

Aus dem Pädiatrischen Forschungszentrum,
Klinik für Nieren-, Leber und Stoffwechselerkrankungen
der Medizinischen Hochschule Hannover

Expressionsanalyse des Fibroblastenwachstumsfaktors 23 im gesunden Mausherz sowie bei Hochdruck-induzierter kardialer Hypertrophie

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
an der Medizinischen Hochschule Hannover

vorgelegt von

Fiona Rohde, geb. Eitner

aus Seattle, USA

Hannover, den 8. Oktober 2024

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am 28.08.2024

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Professor Dr. med. Michael P. Manns

Betreuer/in der Arbeit: PD Dr. rer. nat. Maren Leifheit-Nestler

1. Referent/in: Prof. Dr. med. Kai Wollert
2. Referent/in: PD Dr. rer. nat. Ruth Olmer

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2024

Prüfungsausschuss

Vorsitz: Prof. Dr. med. Constantin von Kaisenberg

1. Prüfer/in: Prof. Dr. med. Anette Melk
2. Prüfer/in: Prof. Dr. med. Hossein Tezval

Diese Dissertationsschrift basiert gemäß §3 Absatz 3 der Promotionsordnung der Medizinischen Hochschule Hannover auf folgender Publikation:

Fiona Eitner†, Beatrice Richtert†, Saskia Schwänen, Malgorzata Szaroszyk, Isabel Vogt, Andrea Grund, Thomas Thum, Joerg Heineke, Dieter Haffner, Maren Leifheit-Nestler (2022)

Comprehensive Expression Analysis of Cardiac Fibroblast Growth Factor 23 in Health and Pressure-induced Cardiac Hypertrophy. Front. Cell Dev. Biol. 9:791479.

doi: 10.3389/fcell.2021.791479

†These authors have contributed equally to this work.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Chronische Nierenerkrankung.....	1
1.2 FGF23.....	1
1.2.1 FGF23 bei Knochenerkrankungen.....	2
1.2.2 FGF23 bei CKD.....	2
1.2.3 FGF23 bei CVD.....	3
1.3 FGF23-Mausmodelle.....	4
2. Fragestellung	6
2.1 Experimentelle Umsetzung.....	6
2.2 Erläuterungen zur Publikation.....	7
3. Publikation	8
4. Ergebnisse und Diskussion	24
4.1 Neue Erkenntnisse durch unsere Studie.....	24
4.2 FGF23 aus Kardiomyozyten.....	24
4.3 Arterielle Hypertonie.....	25
4.3.1 FGF23 und arterielle Hypertonie.....	26
4.3.2 TAC-Operation als Modell der Hochdruck-induzierten LVH.....	27
4.4 FGF23 und Endothelfunktion.....	27
4.5 FGF23 und Fibrose.....	28
4.6 Limitationen der Studie.....	29
5. Zusammenfassung	32
6. Literaturverzeichnis	33
7. Lebenslauf	40
8. Erklärung nach §2 Abs. 2 Nr. 7 und 8 PromO	42
9. Danksagung	43

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der physiologischen und pathologischen Wirkungen von FGF23.

Abkürzungsverzeichnis

AAV:	Adeno-assoziiertes Virus
ACE:	<i>Angiotensin-converting enzyme</i>
ADHR:	autosomal-dominante hypophosphatämische Rachitis
AMCF:	<i>adult mouse cardiac fibroblasts</i> , adulte murine kardiale Fibroblasten
CAKUT:	<i>congenital abnormalities of the kidney and urinary tract</i> , angeborene Fehlbildungen der Niere und der ableitenden Harnwege
CKD:	<i>chronic kidney disease</i> , chronische Nierenerkrankung
CVD:	<i>cardiovascular disease</i> , kardiovaskuläre Erkrankungen
eNOS:	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase
FGF23:	<i>fibroblast growth factor 23</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor 23
FGF23 ^{ΔVDR} -KO:	globaler FGF23-KO gepaart mit einem nicht-funktionalen Vitamin D-Rezeptor
Fgf23 ^{fl/fl} /cre ⁺ :	Kardiomyozyten-spezifischer FGF23-KO
Fgf23 ^{fl/fl} /cre ⁻ :	Wildtyp-Wurfgeschwister der Kardiomyozyten-spezifischen FGF23-KO-Mäuse
FGFR:	<i>fibroblast growth factor receptor</i> , Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor
GFR:	glomeruläre Filtrationsrate
HCAEC:	<i>human coronary artery endothelial cells</i> , Endothelzellen aus humanen Koronararterien
Hyp:	Mausmodell der XLH
IL:	Interleukin
Klotho ^{ΔVDR} -KO:	globaler Klotho-KO gepaart mit einem nicht-funktionalen Vitamin-D-Rezeptor
KO:	Knockout, Ablation eines Gens
LVH:	linksventrikuläre Hypertrophie
MAPK:	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MHC:	<i>myosin heavy chain</i> , schwere Kette des Myosins
MRT:	Magnetresonanztomographie
NaPi:	Natrium-Phosphat-Cotransporter
NCC:	Natrium-Chlorid-Cotransporter
NFAT:	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NO:	Stickstoffmonoxid
Nox:	Nicotinamadenindinukleotidphosphat-Oxidase
NRCF:	<i>neonatal rat cardiac fibroblasts</i> , kardiale Fibroblasten neonataler Ratten
NRVM:	<i>neonatal rat ventricular myocytes</i> , neonatale Ratten-Kardiomyozyten
PTH:	Parathormon
RAAS:	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
TAC:	<i>transverse aortic constriction</i>
TGF:	<i>transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
TIO:	tumorinduzierte Osteomalazie
TNF:	Tumornekrosefaktor
qRT-PCR:	quantitative <i>realtime-polymerase chain reaction</i>
XLH:	<i>X-linked hypophosphatemia</i> , X-chromosomale Hypophosphatämie

1 Einleitung

1.1 Chronische Nierenerkrankung

Bei der chronischen Niereninsuffizienz (*chronic kidney disease, CKD*) handelt es sich um ein weltweites Gesundheitsproblem mit einer globalen Prävalenz von 13,4 %¹. Die CKD ist definiert als eine Anomalie der Nierenfunktion über einen Zeitraum von mehr als drei Monaten, wobei entweder die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) auf unter 60 ml/min/1,73 m² eingeschränkt ist, oder eine Albuminurie, eine histologische Veränderungen oder Elektrolytverschiebungen bestehen². Die Ursachen einer CKD unterscheiden sich stark zwischen pädiatrischen und erwachsenen Patient*innen. Bei pädiatrischen Patient*innen ist die Ursache für eine CKD größtenteils angeboren (*congenital abnormalities of the kidney and urinary tract, CAKUT*) oder sie entsteht aufgrund autoimmuner Geschehen, wie bei einem Steroid-resistenten nephrotischen Syndrom oder einer Lupusnephritis³. CKD im Erwachsenenalter beruht zu einem großen Teil auf Folgen anderer Erkrankungen wie Diabetes mellitus oder arterieller Hypertonie, kann jedoch auch auf autoimmunen Erkrankungen wie Glomerulonephritis basieren⁴. Weltweit kann man Unterschiede in Prävalenz, Ätiologie und auch Progression der CKD erkennen. In Ländern mit höheren Einkommen sieht man eine höhere Prävalenz der CKD, welche sich ätiologisch häufiger auf die oben genannten „Wohlstandskrankheiten“ zurückführen lässt⁵.

Die CKD hat verschiedene Auswirkungen auf die Gesundheit der Patient*innen, wie eine erhöhte Infektanfälligkeit oder veränderte Verstoffwechslung von Arzneimitteln². Das Risiko für CKD-Patient*innen, an einer kardiovaskulären Erkrankung (*cardiovascular disease, CVD*) zu leiden, ist stark erhöht, wobei kardiovaskuläre Ereignisse mit 30,2 % zu den häufigsten Todesursachen bei CKD-Patient*innen gehören und mit sinkender GFR zunehmen^{6,7}. Ca. 50 % der Patient*innen mit Herzinsuffizienz leiden an einer CKD, welche als Risikofaktor für Entstehung und Progress angesehen wird⁸. Bei über 70 % der Patient*innen mit Nierenversagen kommt es zu einem pathologischem kardialen *Remodelling* mit kardialer Hypertrophie und Fibrose, welches wiederum zu Arrhythmien, Herzversagen und kardialen Versterben führen kann^{9,10}.

1.2 FGF23

Der Fibroblastenwachstumsfaktor 23 (*fibroblast growth factor 23, FGF23*) ist ein 32 kDa großes Protein, welches von Osteozyten und Osteoblasten als Reaktion auf verschiedene

Stimuli, wie Phosphat, Vitamin D, Parathormon (PTH) und Calcium sezerniert wird¹¹⁻¹⁶. FGF23 bindet zusammen mit seinem Co-Faktor Klotho an den FGF Rezeptor (FGFR) 1 im proximalen Tubulus und bewirkt über eine Aktivierung der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) eine verminderte Synthese und Internalisierung der Natrium-Phosphat-Cotransporter 2a und 2c (NaPi2a, NaPi2c) und es kommt zu einer verstärkten Phosphaturie^{11,17}. Des Weiteren supprimiert FGF23 die Expression der 1 α -Hydroxylase und induziert die 24-Hydroxylase, wodurch es zu verminderten 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Spiegeln kommt¹¹ (siehe Abb. 1).

Die Expression von FGF23 scheint altersabhängig reguliert zu sein, mit höheren Serumspiegeln innerhalb der ersten Lebensjahre^{18,19}. Die Expression von FGF23 in anderen Organen neben dem Knochen konnte nachgewiesen werden, unter anderem im Herzen, Magen, Milz, Thymus und Lunge²⁰.

1.2.1 FGF23 bei Knochenerkrankungen

Zuerst beschrieben wurde FGF23 als ätiologischer Faktor in verschiedenen Formen der Hypophosphatämie wie der tumorinduzierten Osteomalazie (TIO), der autosomal-dominanten hypophosphatämischen Rachitis (ADHR), und der X-chromosomalen Hypophosphatämie (*X-linked hypophosphatemia*, XLH)^{21,22}. Hierbei führen die erhöhten FGF23-Spiegel im Serum zu einer vermehrten Phosphaturie, niedrigen 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Spiegeln und im Verlauf zu einer hypophosphatämischen Rachitis und Osteomalazie^{21,23}. Erst kürzlich konnte Burosumab, ein humaner Anti-FGF23 Antikörper, als neuer Durchbruch in der Therapie der XLH und TIO gewertet werden, sowohl bei pädiatrischen, als auch bei erwachsenen Patient*innen^{24,25}.

1.2.2 FGF23 bei CKD

Im Verlauf der CKD kommt es aufgrund der eingeschränkten Nierenfunktion zu einer verminderten Phosphatausscheidung und somit zu einer Hyperphosphatämie. Der Körper reagiert darauf mit einer verstärkten Sekretion von FGF23 aus dem Knochen, welche im terminalen Nierenversagen bis zu 1000-mal höher sein kann als bei gesunden Patient*innen^{23,26}. Durch diese Regulation können die Serumspiegel von Phosphat im Verlauf der CKD lange normal gehalten werden, sodass es erst bei einer GFR von unter 30 ml/min/1,73 m² zu einer sichtbaren Hyperphosphatämie kommt²⁷. Während im Verlauf der Erkrankung die FGF23-Spiegel kontinuierlich steigen, steigt parallel auch das Risiko, an CVD zu leiden. Hohe FGF23-Spiegel sind mit einer erhöhten Mortalität durch Herzinsuffizienz und

linksventrikulärer Hypertrophie (LVH) assoziiert, jedoch weniger mit atherosklerotischen Ereignissen^{28,29}. Faul et al. konnten nachweisen, dass FGF23 eine LVH direkt über die Aktivierung des Calcineurin-*nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)-Signalwegs in Kardiomyozyten induziert²⁹. Dies geschieht über die Bindung von FGF23 an den FGFR4 ohne seinen Co-Faktor Klotho³⁰ (siehe Abb. 1).

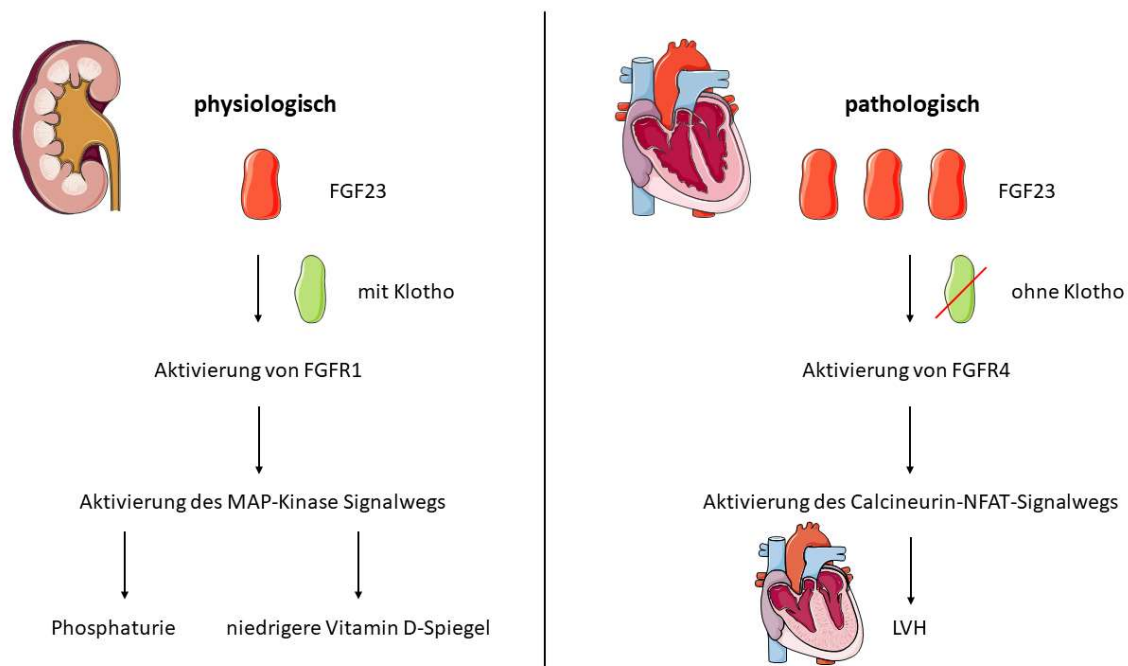


Abbildung 1: Darstellung der physiologischen und pathologischen Wirkungen von FGF23. Teile der Abbildung entstanden durch die Nutzung von Bildern von Servier Medical Art, lizenziert unter Creative Commons Attribution 3.0 Unported License (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Neben der Induktion von einer LVH fördert FGF23 die Entstehung einer kardialen Fibrose über die Aktivierung von β -Catenin³¹. Zusätzlich aktiviert FGF23 das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), welches wiederum die Progression einer LVH und kardialen Fibrosierung verstärkt³². FGF23 ist auch mit endothelialer Dysfunktion bei CKD-Patient*innen sowie in *in vitro*-Experimenten assoziiert^{33,34}.

1.2.3 FGF23 bei CVD

Es wird diskutiert, dass erhöhte Spiegel von FGF23 CKD-unabhängig mit CVD, wie Herzinsuffizienz und koronarer Herzkrankheit, und erhöhter Mortalität assoziiert sind^{35,36}. Die intrakardiale FGF23-Synthese ist bei Patient*innen mit CKD und LVH erhöht³⁷, und konnte auch bei Tiermodellen der Urämie³⁸, des Myokardinfarkts^{39,40}, der *transverse aortic constriction* (TAC)⁴¹ und pulmonalarteriellem Banding⁴² nachgewiesen werden.

Die Expression von FGF23 in Kardiomyozyten^{37,42} und Endothelzellen⁴³ wurde bereits gezeigt, wobei die Expression in Fibroblasten noch Gegenstand der Diskussion ist⁴⁰ und in dieser Arbeit näher betrachtet wird.

1.3 FGF23-Mausmodelle

Zur Untersuchung von FGF23 wurden unterschiedliche Mausmodelle herangezogen. Die globale Ablation von FGF23 in Mäusen (FGF23-Knockout, KO) zeigt keine erhöhte embryonale Letalität, aber starke Wachstumseinschränkungen mit Abnormalitäten in der Knochenstruktur und einer verkürzten Lebenszeit von maximal 12 Wochen⁴⁴. Dieser Phänotyp lässt sich auf den stark veränderten Mineralmetabolismus zurückführen, mit einer Hyperphosphatämie, erhöhten Serumspiegeln von 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D und erniedrigten Serumspiegeln von PTH. Erhöhte 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D-Serumspiegel führen während der Entwicklung zu einer eingeschränkten Knochenmineralisierung und zu einer Akkumulation von Osteoid⁴⁵. Erniedrigte PTH-Spiegel führen zu einem verminderten Knochenumsatz unabhängig von 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D⁴⁶. Neben dem veränderten Wachstum und Knochenstoffwechsel zeigten die FGF23-KO-Mäuse arteriosklerotische Veränderungen mit einer eingeschränkten Nierenfunktion sowie eine Atrophie des Thymus und der Milz mit einer verminderten Anzahl peripherer Leukozyten und Infertilität⁴⁴. Die eingeschränkte Nierenfunktion, Leukopenie sowie eine unklare Hypoglykämie werden diskutiert als mögliche Ursachen für die verkürzte Lebenszeit⁴⁴.

Im Vergleich zur globalen Ablation zeigte die globale Überexpression von FGF23 einen vergleichbaren Phänotyp zu den oben genannten Formen der Hypophosphatämie (ADHR, TIO, XLH) mit erhöhter Phosphatausscheidung, erniedrigten Serumspiegeln von 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D und rachitisch veränderter Knochenstruktur⁴⁷. Die Knochen der Mäuse mit einer globalen Überexpression des humanen FGF23 waren verkürzt, mit einer krankhaft veränderten Wachstumsplatte und einer deutlich verringerten Mineralisierung⁴⁷. Diese Veränderungen lassen sich wahrscheinlich die niedrigen Spiegel von 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D zurückführen⁴⁸. Auch die Mäuse mit einer globalen Überexpression von FGF23 waren infertil und zeigten eine Atrophie von Thymus und Milz mit einer peripheren T-Lymphopenie⁴⁷. Im Gegensatz zu den FGF23-KO-Mäusen zeigten sie zwar ein verringertes Wachstum nach 8 Lebenswochen, jedoch keine verkürzte Lebensdauer.

Clinkenbeard et al. generierten einen FGF23-KO, der spezifisch für Osteoblasten und Osteozyten ist⁴⁹. Die Knochen-spezifischen FGF23-KO-Mäuse zeigten unter normaler Diät normale Serumphosphatspiegel und eine 50%ige Reduktion des Serum-FGF23. Unter einer Hochphosphatdiät zeigte sich, dass die FGF23-KO-Mäuse deutlich höhere Phosphatspiegel ausbildeten als Wildtypiere unter Hochphosphatdiät aufgrund der fehlenden FGF23-Expression aus den Osteozyten und Osteoblasten. Der Phänotyp des Knochen-spezifischen FGF23-KO zeigte keine Wachstumsstörungen wie der globale FGF23-KO, sodass davon ausgegangen werden muss, dass nicht nur Osteoblasten und Osteozyten den Serumspiegel von FGF23 beeinflussen⁴⁹. Des Weiteren wurden *Hyp*-Mäuse, welche ein Modell für die o.g. XLH darstellen, mit den knochenspezifischen FGF23-KO Mäusen gekreuzt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass durch den knochenspezifischen FGF23-KO die hypophosphatämische Rachitis der *Hyp*-Mäuse ausgeglichen werden konnte und diese Mäuse ein normales Knochenwachstum aufzeigten.

