur ein pleiotropes Hormon ist, sondern zusammen mit seinem Rezeptor vermutlich 3% des humanen Genoms kontrolliert (Bouillon, *et al.* 2008; Verstuyf, *et al.* 2010). Darüber hinaus wurde ein Vitamin D-Mangel mit vielen humanen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht (Verstuyf, *et al.* 2010). Nach Bindung an den Vitamin D-Rezeptor (VDR) und Dimerisierung mit dem Retinoid-X Rezeptor (RXR) interagieren die VDR-RXR Heterodimere in der Promoterregion der Zielgene als Transkriptionsfaktoren mit dem Vitamin-D Responsive Element (VDRE) (Plum, *et al.* 2010;

Verstuyf, *et al.* 2010). Das Andocken der VDR-RXR Heterodimere an diese Regionen induziert oder verhindert über Co-Regulatoren die Genexpression. Sowohl der VDR als auch die 1- α -Hydroxylase (CYP27B1) kommen nicht nur in der Niere, sondern auch in einer Vielzahl von Organen, wie z.B. der Haut, Prostata, Mamma, Plazenta, Intestinalzellen, Immunzellen und Osteoblasten vor (Plum, *et al.* 2010; Querfeld, *et al.* 2010; Verstuyf, *et al.* 2010).

Bei Proteinuriepatienten waren sowohl die Serumkonzentrationen von Calcidiol als auch von Calcitriol positiv mit den Fetuin-A Serumspiegeln assoziiert. Calcidiol und Calcitriol zirkulieren im Serum in Protein-gebundener Form. Neben Albumin dient vor allem das Vitamin D-bindende Protein (VDBP) als Träger. Mehrere Studien haben gezeigt, dass der Verlust von VDBP bei großer Proteinurie und beim nephrotischen Syndrom zwar zu einem Vitamin D-Mangel (d.h. erniedrigte Calcidiolspiegel) führt, die Calcitriolspiegel hingegen noch lange im Normalbereich gehalten werden können (Auwerx, *et al.* 1986; Grymonprez, *et al.* 1995; Koenig, *et al.* 1992; Schmidt-Gayk, *et al.* 1977; van Hoof, *et al.* 2001; Weng, *et al.* 2005). Diese Befunde bestätigten sich in unserer Studie. Allerdings lagen die Calcitriolspiegel bei Patienten mit einem nephrotischen Syndrom bereits im unteren Referenzbereich, was auf eine langsame Erschöpfung des Calcidiolspeichers hindeuten könnte. Unter physiologischen Bedingungen liegt Calcidiol gegenüber Calcitriol in einem deutlichen molekularen Überschuss vor (nmol/l vs. pmol/l).

Bei CNI-Patienten zeigten sich keine direkten Zusammenhänge zwischen den Serumkonzentrationen von Fetuin-A und Vitamin D, aber in der Gesamtgruppe der chronisch Nierenkranken waren die Fetuin-A Serumspiegel signifikant mit dem Serumcalcium und der kumulativen gewichtsbezogenen Jahresdosis von Vitamin D₃ assoziiert. In der Dialysegruppe lagen die Serumkonzentrationen von Calcitriol, trotz Substitution, mit einem mittleren Wert von 21 pmol/l deutlich unterhalb des Referenzbereiches (< 43 pmol/l). Zudem korrelierte die Serumkonzentration von Fetuin-A mit der kumulativen gewichtsbezogenen Calcitriol-Jahresdosis sowie mit den Serumspiegeln von PTH positiv, mit CRP negativ. Während die negative Assoziation mit CRP wohl am ehesten Ausdruck der (Mikro-)Inflammationen ist, weisen die positiven Assoziationen mit Vitamin D₃ bzw. Calcitriol und PTH auf die Funktion von Fetuin-A als Bindungsprotein für Calcium und/oder Calciumphosphat-Nanokristalle hin. Das wiederum würde bedeuten, dass die Calciumspiegel die Fetuin-A Synthese triggern. Diese Hypothese wird leider durch die multiple Regressionsanalyse nicht gestützt, hier wurden Vitamin D₃ und die Notwendigkeit einer Dialysebehandlung als unabhängige Prädiktoren der Fetuin-A Serumkonzentration identifiziert, während die Calciumspiegel aus dem endgültigen Modell ausgeschlossen wurden. Damit kann vermutet werden, dass doch die Vitamin D₃-Dosis, die die intestinale Calciumaufnahme stimuliert, das auslösende Moment war.

