

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

**Die FGF23-induzierte Aktivierung des intrakardialen  
Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems fördert die  
Ausbildung einer kardialen Hypertrophie**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
in der  
Medizinischen Hochschule Hannover

Vorgelegt von  
Ineke Böckmann  
aus  
Hann. Münden

Hannover 2021

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover

am 23.08.2021

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover

Präsident: Professor Dr. med. Michael P. Manns

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. med. Dieter Haffner

1. Referentin: PD Dr. Dr. med. Gunilla Einecke, PhD

2. Referentin: PD Dr. med. Ulrike Flierl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.08.2021

Prüfungsausschuss:

Vorsitz: Prof. Dr. med. Philipp Beerbaum

1. Prüferin: Prof.'in Dr. rer. nat. Hildegard Büning

2. Prüfer: Prof. Dr. med. Dietrich Peest

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

Ineke Böckmann<sup>†</sup>, Jonas Lischka<sup>†</sup>, Beatrice Richter, Jennifer Deppe, Anja Rahn, Dagmar-Christiane Fischer, Jörg Heineke, Dieter Haffner, Maren Leifheit-Nestler (2019) **FGF23-Mediated Activation of Local RAAS Promotes Cardiac Hypertrophy and Fibrosis**. Int J Mol Sci. 2019;20(18):4634; doi: 10.3390/ijms20184634

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Chronische Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen.....	1
1.2 Die Wirkung von FGF23 mit und ohne Klotho.....	2
1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System.....	4
1.4 Interaktionen zwischen FGF23 und dem RAAS.....	5
<b>2. Arbeitshypothese</b>	<b>6</b>
2.1 Experimentelle Umsetzung der Fragestellung.....	9
2.2 Erklärung zur Publikation der Daten.....	9
<b>3. Publikation</b>	<b>11</b>
<b>4. Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>28</b>
4.1 FGF23 führt in 5/6Nx-Ratten über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade zur kardialen Hypertrophie .....	28
4.2 Die intrakardiale Expression von <i>Agt</i> , <i>Ren</i> , <i>ACE</i> und <i>AT<sub>1</sub>R</i> ist bei Ratten nach 5/6-Nephrektomie erhöht und korreliert mit der Ausbildung der linksventrikulären Fibrose.....	29
4.3 <i>Agt</i> , <i>Ren</i> , <i>ACE</i> und <i>AT<sub>1</sub>R</i> werden in NRVM und NRCF exprimiert und teilweise durch FGF23-Stimulation induziert.....	30
4.4 FGF23 führt durch die Aktivierung des intrakardialen RAAS zum hypertrophen Wachstum von NRVM <i>in vitro</i> .....	31
4.5 Neue Erkenntnisse unserer Studie.....	32
4.6 Therapiemöglichkeiten der FGF23-ausgelösten kardiovaskulären Erkrankungen bei CKD.....	32
4.6.1 Direkte Inhibition von FGF23.....	33
4.6.2 RAAS-Inhibitoren.....	34

4.6.3	Induktion der ACE2-Achse des RAAS.....	35
4.6.4	Therapieoptionen mittels indirekter RAAS-Hemmung: Vitamin D und Klotho.....	36
4.7	Bedeutung der Studie für die Klinik.....	37
4.8	Limitationen der Studie.....	38
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>41</b>
<b>7.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>Erklärung nach § 2 Abs. 2 Nr. 7 und 8 PromO</b>	<b>50</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>51</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Schaubild der Wirkungen von FGF23 mit und ohne den Kofaktor Klotho an Niere und Herz.....	2
<b>Abbildung 2:</b> Vereinfachtes Schaubild der Interaktionen zwischen Niere, Knochen und Herz bei CKD.....	4
<b>Abbildung 3:</b> Schematische Darstellung der RAAS-Aktivierung inklusive der ACE2-Achse und der möglichen Interaktion von FGF23 mit dem RAAS.....	6
<b>Abbildung 4:</b> Arbeitshypothesen bezüglich der FGF23-vermittelten kardialen Hypertrophie und Fibrose.....	7
<b>Abbildung 5:</b> Arbeitshypothese bezüglich der FGF23-vermittelten kardialen Hypertrophie und Ansatzpunkte von RAAS-Inhibitoren und CsA.....	8
<b>Abbildung 6:</b> Darstellung möglicher therapeutischer Optionen, um ein FGF23-induziertes kardiales Remodeling bei CKD zu verringern oder dem vorzubeugen.....	33