Hesse et al. kreuzten einen globalen FGF23-KO mit einer Mauslinie, die einen nicht-funktionalen Vitamin-D-Rezeptor exprimiert⁵⁰. Um Calcium- und Phosphatstoffwechsel zu normalisieren und ein gesundes Wachstum sicher zu stellen, wurden die FGF23^{ΔVDR}-KO-Mäuse auf eine Ausgleichsdiät gesetzt, die reich an Calcium, Phosphat und Lactose war⁵⁰. Die FGF23^{ΔVDR}-KO-Mäuse auf Ausgleichsdiät zeigten normale Spiegel von Serumcalcium und Serumphosphat, eine normale Körpergröße sowie keine ektopen Kalzifikationen. Zudem hatten sie eine normale Nierenfunktion, keine Hypoglykämien und eine normale Milzgröße⁵⁰.

Zu Beginn unserer Studie war die Auswirkung einer Ablation oder Überexpression von FGF23 auf die kardiale Funktion, Morphologie und Histologie noch nicht betrachtet worden.

2 Fragestellung

Die Fragestellung dieser Arbeit lässt sich in drei verschiedene Bereiche gliedern. Zunächst stellte sich die Frage nach einem allgemeinen Expressionsmuster von FGF23 im Herzen gesunder Mäuse, bezüglich Altersverteilung, Verteilung in verschiedenen Kompartimenten des Herzens sowie verschiedenen kardialen Zelltypen (Fragestellung 1). Zuvor war die Altersabhängigkeit der Expression nur anhand von Serumspiegeln im Menschen gemessen worden¹⁸. Des Weiteren war die Expression von FGF23 in verschiedenen kardialen Zelltypen Gegenstand von Diskussion⁴⁰.

Da die Induktion eines hypertrophen Wachstums von Kardiomyozyten durch endogenes FGF23 beschrieben wurde, fokussierten wir uns im nächsten Schritt auf die Untersuchung eines von uns generierten Kardiomyozyten-spezifischen FGF23-KO ($Fgf23^{fl/fl}/cre^+$) und dessen Auswirkungen auf die allgemeine und kardiale Gesundheit (Fragestellung 2). Zuletzt haben wir uns die Frage gestellt, ob $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ -Mäuse eine möglicherweise reduzierte Herzhypertrophie nach TAC-Operation im Vergleich zu Wildtypmäusen entwickeln und welche Zellen nach TAC-Operation FGF23 exprimieren (Fragestellung 3). Mit den Fragen der 3. Fragestellungen beschäftigte sich zuvor bereits Saskia Schwänen; meine Beiträge zur Beantwortung der Fragestellung werden unten erläutert.

2.1 Experimentelle Umsetzung

Für die Umsetzung der ersten Fragestellung verwendeten wir die Herzen neonataler, 1, 3 und 6 Monate alter $Fgf23^{fl/fl}/cre^-$ -Mäuse und detektierten die Expression von FGF23 histologisch, mittels quantitativer *realtime PCR* (qRT-PCR) und *Western Blot*-Analysen.

Zur Beantwortung der zweiten Fragestellung wurde zunächst ein Kardiomyozyten-spezifischer FGF23-KO ($Fgf23^{fl/fl}/cre^+$) mithilfe des Cre-LoxP Systems generiert und verifiziert. Im Alter von 1, 3 und 6 Monaten wurden Marker der Knochengesundheit im Blut analysiert, die Herzfunktion echokardiographisch erfasst und der Herzphänotyp histologisch und per qRT-PCR evaluiert.

Für die letzte Fragestellung wurden die $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ -Mäuse im Alter von 8 Wochen einer TAC-Operation unterzogen und nach 2 Wochen mit Sham-operierten Kontrollen verglichen. Am Versuchsende wurden kardiale Magnetresonanztomographien (MRT) durchgeführt, die

Herzen histologisch aufgearbeitet sowie Herz- und Knochengewebe in qRT-PCR-Analysen begutachtet.

2.2 Erläuterungen zur Publikation

Die Ergebnisse dieser Arbeit von Fiona Rohde, geb. Eitner wurden im Januar 2022 unter geteilter Erstautorenschaft im Peer Reviewed Journal *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (IF 5,7) publiziert. Die Versuche an TAC-operierten Tieren waren zuvor im Rahmen des StrucMed-Projektes von Saskia Schwänen durchgeführt worden.

Fiona Rohde hat wie folgt zur Publikation beigetragen:

- Mitarbeit an Projekt- und Versuchsplanung
- Handling und Präparation von Versuchstieren
- Auswertung der echokardiographischen Aufnahmen
- Histologische Färbung und Analyse der Fibrose, Kapillarisation und Kardiomyozytengröße bei $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ - und $Fgf23^{fl/fl}/cre^-$ -Mäusen sowie erweiternde Immunfluoreszenz-Färbungen bei TAC-operierten $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ - und $Fgf23^{fl/fl}/cre^-$ -Mäusen
- RNA-Isolation, cDNA-Synthese und qRT-PCR aus Knochen und Herzen der $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ - und $Fgf23^{fl/fl}/cre^-$ -Mäuse
- Analyse, statistische und graphische Auswertung der erhobenen Daten sowie Darstellung dieser
- Erstellen von Abbildungen für das Manuskript
- Mithilfe beim Schreiben des Manuskripts

3 Publikation

Comprehensive Expression Analysis of Cardiac Fibroblast Growth Factor 23 in Health and Pressure-induced Cardiac Hypertrophy.

Fiona Eitner^{1†}, Beatrice Richter^{1†}, Saskia Schwänen¹, Malgorzata Szaroszyk², Isabel Vogt¹, Andrea Grund¹, Thomas Thum³, Joerg Heineke^{2,4}, Dieter Haffner¹, Maren Leifheit-Nestler¹

¹ Department of Pediatric Kidney, Liver and Metabolic Diseases, Pediatric Research Center, Hannover Medical School, Hannover, Germany

² Department of Cardiology and Angiology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

³ Institute of Molecular and Translational Therapeutic Strategies, Hannover Medical School, Hannover, Germany

⁴ Department of Cardiovascular Physiology, European Center for Angioscience (ECAS), Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany

†These authors have contributed equally to this work.



Comprehensive Expression Analysis of Cardiac Fibroblast Growth Factor 23 in Health and Pressure-induced Cardiac Hypertrophy

Fiona Eitner^{1†}, Beatrice Richter^{1†}, Saskia Schwänen¹, Malgorzata Szaroszyk², Isabel Vogt¹, Andrea Grund¹, Thomas Thum³, Joerg Heineke^{2,4}, Dieter Haffner¹ and Maren Leifheit-Nestler^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Trayambak Basak,
Indian Institute of Technology Mandi,
India

Reviewed by:

Miriam Zacchia,
University of Campania Luigi Vanvitelli,
Italy
Ronald J. Vagnozzi,
University of Colorado Anschutz
Medical Campus, United States

*Correspondence:

Maren Leifheit-Nestler
leifheit-nestler.maren@mh-
hannover.de

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Pathology,
a section of the journal
Frontiers in Cell and Developmental
Biology

Received: 08 October 2021

Accepted: 13 December 2021

Published: 18 January 2022

Citation:

Eitner F, Richter B, Schwänen S,
Szaroszyk M, Vogt I, Grund A, Thum T,
Heineke J, Haffner D and
Leifheit-Nestler M (2022)
Comprehensive Expression Analysis of
Cardiac Fibroblast Growth Factor 23 in
Health and Pressure-induced
Cardiac Hypertrophy.
Front. Cell Dev. Biol. 9:791479.
doi: 10.3389/fcell.2021.791479

¹Department of Pediatric Kidney, Liver and Metabolic Diseases, Pediatric Research Center, Hannover Medical School, Hannover, Germany, ²Department for Cardiology and Angiology, Hannover Medical School, Hannover, Germany, ³Institute of Molecular and Translational Therapeutic Strategies, Hannover Medical School, Hannover, Germany, ⁴Department of Cardiovascular Physiology, European Center for Angioscience (ECAS), Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany

Enhanced fibroblast growth factor 23 (FGF23) is associated with left ventricular hypertrophy (LVH) in patients with chronic kidney and heart disease. Experimentally, FGF23 directly induces cardiac hypertrophy and vice versa cardiac hypertrophy stimulates FGF23. Besides the bone, FGF23 is expressed by cardiac myocytes, whereas its synthesis in other cardiac cell types and its paracrine role in the heart in health and disease is unknown. By co-immunofluorescence staining of heart tissue of wild-type mice, we show that Fgf23 is expressed by cardiac myocytes, fibroblasts and endothelial cells. Cardiac Fgf23 mRNA and protein level increases from neonatal to six months of age, whereas no age-related changes in bone *Fgf23* mRNA expression were noted. Cardiac myocyte-specific disruption of *Fgf23* using Cre-LoxP system (*Fgf23^{fl/fl}/cre⁺*) caused enhanced mortality, but no differences in cardiac function or structure. Although pressure overload-induced cardiac hypertrophy induced by transverse aortic constriction (TAC) resulted in a slightly worse phenotype with a more severe reduced ejection fraction, higher end-systolic volume and more enlarged systolic LV diameter in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice compared to controls, this was not translated to any worse cellular hypertrophy, fibrosis or chamber remodeling. TAC induced *Fgf23* mRNA expression in whole cardiac tissue in both genotypes. Interestingly, co-immunofluorescence staining revealed enhanced Fgf23 synthesis in cardiac fibroblasts and endothelial cells but not in cardiac myocytes. RNA sequencing of isolated adult cardiac myocytes, cardiac fibroblasts and endothelial cells confirmed significantly higher *Fgf23* transcription in cardiac fibroblasts and endothelial cells after TAC. Our data indicate that Fgf23 is physiologically expressed in various cardiac cell types and that cardiac fibroblasts and endothelial cells might be an important source of FGF23 in pathological conditions. In addition, investigations in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice suggest that cardiac myocyte-derived FGF23 is needed to maintain cardiac function during pressure overload.

Keywords: FGF23, cardiac myocytes, cardiac fibroblasts, endothelial cells, left ventricular hypertrophy, fibrosis, transverse aortic constriction

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is a worldwide health problem, and CKD patients suffer from an excessive high risk for cardiovascular disease (CVD) (Sarnak et al., 2003; Eckardt et al., 2013). Over 70% of patients with end-stage kidney disease (ESKD) develop pathological cardiac remodeling including hypertrophy and fibrosis, which promotes diastolic dysfunction, arrhythmia, heart failure and sudden death (Van Berlo et al., 2013; Ham et al., 2018). Hereby, the involvement of the bone-derived hormone fibroblast growth factor (FGF) 23 is widely discussed (Riminucci et al., 2003).

FGF23 synthesis in bone is induced in response to various stimuli to maintain phosphate homeostasis (Shimada et al., 2004; Shimada et al., 2005; Kawata et al., 2007; De Borst et al., 2011; Haussler et al., 2012; Rodriguez-Ortiz et al., 2012). Physiologically, FGF23 exerts its renal functions by binding to FGF receptor (FGFR) 1 in proximal tubular cells in the presence of its co-factor klotho causing intracellular activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling leading to increased renal phosphate excretion and decreased 1,25-dihydroxy vitamin D synthesis (Shimada et al., 2004; Urakawa et al., 2006). CKD is a state of high phosphate load and therefore FGF23 levels in the circulation already start to rise in early stages of CKD and reach a 1,000-fold increase in ESKD (Weber et al., 2003; Gutierrez et al., 2005). In parallel, the prevalence of left ventricular hypertrophy (LVH) increases and is associated with a higher mortality rate in these patients (Go et al., 2004; Paoletti et al., 2016). Furthermore, increased circulating FGF23 in CKD is linked to LVH development and mortality (Faul et al., 2011). *In vitro* and *in vivo* data show that FGF23 induces LVH by directly targeting the heart *via* binding and phosphorylating the intracellular receptor kinase domain of FGFR4 leading to the activation of the pro-hypertrophic calcineurin/nuclear factor of activated T cells (NFAT) signaling pathway in a klotho-independent manner (Faul et al., 2011; Grabner et al., 2015). Interestingly, studies in the general population have shown that elevated FGF23 levels are also associated with CVD and mortality independent of the presence of CKD (Kestenbaum et al., 2014; Lutsey et al., 2014). Furthermore, FGF23 promotes myocardial fibrosis *via* activation of β -Catenin (Hao et al., 2016), activates the intra-cardiac renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS), which in turn promotes LVH and cardiac fibrosis (Böckmann et al., 2019), and it is associated with endothelial dysfunction in CKD patients (Yilmaz et al., 2010), and in human coronary artery endothelial cells *in vitro* (Richter et al., 2016).

FGF23 expression is not limited to the bone since its synthesis has been also found in the heart in cardiac myocytes (Fon Tacer et al., 2010; Andrukhova et al., 2015; Hao et al., 2016; Leifheit-Nestler et al., 2016; Kuga et al., 2020) and in human coronary arteries in patients with impaired kidney function (Van Venrooij et al., 2014). However, its expression in non-myocytes is still controversially discussed (Schumacher et al., 2019). Likewise, the impact of cardiac-derived FGF23 and its possible paracrine actions in the heart in comparison to endocrine-acting FGF23 secreted from bone in health and disease are largely elusive (Leifheit-Nestler et al., 2018).

Here, we show that Fgf23 is expressed in the left as well as the right ventricle and in the respective atria in healthy wild-type mice. In addition to cardiac myocytes, cardiac fibroblasts and endothelial cells synthesize Fgf23 too. To more finely examine the function of cardiac-derived Fgf23, we generated conditional Fgf23 knockout mice by cross-breeding mice with LoxP-flanked (floxed) *Fgf23* alleles with mice harboring a cardiac myocyte-specific recombination. Cardiac myocyte-specific *Fgf23* knockout mice showed normal cardiac phenotype under basic conditions, but exhibited a slightly worse cardiac function after transverse aortic constriction (TAC) in comparison to TAC-operated controls that however, was not translated to any worse cellular hypertrophy, fibrosis or chamber remodeling. Interestingly, cardiac myocyte-specific *Fgf23* knockout mice showed elevated *Fgf23* expression in total cardiac tissue after TAC, raising the question whether cardiac fibroblasts and endothelial cells might be an important source of FGF23 in pathological conditions.

MATERIALS AND METHODS

Generation of Conditional Cardiac Myocyte-specific *Fgf23* Knockout Mice

Animal experiments were approved by the State Office Committee for Animal Welfare Lower Saxony (LAVES, #15/1912) in accordance with national animal protection guidelines from Directive 2016/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes. Mice were housed with a 12:12 h light-dark cycle, had free access to water and fed *ad libitum* with standard rodent chow. The Myh7-Cre mouse line expressing Cre recombinase linked to a Myh7 promoter (B6;129S1-Tg(Myh7-Cre)1Jmk) was kindly provided by Prof. Joerg Heineke (Department of Cardiovascular Physiology, European Center for Angioscience (ECAS), Medical Faculty Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany) and described elsewhere (Heineke et al., 2007). Fgf23 floxed mice were generated based on CRISPR/Cas9 technology by InGenious Targeting, Inc. (Ronkonkoma, NY, United States). To obtain mice with cardiac myocyte-specific *Fgf23* deletion, homozygous *Fgf23^{fl/fl}* mice (B6-Fgf23^{tm1Mln}) were interbred with B6;129S1-Tg(Myh7-Cre)1^{Jmk}. *Fgf23^{fl/fl}/cre*-littermates were used as controls.

For genotyping, earmarks were lysed in proteinase K buffer overnight. After deactivation of proteinase K, multiplex PCR was performed to amplify genomic DNA using primer for *Fgf23* floxed allele (forward: AGA TTC CAT TTA CAG TGC CCC TTG G; reverse: ACT TCA GTT ACC TGA AGT CCC AGT TGG) and Myh7-Cre (forward: GGC GTT TTC TGA GCA TAC CT; reverse: CTA CAC CAG AGA CGG AAA TCC). PCR was run for 3 min at 94°C and 31 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 58°C, and 1 min at 72°C, followed by 10 min at 72°C. Samples were separate on a 3% agarose gel including GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotrend) at 120 V for 60 min and analyzed with a Gel DocTMXR+ (Bio-Rad Laboratories).

Respective male and female *Fgf23^{fl/fl}/cre⁻* and *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice with the age of 0 (neonatal), 1, 3 and 6 months were

analyzed. Femur, tibia, and calvaria were isolated and snap-frozen in liquid nitrogen. Isolated mouse hearts were washed in ice-cold PBS followed by 0.5% potassium chloride and cut into three cross-sections. For histological evaluation, the mid cross-section was fixed in 4% RotiHistofix (Carl Roth) and embedded in paraffin. The other two cross-sections were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for molecular and biochemical analyses.

Transthoracic Echocardiography and Cardiac Catheterization

Echocardiography was performed using the Vevo 2100 Imaging System (FUJIFILM VisualSonics Inc.) as described previously (Zacchigna et al., 2021). Anesthesia was induced with 3% isoflurane and maintained with 0.5–1% isoflurane over a breathing mask. Heart views were acquired in parasternal long axis in B- and M-mode, and short axis in M-mode. All echocardiographic images were analyzed using the Vevo Lab 3.2.0 software.

Cardiac catheterization was performed with PowerLab 16/35 (Millar Instruments). Anesthesia was initialized with 3% isoflurane and maintained with 0.8% isoflurane. The measurements were performed on the opened thorax using the polyamide catheter PVR 1045 (Millar Instruments) and analyzed with the software LabChart 8 (AD Instruments).

Transverse Aortic Constriction

Transverse aortic constriction (TAC) or sham surgery was performed in eight-week-old male and female $\text{Fgf23}^{\text{fl/fl}}/\text{cre}^{-}$ and $\text{Fgf23}^{\text{fl/fl}}/\text{cre}^{+}$ mice by subjecting the aorta to a defined constriction as previously described (Grund et al., 2019a). In brief, a 7–0 silk suture was tied around the aortic arch between the branches of the brachiocephalic trunk and the left common carotid artery and a blunted 27-gauge needle, after which the needle was removed to create a defined constriction. The procedure for sham-operated animals was identical, but the aorta was not ligated. Two weeks after surgery, mice were sacrificed as described above.

Cardiac specific cell types were isolated from mice after sham and TAC as previously described (Appari et al., 2017). In brief, ventricular cardiac myocytes were isolated using a Langendorff system, cardiac endothelial cells and fibroblasts were isolated using MACS technology with CD146 microbeads followed by feeder removal microbeads (Miltenyi Biotec). All isolated cell types were directly used for RNA extraction according to standard protocol followed by deep-sequencing analysis as previously described (Grund et al., 2019b).

Cardiac Magnetic Resonance Imaging

Cardiac magnetic resonance imaging (MRI) was performed for TAC or sham-operated $\text{Fgf23}^{\text{fl/fl}}/\text{cre}^{-}$ and $\text{Fgf23}^{\text{fl/fl}}/\text{cre}^{+}$ mice. Cardiac MRI images were recorded with a Bruker 7T Pharmascan 70/16 (Bruker). Anesthesia was induced with 3% isoflurane and maintained with 0.5% isoflurane. First, a positioning scan was performed, followed by images in 9–10 stacks. For every stack, images were made to encompass an entire

heart cycle. All cardiac MRI images were analyzed with Mass4Mice 7.1 software (MEDIS Medical Technologies). Epicardium and endocardium were marked manually to ascertain left ventricular (LV) mass, end-systolic (ES) and end-diastolic (ED) volume, stroke volume (SV), cardiac output, and ejection fraction (EF). In addition, LV wall geometry was determined at the level of papillary muscles. With regard to slice thickness, papillary muscles were included in the LV cavity.