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Calcitriolspiegel bei nicht dialysierten Erwachsenen mit diabetischer Nephropathie und koronarer arterieller Calcifizierung signifikant mit den Fetuin-A Serumspiegeln korrelieren (Mehrotra, *et al.* 2005). Zudem trägt Calcitriol selbst in höheren Dosen zur Calcifizierung bei. Durch Modulation der PTH related peptides (PTHrp) verhindert es, dass diese ihre calcifizierungsinhibitorische Wirkung an glatten Gefäßzellen entfalten können (London, *et al.* 2005). Darüber hinaus zeigte sich bei dialysierten Erwachsenen mit sekundärem Hyperparathyreoidismus, dass Calcitriol nicht nur PTH supprimiert, sondern offensichtlich auch die Fetuin-A Serumspiegel erhöht (Manenti, *et al.* 2010).

Ob der insgesamt dargestellte Einfluss von Vitamin D₃ / Calcitriol auf die hepatische Fetuin-A Synthese durch einen direkten Calcitriol-VDR bezogenen Effekt oder indirekt über die Calciämie ausgelöst wird, bleibt Gegenstand zukünftiger Forschung. Ein persistierender Fetuin-A Mangel könnte eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der kardiovaskulären Morbidität von Kindern mit CNI oder chronischem nephrotischem Syndrom spielen.

Die vorgelegten Studien haben den Nachteil, dass sie zwar den aktuellen Zustand, nicht aber die individuellen Veränderungen während des Verlaufs der Erkrankung erfassen. Dieses wäre insbesondere im Hinblick auf die longitudinalen Effekte von Vitamin D₃ und Calcitriol sehr lohnend und kann möglicherweise im Rahmen der bereits erwähnten 4C-Studie erfolgen (www.4c-study.org).

6 Zusammenfassung

Fetuin-A ist ein multifunktionelles Serumprotein und spielt in seiner Funktion als Calcifizierungsinhibitor für den Mineralstoffwechsel eine besondere Rolle. Bei erwachsenen Dialysepatienten besteht eine Assoziation zwischen niedrigen Fetuin-A Serumkonzentrationen und dem Ausmaß der Gefäßverkalkungen.

Ziel dieser Studie war es

- pädiatrische Referenzwerte für die Fetuin-A Serumkonzentration zu erstellen
- die Auswirkungen einer chronischen Niereninsuffizienz (CNI) im Kindes- und Jugendalter auf die Fetuin-A Serumkonzentration zu untersuchen
- zu überprüfen, ob niedrige Fetuin-A Serumspiegel bei Kindern und Jugendlichen mit chronischer Proteinurie durch renalen Verlust bedingt sind.

Es wurden 246 Seren und 50 Urine von gesunden Kindern und Jugendlichen im Alter von 0 - 18 Jahren untersucht. Die von Alter und Geschlecht unabhängige Fetuin-A Serumkonzentration betrug $0,46 \pm 0,24$ g/l, die mittlere, auf die Kreatinin-Ausscheidung normierte, Fetuin-A Konzentration im Urin betrug $0,37 \pm 0,2$ mg/g U-Kreatinin. Bei gesunden Kindern und Jugendlichen korrelierten die im Serum gemessenen Konzentrationen von Fetuin-A nicht mit der Konzentration von Gesamteiweiß, Albumin, Calcium oder Phosphat.

Die Fetuin-A Serumspiegel wurden bei 112 Kindern und Jugendlichen mit einer CNI bestimmt. Es zeigte sich, dass Kinder mit einer leichten Einschränkung der Nierenfunktion (CNI Stadium 2; n=20) und solche mit terminaler CNI (n=26) gegenüber Kontrollen signifikant erniedrigte Fetuin-A Spiegel aufwiesen. Unabhängig vom Grad der CNI waren die Fetuin-A Serumspiegel signifikant positiv mit den Serumkonzentrationen von Gesamteiweiß, Albumin und Calcium sowie mit der kumulativen gewichtsbezogenen Jahresdosis von Vitamin D₃ korreliert. Signifikant negative Korrelationen bestanden sowohl zwischen den Fetuin-A Serumspiegeln und dem Alter als auch zwischen der CRP- und der Kreatinin-Konzentration im Serum. Mit einer multiplen Regressionsanalyse wurden Dialysebehandlung und die Vitamin D₃-Jahresdosis als unabhängige Prädiktoren der Fetuin-A Serumspiegel identifiziert.