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ACE:</b>	Angiotensin Converting Enzyme
<b>Agt:</b>	Angiotensinogen
<b>Ang:</b>	Angiotensin
<b>ANP:</b>	Atrial Natriuretic Peptide
<b>ARB:</b>	Angiotensin-Rezeptorblocker
<b>AT1R:</b>	Angiotensin II–Rezeptor Typ 1
<b>BNP:</b>	Brain Natriuretic Peptide
<b>CKD:</b>	Chronic Kidney Disease, Chronische Niereninsuffizienz
<b>CTGF:</b>	Connective Tissue Growth Factor
<b>CsA:</b>	Cyclosporin A
<b>FGF23:</b>	Fibroblast Growth Factor 23, Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
<b>FGFR:</b>	Fibroblast Growth Factor - Rezeptor
<b>GFR:</b>	Glomeruläre Filtrationsrate
<b>KHK:</b>	Koronare Herzkrankheit
<b>LVH:</b>	Linksventrikuläre Hypertrophie
<b>Los:</b>	Losartan
<b>MR:</b>	Mineralokortikoidrezeptor
<b>NFAT:</b>	Nuclear Factor of Activated T-cells
<b>NGAL:</b>	Neutrophilengelatinase-assoziiertes Lipocalin
<b>NRCF:</b>	Neonatal Rat Cardiac Fibroblasts
<b>NRVM:</b>	Neonatal Rat Ventricular Myocytes
<b>PCR:</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PLC<math>\gamma</math>:</b>	Phospholipase C $\gamma$
<b>RAAS:</b>	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
<b>rFGF23:</b>	Rekombinantes FGF23
<b>SARS-CoV-2:</b>	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
<b>sKlotho:</b>	soluble Klotho, lösliches Klotho
<b>Spiro:</b>	Spironolacton
<b>TGF<math>\beta</math>:</b>	Transforming Growth Factor beta 1
<b>VDRE:</b>	Vitamin D responsive Elements
<b>5/6Nx:</b>	5/6-nephrektomiert