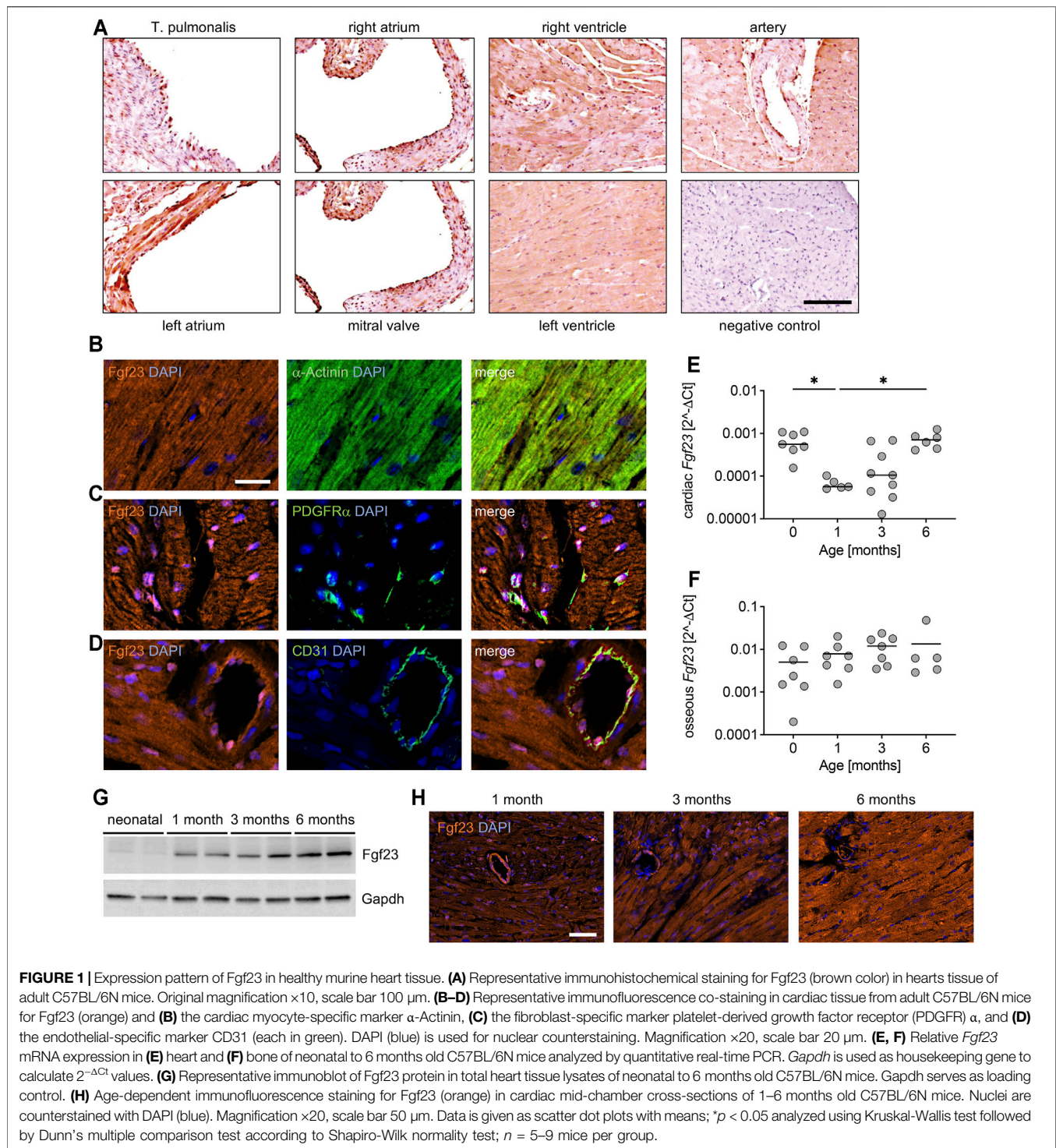
Blood and Urine Biochemistry

Plasma was analyzed for total FGF23 (#60-6300) and intact FGF23 (#60-6800) by ELISA (both from Immotopics). Urine and serum biochemistry were measured on a cobas c111 system (Roche Diagnostics) using Calcium Gen.2, Phosphate ver.2 and creatinine Creatinine Jaffé Gen.2 (all from Roche Diagnostics). No urine was available for one month old $\text{Fgf23}^{\text{fl/fl}}/\text{cre}^{+}$ and $\text{Fgf23}^{\text{fl/fl}}/\text{cre}^{-}$ mice.

Histological Staining of Heart Tissue and Quantification of Cardiac Myocyte Size, Capillarization and LV Fibrosis

Three μm thick cardiac mid-chamber sections were deparaffinized in xylene and hydrated using a descending alcohol series. Hematoxylin and eosin (HE) staining was performed using Meyers hematoxylin and eosin G (Merck Millipore). To visualize interstitial cardiac fibrosis, sections were incubated using picosirius red solution (Merck Millipore) in 1.2% picric acid. For immunohistochemical staining of FGF23 in heart tissue, antigen retrieval was done in citrate buffer pH 6.0, followed by inhibition of endogenous peroxidase activity by hydrogen peroxidase and blocking with 10% normal goat serum in PBS. After incubation with anti-FGF23 primary antibody (Bioss #bs-5768R, dilution 1:200), sections were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch #111-035-144, dilution 1:100), followed by incubation with diaminobenzidine substrate (Thermo Scientific #34065) and counterstaining with hematoxylin. Images were taken with either 10x (HE) or 20x objective using the Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss). To quantify interstitial cardiac fibrosis, five pictures per mouse of the left ventricle were taken using 20x magnification followed by quantification using ImageJ (Böckmann et al., 2019).

For visualization of cell type-specific expression of FGF23, cardiac tissue was stained for anti-CD31 (R&D systems #AF3628; dilution 1:100 in 5% milk in TBST), followed by donkey-anti-goat Alexa Fluor 480 secondary antibody (Invitrogen #A11055, dilution 1:500), anti- α -Actinin (Sigma-Aldrich #A7732, dilution 1:100), followed by goat-anti-mouse Alexa Fluor 660 secondary antibody (Invitrogen #A21054, dilution 1:500), or anti-PDGFR α (R&D Systems #AF1062, dilution 1:100), followed by donkey-anti-goat Alexa Fluor 480 secondary antibody. Afterwards, tissues were stained with anti-FGF23 (Bioss #bs-5768R, dilution 1:200), followed by goat-anti-rabbit Alexa Fluor 555 secondary antibody (Invitrogen #A21428, dilution 1:500). All primary



antibodies were incubated over night at 4°C, and secondary antibodies were incubated for 90 min at room temperature. For measurement of capillarization and cardiac myocyte size, the staining with CD31 was followed by incubation with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wheat germ agglutinin (WGA)Alexa Fluor 555 (Invitrogen #W32464) for one hour. Nuclear counterstaining in immunofluorescence was performed with DAPI. All images

were taken with a 20x objective on a Zeiss Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss) and quantification of cardiac myocyte area was performed with 100 cells per animal using the Zen 2.3 lite software (Carl Zeiss). For quantification of capillarization, five images in 20x magnification per animal were taken and number of capillaries were divided by number of cardiac myocytes per power field.

RNA Isolation, cDNA Synthesis and Quantitative Real-Time PCR Analysis

The RNeasy Mini Kit was used according to manufacturer's protocol for total RNA isolation from murine heart and cardiac specific cell types. For murine bone (either calvaria or femur), the RNeasy Lipid Tissue Kit was used. 500 ng RNA was transcribed into cDNA according to the data sheet of the QuantiTect Reverse Transcription Kit. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed in triplets using the QuantiFAST SYBR Green PCR Kit (all kits from Qiagen) on a 7900 HT Fast RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific) and analyzed using the SDS Software v2.4 (Thermo Fisher Scientific). For murine primer sequences see **Supplementary Table S1**. Relative gene expression levels of *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice compared to control were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with *Gapdh* and *18s* (in bone) serving as housekeeping genes. For *Fgf23* mRNA quantification in **Figures 1, 4**, $2^{-\Delta Ct}$ values were used.

Protein Isolation and Western Blot Analysis

Protein isolation of murine heart tissue was performed with the TissueLyser LT (Qiagen) using RIPA buffer with proteinase and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich). Samples were incubated at 4°C for 30 min followed by sonification. Protein concentrations were measured *via* BCA assay (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's protocol.

100 µg total protein was separated on a 12% SDS-gel and transferred on nitrocellulose membrane in transfer buffer containing 18% methanol for 1 h. Membranes were blocked in 5% milk in TBS containing 0.05% Tween-20 for 1 h, afterwards primary antibodies were incubated over-night at 4°C (FGF23-6310 Goat mAb, dilution 1:500, Immotopics; GAPDH 14C10 Rabbit mAb, dilution 1:1,000, Cell Signaling Technology). After washing, secondary antibodies were incubated for 1 h at room temperature (Goat anti-rabbit IgG HRP, dilution 1:1,000, Santa Cruz; Donkey anti-goat IgG HRP, dilution 1:2000, R and D Systems). ECL development was done with the SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) and signals were detected with the Odyssey FC Imaging System (LI-COR Bioscience). Expression levels were quantified with the Image Studio Lite 5.2 software (LI-COR Bioscience).

Statistical Analyses

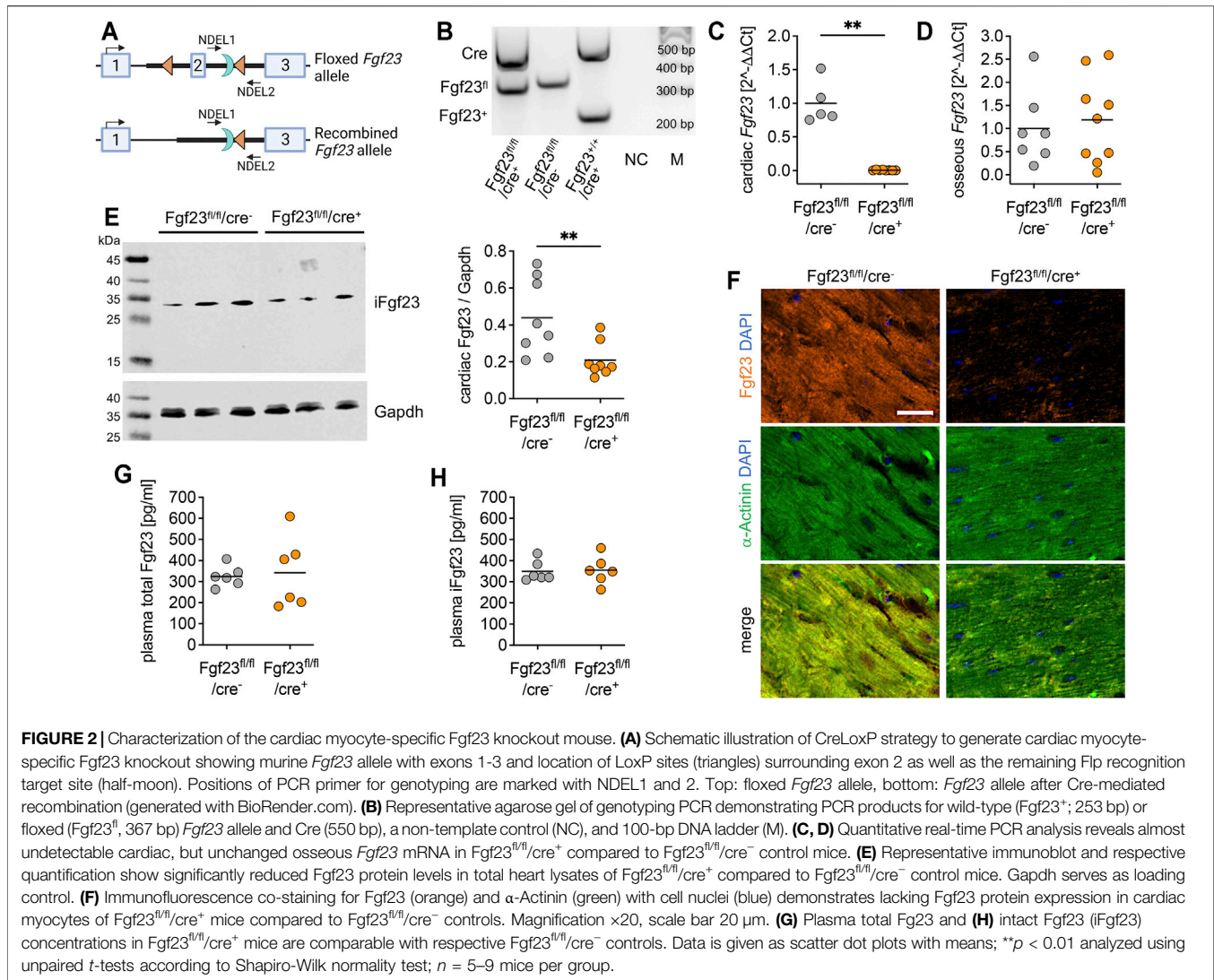
All statistical analyses were performed using GraphPad Prism software 7 (GraphPad Software) Gaussian's distribution was analyzed by Shapiro-Wilk test. Differences between two groups were determined using 2-tailed Students *t*-test or Mann Whitney *U* test, respectively. For time-dependent analyses, one-way ANOVA or Kruskal-Wallis test followed by Dunnett or Dunn's multiple comparison tests were used. TAC-experiments were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. *p* values < 0.05 were considered as statistically significant.

RESULTS

The Healthy Murine Heart Is a Source of Fgf23

Most clinical and experimental studies over the past decade focused on FGF23 in the context of LV pathologies (Faul et al., 2011; Grabner et al., 2015; Matsui et al., 2018). It has not been investigated so far in which areas of the whole heart *Fgf23* is locally expressed. Therefore, we first performed immunohistochemical staining for *Fgf23* using longitudinal sections of healthy adult C57BL/6N wild-type mice. The expression of *Fgf23* was comparable between the left and the right ventricle (**Figure 1A**). In direct comparison, the synthesis of *Fgf23* was higher in the left atrium than in the right atrium (**Figure 1A**). *Fgf23* was clearly expressed in all regions of endocardium and endothelium (**Figure 1A**), while it appeared to be only minimal in the *tunica media* of the depicted vessels, which is predominantly composed of vascular smooth muscle cells (**Figure 1A**). To further elucidate the expression pattern of murine *Fgf23* within specific cardiac cell types, we performed co-immunofluorescence staining of *Fgf23* with cell type specific markers for cardiac myocytes, fibroblasts and endothelial cells in formalin-fixed paraffin-embedded cardiac cross-sections of adult C57BL/6N wild-type mice. *Fgf23* was co-localized with the cardiac myocyte-specific marker α -Actinin, verifying, that healthy cardiac myocytes express *Fgf23* (**Figure 1B**). *Fgf23* was further expressed in platelet-derived growth factor receptor A (PDGFR α) positive cardiac fibroblast (**Figure 1C**) and co-localized with CD31, known as platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), suggesting the expression of *Fgf23* in endothelial cells of the murine heart, too (**Figure 1D**).

Studies in humans showed that circulating total FGF23 is highest in infants and adolescents and lowest at adult age (Fischer et al., 2012), but the age-dependent synthesis of FGF23 in the heart and bone has not been studied so far. Therefore, we next investigated the *Fgf23* expression in heart and bone tissue of C57BL/6N mice from neonatal (0) to 6 months of age. Although the individual variability of mice was high, cardiac *Fgf23* mRNA levels were significantly lower in 1 month old mice compared to neonates and increased again with increasing age (**Figure 1E**), whereas no age-related changes in bone *Fgf23* mRNA expression were noted (**Figure 1F**). Of note, osseous expression of *Fgf23* was approximately 20-fold higher than in the heart. Immunoblot analysis of total cardiac tissue confirmed an age-dependent increase of *Fgf23* protein synthesis (**Figure 1G**), which was verified by immunofluorescence staining of *Fgf23* in cardiac mid-chamber cross-sections (**Figure 1H**). It appears that the increasing total amount of cardiac *Fgf23* originates mainly from cardiac myocytes and that expression in endothelial cells and fibroblasts remains approximately the same with increasing age.

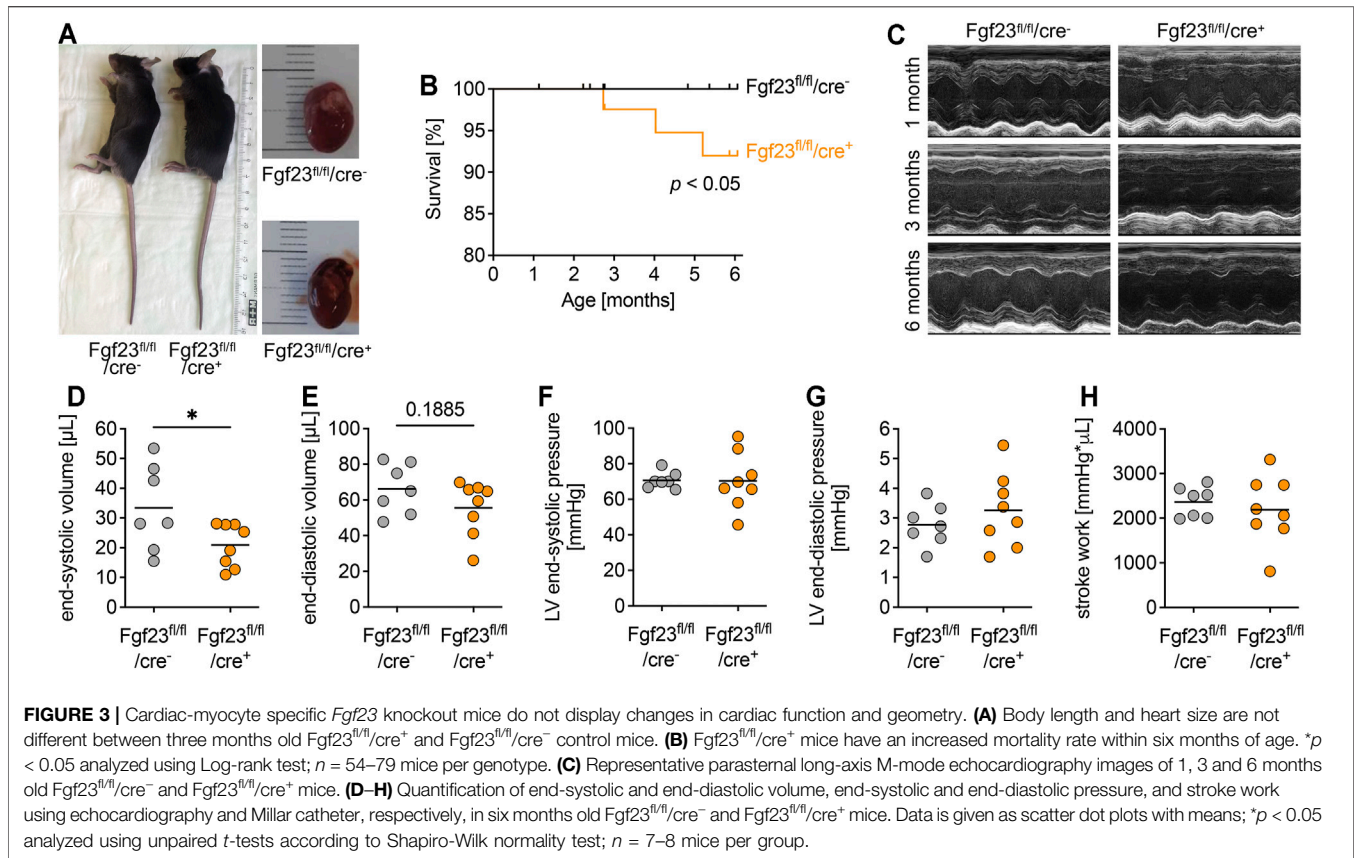


Taken together, *Fgf23* is not only expressed in cardiac myocytes, but also in cardiac fibroblasts and endothelial cells, suggesting that the heart is a source of *Fgf23*.