Bei Kindern und Jugendlichen mit terminaler Niereninsuffizienz fanden sich zwischen den Fetuin-A Serumspiegeln und dem PTH-Serumspiegel sowie der kumulativen gewichtsbezogenen Calcitriol-Jahresdosis positive Korrelationen. Patienten mit Peritonealdialyse zeigten im Gegensatz zu den mit Hämodialyse behandelten Patienten nahezu normale Fetuin-A Serumspiegel.

Pädiatrische Patienten mit Proteinurie zeigten gegenüber gesunden Kontrollen signifikant niedrigere Fetuin-A Serumspiegel. Des Weiteren korrelierten bei diesen Patienten die Fetuin-A Serumkonzentrationen positiv mit der Protein-, Albumin-, Calcium-, Calcidiol- und Calcitriolkonzentration im Serum. Darüber hinaus zeigten sich signifikant negative Korrelationen zwischen den Fetuin-A Serumspiegeln und dem Grad der Proteinurie, der Albuminurie und der Fetuin-A Konzentration im Urin. Die Albumin- und Fetuin-A Konzentrationen im Urin nahmen mit steigender Proteinurie zu. Auch die fraktionelle Fetuin-A Ausscheidung war signifikant mit dem Grad der Proteinurie und mit dem Fetuin-A Serumspiegel assoziiert. Diese Befunde wurden durch Western Blot Untersuchungen bestätigt.

7 Thesen

1. Das Referenzintervall für die Fetuin-A Konzentration im Serum gesunder Kinder und Jugendlicher beträgt 0,22 bis 0,70 g/l ($0,46 \pm 0,24$ g/l).
2. Die mittlere auf Kreatinin bezogene Konzentration von Fetuin-A im Urin betrug bei gesunden Kindern $0,37 \pm 0,2$ mg/g Kreatinin.
3. Die Serumspiegel von Fetuin-A waren bei Patienten mit CNI Stadium 2 im Vergleich zur Referenzgruppe signifikant erniedrigt.
4. Bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz waren die Fetuin-A Serumspiegel signifikant mit dem Serumcalciumgehalt und mit der kumulativen gewichtsbezogenen Jahresdosis von Vitamin D₃ assoziiert.
5. Bei hämodialysierten Patienten waren die Fetuin-A Serumkonzentrationen gegenüber den Referenzwerten signifikant vermindert und die Serumspiegel von Fetuin-A und CRP korrelierten negativ.
6. Bei Dialysepatienten korrelierten die kumulative gewichtsbezogene Calcitriol-Jahresdosis und die Serumspiegel von PTH jeweils mit den Fetuin-A Serumspiegeln.
7. Das Gesamtkollektiv der Proteinuriepatienten, die Erkrankten mit nephrotischem Syndrom und die Patienten mit großer Proteinurie zeigten signifikant niedrigere Fetuin-A Serumspiegel als das Referenzkollektiv.
8. Im Gesamtkollektiv der Proteinuriepatienten korrelierten die Fetuin-A Serumkonzentrationen positiv mit dem Protein- und dem Albumingehalt im Serum. Auch zwischen den Calcium- und Fetuin-A Serumspiegeln ergab sich eine positive Korrelation, die nach Korrektur um das albumingebundene Calcium ins Negative umschlug.
9. Western Blot Untersuchungen zeigten ein intensives Fetuin-A Signal im Urin von Kindern mit nephrotischem Syndrom, ein schwächeres Signal im Urin von Kindern mit einer großen Proteinurie und bei der Kontrollgruppe sowie bei Kindern mit milder Proteinurie kaum ein Signal.
10. Bei Proteinuriepatienten waren die Fetuin-A Serumkonzentrationen signifikant negativ mit dem Grad der Proteinurie, der Albuminurie und der Fetuin-A Konzentration im Urin assoziiert.
11. Der Grad der Proteinurie korrelierte stark mit der Albuminurie und mit der Fetuin-A Ausscheidung im Urin.

12. Die fraktionelle Fetuin-A Ausscheidung war signifikant mit dem Grad der Proteinurie und mit den Fetuin-A Serumspiegeln assoziiert.
13. Bei Proteinurienpatienten waren sowohl die Serumkonzentrationen von Calcidiol als auch von Calcitriol positiv mit den Fetuin-A Serumspiegeln assoziiert.