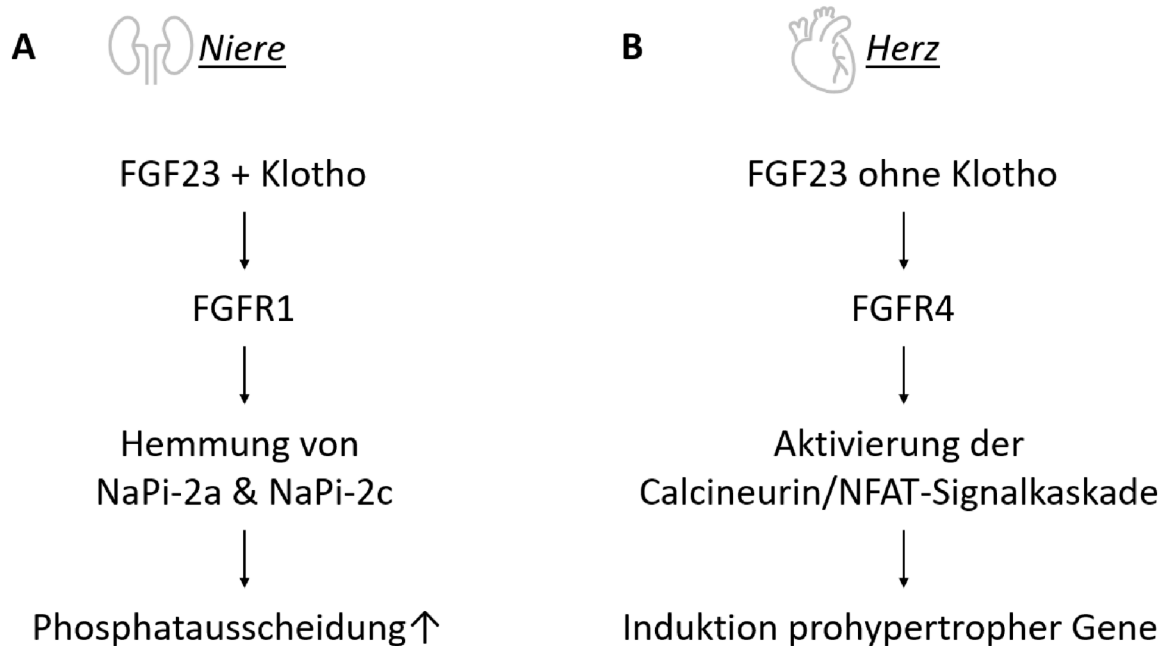
# 1. Einleitung

## 1.1 Chronische Niereninsuffizienz und kardiovaskuläre Erkrankungen

Die chronische Niereninsuffizienz (*chronic kidney disease*, CKD) ist mit einer Prävalenz von 13,4 % ein globales Gesundheitsproblem<sup>1</sup> mit steigender weltweiter Mortalitätsrate.<sup>2</sup> Eine CKD liegt definitionsgemäß vor, wenn über mindestens drei Monate eine glomeruläre Filtrationsrate (GFR) von unter 60 ml/min pro 1,73 m<sup>2</sup> oder Zeichen der Nierenschädigung, wie beispielsweise eine Albuminurie oder Auffälligkeiten in der Bildgebung oder Histologie, vorliegen.<sup>3</sup> Die Ursachen für die Entwicklung einer CKD sind in verschiedenen Regionen der Erde unterschiedlich. In Ländern mit hohen und mittleren Einkommen stellen Bluthochdruck und Diabetes mellitus die führenden Ursachen dar.<sup>4</sup> Zu den häufigsten Todesursachen von CKD-Patienten gehören zu 30,2 % kardiovaskuläre Ereignisse<sup>5</sup> und etwa 50 % der Patienten mit Herzinsuffizienz leiden zusätzlich an einer CKD.<sup>6</sup> Die Rate der kardiovaskulären Ereignisse bei CKD-Patienten ist mit erhöhten Serumspiegeln des phosphaturischen Hormons *Fibroblast Growth Factor 23* (FGF23) assoziiert, dabei ist die Assoziation zur Herzinsuffizienz stärker als die zu atherosklerotischen Ereignissen.<sup>7</sup> Der negative Einfluss der CKD auf das kardiovaskuläre System ist unter anderem durch eine erhöhte FGF23-Konzentration im Serum bedingt. FGF23 wirkt prohypertroph, proarrhythmogen und profibrotisch auf kardiale Zellen,<sup>8,9</sup> ist ein Risikofaktor für chronische Inflammation und Anämie bei CKD-Patienten,<sup>10</sup> ist bei Patienten ohne CKD mit erhöhten Blutdrücken assoziiert und führt bei Mäusen ohne Nierenerkrankung zur Hypertonie.<sup>11,12</sup> Erhöhte FGF23-Serumkonzentrationen sind sowohl bei Patienten mit CKD als auch unabhängig von der Nierenfunktion mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und Herzinsuffizienz assoziiert.<sup>13</sup> Auch bei pädiatrischen CKD-Patienten nach Nierentransplantation ist ein hoher FGF23-Spiegel weiterhin mit einer schlechteren linksventrikulären Funktion assoziiert.<sup>14</sup> Die sich verschlechternde kardiale Funktion bei CKD kann wiederum zu einem kardiorenenalen Syndrom Typ 4 führen, das als chronische Nierenschädigung mit folgend einhergehender kardialer Dysfunktion definiert wird.<sup>15</sup>

## 1.2 Die Wirkung von FGF23 mit und ohne Klotho

FGF23 ist ein 30 kDa großes, phosphaturisches Hormon, das im Knochen von Osteoblasten und Osteozyten exprimiert und sezerniert wird.<sup>16</sup> In Abhängigkeit seines Kofaktors  $\alpha$ -Klotho (im Folgenden als Klotho bezeichnet) hemmt FGF23 die renale Rückresorption von Phosphat über die Hemmung der Natrium-Phosphat-Kotransporter NaPi-2a und NaPi-2c im proximalen Tubulus (Abbildung 1A). Zusätzlich führt FGF23 über die Reduktion der renalen Synthese von aktivem Vitamin D (Calcitriol) zu einer verringerten intestinalen Phosphataufnahme. Die Verringerung der renalen Calcitriol-Synthese geschieht durch die Inhibition des Enzyms CYP27B1, das der Hydroxylierung von Vitamin D dient, sowie durch die Induktion von CYP24A1, das am Abbau von aktivem Vitamin D beteiligt ist.<sup>17,18</sup>