Mice With Cardiac Myocyte-specific *Fgf23* Deletion Reveal Normal Circulating *Fgf23* Levels

The physiological role of bone-derived endocrine-acting FGF23 in renal phosphate homeostasis is well-established (Shimada et al., 2004), whereas the role of intra-cardiac FGF23 synthesis has been poorly studied. To investigate cardiac-derived FGF23 in more detail, we generated a cardiac myocyte-specific *Fgf23* knockout mouse using Cre-LoxP system (Figure 2A). The first LoxP site was inserted 222 bp upstream of exon 2 and the Neo cassette, containing the second LoxP site, was inserted 342 bp downstream of exon 2. The size of the target region was 668 bp containing exon 2. The respective *Fgf23*-LoxP construct was delivered to iTL BF1 (C57BL/6 FLP) embryonic stem cells,

which were microinjected into Balb/c blastocysts using standard protocols. Resulting chimeras with high percentage black fur color were mated to C57BL/6 wild-type mice to generate germline floxed *Fgf23* mice. After intercrossing *Fgf23*^{fl/+} mice, homozygous non-recombined *Fgf23*-LoxP mice (*Fgf23*^{fl/fl}) were mated with transgenic cardiac myocyte-specific B6;129S1-Tg(Myh7-Cre)^{1Jmk} mice by standard breeding regimen. As published elsewhere, in B6;129S1-Tg(Myh7-Cre)^{1Jmk} mice, the Cre enzyme has a significant activity at embryonic day 17.5 (Oka et al., 2006). Finally, female *Fgf23*^{fl/fl}/*Myh7-cre*⁻ mice were bred with males fully recombined for *Fgf23* (*Fgf23*^{fl/fl}/*Myh7-cre*⁺). To verify genotypes, PCR products were amplified from genomic DNA using primer pairs spanning the floxed exon 2 region of murine *Fgf23* and Cre recombinase in a semi-quantitative multiplex PCR (see Methods). Thereby a 253 bp product represented the wild-type *Fgf23* allele, a 367 bp product the floxed *Fgf23* allele, and a 550 bp product the Cre expression (Figure 2B). Male and female *Fgf23*^{fl/fl}/*Myh7-cre*⁺ mice (in the following termed as *Fgf23*^{fl/fl}/*cre*⁺) were analyzed in all



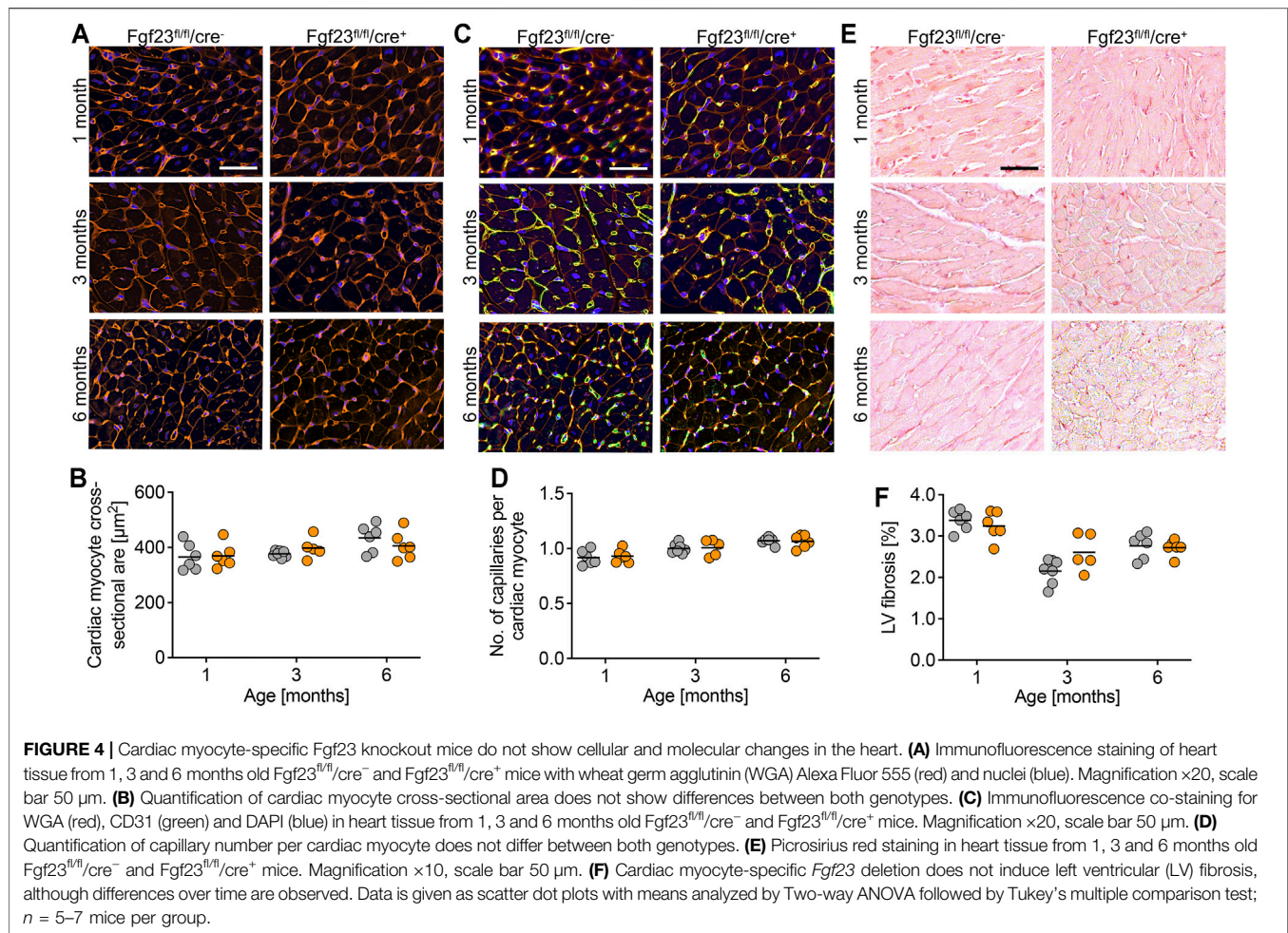
experiments and respective non-recombined *Fgf23^{fl/fl}/Myh7-cre⁻* littermates (in the following termed as *Fgf23^{fl/fl}/cre⁻*) were used as controls. First, we verified the cardiac myocyte-specific *Fgf23* knockout. Thereby, *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice showed significantly reduced cardiac *Fgf23* mRNA expression compared to controls (**Figure 2C**), while their osseous *Fgf23* synthesis remained unaffected (**Figure 2D**). Western blot analysis showed significantly reduced full-length cardiac *Fgf23* protein in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* compared to control mice (**Figure 2E**). Using anti- α -Actinin antibody, immunofluorescence microscopy confirmed the cardiac myocytes-specific *Fgf23* knockout (**Figure 2F**). However, circulating total and intact *Fgf23* (i*Fgf23*) levels in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice were comparable to controls (**Figures 2G,H**), and phosphate and calcium metabolism remained unchanged up to six months of age (**Supplementary Table S2**).

Cardiac Myocyte-specific *Fgf23* Deletion Does Not Affect Cardiac Function or Structure in Unchallenged Mice

Mice with cardiac myocyte specific *Fgf23* deletion showed normal body length and heart size compared to age-matched controls (**Figure 3A**). The body weight related organ weights including heart, lung, kidney and liver increased with age, but did not differ between both genotypes (**Supplementary Table S3**). However, the mortality of *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice during the first 6 months of

life was slightly but significantly increased compared to controls (**Figure 3B**). Next, we performed echocardiography and Millar catheter to determine whether cardiac function was affected in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice, which in turn may promote their increased mortality. In echocardiography, no differences between *Fgf23^{fl/fl}/cre⁻* and *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice were observed, irrespective of age (**Figure 3C**, **Supplementary Table S4**), except for a significantly reduced end-systolic volume (ESV) and slightly lower end-diastolic volume (EDV) in six months old *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice compared to control (**Figures 3D,E**). Using Millar catheter, no differences were found in end-systolic or end-diastolic LV pressure or stroke work (**Figures 3F,G**). Overall, these data indicate no pathologic cardiac phenotype in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice.

Next, we performed histological analyses to determine alterations in the cardiac structure of *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* and control mice. Quantified by wheat germ agglutinin (WGA) staining and fluorescence microscopy, cardiac myocyte cross-sectional area did not differ between the genotypes (**Figures 4A,B**). This was in line with the equal expression of the pro-hypertrophic markers atrial natriuretic peptide (*ANP*), brain natriuretic peptide (*BNP*) and beta myosin heavy chain (*bmHC*) in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice compared to controls, irrespective of age (**Supplementary Figures S1A–C**). Neither the capillary density (**Figures 4C,D**) nor the accumulation of interstitial collagen fibers (**Figures 4E,F**) were affected by the conditional cell-specific disruption of *Fgf23* in cardiac myocytes over time. The mRNA expression of the profibrotic marker transforming growth factor beta 1 (*Tgfb1*) and its

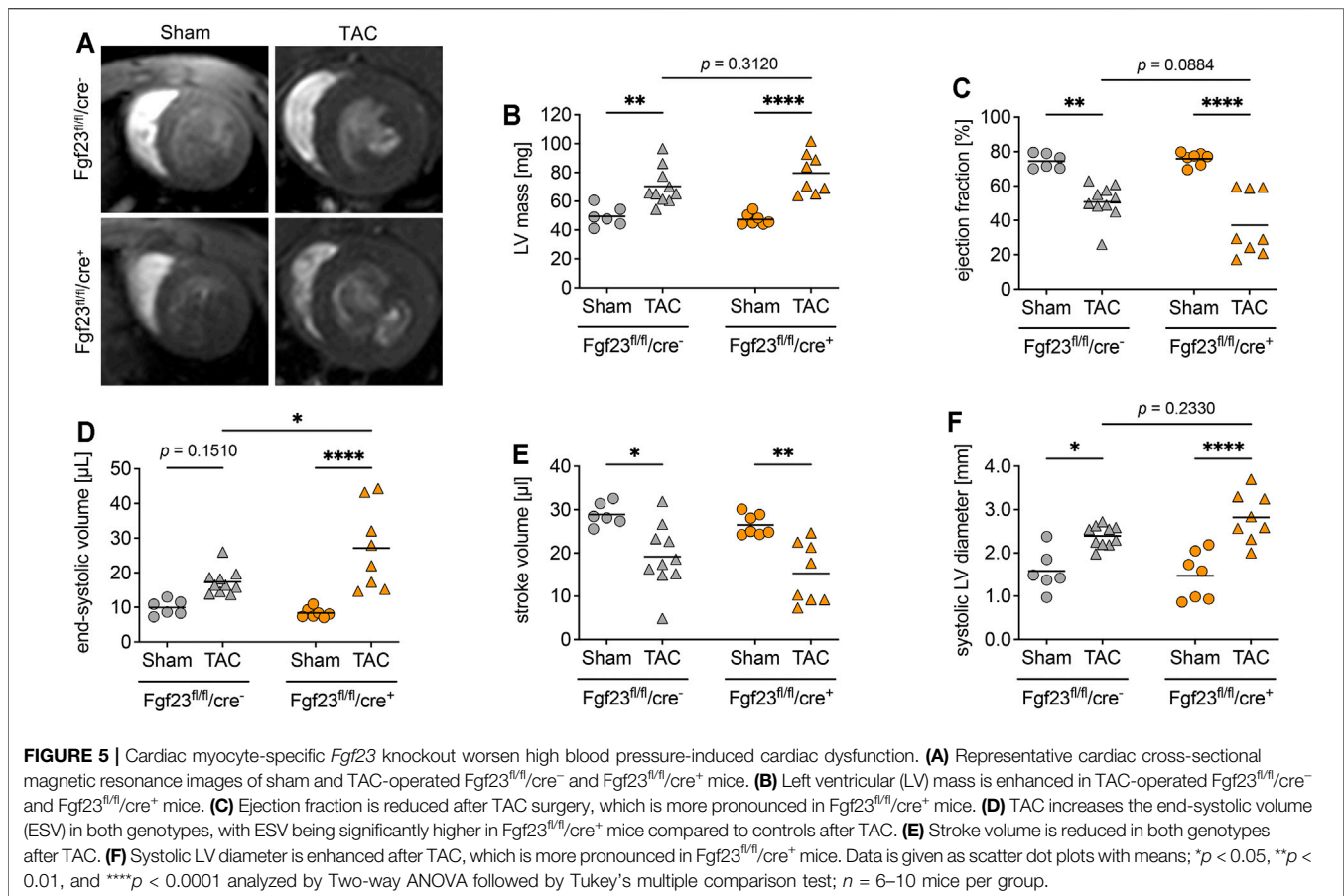


downstream target connective tissue growth factor (*Ctgf*) was equal between both groups (**Supplementary Figures S1D,E**). Consistently, collagen type 1, alpha 1, recently identified as a marker in human heart failure progression related to tissue fibrosis (Hua et al., 2020) and encoded by the gene *Colla1*, was not differentially expressed in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice compared to age-matched controls (**Supplementary Figure S1F**). Thus, in line with normal heart function in echocardiography and Millar catheter, conditional deletion of *Fgf23* in cardiac myocytes does not alter cardiac structure.

Loss of Cardiac Myocyte-specific *Fgf23* Does Not Alter Impaired Cardiac Function After Transverse Aortic Constriction

Enhanced circulating and cardiac FGF23 levels are shown to be associated with LVH in CKD (Faul et al., 2011; Leifheit-Nestler et al., 2016). Furthermore, high plasma FGF23 is present in patients with infarction-related cardiogenic shock and acute decompensated heart failure, which is associated with disease severity and mortality (Pöss et al., 2013; Fuernau et al., 2014; Andersen et al., 2016). It was previously shown that TAC, a

model for high blood pressure-induced cardiac hypertrophy and heart failure, induces the expression of cardiac *Fgf23* in mice (Slavic et al., 2017). Thus, we next investigated whether the deletion of cardiac myocyte-specific *Fgf23* is protective against pathological cardiac remodeling after aortic banding. Two weeks after TAC, cardiac function and geometry were determined by magnetic resonance imaging (MRI) (**Figure 5A**). TAC significantly enhanced LV mass and impaired ejection fraction (EF) in both genotypes (**Figures 5B,C**). It increased ESV, decreased stroke volume (SV) and enlarged systolic LV diameter in both groups (**Figures 5D-F**). Compared to respective TAC *Fgf23^{fl/fl}/cre⁻* controls, heart function seemed to be even more impaired in TAC-operated *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice. However, H&E-stained cardiac mid chamber cross-sections revealed increased LV wall thickness after TAC in both groups (**Figure 6A**). Concomitantly, similar increases in cardiac myocyte size and pro-hypertrophic *BNP* mRNA expression were seen in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice and controls after TAC (**Figures 6B-D**). The mean percentage of LV fibrosis after TAC was similar in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* and *Fgf23^{fl/fl}/cre⁻* mice (**Figures 6E,F**). Taken together, our findings suggest that specific disruption of *Fgf23* in cardiac myocytes does not



essentially alter cardiac dysfunction in the TAC mouse model, with the exception of a modest alteration in ESV that however, does not translate to any changes in hypertrophy, fibrosis or chamber remodeling.

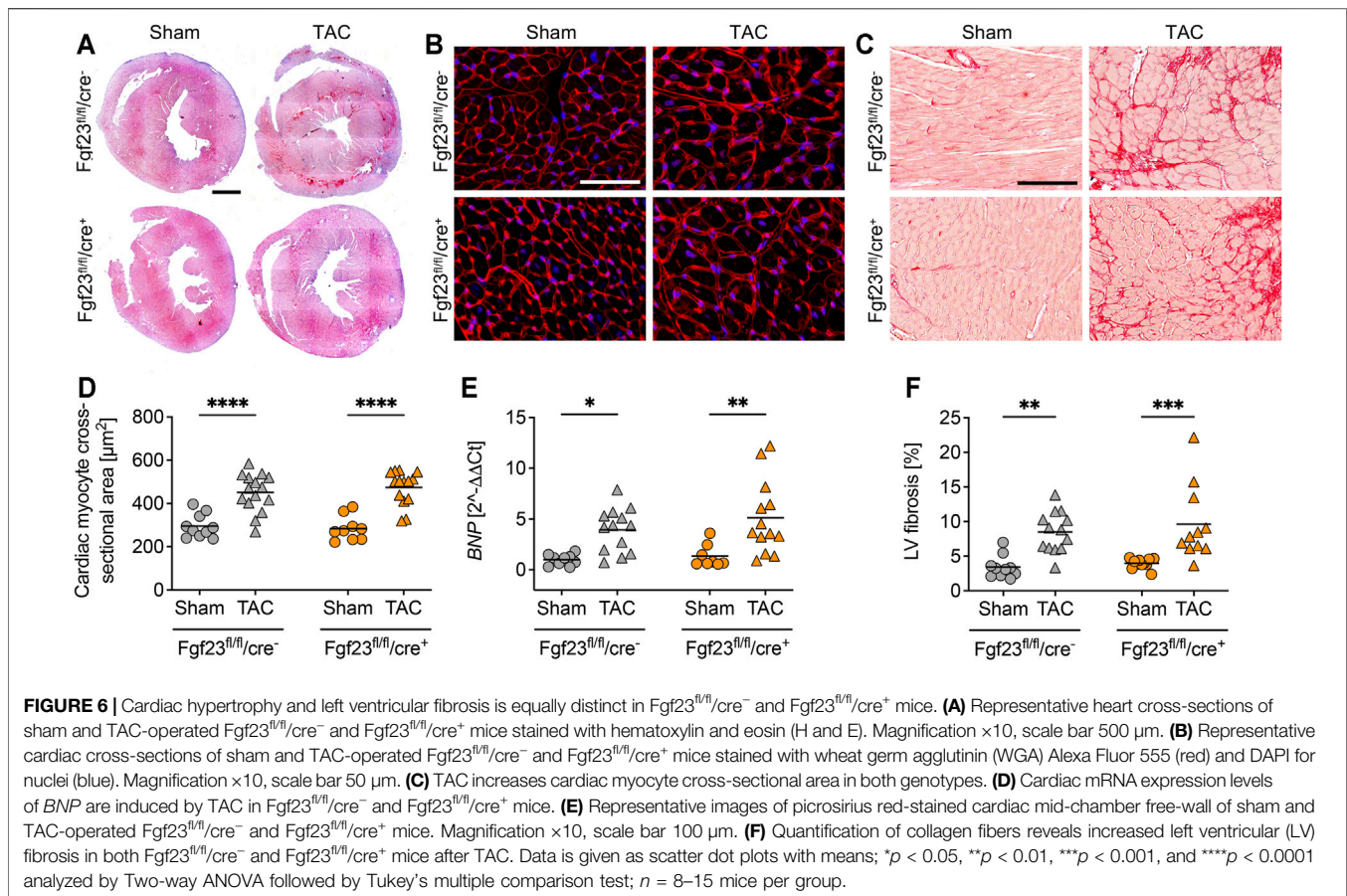
Transverse Aortic Constriction Induces the Expression of *Fgf23* in Cardiac Fibroblasts and Endothelial Cells

Next, we assessed the TAC-induced changes in *Fgf23* synthesis. As shown by qPCR analysis, TAC stimulated the expression of *Fgf23* in bone of both *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice and *Fgf23^{fl/fl}/cre⁻* mice, although the latter did not reach the level of statistical significance in Two-way ANOVA comparisons (**Figure 7A**). TAC further resulted in increased *Fgf23* mRNA levels in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁻* mice using total cardiac tissue (**Figure 7B**). Interestingly, cardiac *Fgf23* was also slightly increased after TAC in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice compared to sham, although *Fgf23* mRNA levels were significantly lower than in TAC-operated controls. To elucidate the origin of TAC-induced cardiac *Fgf23*, we next performed co-immunofluorescence staining of *Fgf23* with α -Actinin, PDGFR α , and CD31. TAC did not affect the synthesis of *Fgf23* in cardiac myocytes (**Figure 7C**), while PDGFR α co-staining revealed enhanced accumulation of cardiac fibroblasts clearly expressing *Fgf23* in both genotypes

(**Figure 7D**), which was in line with severe fibrosis due to TAC as detected by picrosirius red staining (**Figures 6E,F**). Interestingly, TAC caused an enhanced *Fgf23* synthesis in endothelial cells in both genotypes, as shown by increased *Fgf23* detection in CD31-positive blood vessels (**Figure 7E**). The isolation of cardiac myocytes, cardiac fibroblasts and endothelial cells confirmed a specific induction of *Fgf23* transcription in cardiac fibroblasts and endothelial cells after TAC compared to sham, while the absolute *Fgf23* levels in cardiac myocytes remained unchanged (**Figure 7F**). Taken together, irrespective of the disruption of cardiac myocyte-specific *Fgf23*, TAC leads to increased cardiac *Fgf23* levels that most likely results from a specific induction of *Fgf23* synthesis in cardiac fibroblasts and endothelial cells.