8 Literaturverzeichnis

- Auberger P, Falquerho L, Contreres JO, Pages G, Le Cam G, Rossi B, Le Cam A: Characterization of a natural inhibitor of the insulin receptor tyrosine kinase: cDNA cloning, purification, and anti-mitogenic activity. *Cell* 1989;58(4):S.631-640.
- Auwerx J, De Keyser L, Bouillon R, De Moor P: Decreased free 1,25-dihydroxycholecalciferol index in patients with the nephrotic syndrome. *Nephron* 1986;42(3):S.231-235.
- Bazzi C, Petrini C, Rizza V, Arrigo G, D'Amico G: A modern approach to selectivity of proteinuria and tubulointerstitial damage in nephrotic syndrome. *Kidney Int* 2000;58(4):S.1732-41.
- Bergwitz C, Jüppner H: Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and FGF23. *Annu Rev Med* 2010;61:S.91-104.
- Berndt T, Kumar R: Novel mechanisms in the regulation of phosphorus homeostasis. *Physiology (Bethesda, Md)* 2009;24:S.17-25.
- Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M: Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008;29(6):S.726-776.
- Briese S, Wiesner S, Will JC, Lembcke A, Opgen-Rhein B, Nissel R, Wernecke KD, Andreae J, Haffner D, Querfeld U: Arterial and cardiac disease in young adults with childhood-onset end-stage renal disease--impact of calcium and vitamin D therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(7):S.1906-14.
- Brown WM, Dziegielewska KM: Friends and relations of the cystatin superfamily--new members and their evolution. *Protein Sci* 1997;6(1):S.5-12.
- Carrelli AL, Walker MD, Lowe H, McMahon DJ, Rundek T, Sacco RL, Silverberg SJ: Vitamin D Deficiency Is Associated With Subclinical Carotid Atherosclerosis: The Northern Manhattan Study. *Stroke* 2011;42(8):S.2240-45.
- Chen JH, Yip CY, Sone ED, Simmons CA: Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol* 2009;174(3):S.1109-19.
- Chen NX, O'Neill KD, Chen X, Duan D, Wang E, Sturek MS, Edwards JM, Moe SM: Fetuin-A uptake in bovine vascular smooth muscle cells is calcium dependent and mediated by annexins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;292(2):S.599-606.

- Cottone S, Palermo A, Arsena R, Riccobene R, Guarneri M, Mule G, Tornese F, Altieri C, Vaccaro F, Previti A, Cerasola G: Relationship of fetuin-A with glomerular filtration rate and endothelial dysfunction in moderate-severe chronic kidney disease. *J Nephrol* 2010;23(1):S.62-69.
- Deegens JK, Wetzels JF: Fractional excretion of high- and low-molecular weight proteins and outcome in primary focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Nephrol* 2007;68(4):S.201-208.
- Demer LL, Tintut Y: Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 2008;117(22):S.2938-48.
- Fischer DC, Schaible J, Wigger M, Staude H, Drueckler E, Kundt G, Haffner D: Reduced serum fetuin-A in nephrotic children: a consequence of proteinuria? *Am J Nephrol* 2011;34(4):S.373-80.
- Foley RN, Murray AM, Li S, Herzog CA, McBean AM, Eggers PW, Collins AJ: Chronic kidney disease and the risk for cardiovascular disease, renal replacement, and death in the United States Medicare population, 1998 to 1999. *J Am Soc Nephrol* 2005;16(2):S.489-95.
- Foley RN, Parfrey PS: Cardiovascular disease and mortality in ESRD. *J Nephrol* 1998;11(5):S.239-45.
- Frei U, Schober-Halstenberg H-J: Nierenersatztherapie in Deutschland - Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2006/2007. *QuaSi-Niere* 2006.
- Giachelli CM: Vascular calcification mechanisms. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(12):S.2959-64.
- Grymonprez A, Proesmans W, Van Dyck M, Jans I, Goos G, Bouillon R: Vitamin D metabolites in childhood nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1995;9(3):S.278-81.
- Haffner D, Fischer DC: Bone cell biology and pediatric renal osteodystrophy. *Minerva Pediatr* 2010;62(3):S.273-84.
- Haffner D, Hoher B, Muller D, Simon K, Konig K, Richter CM, Eggert B, Schwarz J, Godes M, Nissel R, Querfeld U: Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)2D3. *J Hypertens* 2005;23(5):S.1067-75.
- Hamano T, Matsui I, Mikami S, Tomida K, Fujii N, Imai E, Rakugi H, Isaka Y: Fetuin-mineral complex reflects extraosseous calcification stress in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(11):S.1998-2007.