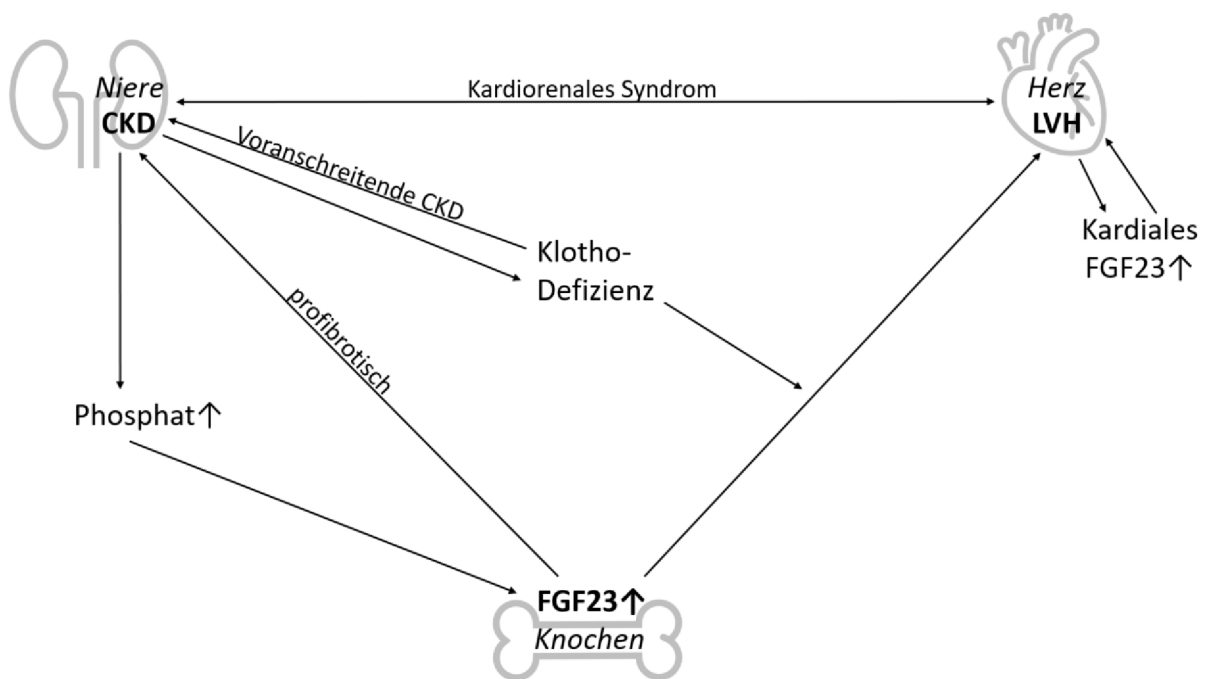


**Abbildung 1.** Schaubild der Wirkungen von FGF23 mit und ohne den Kofaktor Klotho an Niere und Herz. **A:** An der Niere führt FGF23 gemeinsam mit seinem Kofaktor Klotho zur Aktivierung des FGFR1 und nachfolgend zur Hemmung der Phosphattransporter NaPi-2A und NaPi-2c und damit zu einer erhöhten Phosphatausscheidung. **B:** Am Herzen aktiviert FGF23 Klotho-unabhängig den FGF-Rezeptor 4, wodurch es zur Aktivierung der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade und zur Induktion prohypertropher Gene kommt.

Die Wirkung von Klotho ist bedeutend für den physiologischen und pathologischen Einfluss von FGF23 auf den Organismus. Klotho-Knockoutmäuse zeigen Symptome des Alterns, wie zum Beispiel atherosklerotische Veränderungen und frühes

Versterben.<sup>19</sup> Umgekehrt führt die parenterale Gabe von Klotho bei Mäusen mit experimenteller Urämie zu reduziertem kardialen Remodeling.<sup>20</sup> Klotho-abhängig reguliert FGF23 die Phosphathomöostase des Körpers über die Wirkung an renalen Tubuluszellen sowie die Calciumhomöostase über eine herabgesetzte Expression und Sekretion von Parathormon in den Nebenschilddrüsen.<sup>21</sup> Die Klotho-unabhängigen Wirkungen von FGF23 treten vor allem bei stark erhöhten FGF23-Serumkonzentrationen auf, da FGF23 als endokrines FGF ohne Klotho eine geringe Bindungsaffinität für FGF-Rezeptoren hat.<sup>22</sup> So führt FGF23 Klotho-unabhängig zu pathologischen Zellveränderungen wie der kardialen Hypertrophie und Fibrose sowie der renalen Fibrose.<sup>21</sup> Die herzscheidende Wirkung von FGF23 entsteht durch die Klotho-unabhängige Aktivierung des FGF-Rezeptor 4 (FGFR4), die zur Phosphorylierung der Phospholipase C gamma (PLCγ) und einem vermehrten Calcium-Einstrom in Kardiomyozyten führt. Über die nachfolgende Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs (*nuclear factor of activated T-cells*) werden prohypertrophe Gene induziert, die ein hypertrophes Wachstum von Kardiomyozyten begünstigen<sup>23,24</sup> (Abbildung 1B). Entsprechend dieser molekularen Beobachtungen ist die Aktivierung des kardialen FGF23/FGFR4-Komplexes mit einer LVH bei Patienten mit CKD assoziiert.<sup>25</sup>