DISCUSSION

Enhanced FGF23 levels are associated with the development of LVH in patients with CKD (Kovesdy and Quarles, 2016) and it has been shown that FGF23 directly induces cardiac hypertrophy *in vitro* and *in vivo* (Faul et al., 2011). Here we showed that the healthy heart is a source of *Fgf23*, where cardiac myocytes, fibroblasts and endothelial cells express *Fgf23*. Although, a cardiac myocyte-specific *Fgf23* knockout in mice did neither resulted in altered mineral metabolism, nor in cardiac

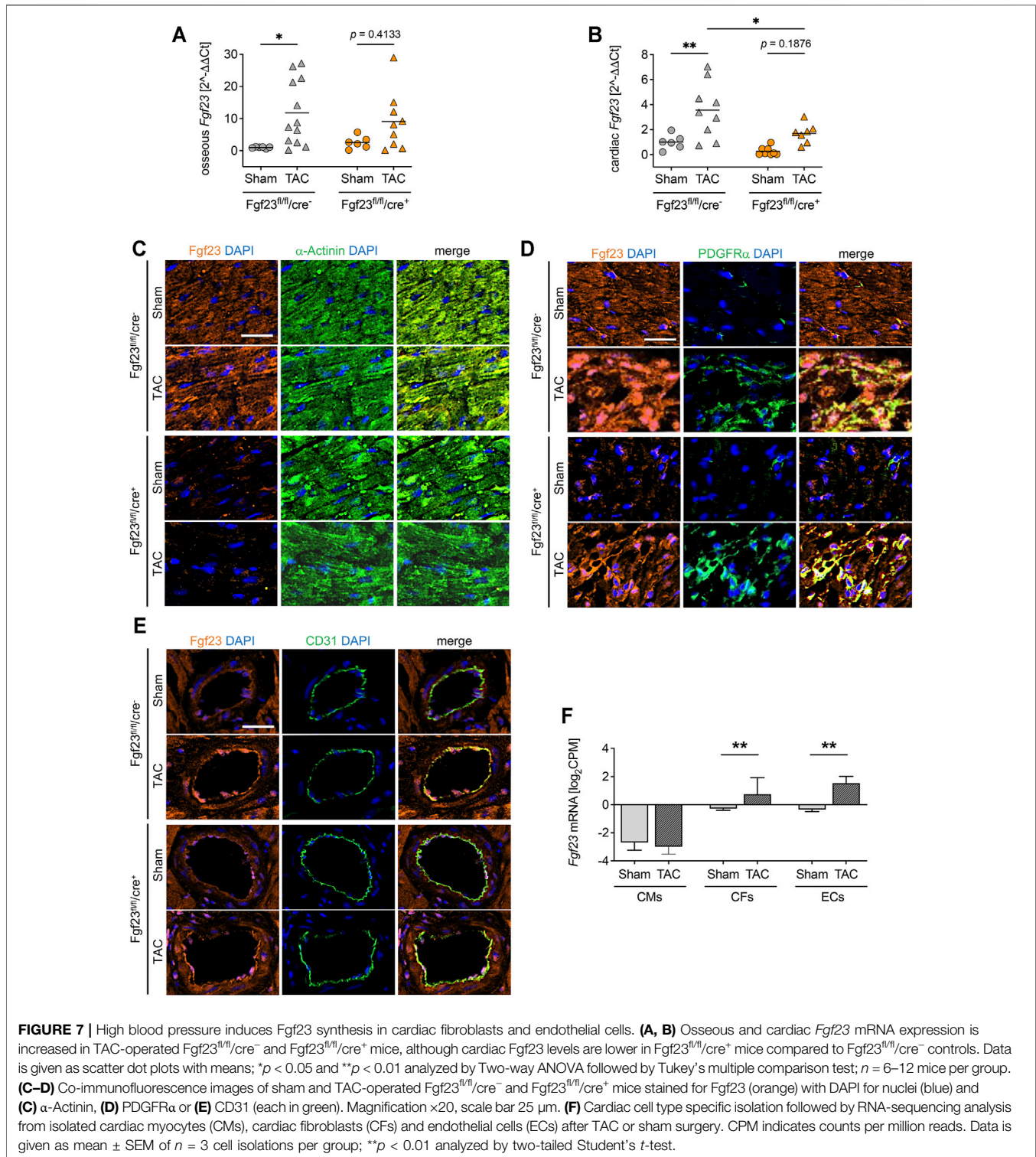


dysfunction or cellular pathologies, overall mortality was enhanced in $Fgf23^{fl/fl}/cre^{+}$ mice within six months of age. After TAC, cardiac function deteriorated in $Fgf23^{fl/fl}/cre^{+}$ and $Fgf23^{fl/fl}/cre^{-}$ mice compared to sham controls and the evaluation of cardiac *Fgf23* synthesis revealed elevated expression in cardiac fibroblasts and endothelial cells after TAC even in $Fgf23^{fl/fl}/cre^{+}$ mice. Interestingly, cardiac myocyte-derived *Fgf23* was unaffected by TAC.

High intra-cardiac synthesis of FGF23 has been shown in patients with CKD and LVH (Leifheit-Nestler et al., 2016) as well as in animal models of experimental uremia (Leifheit-Nestler et al., 2017), myocardial infarction (Andrukhova et al., 2015; Schumacher et al., 2019) and after pulmonary artery banding (Kuga et al., 2020). It is well established that FGF23 induces LVH (Faul et al., 2011), and we and others have shown that cardiac myocytes express FGF23 *in vitro* and in human heart samples (Richter et al., 2015; Leifheit-Nestler et al., 2016; Leifheit-Nestler and Haffner, 2018). Indeed, most investigations regarding cardiac FGF23 focused on the LV and associated disorders, but here we observed that also the right ventricle is a source of *Fgf23* in healthy mice. This was supported by a recently published study of Kuga et al. showing that *Fgf23* promoted cardiac fibrosis in the right ventricle, predominantly mediated by the induction in cardiac myocytes (Kuga et al., 2020). FGF23 was further shown to be expressed in human coronary arteries of patients with kidney function impairment (Van Venrooij et al., 2014)

underscoring our findings on the expression of *Fgf23* in healthy mouse endothelium in the present study. However, the regulation of endogenous FGF23 synthesis in cardiac endothelial cells has not been addressed so far. The expression of FGF23 in cardiac fibroblasts is controversial. Here, we showed a clear expression of *Fgf23* in cardiac fibroblasts of healthy mice, whereas Schumacher et al. found *Fgf23* to be expressed by cardiac fibroblasts only immediately after myocardial infarction (MI) during the inflammatory phase, but neither in later phases nor in health (Schumacher et al., 2019). Hao et al. were able to detect *Fgf23* expression in untreated adult mouse cardiac fibroblasts (AMCF) as well as in neonatal rat cardiac fibroblasts (NRCF) *in vitro* (Hao et al., 2016), whereas others could not detect *Fgf23* in NRCF (Leifheit-Nestler et al., 2018). However, *Fgf23* was also detected in kidney fibroblasts, especially myofibroblasts (Smith et al., 2017). Additionally, Smith et al. pointed out that *Fgf23* was induced in kidney fibroblasts after injury, which appears to be in line with the findings of Schumacher et al. regarding the induction of *Fgf23* in cardiac fibroblasts after MI (Schumacher et al., 2019) and our finding of increased *Fgf23* expression in cardiac fibroblasts after TAC.

Whether different diseases stimulate cardiac FGF23 synthesis or *vice versa* high cardiac FGF23 promotes these cardiac pathologies is still not clear and the specific cellular source of cardiac FGF23 in these settings has not been sufficiently investigated. Genetically modified animal models are



important to study and understand the function of specific genes in health and disease. Hereby, mouse models with deletion or overexpression of *Fgf23* were critical for understanding the role of *Fgf23* in the bone-kidney signaling axis (Shimada et al., 2004a and

Shimada et al., 2004b). At birth, transgenic *Fgf23* overexpressing mice and global *Fgf23* knockout mice are phenotypically not different from wild-type mice, but develop growth retardation due to skeletal malformations at weaning age or by 13 days of age,

respectively. Although both genotypes are viable, global *Fgf23* knockout mice did not survive longer than 13 weeks of age (Shimada et al., 2004b). Therefore, we generated a mouse model with conditional cardiac myocyte-specific *Fgf23* knockout to investigate the role of cardiac FGF23 in health and disease. We confirmed that the cardiac mRNA expression of *Fgf23* in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* was almost undetectable and histological evaluation revealed no synthesis in cardiac myocytes. *Fgf23* protein levels in whole heart tissue lysates were reduced compared to controls but still present. This could be due to unchanged *Fgf23* concentrations in cardiac fibroblasts and endothelial cells. Compared to the global *Fgf23* knockout mouse, *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice were also viable but did not show any growth retardation at birth or in later stages of life, which can be attributed to the normal bone and mineral metabolism. Heart geometry and function was not altered in mice with conditional cardiac myocyte-specific *Fgf23* disruption up to six months of age. Comparably, *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice showed no structural or molecular cardiac abnormalities.

Clinical studies regarding the association of high FGF23 and hypertension are controversial (Li et al., 2018; Ramezanzade et al., 2019; Drew et al., 2020). Nevertheless, *in vivo* studies showed that *Fgf23* increased sodium uptake in the distal tubule resulting in volume expansion, hypertension and finally cardiac hypertrophy (Andrukhova et al., 2014). In addition, TAC-induced LVH in mice was associated with increased cardiac *Fgf23* in whole tissue samples (Slavic et al., 2017; Matsui et al., 2018). Slavic et al. performed TAC in a global *Fgf23* knockout mouse crossed with mice expressing a non-functioning vitamin D receptor (VDR) to prohibit vitamin D intoxication on a rescue diet to ensure normal growth, and showed no differences in the progression of cardiac hypertrophy compared to controls (Slavic et al., 2017). However, effects of non-functioning VDR or rescue diet cannot be excluded in this model and do not refute a possible causal relationship of cardiac FGF23 and pressure-induced LVH. Taken all these into account, it cannot be ruled out that loss of FGF23 in cardiac myocytes protects them from hypertrophic growth or at least reduces pro-hypertrophic signaling. To analyze whether cardiac FGF23 plays a role in pressure-induced LVH, we performed TAC on *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* and control mice. In contrast to Slavic et al., TAC even tended to worsen cardiac function in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺*, although this was not translated to any alterations in cellular hypertrophy, fibrosis or chamber remodeling. Analyzing cardiac *Fgf23* in more detail, our data observed increased *Fgf23* mRNA expression due to TAC even in total heart tissue of cardiac myocyte-specific *Fgf23* knockout mice. Immunofluorescence staining of cardiac mid-chamber cross-sections and deep-sequencing data of isolated adult cardiac myocytes, cardiac fibroblasts and endothelial cells revealed a specific induction of *Fgf23* synthesis in cardiac fibroblasts and endothelial cells after TAC, which explain enhanced *Fgf23* expression even in TAC-operated hearts of

Fgf23^{fl/fl}/cre⁺ mice. Taken all this into account, cardiac myocyte specific depletion of *Fgf23* might not have a great impact in heart performance and structure at both basal and after stressing conditions due to the expression in other cardiac cell types. Additionally, enhanced expression and secretion of cardiac fibroblast-derived *Fgf23* may stimulate myofibroblast differentiation and promote hypertrophic growth of cardiac myocytes in an endocrine manner even in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice after TAC. The deleterious effect of high *Fgf23* on the endothelium has also been discussed before (Six et al., 2014; Silswal N et al., 2014; Verkaik et al., 2018; Richter et al., 2016). Thus, *Fgf23* secreted from cardiac fibroblast may further affect endothelial cells in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* mice in a paracrine manner that are already under stress due to high pressure after TAC. Crosstalk between endothelial cells and cardiac myocytes is also known and intensively studied (Chen et al., 2010; Zhang et al., 2015; Kivelä et al., 2019). Here, we showed that *Fgf23* synthesis was induced in endothelial cells in *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺* and control mice after TAC compared to respective sham-operated animals, which could further strengthen cardiac myocytes hypertrophy irrespective of cardiac myocyte-derived *Fgf23*.

Taken together, we showed that besides the LV, FGF23 is also expressed in the right ventricle and thus, beside LVH, could play a role in other cardiac diseases. Our data further point out that FGF23 is not only expressed in cardiac myocytes but also in cardiac fibroblasts and endothelial cells and thereby may impact heart development, and physiological and pathological cardiac function. Additionally, we investigated for the first-time cell type-specific regulation of FGF23 in heart tissue due to high blood pressure showing increased synthesis in cardiac fibroblasts and endothelial cells. Exact molecular mechanisms and the crosstalk between cardiac myocytes and non-cardiac myocytes with respect to FGF23 and its impact for cardiac physiology and pathology have to be addressed in respective *in vivo* and *in vitro* settings in further studies.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/**Supplementary Material**. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

All experimental animal procedures were performed in accordance with national animal protection guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the governmental committee on animal welfare Lower Saxony (Niedersächsische Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit; #15/1912).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ML-N. and DH conceived and designed the study. FE, BR, SS, IV and AG performed experiments and analyzed data. MS performed TAC surgery. JH provided the Myh7-cre mice and discussed breeding strategies. JH, TT and DH supported funding and provided infrastructure. FE and BR drafted the manuscript. ML-N and DH critically revised the paper. All authors approved the final version of the manuscript.

FUNDING

This work was supported with internal funding.

REFERENCES

- Andersen, I. A., Huntley, B. K., Sandberg, S. S., Heublein, D. M., and Burnett, J. C. (2016). Elevation of Circulating but Not Myocardial FGF23 in Human Acute Decompensated Heart Failure. *Nephrol. Dial. Transpl.* 31, 767–772. doi:10.1093/ndt/gfv398
- Andrukhova, O., Slavic, S., Smorodchenko, A., Zeitz, U., Shalhoub, V., and Lanske, B. (2014). FGF23 Regulates Renal Sodium Handling and Blood Pressure. *EMBO Mol. Med.* 6, 744–759. doi:10.1002/emmm.201303716
- Andrukhova, O., Slavic, S., Odörfer, K. I., and Erben, R. G. (2015). Experimental Myocardial Infarction Upregulates Circulating Fibroblast Growth Factor-23. *J. Bone Miner. Res.* 30, 1831–1839. doi:10.1002/jbmr.2527
- Appari, M., Breitbart, A., Brandes, F., Szaroszyk, M., Froese, N., Korf-Klingebiel, M., et al. (2017). C1q-TNF-Related Protein-9 Promotes Cardiac Hypertrophy and Failure. *Circ. Res.* 120, 66–77. doi:10.1161/circresaha.116.309398
- Böckmann, I., Lischka, J., Richter, B., Deppe, J., Rahn, A., Fischer, D.-C., et al. (2019). FGF23-mediated Activation of Local RAAS Promotes Cardiac Hypertrophy and Fibrosis. *Ijms* 20, 4634. doi:10.3390/ijms20184634
- Chen, K., Bai, H., Arzigian, M., Gao, Y.-X., Bao, J., Wu, W.-S., et al. (2010). Endothelial Cells Regulate Cardiomyocyte Development from Embryonic Stem Cells. *J. Cel. Biochem.* 111, 29–39. doi:10.1002/jcb.22680
- De Borst, M. H., Vervloet, M. G., Ter Wee, P. M., and Navis, G. (2011). Cross Talk between the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Vitamin D-FGF-23-Klotho in Chronic Kidney Disease: Figure 1. *Jasn* 22, 1603–1609. doi:10.1681/asn.2010121251
- Drew, D. A., Katz, R., Kritchevsky, S., Ix, J. H., Shlipak, M. G., Newman, A. B., et al. (2020). Fibroblast Growth Factor 23 and Blood Pressure in Older Adults: The Health, Aging, and Body Composition Study. *Hypertension* 76, 236–243. doi:10.1161/hypertensionaha.120.14703
- Eckardt, K.-U., Coresh, J., Devuyst, O., Johnson, R. J., Köttgen, A., Levey, A. S., et al. (2013). Evolving Importance of Kidney Disease: From Subspecialty to Global Health burden. *The Lancet* 382, 158–169. doi:10.1016/s0140-6736(13)60439-0
- Faul, C., Amaral, A. P., Oskoueï, B., Hu, M.-C., Sloan, A., Isakova, T., et al. (2011). FGF23 Induces Left Ventricular Hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 121, 4393–4408. doi:10.1172/jci46122
- Fischer, D.-C., Mischek, A., Wolf, S., Rahn, A., Salweski, B., Kundt, G., et al. (2012). Paediatric Reference Values for the C-Terminal Fragment of Fibroblast-Growth Factor-23, Sclerostin, Bone-specific Alkaline Phosphatase and Isoform 5b of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase. *Ann. Clin. Biochem.* 49, 546–553. doi:10.1258/acb.2012.011274
- Fon Tacer, K., Bookout, A. L., Ding, X., Kurosu, H., John, G. B., Wang, L., et al. (2010). Research Resource: Comprehensive Expression Atlas of the Fibroblast Growth Factor System in Adult Mouse. *Mol. Endocrinol.* 24, 2050–2064. doi:10.1210/me.2010-0142
- Fuernau, G., Pöss, J., Denks, D., Desch, S., Heine, G. H., Eitel, I., et al. (2014). Fibroblast Growth Factor 23 in Acute Myocardial Infarction Complicated by Cardiogenic Shock: A Biomarker Substudy of the Intraaortic Balloon Pump in

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Karina Zimmer for performing echocardiography, Margit Überheide for technical support, and the core facility of the Small Animal Imaging Center, Hannover Medical School, for performing MRI.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2021.791479/full#supplementary-material>