- Harambat J, van Stralen KJ, Kim JJ, Tizard EJ: Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol* 2011;27(3):S.363-73.
- Häusler M, Schäfer C, Osterwinter C, Jahnen-Dechent W: The physiologic development of fetuin-a serum concentrations in children. *Pediatr Res* 2009;66(6):S.660-64.
- Heiss A, Pipich V, Jahnen-Dechent W, Schwahn D: Fetuin-A is a mineral carrier protein: small angle neutron scattering provides new insight on Fetuin-A controlled calcification inhibition. *Biophys J* 2010;99(12):S.3986-95.
- Hemmelgarn BR, Manns BJ, Lloyd A, James MT, Klarenbach S, Quinn RR, Wiebe N, Tonelli M: Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. *JAMA* 2010;303(5):S.423-29.
- Hintzpeter B, Mensink GB, Thierfelder W, Muller MJ, Scheidt-Nave C: Vitamin D status and health correlates among German adults. *Eur J Clin Nutr* 2008;62(9):S.1079-89.
- Hofbauer LC, Brueck CC, Shanahan CM, Schoppet M, Dobnig H: Vascular calcification and osteoporosis--from clinical observation towards molecular understanding. *Osteoporos Int* 2007;18(3):S.251-59.
- Holick MF: Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007;357(3):S.266-81.
- Ix JH, Shlipak MG, Brandenburg VM, Ali S, Ketteler M, Whooley MA: Association between human fetuin-A and the metabolic syndrome: data from the Heart and Soul Study. *Circulation* 2006;113(14):S.1760-67.
- Jahnen-Dechent W, Heiss A, Schäfer C, Ketteler M: Fetuin-a regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res* 2011;108(12):S.1494-509.
- Jahnen-Dechent W, Schäfer C, Ketteler M, McKee MD: Mineral chaperones: a role for fetuin-A and osteopontin in the inhibition and regression of pathologic calcification. *J Mol Med* 2008;86(4):S.379-89.
- Jahnen-Dechent W, Schinke T, Trindl A, Muller-Esterl W, Sablitzky F, Kaiser S, Blessing M: Cloning and targeted deletion of the mouse fetuin gene. *J Biol Chem* 1997;272(50):S.31496-503.
- Kalantar-Zadeh K, Shah A, Duong U, Hechter RC, Dukkipati R, Kovesdy CP: Kidney bone disease and mortality in CKD: revisiting the role of vitamin D, calcimimetics, alkaline phosphatase, and minerals. *Kidney Int Suppl* 2010(117):S.S10-21.

- Kemper MJ, Altrogge H, Ganschow R, Muller-Wiefel DE: Serum levels of immunoglobulins and IgG subclasses in steroid sensitive nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 2002;17(6):S.413-417.
- Ketteler M, Bongartz P, Westenfeld R, Wildberger JE, Mahnken AH, Bohm R, Metzger T, Wanner C, Jahnke-Dechent W, Floege J: Association of low fetuin-A (AHSG) concentrations in serum with cardiovascular mortality in patients on dialysis: a cross-sectional study. *Lancet* 2003;361(9360):S.827-33.
- Ketteler M, Floege J: Calcification and the usual suspect phosphate: still guilty but there are other guys behind the scenes. *Nephrol Dial Transplant* 2006;21(1):S.33-35.
- Ketteler M, Westenfeld R, Schlieper G, Brandenburg V: Pathogenesis of vascular calcification in dialysis patients. *Clin Exp Nephrol* 2005;9(4):S.265-70.
- Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL: Indices of relative weight and obesity. *J Chronic Dis* 1972;25(6):S.329-43.
- Kishore BK, Gejyo F, Arakawa M: Alpha 2HS-glycoprotein in the serum and urine of patients with renal diseases. *Postgrad Med J* 1983;59(691):S.304-307.
- Koenig KG, Lindberg JS, Zerwekh JE, Padalino PK, Cushner HM, Copley JB: Free and total 1,25-dihydroxyvitamin D levels in subjects with renal disease. *Kidney Int* 1992;41(1):S.161-165.
- Komaba H, Fukagawa M: FGF23-parathyroid interaction: implications in chronic kidney disease. *Kidney international* 2010;77(4):S.292-298.
- Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, Geller F, Geiß HC, Hesse V, Von Hippel A, Jaeger U, Johnsen D, Korte W, Menner K, Müller G, Müller JM, Niemann-Pilatus A, Remer T, Schaefer F, Wittchen H-U, Zabransky S, Zellner K, Ziegler A, Hebebrand J: Perzentile für den Body-mass-Index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschr Kinderheilkd* 2001;149:S.807-818.
- Kuro-o M: Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2006;15(4):S.437-41.
- Kuro-o M: Overview of the FGF23-Klotho axis. *Pediatr Nephrol* 2010;25(4):S.583-90.
- Lebreton JP, Joisel F, Raoult JP, Lannuzel B, Rogez JP, Humbert G: Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *J Clin Invest* 1979;64(4):S.1118-29.