FGF23 steigt mit sinkender GFR an, noch bevor Erhöhungen des Parathormons oder von Phosphat auftreten.<sup>26</sup> Der Rückkopplungsmechanismus der vermehrten proteolytischen Spaltung des biologisch aktiven FGF23 bei hohen FGF23-Serumkonzentrationen scheint bei Patienten mit CKD verringert zu sein.<sup>27</sup> Die erhöhten FGF23-Serumkonzentrationen und die verringerte Spaltung und damit Inaktivierung halten die Phosphatkonzentration zu Beginn der Niereninsuffizienz im Normbereich. Bei terminaler Niereninsuffizienz steigt die FGF23-Serumkonzentration auf bis zu 1000-fach erhöhte Werte an<sup>28</sup> und ist mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko assoziiert.<sup>7,29,30</sup> Weiterhin zeigt sich bei Patienten mit CKD schon in frühen Stadien der Erkrankung eine Klotho-Defizienz,<sup>31</sup> die zu einer FGF23-Resistenz der Nieren, voranschreitender CKD und extrarenalen Komplikationen führt (Abbildung 2).<sup>32</sup> Abgesehen vom Knochen wird FGF23 auch endogen im Herzen von Kardiomyozyten exprimiert.<sup>33</sup> Die kardiale FGF23-Expression steigt in Mausmodellen eines Myokardinfarktes<sup>34</sup> und der linksventrikulären Hypertrophie (LVH) ohne ursächliche CKD,<sup>35</sup> in urämischen Ratten<sup>36</sup> sowie in Patienten mit CKD<sup>25</sup> an (Abbildung 2).



**Abbildung 2.** Vereinfachtes Schaubild der Interaktionen zwischen Niere, Knochen und Herz bei CKD. Bei CKD ist die renale Phosphatausscheidung reduziert. Das folglich erhöhte Serum-Phosphat führt zur erhöhten Synthese und Sekretion von FGF23 im Knochen, das profibrotisch auf die Niere und prohypertroph auf das Herz wirkt. Die geschädigte Niere exprimiert weniger Klotho und die so entstehende Klotho-Defizienz führt zu einer voranschreitenden CKD und LVH. Die Expression von kardialen FGF23 ist bei CKD sowie bei CKD-unabhängiger LVH gesteigert. Die gesteigerte endogene Expression von FGF23 in Kardiomyozyten führt zur LVH und umgekehrt. Die chronische kardiale Dysfunktion führt über das kardioresnales Syndrom Typ 2 zur Nierenschädigung. Umgekehrt führt die chronisch geschädigte Niere über das kardioresnales Syndrom Typ 4 zur kardialen Dysfunktion.

### 1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Das systemische Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist einer der Blutdruck-regulierenden Mechanismen des Körpers. Nimmt die Durchblutung des juxtaglomerulären Apparates der Niere ab, wird Renin ausgeschüttet. Renin spaltet das in Leber und Fettgewebe synthetisierte Glykoprotein Angiotensinogen (Agt) zu Angiotensin I (Ang I). Ang I wird durch das *Angiotensin Converting Enzyme* (ACE), das hauptsächlich in Endothelzellen der Lunge gebildet wird, zu Angiotensin II (Ang II) gespalten. Ang II aktiviert den Angiotensin II-Rezeptor Typ 1 (AT<sub>1</sub>R) im zentralen Nervensystem und in den Blutgefäßen. Diese Aktivierung führt zu einer peripheren Vasokonstriktion, zentral zur Sympathikusaktivierung und zur Aldosteron-Ausschüttung durch die Nebennierenrinde. Aldosteron löst eine erhöhte Rückresorption von Natrium und Wasser im distalen Tubulus und damit eine Erhöhung

des Blutdrucks aus.<sup>37</sup> Dadurch kann bei verringertem Blutdruck die glomeruläre Filtrationsrate aufrechterhalten werden.