- Cardiogenic Shock II (IABP-SHOCK II) Trial. *Crit. Care* 18, 713. doi:10.1186/s13054-014-0713-8
- Go, A. S., Chertow, G. M., Fan, D., McCulloch, C. E., and Hsu, C.-y. (2004). Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *N. Engl. J. Med.* 351, 1296–1305. doi:10.1056/nejmoa041031
- Grabner, A., Amaral, A. P., Schramm, K., Singh, S., Sloan, A., Yanucil, C., et al. (2015). Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cel. Metab.* 22, 1020–1032. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.002
- Grund, A., Szaroszyk, M., Korf-Klingebiel, M., Malek Mohammadi, M., Trogisch, F. A., Schrameck, U., et al. (2019a). TIP30 Counteracts Cardiac Hypertrophy and Failure by Inhibiting Translational Elongation. *EMBO Mol. Med.* 11, e10018. doi:10.15252/emmm.201810018
- Grund, A., Szaroszyk, M., Döppner, J. K., Malek Mohammadi, M., Kattih, B., Korf-Klingebiel, M., et al. (2019b). A Gene Therapeutic Approach to Inhibit Calcium and Integrin Binding Protein 1 Ameliorates Maladaptive Remodelling in Pressure Overload. *Cardiovasc. Res.* 115, 71–82. doi:10.1093/cvr/cvy154
- Gutierrez, O., Isakova, T., Rhee, E., Shah, A., Holmes, J., Collerone, G., et al. (2005). Fibroblast Growth Factor-23 Mitigates Hyperphosphatemia but Accentuates Calcitriol Deficiency in Chronic Kidney Disease. *Jasn* 16, 2205–2215. doi:10.1681/asn.2005010052
- Ham, O., Jin, W., Lei, L., Huang, H. H., Tsuji, K., Huang, M., et al. (2018). Pathological Cardiac Remodeling Occurs Early in CKD Mice from Unilateral Urinary Obstruction, and Is Attenuated by Enalapril. *Sci. Rep.* 8, 16087. doi:10.1038/s41598-018-34216-x
- Hao, H., Li, X., Li, Q., Lin, H., Chen, Z., Xie, J., et al. (2016). FGF23 Promotes Myocardial Fibrosis in Mice through Activation of β -catenin. *Oncotarget* 7, 64649–64664. doi:10.18632/oncotarget.11623
- Hausler, M. R., Whitfield, G. K., Kaneko, I., Forster, R., Saini, R., Hsieh, J.-C., et al. (2012). The Role of Vitamin D in the FGF23, Klotho, and Phosphate Bone-Kidney Endocrine axis. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 13, 57–69. doi:10.1007/s11154-011-9199-8
- Heineke, J., Auger-Messier, M., Xu, J., Oka, T., Sargent, M. A., York, A., et al. (2007). Cardiomyocyte GATA4 Functions as a Stress-Responsive Regulator of Angiogenesis in the Murine Heart. *J. Clin. Invest.* 117, 3198–3210. doi:10.1172/jci32573
- Hua, X., Wang, Y. Y., Jia, P., Xiong, Q., Hu, Y., Chang, Y., et al. (2020). Multi-level Transcriptome Sequencing Identifies COL1A1 as a Candidate Marker in Human Heart Failure Progression. *BMC Med.* 18, 2–16. doi:10.1186/s12916-019-1469-4
- Kawata, T., Imanishi, Y., Kobayashi, K., Miki, T., Arnold, A., Inaba, M., et al. (2007). Parathyroid Hormone Regulates Fibroblast Growth Factor-23 in a Mouse Model of Primary Hyperparathyroidism. *Jasn* 18, 2683–2688. doi:10.1681/asn.2006070783
- Kestenbaum, B., Sachs, M. C., Hoofnagle, A. N., Siscovick, D. S., Ix, J. H., Robinson-Cohen, C., et al. (2014). Fibroblast Growth Factor-23 and Cardiovascular Disease in the General Population. *Circ. Heart Fail.* 7, 409–417. doi:10.1161/circheartfailure.113.000952

- Kivelä, R., Hemanthakumar, K. A., Vaparanta, K., Robciuc, M., Izumiya, Y., Kidoya, H., et al. (2019). Endothelial Cells Regulate Physiological Cardiomyocyte Growth via VEGFR2-Mediated Paracrine Signaling. *Circulation* 139, 2570–2584. doi:10.1161/circulationaha.118.036099
- Kovesdy, C. P., and Quarles, L. D. (2016). FGF23 from Bench to Bedside. *Am. J. Physiology-Renal Physiol.* 310, F1168–F1174. doi:10.1152/ajprenal.00606.2015
- Kuga, K., Kusakari, Y., Uesugi, K., Semba, K., Urashima, T., Akaike, T., et al. (2020). Fibrosis Growth Factor 23 Is a Promoting Factor for Cardiac Fibrosis in the Presence of Transforming Growth Factor-B1. *PLoS One* 15, e0231905. doi:10.1371/journal.pone.0231905
- Leifheit-Nestler, M., Grabner, A., Hermann, L., Richter, B., Schmitz, K., Fischer, D.-C., et al. (2017). Vitamin D Treatment Attenuates Cardiac FGF23/FGFR4 Signaling and Hypertrophy in Uremic Rats. *Nephrol. Dial. Transpl.* 32, 1493–1503. doi:10.1093/ndt/gfw454
- Leifheit-Nestler, M., große Siemer, R., Flasbart, K., Richter, B., Kirchhoff, F., Ziegler, W. H., et al. (2016). Induction of Cardiac FGF23/FGFR4 Expression Is Associated with Left Ventricular Hypertrophy in Patients with Chronic Kidney Disease. *Nephrol. Dial. Transpl.* 31, 1088–1099. doi:10.1093/ndt/gfv421
- Leifheit-Nestler, M., and Haffner, D. (2018). Paracrine Effects of FGF23 on the Heart. *Front. Endocrinol.* 9, 278. doi:10.3389/fendo.2018.00278
- Leifheit-Nestler, M., Kirchhoff, F., Nespore, J., Richter, B., Soetje, B., Klintschar, M., et al. (2018). Fibroblast Growth Factor 23 Is Induced by an Activated Renin-Angiotensin-Aldosterone System in Cardiac Myocytes and Promotes the Pro-fibrotic Crosstalk between Cardiac Myocytes and Fibroblasts. *Nephrol. Dial. Transpl.* 33, 1722–1734. doi:10.1093/ndt/gfy006
- Li, J. X., Yu, G. Q., and Zhuang, Y. Z. (2018). Impact of Serum FGF23 Levels on Blood Pressure of Patients with Chronic Kidney Disease. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22, 721–725. doi:10.26355/eurrev_201802_14299
- Lutsey, P. L., Alonso, A., Selvin, E., Pankow, J. S., Michos, E. D., Agarwal, S. K., et al. (2014). Fibroblast Growth Factor-23 and Incident Coronary Heart Disease, Heart Failure, and Cardiovascular Mortality: The Atherosclerosis Risk in Communities Study. *J. Am. Heart Assoc.* 3, e000936. doi:10.1161/JAHA.114.000936
- Matsui, I., Oka, T., Kusunoki, Y., Mori, D., Hashimoto, N., Matsumoto, A., et al. (2018). Cardiac Hypertrophy Elevates Serum Levels of Fibroblast Growth Factor 23. *Kidney Int.* 94, 60–71. doi:10.1016/j.kint.2018.02.018
- Oka, T., Maillet, M., Watt, A. J., Schwartz, R. J., Aronow, B. J., Duncan, S. A., et al. (2006). Cardiac-specific Deletion of Gata4 Reveals its Requirement for Hypertrophy, Compensation, and Myocyte Viability. *Circ. Res.* 98, 837–845. doi:10.1161/01.res.0000215985.18538.c4
- Paoletti, E., De Nicola, L., Gabbai, F. B., Chiodini, P., Ravera, M., Pieracci, L., et al. (2016). Associations of Left Ventricular Hypertrophy and Geometry with Adverse Outcomes in Patients with CKD and Hypertension. *Cjasn* 11, 271–279. doi:10.2215/cjn.06980615
- Pöss, J., Mahfoud, F., Seiler, S., Heine, G. H., Fliser, D., Böhm, M., et al. (2013). FGF-23 Is Associated with Increased Disease Severity and Early Mortality in Cardiogenic Shock. *Eur. Heart J. Acute Cardiovasc. Care* 2, 211–218. doi:10.1177/2048872613494025
- Ramezanzade, E., Minoof, F., Lebad, M. K., Jedinia, A., Saheli, Y. H., Aghajanzadeh, P., et al. (2019). Investigating the Relationship between Blood Pressure and Serum FGF23 Level in Patients Undergoing Hemodialysis in Guilan Province, A Cross Sectional Study. *Iran J. Kidney Dis.* 13, 262–268.
- Richter, B., Haller, J., Haffner, D., and Leifheit-Nestler, M. (2016). Klotho Modulates FGF23-Mediated NO Synthesis and Oxidative Stress in Human Coronary Artery Endothelial Cells. *Pflugers Arch. - Eur. J. Physiol.* 468, 1621–1635. doi:10.1007/s00424-016-1858-x
- Richter, M., Lautze, H.-J., Walther, T., Braun, T., Kostin, S., and Kubin, T. (2015). The Failing Heart Is a Major Source of Circulating FGF23 via Oncostatin M Receptor Activation. *J. Heart Lung Transplant.* 34, 1211–1214. doi:10.1016/j.healun.2015.06.007
- Riminucci, M., Collins, M. T., Fedarko, N. S., Cherman, N., Corsi, A., White, K. E., et al. (2003). FGF-23 in Fibrous Dysplasia of Bone and its Relationship to Renal Phosphate Wasting. *J. Clin. Invest.* 112, 683–692. doi:10.1172/JCI18399
- Rodríguez-Ortiz, M. E., Lopez, I., Muñoz-Castañeda, J. R., Martínez-Moreno, J. M., Ramírez, A. P., Pineda, C., et al. (2012). Calcium Deficiency Reduces Circulating Levels of FGF23. *Jasn* 23, 1190–1197. doi:10.1681/asn.2011101006
- Sarnak, M. J., Levey, A. S., Schoolwerth, A. C., Coresh, J., Culleton, B., Hamm, L. L., et al. (2003). Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease. *Circulation* 108, 2154–2169. doi:10.1161/01.cir.0000095676.90936.80
- Schumacher, D., Alampour-Rajabi, S., Ponomarev, V., Curaj, A., Wu, Z., Staudt, M., et al. (2019). Cardiac FGF23: New Insights into the Role and Function of FGF23 after Acute Myocardial Infarction. *Cardiovasc. Pathol.* 40, 47–54. doi:10.1016/j.carpath.2019.02.001
- Shimada, T., Hasegawa, H., Yamazaki, Y., Muto, T., Hino, R., Takeuchi, Y., et al. (2004). FGF-23 Is a Potent Regulator of Vitamin D Metabolism and Phosphate Homeostasis. *J. Bone Miner. Res.* 19, 429–435. doi:10.1359/JBMR.0301264
- Shimada, T., Yamazaki, Y., Takahashi, M., Hasegawa, H., Urakawa, I., Oshima, T., et al. (2005). Vitamin D Receptor-independent FGF23 Actions in Regulating Phosphate and Vitamin D Metabolism. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 289, F1088–F1095. doi:10.1152/ajprenal.00474.2004
- Shimada, T., Kakitani, M., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Takeuchi, Y., Fujita, T., et al. (2004b). Targeted Ablation of Fgf23 Demonstrates an Essential Physiological Role of FGF23 in Phosphate and Vitamin D Metabolism. *J. Clin. Invest.* 113, 561–568. doi:10.1172/jci200419081
- Shimada, T., Urakawa, I., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Hino, R., Yoneya, T., et al. (2004a). FGF-23 Transgenic Mice Demonstrate Hypophosphatemic Rickets with Reduced Expression of Sodium Phosphate Cotransporter Type IIa. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 314, 409–414. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.102
- Silswal, N., Touchberry, C. D., Daniel, D. R., McCarthy, D. L., Zhang, S., Andresen, J., et al. (2014). FGF23 Directly Impairs Endothelium-dependent Vasorelaxation by Increasing Superoxide Levels and Reducing Nitric Oxide Bioavailability. *Am. J. Physiology-Endocrinology Metab.* 307, E426–E436. doi:10.1152/ajpendo.00264.2014
- Six, I., Okazaki, H., Gross, P., Cagnard, J., Boudot, C., Maizel, J., et al. (2014). Direct, Acute Effects of Klotho and FGF23 on Vascular Smooth Muscle and Endothelium. *PLoS One* 9, e93423. doi:10.1371/journal.pone.0093423
- Slavic, S., Ford, K., Modert, M., Becirovic, A., Handschuh, S., Baierl, A., et al. (2017). Genetic Ablation of Fgf23 or Klotho Does Not Modulate Experimental Heart Hypertrophy Induced by Pressure Overload. *Sci. Rep.* 7, 11298. doi:10.1038/s41598-017-10140-4
- Smith, E. R., Tan, S.-J., Holt, S. G., and Hewitson, T. D. (2017). FGF23 Is Synthesised Locally by Renal Tubules and Activates Injury-Primed Fibroblasts. *Sci. Rep.* 7, 3345. doi:10.1038/s41598-017-02709-w
- Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., et al. (2006). Klotho Converts Canonical FGF Receptor into a Specific Receptor for FGF23. *Nature* 444, 770–774. doi:10.1038/nature05315
- Van Berlo, J. H., Maillet, M., and Molkenin, J. D. (2013). Signaling Effectors Underlying Pathologic Growth and Remodeling of the Heart. *J. Clin. Invest.* 123, 37–45. doi:10.1172/jci62839
- Van Venrooij, N. A., Pereira, R. C., Tintut, Y., Fishbein, M. C., Tumber, N., Demer, L. L., et al. (2014). FGF23 Protein Expression in Coronary Arteries Is Associated with Impaired Kidney Function. *Nephrol. Dial. Transpl.* 29, 1525–1532. doi:10.1093/ndt/gft523
- Verkaik, M., Juni, R. P., van Loon, E. P. M., van Poelgeest, E. M., Kweskeboom, R. F. J., Gam, Z., et al. (2018). FGF23 Impairs Peripheral Microvascular Function in Renal Failure. *Am. J. Physiology-Heart Circulatory Physiol.* 315, H1414–H1424. doi:10.1152/ajpheart.00272.2018
- Weber, T. J., Liu, S., Indridason, O. S., and Quarles, L. D. (2003). Serum FGF23 Levels in Normal and Disordered Phosphorus Homeostasis. *J. Bone Miner. Res.* 18, 1227–1234. doi:10.1359/jbmr.2003.18.7.1227
- Yilmaz, M. I., Sonmez, A., Saglam, M., Yaman, H., Kilic, S., Demirkaya, E., et al. (2010). FGF-23 and Vascular Dysfunction in Patients with Stage 3 and 4 Chronic Kidney Disease. *Kidney Int.* 78, 679–685. doi:10.1038/ki.2010.194
- Zacchigna, S., Paldino, A., Falcão-Pires, I., Daskalopoulos, E. P., Dal Ferro, M., Vodret, S., et al. (2021). Towards Standardization of Echocardiography for the Evaluation of Left Ventricular Function in Adult Rodents: a Position Paper of the ESC Working Group on Myocardial Function. *Cardiovasc. Res.* 117, 43–59. doi:10.1093/cvr/cvaa110
- Zhang, Y., Li, H., Wei, R., Ma, J., Zhao, Y., Lian, Z., et al. (2015). Endothelial Cells Regulate Cardiac Myocyte Reorganization through β 1-integrin Signalling. *Cell Physiol Biochem* 35, 1808–1820. doi:10.1159/000373992

Conflict of Interest: TT filed and licensed patents in the field of noncoding RNAs. TT is founder and shareholder of Cardior Pharmaceuticals GmbH.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in

this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Eitner, Richter, Schwänen, Szaroszyk, Vogt, Grund, Thum, Heineke, Haffner and Leifheit-Nestler. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4 Ergebnisse und Diskussion

FGF23 ist ein phosphaturisches Hormon, welches eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen spielt. Die genaue Rolle des vom Herzen exprimierten FGF23 und dessen parakrine Wirkungen im Herz werden kontrovers diskutiert⁵¹. Diese Arbeit hatte zur Aufgabe, sich genauer mit dem kardialen FGF23 auseinanderzusetzen und seinen Einfluss auf die kardiale Gesundheit zu untersuchen.

4.1 Neue Erkenntnisse durch unsere Studie

Unsere Studie stellt die erste umfassende Charakterisierung der Expression des kardialen FGF23 dar. Wir konnten zeigen, dass das kardiale FGF23 in $Fgf23^{fl/fl}/cre^{-}$ -Mäusen altersabhängig exprimiert wird und im Alter von 6 Monaten am höchsten ist. Vor unserer Studie zeigten Messungen auch im Menschen altersabhängige Serumspiegel von FGF23 mit deutlich höheren Spiegeln im Kleinkindalter¹⁸. Aktuelle Daten sprechen jedoch gegen diese Altersabhängigkeit, Pott et al. zeigten eine gleichbleibende 50. Perzentile über alle Altersklassen bis zur Volljährigkeit, mit einer größeren Streuung innerhalb der ersten zwei Lebensjahre¹⁹. Des Weiteren konnten wir die Synthese von FGF23 im gesamten Herzmuskel, sowohl in Kardiomyozyten und Endothelzellen als auch in Fibroblasten nachweisen. Die Expression in Fibroblasten war zuvor umstritten gewesen⁴⁰.

Eine Neuheit stellt unser Mausmodell des Kardiomyozyten-spezifischen FGF23-KO dar. Wir konnten nachweisen, dass $Fgf23^{fl/fl}/cre^{+}$ -Mäuse im Gegensatz zum globalen FGF23-KO⁴⁷ einen normalen Knochen- und Mineralstoffwechsel haben und keine Wachstumsunterschiede aufweisen. Ohne Intervention zeigten die Tiere eine normale Herzfunktion und -struktur. Nach TAC-Operation waren die $Fgf23^{fl/fl}/cre^{+}$ -Mäuse weder vor einer LVH geschützt, noch zeigten sie einen signifikant aggravierten Herzphänotyp im Vergleich zu $Fgf23^{fl/fl}/cre^{-}$ -Mäuse. Besonders interessant ist die Beobachtung, dass nach TAC-Operation die Expression von FGF23 nicht in Kardiomyozyten, sondern in Endothelzellen und in Fibroblasten induziert wurde, was erklären könnte, dass unser Kardiomyozyten-spezifischer FGF23-KO keinen Einfluss auf die Entstehung einer LVH hatte.

4.2 FGF23 aus Kardiomyozyten

In dieser Studie haben wir uns auf das FGF23 konzentriert, welches von Kardiomyozyten exprimiert wird. Die Expression von FGF23 aus Kardiomyozyten war bereits zuvor anhand von Biopsien aus menschlichem Myokard post mortem nachgewiesen worden³⁷. Die genaue Rolle

des FGF23 aus Kardiomyozyten ist jedoch bisher unbekannt. In unserer Studie zeigten $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ -Mäuse eine normale Herzfunktion und -morphologie im Vergleich zu $Fgf23^{fl/fl}/cre^-$ -Wurfgeschwistern.

Eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von FGF23 mithilfe eines Adeno-assoziierten Virus (AAV) führte bei gesunden Mäusen ebenso zu einer normalen Herzfunktion und -morphologie⁵². Die FGF23-AAV-Mäuse zeigten FGF23-Serumspiegel, welche in anderen Studien nach Injektion von rekombinantem FGF23 zu LVH und kardialer Fibrose geführt hatten²⁹. Auch Hao et al. zeigten, dass eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von FGF23 allein nicht zu einer vermehrten Fibrose führte³¹. Nur nach Myokardinfarkt oder Ischämie/Reperfusion der Koronararterien zeigte sich eine vermehrte Fibrose im Vergleich zu Mäusen mit einer normalen kardialen FGF23-Expression³¹. Das FGF23 aus Kardiomyozyten scheint folglich keine physiologische Rolle zu spielen, da weder eine spezifische fehlende Expression, noch eine spezifische Überexpression zu einer krankhaften Veränderung der Herzfunktion geführt haben.

Der Einfluss von im Herzen lokal exprimierten FGF23 auf die kardiovaskuläre Gesundheit bei Patient*innen mit CKD ist bisher nur wenig untersucht worden. Eine genaue Analyse der Herzfunktion und -strukturveränderung der $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ -Mäuse im Rahmen einer experimentellen CKD durch z.B. 5/6-Nephrektomie, unilaterale Obstruktion des Ureters oder diätetische Maßnahmen wie die Adenin-reiche Diät, könnte in zukünftigen Studien wichtige Hinweise für die Relevanz von FGF23 aus Kardiomyozyten bei CKD geben und mögliche Therapieansätze aufzeigen.

4.3 Arterielle Hypertonie

Die bei unseren $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ -Mäusen durchgeführte TAC-Operation stellt ein experimentelles Modell der Hochdruck-induzierten LVH dar. Bei arterieller Hypertonie im Menschen ist die LVH einerseits eine physiologische Anpassung an den erhöhten Blutdruck, kann im Verlauf jedoch der krankhafte Ausdruck der hypertensiven Herzerkrankung werden⁵³. Leider haben wir keine Daten zum Blutdruck unserer Tiere erhoben. Aber beim Menschen spricht man von einer arteriellen Hypertonie bei einem systolischen Blutdruck von ≥ 140 mmHg und einem diastolischen Blutdruck von ≥ 90 mmHg. Bei Patient*innen mit CVD oder anderen kardiovaskulären Risiken wie CKD oder Diabetes mellitus beginnt die Hypertonie bereits ab einem systolischen Blutdruck von ≥ 130 mmHg⁵⁴.