- Lee C, Bongcam-Rudloff E, Sollner C, Jahnen-Dechent W, Claesson-Welsh L: Type 3 cystatins; fetuins, kininogen and histidine-rich glycoprotein. *Front Biosci* 2009;14:S.2911-22.
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2006; 8.Auflage:S688-691.
- London GM: Cardiovascular calcifications in uremic patients: clinical impact on cardiovascular function. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(9 Suppl 4):S.S305-9.
- London GM, Marchais SJ, Guerin AP, Metivier F: Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005;14(6):S.525-31.
- Looker AC, Dawson-Hughes B, Calvo MS, Gunter EW, Sahyoun NR: Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III. *Bone* 2002;30(5):S.771-777.
- Makariou S, Liberopoulos EN, Elisaf M, Challa A: Novel roles of vitamin D in disease: What is new in 2011? *Eur J Intern Med* 2011;22(4):S.355-62.
- Manenti L, Vaglio A, Pasquali S: Increased fetuin-A levels following treatment with a vitamin D analog. *Kidney Int* 2010;78(11):S.1187; author reply 1187-9.
- Manghat P, Souleimanova I, Cheung J, Wierzbicki AS, Harrington DJ, Shearer MJ, Chowiencki P, Fogelman I, Nerlander M, Goldsmith D, Hampson G: Association of bone turnover markers and arterial stiffness in pre-dialysis chronic kidney disease (CKD). *Bone* 2011;48(5):S.1127-32.
- Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J, Gansevoort RT: Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet* 2010;375(9731):S.2073-81.
- Mehrotra R, Westendorf R, Christenson P, Budoff M, Ipp E, Takasu J, Gupta A, Norris K, Ketteler M, Adler S: Serum fetuin-A in nondialyzed patients with diabetic nephropathy: relationship with coronary artery calcification. *Kidney Int* 2005;67(3):S.1070-77.
- Mellgren RL, Huang X: Fetuin A stabilizes m-calpain and facilitates plasma membrane repair. *J Biol Chem* 2007;282(49):S.35868-77.
- Moe SM, Drueke T, Lameire N, Eknoyan G: Chronic kidney disease-mineral-bone disorder: a new paradigm. *Adv Chronic Kidney Dis* 2007;14(1):S.3-12.
- Mosteller RD: Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med* 1987;317(17):S.1098.

- Murshed M, Harmey D, Millan JL, McKee MD, Karsenty G: Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev* 2005;19(9):S.1093-104.
- National-Kidney-Foundation: K/DOQI clinical practice guidelines for cardiovascular disease in dialysis patients. *Am J Kidney Dis* 2005;45(4 Suppl 3):S.S1-153.
- Neven E, Dauwe S, De Broe ME, D'Haese PC, Persy V: Endochondral bone formation is involved in media calcification in rats and in men. *Kidney Int* 2007;72(5):S.574-81.
- Nitta K: Relationship between Fibroblast Growth Factor-23 and Mineral Metabolism in Chronic Kidney Disease. *International journal of nephrology* 2010;2010:S.167984.
- Oh J, Wunsch R, Turzer M, Bahner M, Raggi P, Querfeld U, Mehls O, Schaefer F: Advanced coronary and carotid arteriopathy in young adults with childhood-onset chronic renal failure. *Circulation* 2002;106(1):S.100-105.
- Osawa M, Umetsu K, Sato M, Ohki T, Yukawa N, Suzuki T, Takeichi S: Structure of the gene encoding human alpha 2-HS glycoprotein (AHSG). *Gene* 1997;196(1-2):S.121-125.
- Payne RB, Little AJ, Williams RB, Milner JR: Interpretation of serum calcium in patients with abnormal serum proteins. *Br Med J* 1973;4(5893):S.643-646.
- Persy V, D'Haese P: Vascular calcification and bone disease: the calcification paradox. *Trends Mol Med* 2009;15(9):S.405-16.
- Plum LA, DeLuca HF: Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(12):S.941-55.
- Prader A, Largo RH, Molinari L, Issler C: Physical growth of Swiss children from birth to 20 years of age. First Zurich longitudinal study of growth and development. *Helv Paediatr Acta Suppl* 1989;52:S.1-125.
- Price PA, Caputo JM, Williamson MK: Bone origin of the serum complex of calcium, phosphate, fetuin, and matrix Gla protein: biochemical evidence for the cancellous bone-remodeling compartment. *J Bone Miner Res* 2002;17(7):S.1171-79.
- Price PA, Faus SA, Williamson MK: Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21(5):S.817-24.
- Querfeld U, Mak RH: Vitamin D deficiency and toxicity in chronic kidney disease: in search of the therapeutic window. *Pediatr Nephrol* 2010;25(12):S.2413-30.