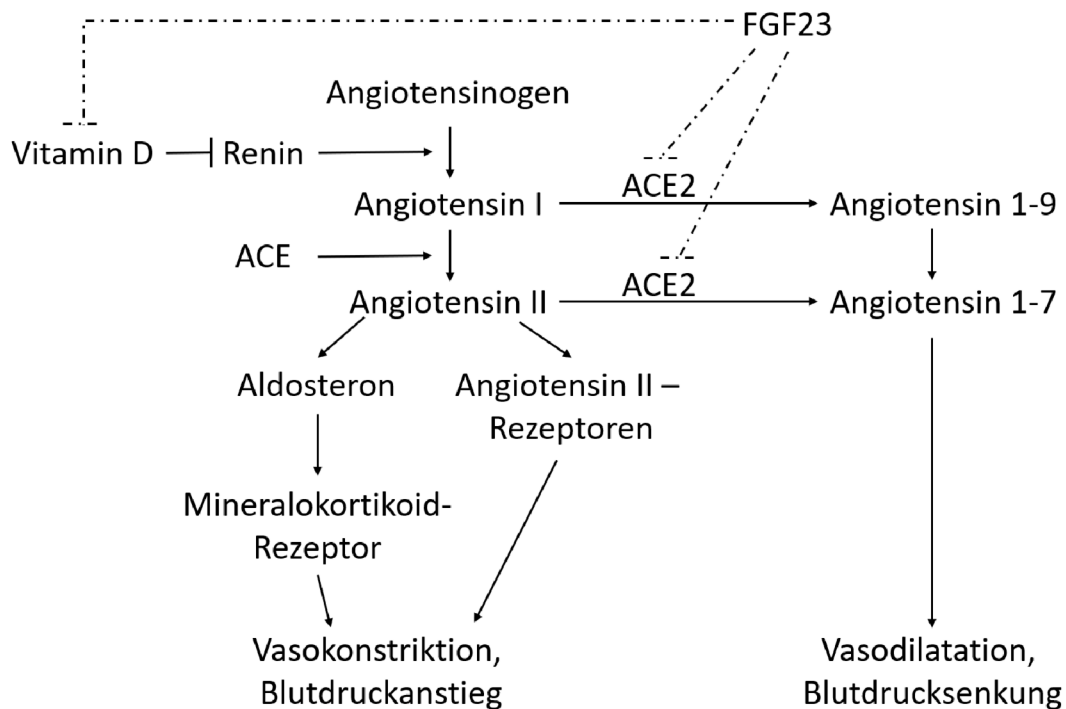
Durch eine reduzierte Anzahl an Glomeruli, eine Überaktivität des sympathischen Nervensystems und eine folgend erhöhte Reninproduktion besteht bei Patienten mit CKD eine chronische Aktivierung des RAAS.<sup>38</sup> Die Aktivierung des RAAS führt zur Aggravation der CKD und Entwicklung einer LVH.<sup>39,40</sup> Ang II und Aldosteron lösen prohypertrophe und profibrotische Effekte am Herzgewebe bei Nagetieren und Patienten aus,<sup>41–45</sup> so wie es, wie oben beschrieben, ebenfalls durch FGF23 beobachtet werden konnte. Vice versa zeigt die Inhibition des RAAS in klinischen Studien einen protektiven Effekt bezüglich kardiovaskulärer Ereignisse<sup>46,47</sup> und verhindert die Entwicklung einer LVH.<sup>48</sup> Experimentell konnte gezeigt werden, dass die subkutane Injektion von Angiotensin 1-7 eine Reduktion einer Ang II-induzierten LVH bei Ratten<sup>49</sup> bewirkt und ein reduzierter Ang II/Ang 1-7-Quotient in 5/6 nephrektomierten (Nx) Ratten mit einem verringerten kardialen Remodeling assoziiert ist.<sup>50</sup>

Neben dem systemischen RAAS wird in verschiedenen Organen, unter anderem im Herzen, ein lokales RAAS diskutiert.<sup>51</sup> So wurden Agt und Renin in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten neonataler Ratten<sup>52</sup> und ACE, Ang I, Ang II und AT<sub>1</sub>R im Herzgewebe von Ratten und Menschen nachgewiesen.<sup>53</sup> Im Herzgewebe von CKD-Patienten unter Dialysetherapie konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich eine erhöhte *Agt*-Expression und deren Assoziation zu einer verstärkten kardialen Fibrose feststellen.<sup>54</sup>

#### 1.4 Interaktionen zwischen FGF23 und dem RAAS

In den letzten Jahren wurden verschiedene Interaktionen zwischen FGF23 und dem RAAS gezeigt. In Ang II-behandelten Ratten stieg die Konzentration des zirkulierenden FGF23 sowie auch die Expression des kardialen FGF23 signifikant gegenüber Kontrolltieren an.<sup>41,54,55</sup> Durch die Gabe von Klotho konnte in Mäusen die Ang II-induzierte kardiale Hypertrophie und Fibrose gemindert werden,<sup>56</sup> was darauf hinweist, dass die Hemmung pathologischer FGF23-Signalkaskaden mittels Klotho die Wirkung des RAAS reduziert. Des Weiteren inhibiert aktives Vitamin D die Renin-Expression,<sup>57</sup> so dass postuliert wird, dass FGF23 über die Hemmung von aktivem Vitamin D indirekt zur Aktivierung des RAAS beitragen kann<sup>58</sup> (Abbildung 3). Einer weiteren Hypothese