Ein dauerhaft erhöhter Blutdruck stellt einen großen Risikofaktor für CVD dar⁵⁵. Bei der LVH handelt es sich um eine der führenden Folgen der Hypertonie. Der Herzmuskel reagiert zunächst physiologisch auf die erhöhte Nachlast mit dem hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer Dekompensation mit Myokardischämie, Inflammation und Fibrose⁵⁶. Diese Faktoren steigern das Risiko für Arrhythmien und den plötzlichen Herztod⁵⁷.

4.3.1 FGF23 und arterielle Hypertonie

Die Rolle von FGF23 in der Entstehung und Aufrechterhaltung der arteriellen Hypertonie ist bisher noch ungeklärt. Hohe Serumlevel von FGF23 sind assoziiert mit einer höheren Inzidenz von Hypertonie in zuvor gesunden Patient*innen, unabhängig von Nierenfunktion und ethnischer Herkunft^{58,59}. Die Assoziation zwischen FGF23 und arterieller Hypertonie ist jedoch nicht konstant. In einer randomisierten Studie, in der CKD-Patient*innen entweder die Standardtherapie des Bluthochdrucks oder eine intensiviertere Bluthochdrucktherapie erhielten, gab es trotz intensivierter Blutdrucktherapie einen Anstieg an Serum-FGF23⁶⁰. Die oben beschriebenen Knochenerkrankungen mit deutlich erhöhten Serumspiegeln von FGF23 wie die XLH zeigen keine arterielle Hypertonie⁶¹. Folglich ist unklar, ob FGF23 allein das Risiko für eine Hypertonie oder CVD erhöht.

Experimentelle Studien zeigten eine Aktivierung des systemischen RAAS durch zirkulierendes FGF23, einerseits indirekt durch die Abwesenheit von 1,25-Dihydroxy-Vitamin-D⁶², andererseits direkt durch die Suppression des *Angiotensin-converting enzyme 2* (ACE2)⁶³. Die Induktion des RAAS hat pathologische kardiovaskuläre und renale Effekte, Inhibitoren des RAAS stellen einen wichtigen Baustein der Therapie einer arteriellen Hypertonie dar⁶⁴.

In vitro zeigte sich eine Aktivierung des lokalen RAAS in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (*neonatal rat ventricular myocytes*, NRVM) und kardialen Fibroblasten neonataler Ratten (*neonatal rat cardiac fibroblasts*, NRCF) durch FGF23³². Die Induktion des lokalen RAAS führte zu einer Hypertrophie der NRVM sowie einer Induktion profibrotischer Signalwege in den NRCF, welches beides weitere Wege sind, wie FGF23 zur LVH beitragen könnte.

Neben der Aktivierung des RAAS könnte FGF23 durch die Regulation der renalen Natrium-Chlorid-Cotransporter (NCC) einen Einfluss auf den Blutdruck haben⁶⁵. Nach einer Injektion mit rekombinantem FGF23 zeigten Mäuse eine vermehrte Natriumrückresorption im distalen Tubulus mit Anstieg des intravasalen Volumens und Hypertonie. Andersherum hatten die

bereits oben beschriebenen FGF23^{ΔVDR}-KO-Mäuse eine vermehrte Natriurie, Hypovolämie und niedrigere Blutdrücke im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen⁶⁵. Klinische Studien konnten die Rolle von FGF23 in der Entstehung einer Hypertonie durch klinisch relevante Natriumretention nicht untermauern, sondern zeigten eine Assoziation von FGF23 mit erhöhter fraktioneller Natriumausscheidung^{66,67}.

4.3.2 TAC-Operation als Modell der Hochdruck-induzierten LVH

Nach TAC-Operation lassen sich bei Mäusen die oben beschriebenen Folgen einer erhöhten Nachlast nachweisen wie bei einer Hochdruck-induzierten LVH beim Menschen^{68,69}. Zunächst zeigt sich eine kompensierte asymmetrische, konzentrische Hypertrophie des Herzmuskels⁷⁰. Im Verlauf kommt es zur Dekompensation mit kardialer Fibrose und Dilatation, bis es letztlich zum Herzversagen kommt^{71,72}.

Slavic et al. beschrieben einen Anstieg der kardialen FGF23-Expression nach TAC-Operation⁴¹. Die Autoren nutzten den bereits oben beschriebenen FGF23^{ΔVDR}-KO zur genaueren Betrachtung der Auswirkung einer Abwesenheit von FGF23 auf die kardiale Gesundheit⁴¹. Es zeigten sich keine Unterschiede in der kardialen Reaktion mit LVH und kardialer Fibrose nach TAC-Operation zwischen FGF23^{ΔVDR}-KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen. Zusätzlich betrachteten die Autoren auch einen Klotho^{ΔVDR}-KO, auch dieser zeigte keine Unterschiede in der kardialen Hypertrophie und Fibrose im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen⁴¹. Anders als bei unserem Modell handelte es sich bei diesem Modell jedoch um einen globalen FGF23-KO mit einem komplexen genetischen Background und Ausgleichsdiät, sodass es schwierig ist, die Ergebnisse der beiden Studien zu vergleichen. Die Relevanz von FGF23 in der Hochdruck-induzierten LVH sollte jedoch trotzdem weiter betrachtet werden, da in unserer Studie eine Rolle des FGF23 aus Endothelzellen und kardialen Fibroblasten nicht ausgeschlossen werden konnte.

4.4 FGF23 und Endothelfunktion

Wir konnten in unserem Mausmodell zeigen, dass ein Kardiomyozyten-spezifischer FGF23-KO keinen Einfluss auf die Entwicklung einer Druck-induzierten LVH hatte, wohl aber die TAC-Operation zur Induktion von FGF23 in kardialen Endothelzellen und Fibroblasten geführt hat. Das Endothel hat verschiedene Funktionen, unter anderem die Aufrechterhaltung des Gefäßtonus, Thrombozytenaggregation und Adhäsion von Leukozyten⁷³. Des Weiteren spielt ein gesundes Endothel eine wichtige Rolle in der Prävention von Arteriosklerose durch die

Synthese und Exkretion von Stickstoffmonoxid (NO)⁷⁴. Eine endotheliale Dysfunktion hat eine große Rolle in der Pathogenese von CVD.

Generell konnten wir die Daten zur Expression von FGF23 in Endothelzellen anderer Arbeitsgruppen⁴³ verifizieren. Van Venrooij et al. beschrieben die Expression von FGF23 in humanen Koronararterien und zeigten eine Korrelation zwischen endothelialer FGF23-Expression und Calciumablagerungen in den Koronararterien sowie eine Korrelation zwischen endothelialer FGF23-Expression einer Abnahme der Nierenfunktion⁴³. Zusätzlich zu der Expression in Endothelzellen zeigten die Autoren Co-Färbung von FGF23 mit CD68, welches für eine FGF23-Expression in Makrophagen spricht. Bei Patient*innen mit höhergradiger CKD besteht eine Korrelation zwischen Serumspiegeln von FGF23 und endothelialer Dysfunktion³³. Aus derartigen Beobachtungsstudien kann man FGF23 jedoch keine kausale Rolle in der Entstehung endothelialer Dysfunktion zuschreiben.

In vitro-Studien mit humanen Endothelzellen aus Koronararterien (*human coronary artery endothelial cells*, HCAEC) zeigten, dass FGF23 in der Anwesenheit seines Co-Faktors Klotho sowohl die endotheliale NO-Synthetase (eNOS) aktiviert als auch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch eine Aktivierung der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat-Oxidase 2 (Nox2) fördert³⁴. In Abwesenheit von Klotho wurde die Synthese und Freisetzung von NO inhibiert und so könnte durch vermehrtes Anfallen reaktiver Sauerstoffspezies zur endothelialen Dysfunktion beitragen werden³⁴. Da dies jedoch erst in Zuständen einer Klotho-Defizienz wie CKD⁷⁵ geschieht, wissen wir nicht, ob systemisches oder lokales endotheliales FGF23 Auslöser einer endothelialen Dysfunktion sind.

4.5 FGF23 und Fibrose

Neben der Expression im Kardiomyozyten und im kardialen Endothel konnten wir nachweisen, dass FGF23 auch in kardialen Fibroblasten gesunder Mäuse exprimiert und durch TAC-Operation induziert wird. Die Expression von FGF23 in kardialen Fibroblasten wurde zuvor kontrovers diskutiert. Hao et al. wiesen die Expression von FGF23 in adulten murinen kardialen Fibroblasten (*adult mouse cardiac fibroblasts*, AMCF) nach³¹. In ihrer Arbeit zeigte sich, dass profibrotische und prohypertrophe Faktoren wie Angiotensin II und Phenylephrin zu einer erhöhten Expression von FGF23 in AMCF führen³¹. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass FGF23 die Entwicklung einer Fibrose über die Aktivierung von β -Catenin fördert³¹. β -Catenin

ist ein profibrotisches Protein, welches mit dem *transforming growth factor* (TGF)- β -Signalweg interagiert⁷⁶.

Schumacher et al. konnten FGF23 lediglich in aktivierten kardialen Fibroblasten nach Myokardinfarkt nachweisen⁴⁰. Die Autoren führten dies auf die anfängliche Inflammation zurück, bei der Faktoren wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α die Expression von FGF23 induzierten⁴⁰. In späteren Stadien der Fibrose wurde die Expression von FGF23 durch TGF- β inhibiert⁴⁰. In ihrer Arbeit verifizierten sie die Beobachtungen anderer Studien, dass FGF23 zu einer vermehrten Migration kardialer Fibroblasten sowie einer erhöhten Expression profibrotischer Gene wie TGF- β und Kollagen 1 führt^{32,40,77}.

Leifheit-Nestler et al. zeigten zuvor, dass FGF23 einen vermehrten profibrotischen Crosstalk zwischen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten induziert⁷⁷. Die Aktivierung des RAAS durch FGF23 führte in NRVM zu Hypertrophie und in NRCF zu einer vermehrten Proliferation, Migration und der Induktion profibrotischer Gene³². Die genaue parakrine und endokrine Wirkung von FGF23 aus Kardiomyozyten und Fibroblasten ist noch nicht vollständig verstanden und muss in Zukunft weiter untersucht werden.

4.6 Limitationen der Studie

Zur Analyse der Expression von FGF23 im Herzen haben wir uns ausschließlich auf qRT-PCR, Western Blot, immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen verlassen. Zur genaueren Unterscheidung der Expression wären zum Beispiel eine Isolation der einzelnen Zellen mit zellspezifischer Messung der Expression wie zum Beispiel eine FACS-Analyse interessant⁷⁸. Eine Bestimmung, wann genau welche Zelltypen FGF23 im Herzen exprimieren, wäre relevant für die Bestimmung der Rolle von FGF23 in der kardialen Gesundheit und Pathologie.

Den Kardiomyozyten-spezifischen FGF23-KO haben wir mithilfe des Cre-LoxP-Systems generiert⁷⁹. Hierbei wird ein Bereich eines Gens, welches von LoxP-Sites flankiert ist, nur in Anwesenheit der Cre-Rekombinase aus dem Gen gespleißt, wodurch es je nach Lokalisation sowohl zu einem KO eines Gens oder zu einer erneuten Expression kommen kann⁷⁹. Im Falle der *Fgf23^{fl/fl}/cre⁺*-Mäuse ist das Exon 2 von FGF23 mit den LoxP-Sites flankiert und wird durch eine Myh7-Cre, welche bei Ablesen des β -*myosin heavy chain* (MHC)-Promotors transkribiert wird⁸⁰, in Kardiomyozyten exzidiert mit dem Resultat eines Funktionsverlustes. Das Cre-LoxP-System ist ein etabliertes System, mit welchem man sicher KO erstellen kann, birgt jedoch

auch Nachteile. Die Cre-Rekombinase kann Effekte an Orten neben der Zielstruktur haben und hat Toxizität in verschiedenen Zelltypen, unter anderem Kardiomyozyten gezeigt⁸¹. Vor allem die α -MHC-Cre zeigte eine kardiale Toxizität mit Kardiomyopathie⁸², wobei im Fall der $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ -Mäuse die Myh7-Cre, also an β -MHC gebunden, verwendet wurde. Die Zuverlässigkeit der Exzision der LoxP-Sites durch die Myh7-Cre liegt bei 90%⁸³, sodass nicht mit einem vollständigen KO gerechnet werden kann. Neben den kontinuierlich aktiven Cre-Rekombinasen gibt es auch Modelle, in denen die Cre durch Medikamente wie Tamoxifen oder Doxyzyklin induziert werden kann⁸¹. Aufgrund der genannten Risiken der Cre kann man nicht vollständig sicherstellen, dass alle Effekte, die man bei unseren $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ -Mäusen gesehen hat, allein durch die Abwesenheit von FGF23 im Kardiomyozyten zu begründen sind.

Eine Limitation unserer Studie beinhaltet die Betrachtung des Blutdrucks. Die Rolle von FGF23 in der Entstehung der arteriellen Hypertonie ist unklar, sodass regelmäßige Messungen des Blutdrucks unserer $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ -Mäuse von Interesse gewesen wären. Blutdruckmessungen bei Mäusen sind jedoch schwierig, entweder kann man den Blutdruck an der Schwanzwurzel messen oder mithilfe des Millar Katheters. An die Blutdruckmessung an der Schwanzwurzel müssen sich Mäuse gewöhnen⁸⁴, man kann nicht ausschließen, dass hohe Blutdrücke auf eine sympathische Reaktion zurückzuführen sind. Bei der Millar-Katheter-Untersuchung handelt es sich um ein Endpunktexperiment, sodass wir diese nur im Alter von 6 Monaten durchgeführt haben und keine Vergleichsdaten in niedrigerem Lebensalter haben. Alternative Methoden zur Messung des Blutdrucks beinhalten zum Beispiel die Implantation eines Radiotelemeters⁸⁵. Nachteile in der Implantation eines Radiotelemeter bestehen in dem Bedarf einer hohen chirurgischen Expertise, da das Messgerät intraperitoneal an die Aorta abdominalis angeschlossen wird, Risiken der Narkose, eine Gewichtsabnahme der Tiere sowie vermehrte Infektionen um das Implantat⁸⁵.

In der Betrachtung der Herzfunktion der $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ -Mäuse nutzten wir die Echokardiographie. Für die Beurteilung der Herzfunktion nach TAC-Operation wurde das kardiale MRT benutzt. Beide Untersuchungsmethoden bürgen Vor- und Nachteile⁸⁶, wichtig wäre jedoch für zukünftige Studien, eine einheitliche Untersuchungsmethode zu verwenden.

Bei dem hier genutzten TAC-Modell handelt es sich um ein etabliertes Modell, mit welchem man Hochdruck-induzierte LVH auslösen kann⁷¹. Die klinische Relevanz der TAC-Operation als Modell der Hochdruck-induzierten LVH wird jedoch kontrovers diskutiert, da es in der Klinik

keine Krankheit gibt, bei der es so plötzlich zu einer so starken Erhöhung der Nachlast kommt⁸⁷. Zudem zeigten sich Unterschiede der Ausprägung der LVH bei verschiedenen Mausstämmen⁷² und Variabilität der Phänotypen innerhalb der gleichen Mausstämme⁸⁸, dies muss bei der Nutzung dieses Modells beachtet werden.

5 Zusammenfassung

Die chronische Nierenerkrankung (*chronic kidney disease*, CKD) ist eine Erkrankung mit einer hohen weltweiten Prävalenz, welche weitreichende Folgen für die Mortalität und Morbidität der Patient*innen birgt. Der Fibroblastenwachstumsfaktor 23 (FGF23) ist ein Hormon, welches physiologischerweise im Knochen exprimiert wird und zu einer renalen Phosphaturie durch eine verminderte NaPi2a-Synthese sowie zu einer verminderten Synthese von aktivem Vitamin D führt. In der CKD kann FGF23 die Phosphatspiegel lange niedrig halten, hat aber selbst gesundheitsschädliche Effekte, wie die direkte Förderung einer linksventrikulären Hypertrophie (LVH). Nicht nur der Knochen, sondern auch andere Gewebe, wie der Herzmuskel exprimieren FGF23.

In unserer Studie haben wir zunächst die Expression von FGF23 im Herzen bei Mäusen untersucht. Hier stellten wir fest, dass FGF23 im gesamten Herzen, in Kardiomyozyten, Endothelzellen und kardialen Fibroblasten exprimiert wird. Zusätzlich konnten wir altersabhängige Unterschiede in der kardialen FGF23-Expression feststellen, jedoch nicht in der ossären.

Nach diesen Erkenntnissen haben wir einen Kardiomyozyten-spezifischen FGF23-KO ($Fgf23^{fl/fl}/cre^+$) mithilfe des Cre-LoxP-Systems etabliert. Diese Mäuse zeigten eine signifikant niedrigere kardiale FGF23-Expression, jedoch keine Unterschiede in der ossären FGF23-Expression oder im Mineralstoffwechsel. Die Mäuse zeigten keine Wachstumsunterschiede und keine Unterschiede im kardialen Phänotyp, sie zeigten jedoch eine signifikant erhöhte 6-Monats-Mortalität. Nach Durchführung einer TAC-Operation zeigten $Fgf23^{fl/fl}/cre^+$ -Mäuse keine stärkere oder schwächere Einschränkung der Herzfunktion als ihre $Fgf23^{fl/fl}/cre^-$ -Wurfgeschwister. Wir konnten bei beiden TAC-operierten Gruppen eine erhöhte kardiale FGF23-Expression feststellen, welche sich auf eine erhöhte FGF23-Expression in kardialen Endothelzellen sowie kardialen Fibroblasten zurückführen ließ.

Folglich lässt sich aus unseren Ergebnissen schließen, dass FGF23 aus Kardiomyozyten keine entscheidende Rolle in der Hochdruck-induzierten LVH spielt, wie zuvor vermutet, sondern dass Endothelzellen und Fibroblasten von größerer Bedeutung in diesem Zusammenhang zu sein scheinen. Dies muss in weiterführenden Studien näher adressiert werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Hill NR, Fatoba ST, Oke JL, et al. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease – A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2016;11(7):e0158765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158765>
2. Levin, A., Stevens, P. E., Bilous, R. W., Coresh, J., De Francisco, A. L. M., De Jong, P. E., Griffith, K. E., Hemmelgarn, B. R., Iseki, K., Lamb, E. J., Levey, A. S., Riella, M. C., Shlipak, M. G., Wang, H., White, C. T., & Winearls CG. Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2013;3(1):1-150. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.73>
3. Becherucci F, Roperto RM, Materassi M, Romagnani P. Chronic kidney disease in children. *Clin Kidney J*. 2016;9(4):583-591. doi:10.1093/ckj/sfw047
4. Kramer A, Pippias M, Noordzij M, et al. The European Renal Association - European Dialysis and Transplant Association (ERA-EDTA) Registry Annual Report 2016: A summary. *Clin Kidney J*. 2019;12(5):702-720. doi:10.1093/ckj/sfz011
5. Webster AC, Nagler E V, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*. 2017;389(10075):1238-1252. doi:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32064-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32064-5)
6. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, et al. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease: A Statement From the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 2003;108(17):2154-2169. doi:10.1161/01.CIR.0000095676.90936.80
7. Thompson S, James M, Wiebe N, et al. Cause of death in patients with reduced kidney function. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(10):2504-2511. doi:10.1681/ASN.2014070714
8. van de Wouw J, Broekhuizen M, Sorop O, et al. Chronic Kidney Disease as a Risk Factor for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Focus on Microcirculatory Factors and Therapeutic Targets. *Front Physiol*. 2019;10(September). doi:10.3389/fphys.2019.01108
9. Van Berlo JH, Maillet M, Molkenin JD. Signaling effectors underlying pathologic growth and remodeling of the heart. *J Clin Invest*. 2013;123(1):37-45. doi:10.1172/JCI62839
10. Ham O, Jin W, Lei L, et al. Pathological cardiac remodeling occurs early in CKD mice from unilateral urinary obstruction, and is attenuated by Enalapril. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-17. doi:10.1038/s41598-018-34216-x
11. Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, et al. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2004;19(3):429-435. doi:10.1359/JBMR.0301264
12. Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, et al. Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *Am J Physiol - Ren Physiol*. 2005;289(5 58-5):1088-1095. doi:10.1152/ajprenal.00474.2004
13. Vervloet MG, van Ittersum FJ, Büttler RM, Heijboer AC, Blankenstein MA, ter Wee PM.