- Reinehr T, Roth CL: Fetuin-A and its relation to metabolic syndrome and fatty liver disease in obese children before and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(11):S.4479-85.
- Schäfer C, Heiss A, Schwarz A, Westenfeld R, Ketteler M, Floege J, Muller-Esterl W, Schinke T, Jahnen-Dechent W: The serum protein alpha 2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification. *J Clin Invest* 2003;112(3):S.357-66.
- Schaible J, Wigger M, Staude H, Drueckler E, Kundt G, Haffner D, Fischer DC: Serum fetuin-A and vitamin D in children with mild-to-severe chronic kidney disease: a cross-sectional study. *Nephrol Dial Transplant* 2011;27(3):S.1107-13.
- Schmidt-Gayk H, Grawunder C, Tschöpe W, Schmitt W, Ritz E, Pietsch V, Andrassy K, Bouillon R: 25-hydroxy-vitamin-D in nephrotic syndrome. *Lancet* 1977;2(8029):S.105-108.
- Schoppet M, Shroff RC, Hofbauer LC, Shanahan CM: Exploring the biology of vascular calcification in chronic kidney disease: what's circulating? *Kidney Int* 2008;73(4):S.384-90.
- Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM, Jr., Spitzer A: A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics* 1976;58(2):S.259-63.
- Shroff R, Egerton M, Bridel M, Shah V, Donald AE, Cole TJ, Hiorns MP, Deanfield JE, Rees L: A bimodal association of vitamin D levels and vascular disease in children on dialysis. *J Am Soc Nephrol* 2008;19(6):S.1239-46.
- Shroff RC, Shah V, Hiorns MP, Schoppet M, Hofbauer LC, Hawa G, Schurgers LJ, Singhal A, Merryweather I, Brogan P, Shanahan C, Deanfield J, Rees L: The circulating calcification inhibitors, fetuin-A and osteoprotegerin, but not matrix Gla protein, are associated with vascular stiffness and calcification in children on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23(10):S.3263-71.
- Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Rajkumar C, McMahon LP, Holt SG: Phosphorylated fetuin-A-containing calciprotein particles are associated with aortic stiffness and a procalcific milieu in patients with pre-dialysis CKD. *Nephrol Dial Transplant* 2011.
- Smith ER, Ford ML, Tomlinson LA, Rocks BF, Rajkumar C, Holt SG: Poor agreement between commercial ELISAs for plasma fetuin-A: An effect of protein glycosylation? *Clin Chim Acta* 2010;411(17-18):S.1367-70.

- Srinivas PR, Wagner AS, Reddy LV, Deutsch DD, Leon MA, Goustin AS, Grunberger G: Serum alpha 2-HS-glycoprotein is an inhibitor of the human insulin receptor at the tyrosine kinase level. *Mol Endocrinol* 1993;7(11):S.1445-55.
- Stefan N, Fritsche A, Weikert C, Boeing H, Joost HG, Haring HU, Schulze MB: Plasma fetuin-A levels and the risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 2008;57(10):S.2762-67.
- Stenvinkel P, Wang K, Qureshi AR, Axelsson J, Pecoits-Filho R, Gao P, Barany P, Lindholm B, Jogestrand T, Heimbürger O, Holmes C, Schalling M, Nordfors L: Low fetuin-A levels are associated with cardiovascular death: Impact of variations in the gene encoding fetuin. *Kidney Int* 2005;67(6):S.2383-92.
- Szweras M, Liu D, Partridge EA, Pawling J, Sukhu B, Clokie C, Jahnen-Dechent W, Tenenbaum HC, Swallow CJ, Grynblas MD, Dennis JW: alpha 2-HS glycoprotein/fetuin, a transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein antagonist, regulates postnatal bone growth and remodeling. *J Biol Chem* 2002;277(22):S.19991-97.
- Tolleshaug H: Intracellular segregation of asialo-transferrin and asialo-fetuin following uptake by the same receptor system in suspended hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1984;803(3):S.182-190.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(9):S.4350-54.
- Triffitt JT, Gebauer U, Ashton BA, Owen ME, Reynolds JJ: Origin of plasma alpha2HS-glycoprotein and its accumulation in bone. *Nature* 1976;262(5565):S.226-227.
- van der Velde M, Halbesma N, de Charro FT, Bakker SJ, de Zeeuw D, de Jong PE, Gansevoort RT: Screening for albuminuria identifies individuals at increased renal risk. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(4):S.852-862.
- van Hoof HJ, de Sevaux RG, van Baelen H, Swinkels LM, Klipping C, Ross HA, Sweep CG: Relationship between free and total 1,25-dihydroxyvitamin D in conditions of modified binding. *Eur J Endocrinol* 2001;144(4):S.391-396.
- van Husen M, Fischer AK, Lehnhardt A, Klaassen I, Moller K, Muller-Wiefel DE, Kemper MJ: Fibroblast growth factor 23 and bone metabolism in children with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2010;78(2):S.200-206.
- Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C: Vitamin D: a pleiotropic hormone. *Kidney Int* 2010;78(2):S.140-145.