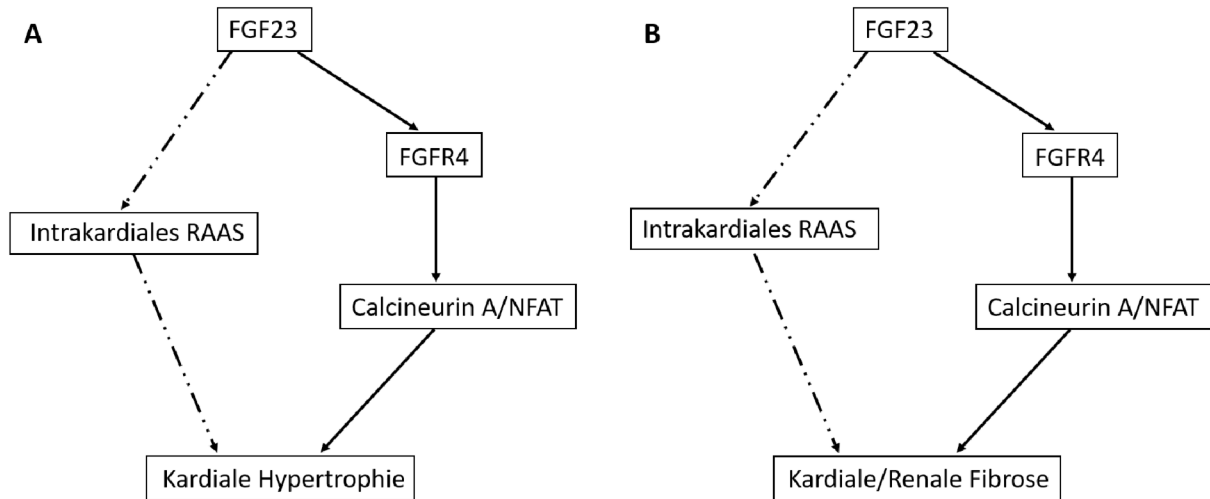
nach könnte FGF23 direkt über die Hemmung von ACE2, das Ang I und II in die vasodilatativ wirkenden Formen Angiotensin 1-9 und Angiotensin 1-7 umwandelt,<sup>59</sup> aktivierend auf das RAAS wirken, so wie es im Mausmodell der CKD beobachtet wurde.<sup>60</sup>



**Abbildung 3.** Schematische Darstellung der RAAS-Aktivierung inklusive der ACE2-Achse und der möglichen Interaktion von FGF23 mit dem RAAS (gestrichelte Pfeile).

## 2. Arbeitshypothese

In Zusammenschau der oben genannten Hinweise stellten wir die Hypothese auf, dass FGF23 neben der Induktion der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade zusätzlich über eine Aktivierung des intrakardialen RAAS zur Hypertrophie der Kardiomyozyten und zur Fibrose des Herzens führt (Abbildung 4). Innerhalb des gemeinsam bearbeiteten Projekts und der in geteilter Erstautorenschaft veröffentlichten Publikation bearbeitete Herr Jonas Lischka den Teil unserer Arbeitshypothese bezüglich der Fibrose. Mein Projektanteil konzentrierte sich auf die Untersuchung der Hypertrophie der Kardiomyozyten. Aus diesem Grund werde ich mich auch im Folgenden vornehmlich auf den hypertrophen Effekt von FGF23 auf das Herz beziehungsweise auf die Herzmuskelzellen konzentrieren.



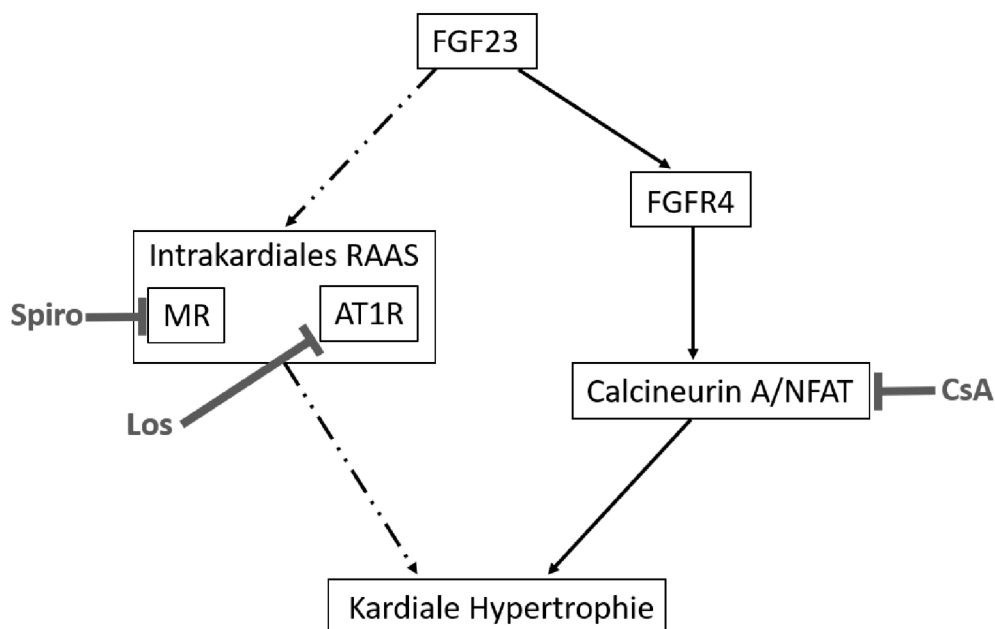
**Abbildung 4.** Arbeitshypothesen bezüglich der FGF23-vermittelten kardialen Hypertrophie und Fibrose. **A:** Als bewiesen gilt, dass FGF23 über die Aktivierung der FGFR4/Calcineurin/NFAT-Signalkaskade eine kardiale Hypertrophie induziert (durchgezogene Pfeile). Der Hypothese nach könnte FGF23 zusätzlich über die Aktivierung des intrakardialen RAAS zur Ausbildung einer Hypertrophie beitragen (gestrichelte Pfeile). **B:** Experimentell wurde gezeigt, dass die FGF23-abhängige Aktivierung der FGFR4/Calcineurin/NFAT-Signalkaskade die Entstehung einer renalen Fibrose fördert<sup>61,62</sup> (durchgezogene Pfeile). Der Hypothese nach könnte die FGF23-induzierte kardiale Fibrose ebenfalls durch die Aktivierung der FGFR4/Calcineurin/NFAT-Signalkaskade und/oder die Induktion des intrakardialen RAAS bedingt sein (gestrichelte Pfeile). Die Hypothese B wurde im Rahmen unseres Projektes von Jonas Lischka bearbeitet.