- Effects of Dietary Phosphate and Calcium Intake on Fibroblast Growth Factor-23. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(2):383 LP - 389. doi:10.2215/CJN.04730510
14. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, et al. The role of vitamin D in the FGF23, klotho, and phosphate bone-kidney endocrine axis. *Rev Endocr Metab Disord*. 2012;13(1):57-69. doi:10.1007/s11154-011-9199-8
 15. Kawata T, Imanishi Y, Kobayashi K, et al. Parathyroid hormone regulates fibroblast growth factor-23 in a mouse model of primary hyperparathyroidism. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(10):2683-2688. doi:10.1681/ASN.2006070783
 16. Rodriguez-Ortiz ME, Lopez I, Muñoz-Castañeda JR, et al. Calcium deficiency reduces circulating levels of FGF23. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(7):1190-1197. doi:10.1681/ASN.2011101006
 17. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*. 2006;444(7120):770-774. doi:10.1038/nature05315
 18. Fischer DC, Mischek A, Wolf S, et al. Paediatric reference values for the C-terminal fragment of fibroblast-growth factor-23, sclerostin, bone-specific alkaline phosphatase and isoform 5b of tartrate-resistant acid phosphatase. *Ann Clin Biochem*. 2012;49(6):546-553. doi:10.1258/acb.2012.011274
 19. Pott V, Tietze H, Kanzelmeyer N, et al. LMS-Based Pediatric Reference Values for Parameters of Phosphate Homeostasis in the HARP Cohort. *J Clin Endocrinol Metab*. 2023;(August):1-12. doi:10.1210/clinem/dgad597
 20. Fon Tacer K, Bookout AL, Ding X, et al. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol*. 2010;24(10):2050-2064. doi:10.1210/me.2010-0142
 21. Quarles LD, Drezner MK. Editorial: Pathophysiology of X-linked hypophosphatemia, tumor-induced osteomalacia, and autosomal dominant hypophosphatemia: A perPHEXing problem. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(2):494-496. doi:10.1210/jcem.86.2.7302
 22. Yamazaki Y, Okazaki R, Shibata M, et al. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(11):4957-4960. doi:10.1210/jc.2002-021105
 23. Weber TJ, Liu S, Indridason OS, Quarles LD. Serum FGF23 Levels in Normal and Disordered Phosphorus Homeostasis. *J Bone Miner Res*. 2003;18(7):1227-1234. doi:10.1359/jbmr.2003.18.7.1227
 24. Carpenter TO, Whyte MP, Imel EA, et al. Burosumab Therapy in Children with X-Linked Hypophosphatemia. *N Engl J Med*. 2018;378(21):1987-1998. doi:10.1056/nejmoa1714641
 25. Insogna KL, Briot K, Imel EA, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial Evaluating the Efficacy of Burosumab, an Anti-FGF23 Antibody, in Adults With X-Linked Hypophosphatemia: Week 24 Primary Analysis. *J bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2018;33(8):1383-1393. doi:10.1002/jbmr.3475

26. Gutierrez O, Isakova T, Rhee E, et al. Fibroblast growth factor-23 mitigates hyperphosphatemia but accentuates calcitriol deficiency in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(7):2205-2215. doi:10.1681/ASN.2005010052
27. Wilson L, Felsenfeld A, Drezner MK, Llach F. Altered divalent ion metabolism in early renal failure: Role of 1,25(OH)2D. *Kidney Int*. 1985;27(3):565-573. doi:10.1038/ki.1985.48
28. Scialla JJ, Xie H, Rahman M, et al. Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular events in CKD. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(2):349-360. doi:10.1681/ASN.2013050465
29. Faul C, Amaral AP, Oskouei B, et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest*. 2011;121(11):4393-4408. doi:10.1172/JCI46122
30. Grabner A, Amaral AP, Schramm K, et al. Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab*. 2015;22(6):1020-1032. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.002
31. Hao H, Li X, Li Q, et al. FGF23 promotes myocardial fibrosis in mice through activation of β -catenin. *Oncotarget*. 2016;7(40):64649-64664. doi:10.18632/oncotarget.11623
32. Böckmann I, Lischka J, Richter B, et al. FGF23-mediated activation of local RAAS promotes cardiac hypertrophy and fibrosis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(18):1-16. doi:10.3390/ijms20184634
33. Yilmaz MI, Sonmez A, Saglam M, et al. FGF-23 and vascular dysfunction in patients with stage 3 and 4 chronic kidney disease. *Kidney Int*. 2010;78(7):679-685. doi:10.1038/ki.2010.194
34. Richter B, Haller J, Haffner D, Leifheit-Nestler M. Klotho modulates FGF23-mediated NO synthesis and oxidative stress in human coronary artery endothelial cells. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*. 2016;468(9):1621-1635. doi:10.1007/s00424-016-1858-x
35. Kestenbaum B, Sachs MC, Hoofnagle AN, et al. Fibroblast growth factor-23 and cardiovascular disease in the general population the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Circ Hear Fail*. 2014;7(3):409-417. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.113.000952
36. Lutsey PL, Alonso A, Selvin E, et al. Fibroblast growth factor-23 and incident coronary heart disease, heart failure, and cardiovascular mortality: The atherosclerosis risk in communities study. *J Am Heart Assoc*. 2014;3(3):1-11. doi:10.1161/JAHA.114.000936
37. Leifheit-Nestler M, Siemer RG, Flasbart K, et al. Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(7):1088-1099. doi:10.1093/ndt/gfv421
38. Leifheit-Nestler M, Grabner A, Hermann L, et al. Vitamin D treatment attenuates cardiac FGF23/FGFR4 signaling and hypertrophy in uremic rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32(9):1493-1503. doi:10.1093/ndt/gfw454
39. Andrukhova O, Slavic S, Odörfer KI, Erben RG. Experimental myocardial infarction upregulates circulating fibroblast growth factor-23. *J Bone Miner Res*. 2015;30(10):1831-1839. doi:10.1002/jbmr.2527

40. Schumacher D, Alampour-Rajabi S, Ponomariov V, et al. Cardiac FGF23: new insights into the role and function of FGF23 after acute myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol*. 2019;40:47-54. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carpath.2019.02.001>
41. Slavic S, Ford K, Modert M, et al. Genetic Ablation of Fgf23 or Klotho Does not Modulate Experimental Heart Hypertrophy Induced by Pressure Overload. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-12. doi:10.1038/s41598-017-10140-4
42. Kuga K, Kusakari Y, Uesugi K, et al. Fibrosis growth factor 23 is a promoting factor for cardiac fibrosis in the presence of transforming growth factor- β 1. *PLoS One*. 2020;15(4):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0231905
43. Van Venrooij NA, Pereira RC, Tintut Y, et al. FGF23 protein expression in coronary arteries is associated with impaired kidney function. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(8):1525-1532. doi:10.1093/ndt/gft523
44. Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, et al. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *J Clin Invest*. 2004;113(4):561-568. doi:10.1172/JCI200419081
45. St-Arnaud R, Arabian A, Travers R, et al. Deficient mineralization of intramembranous bone in vitamin D-24-hydroxylase-ablated mice is due to elevated 1,25-dihydroxyvitamin D and not to the absence of 24,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology*. 2000;141(7):2658-2666. doi:10.1210/endo.141.7.7579
46. Langdahl BL, Mortensen L, Vesterby A, Eriksen EF, Charles P. Bone histomorphometry in hypoparathyroid patients treated with vitamin D. *Bone*. 1996;18(2):103-108. doi:10.1016/8756-3282(95)00443-2
47. Shimada T, Urakawa I, Yamazaki Y, et al. FGF-23 transgenic mice demonstrate hypophosphatemic rickets with reduced expression of sodium phosphate cotransporter type IIa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;314(2):409-414. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.12.102>
48. Panda DK, Miao D, Tremblay ML, et al. Targeted ablation of the 25-hydroxyvitamin D 1 α -hydroxylase enzyme: Evidence for skeletal, reproductive, and immune dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(13):7498-7503. doi:10.1073/pnas.131029498
49. Clinkenbeard EL, Cass TA, Ni P, et al. Conditional Deletion of Murine Fgf23: Interruption of the Normal Skeletal Responses to Phosphate Challenge and Rescue of Genetic Hypophosphatemia. *J Bone Miner Res*. 2016;31(6):1247-1257. doi:10.1002/jbmr.2792
50. Hesse M, Fröhlich LF, Zeitz U, Lanske B, Erben RG. Ablation of vitamin D signaling rescues bone, mineral, and glucose homeostasis in Fgf-23 deficient mice. *Matrix Biol*. 2007;26(2):75-84. doi:10.1016/j.matbio.2006.10.003
51. Leifheit-Nestler M, Haffner D. Paracrine effects of FGF23 on the heart. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(MAY):1-13. doi:10.3389/fendo.2018.00278
52. Leifheit-Nestler M, Wagner MA, Richter B, et al. Cardiac Fibroblast Growth Factor 23 Excess Does Not Induce Left Ventricular Hypertrophy in Healthy Mice. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(October):1-13. doi:10.3389/fcell.2021.745892

53. Devereux RB, Pickering TG, Alderman MH, Chien S, Borer JS, Laragh JH. Left ventricular hypertrophy in hypertension. Prevalence and relationship to pathophysiologic variables. *Hypertension*. 1987;9(2_pt_2):II53. doi:10.1161/01.HYP.9.2_Pt_2.II53
54. Al-Makki A, DiPette D, Whelton PK, et al. Hypertension pharmacological treatment in adults: A world health organization guideline executive summary. *Hypertension*. 2022;79(1):293-301. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.121.18192
55. Urbina EM, Khoury PR, Mccoy C, Daniels SR, Kimball TR, Dolan LM. Cardiac and Vascular Consequences of Pre-Hypertension in Youth. *J Clin Hypertens*. 2011;13(5):332-342. doi:10.1111/j.1751-7176.2011.00471.x
56. Kahan T, Bergfeldt L. Left ventricular hypertrophy in hypertension: Its arrhythmogenic potential. *Heart*. 2005;91(2):250-256. doi:10.1136/hrt.2004.042473
57. Shenasa M, Shenasa H. Hypertension, left ventricular hypertrophy, and sudden cardiac death. *Int J Cardiol*. 2017;237:60-63. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2017.03.002
58. Fyfe-Johnson AL, Alonso A, Selvin E, et al. Serum fibroblast growth factor-23 and incident hypertension: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Hypertens*. 2016;34(7):1266-1272. doi:10.1097/HJH.0000000000000936
59. Akhabue E, Montag S, Reis JP, et al. FGF23 (fibroblast growth factor-23) and incident hypertension in young and middle-aged adults: The CARDIA study. *Hypertension*. 2018;72(1):70-76. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11060
60. Ginsberg C, Katz R, Chonchol MB, et al. The Effects of Intensive Blood Pressure Lowering on Markers of Mineral Metabolism in Persons with CKD in SPRINT. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020;15(6):852-854. doi:10.2215/CJN.01400220
61. Pastor-Arroyo EM, Gehring N, Krudewig C, et al. The elevation of circulating fibroblast growth factor 23 without kidney disease does not increase cardiovascular disease risk. *Kidney Int*. 2018;94(1):49-59. doi:10.1016/j.kint.2018.02.017
62. de Borst MH, Vervloet MG, ter Wee PM, Navis G. Cross talk between the renin-angiotensin-aldosterone system and vitamin D-FGF-23-klotho in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(9):1603-1609. doi:10.1681/ASN.2010121251
63. Dai B, David V, Martin A, et al. A Comparative Transcriptome Analysis Identifying FGF23 Regulated Genes in the Kidney of a Mouse CKD Model. *PLoS One*. 2012;7(9):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0044161
64. Ames MK, Atkins CE, Pitt B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J Vet Intern Med*. 2019;33(2):363-382. doi:10.1111/jvim.15454
65. Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, et al. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Mol Med*. 2014;6(6):744-759. doi:10.1002/emmm.201303716
66. Xu H, Hashem A, Witasp A, et al. Fibroblast growth factor 23 is associated with fractional excretion of sodium in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(12):2051-2057. doi:10.1093/ndt/gfy315
67. Freundlich M, Cuervo C, Abitbol CL. Fibroblast growth factor 23 and tubular sodium

- handling in young patients with incipient chronic kidney disease. *Clin Kidney J.* 2020;13(3):389-396. doi:10.1093/ckj/sfz081
68. Rockman HA, Ross RS, Harris AN, et al. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(18):8277-8281. doi:10.1073/pnas.88.18.8277
 69. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(8):589-600. doi:10.1038/nrm1983
 70. Yalçın F, Kucukler N, Cingolani O, et al. Evolution of ventricular hypertrophy and myocardial mechanics in physiological and pathological hypertrophy. *J Appl Physiol.* 2019;126(2):354-362. doi:10.1152/jappphysiol.00199.2016
 71. deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XHT. Transverse aortic constriction in mice. *J Vis Exp.* 2010;(38):7-9. doi:10.3791/1729
 72. Barrick CJ, Rojas M, Schoonhoven R, Smyth SS, Threadgill DW. Cardiac response to pressure overload in 129S1/SvImJ and C57BL/6J mice: Temporal- and background-dependent development of concentric left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2007;292(5). doi:10.1152/ajpheart.00816.2006
 73. Vita JA. Endothelial function. *Circulation.* 2011;124(25):906-912. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.078824
 74. Ganz P, Vita JA. Testing Endothelial Vasomotor Function: Nitric Oxide, a Multipotent Molecule. *Circulation.* 2003;108(17):2049-2053. doi:10.1161/01.CIR.0000089507.19675.F9
 75. Hu MC, Kuro-O M, Moe OW. Klotho and kidney disease. *J Nephrol.* 2010;23(SUPPL.16):1-16.
 76. Guo Y, Xiao L, Sun L, Liu F. Wnt/ β -catenin signaling: A promising new target for fibrosis diseases. *Physiol Res.* 2012;61(4):337-346. doi:10.33549/physiolres.932289
 77. Leifheit-Nestler M, Kirchhoff F, Nespore J, et al. Fibroblast growth factor 23 is induced by an activated renin-angiotensin-aldosterone system in cardiac myocytes and promotes the pro-fibrotic crosstalk between cardiac myocytes and fibroblasts. *Nephrol Dial Transplant.* 2018;33(10):1722-1734. doi:10.1093/ndt/gfy006
 78. Banerjee I, Fuseler JW, Price RL, Borg TK, Baudino TA. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2007;293(3):1883-1891. doi:10.1152/ajpheart.00514.2007
 79. Kühn R, M. Torres R. Cre/loxP Recombination System and Gene Targeting BT - Transgenesis Techniques: Principles and Protocols. In: Clarke AR, ed. Springer New York; 2002:175-204. doi:10.1385/1-59259-178-7:175
 80. Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, et al. Cardiomyocyte GATA4 functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in the murine heart. *J Clin Invest.* 2007;117(11):3198-3210. doi:10.1172/JCI32573
 81. McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol.*

2017;7(1):1-12. doi:10.1002/cpmo.22

82. Buerger A, Rozhitskaya O, Sherwood MC, et al. Dilated Cardiomyopathy Resulting From High-Level Myocardial Expression of Cre-Recombinase. *J Card Fail.* 2006;12(5):392-398. doi:10.1016/j.cardfail.2006.03.002
83. Oka T, Maillet M, Watt AJ, et al. Cardiac-specific deletion of gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circ Res.* 2006;98(6):837-845. doi:10.1161/01.RES.0000215985.18538.c4
84. Daugherty A, Rateri D, Hong L, Balakrishnan A. Measuring blood pressure in mice using volume pressure recording, a tail-cuff method. *J Vis Exp.* 2009;(27):2-3. doi:10.3791/1291
85. Mills PA, Huetteman DA, Brockway BP, et al. A new method for measurement of blood pressure, heart rate, and activity in the mouse by radiotelemetry. *J Appl Physiol.* 2000;88(5):1537-1544. doi:10.1152/jappl.2000.88.5.1537
86. Zacchigna S, Paldino A, Falcão-Pires I, et al. Towards standardization of echocardiography for the evaluation of left ventricular function in adult rodents: a position paper of the ESC Working Group on Myocardial Function. *Cardiovasc Res.* 2021;117(1):43-59. doi:10.1093/cvr/cvaa110
87. Patten RD, Hall-Porter MR. Small animal models of heart failure development of novel therapies, past and present. *Circ Hear Fail.* 2009;2(2):138-144. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.839761
88. Mohammed SF, Storlie JR, Oehler EA, et al. Variable phenotype in murine transverse aortic constriction. *Cardiovasc Pathol.* 2012;21(3):188-198. doi:10.1016/j.carpath.2011.05.002
89. Salto-Tellez M, Lim SY, El Oakley RM, Tang TPL, Almsherqi ZAM, Lim SK. Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: A quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovasc Pathol.* 2004;13(2):91-97. doi:10.1016/S1054-8807(03)00129-7

8 Erklärung nach §2 Abs. 2 Nr. 7 und 8 PromO

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Expressionsanalyse des Fibroblastenwachstumsfaktors 23 im gesunden Mausherz sowie bei Hochdruck-induzierter kardialer Hypertrophie“

In der Klinik für Pädiatrische Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von Frau PD Dr. Maren Leifheit-Nestler und Prof. Dr. Dieter Haffner ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel genutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden.

Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel bisher noch nicht erworben habe.

Ergebnisse der Dissertation wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Frontiers in Cell and Developmental Biology, Published: 18 January 2022

Ort, Datum

Unterschrift

9 Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich nun all den Personen danken, die mir diese Doktorarbeit ermöglicht haben.

Ganz besonders danken möchte ich meiner Doktormutter PD Dr. Maren Leifheit-Nestler, sowohl für die Vergabe des Promotionsprojektes als auch für die Betreuung bei der experimentellen Bearbeitung des Projektes. Eine so tatkräftige Unterstützung und Förderung einer wissenschaftlichen Publikation ist wirklich nicht selbstverständlich. Aufgrund dieser tollen Unterstützung war es mir möglich, insgesamt drei Mal an der Konferenz der deutschen Gesellschaft für Nephrologie teilzunehmen, welche mir interessante Einblicke in die Nephrologie und nephrologische Forschung gegeben haben. All dies war nur unter der Klinikleitung von Prof. Dr. Dieter Haffner möglich, bei welchem ich mich auch ganz herzlich bedanken möchte.

Zudem danke ich auch der Arbeitsgruppe für pädiatrische Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen für die Hilfestellung bei Experimenten und freundliche Zusammenarbeit. Ich bedanke mich für die wissenschaftliche Unterstützung durch Dr. Beatrice Richter, Dr. Isabel Manegold und Dr. Andrea Grund. Vielen Dank an meine StrucMed-Kollegin Stefanie Walter für die technische Unterstützung als auch für die schöne gemeinsame Zeit.

Besonders dankbar bin ich meinem Ehemann Philipp Rohde, der mich mental unterstützt und auch gut abgelenkt hat. Neben meinem Ehemann möchte ich mich auch bei meiner Familie danken, das heißt meinen Eltern Petra Eitner und Prof. Dr. Frank Eitner sowie meinen Geschwistern Dominik und Annika Eitner. Meine Eltern haben mich immer in meiner akademischen Laufbahn unterstützt und standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.