- Voigt M, Fischer DC, Rimpau M, Schareck W, Haffner D: Fibroblast growth factor (FGF)-23 and fetuin-A in calcified carotid atheroma. *Histopathology* 2010;56(6):S.775-788.
- Wang AY, Woo J, Lam CW, Wang M, Chan IH, Gao P, Lui SF, Li PK, Sanderson JE: Associations of serum fetuin-A with malnutrition, inflammation, atherosclerosis and valvular calcification syndrome and outcome in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20(8):S.1676-85.
- Warshaw BL, Check IJ, Hymes LC, DiRusso SC: Decreased serum transferrin concentration in children with the nephrotic syndrome: effect on lymphocyte proliferation and correlation with serum immunoglobulin levels. *Clin Immunol Immunopathol* 1984;33(2):S.210-219.
- Weikert C, Stefan N, Schulze MB, Pischon T, Berger K, Joost HG, Haring HU, Boeing H, Fritsche A: Plasma fetuin-a levels and the risk of myocardial infarction and ischemic stroke. *Circulation* 2008;118(24):S.2555-62.
- Weng FL, Shults J, Herskovitz RM, Zemel BS, Leonard MB: Vitamin D insufficiency in steroid-sensitive nephrotic syndrome in remission. *Pediatr Nephrol* 2005;20(1):S.56-63.
- Wigger M, Schaible J, Muscheites J, Kundt G, Haffner D, Fischer DC: Fetuin-A serum concentrations in healthy children. *Ann Clin Biochem* 2009;46(6):S.511-513.
- Zittermann A, Schleithoff SS, Koerfer R: Vitamin D and vascular calcification. *Curr Opin Lipidol* 2007;18(1):S.41-46.

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Dagmar-Christiane Fischer. Sie hat mich die gesamte Zeit über in jeder erdenklichen Weise unterstützt und begleitet. Ihr verdanke ich die endgültige Festlegung des Themas der Dissertation, viele anregende Diskussionen und persönliche Gespräche.

Herrn Prof. Dr. med. Dieter Haffner danke ich für die freundliche Überlassung und Konkretisierung dieses hochinteressanten Themas sowie für die zahlreichen konstruktiven Gespräche bei der Auswertung des untersuchten Materials.

Frau Prof. Dr. med. Marianne Wigger möchte ich für die Idee zu dieser Arbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Frau Anja Rahn und Frau Birgit Salewski danke ich für die stets freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung bei allen Arbeiten im Labor.

Bei Herrn Prof. Dr.-Ing. Günther Kundt möchte ich mich für den Beistand bei der statistischen Auswertung der Daten bedanken.

Allen Personen, die bei dieser Studie als Probanden mitgewirkt haben, danke ich herzlich für ihr Engagement und die eingebrachte Zeit.

Für die Unterstützung beim Sammeln der Proben möchte ich den Ärzten und Schwestern der UKJ Rostock danken.

Allen Mitdoktoranden danke ich für die schöne Zeit und die netten Gespräche.

Ich danke meiner Frau Isabel Möller und meinen Eltern für ihre Unterstützung.

10 Tabellarischer Lebenslauf

11 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, die vorliegende Arbeit selbständig ohne fremde Hilfe, nur unter Nutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und weder diese noch eine andere Arbeit zuvor an einer Hochschule als Dissertation eingereicht zu haben.

Köln, den 30.06.2013

Jan Christoph Möller, geb. Schaible