Die Basis der Arbeitshypothese dieses Projektes war die Beobachtung, dass bei CKD-Patienten mit erhöhten FGF23-Spiegeln,<sup>26,28</sup> einem aktivierten RAAS,<sup>38</sup> einer Klotho-Defizienz<sup>31</sup> sowie verringerten Vitamin D-Spiegeln,<sup>18,63</sup> vier Dysregulationen vorliegen, die mit kardiovaskulären Ereignissen bei CKD in Verbindung gebracht werden. Vice versa zeigten sich Calcitriol (aktives Vitamin D) und Klotho in Versuchen an Ratten mit experimenteller Urämie als kardioprotektiv wirksam.<sup>20,36</sup>

Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Gabe von Calcitriol bei urämischen 5/6Nx-Ratten zur einer Reduktion der FGF23-vermittelten LVH, der kardialen Expression von FGFR4 und der Aktivierung von Calcineurin/NFAT sowie zu einem verstärkten Cleavage von aktivem FGF23 im Herzgewebe führte.<sup>36</sup> Aus diesen Beobachtungen ergab sich die Frage, wie die kardioprotektive Wirkung von Calcitriol vermittelt wird. Im humanen FGF23-Gen auf Chromosom 12 liegen *Vitamin D responsive elements* (VDRE), was auf eine Vitamin D-vermittelte Induktion von FGF23

hindeutet.<sup>64</sup> Paradoxe Weise führt Calcitriol zu erhöhten FGF23-Serumspiegeln und einer erhöhten FGF23-Expression im Knochen von Mäusen sowie zu einer verstärkten FGF23-Synthese in isolierten Osteoblasten von Ratten,<sup>65,66</sup> was der Hypothese nach eher zu einer Herzschädigung als zur Protektion beitragen müsste. Auf welchem molekularen Mechanismus die Verbesserung des Herzphänotypen durch Calcitriol basiert, ist noch nicht abschließend geklärt. Ein gemeinsam genutzter Signalweg von Vitamin D und FGF23 könnte das RAAS sein, das bei CKD-Patienten sowohl durch eine Vitamin D-Defizienz als auch durch erhöhte FGF23-Spiegel aktiviert wird und zur Entstehung einer kardialen Hypertrophie und Fibrose beiträgt.<sup>45,49,58,59</sup>

Aufgrund dieses Zusammenhangs widmeten wir uns der Frage, ob ein intrakardiales RAAS innerhalb von Kardiomyozyten existiert und ob die prohypertrophen Wirkungen von FGF23 neben der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade über eine Aktivierung des intrakardialen RAAS ausgelöst werden könnten. Dazu sollten Kardiomyozyten neonataler Ratten (*neonatal rat ventricular myocytes*, NRVM) auf die Expression von RAAS-Genen untersucht werden sowie der Einsatz von Cyclosporin A (CsA) bzw. Losartan (Los) und Spironolacton (Spiro) zur jeweiligen Kostimulation mit FGF23 erfolgen (Abbildung 5).



**Abbildung 5.** Arbeitshypothese der FGF23-vermittelten kardialen Hypertrophie über die Aktivierung des intrakardialen RAAS bzw. der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade und Ansatzpunkte von Spironolacton (Spiro), Losartan (Los) und Cyclosporin A (CsA) innerhalb der Signalkaskaden.

Cyclosporin A ist ein Calcineurin-Inhibitor, der den Signalweg der FGF23-vermittelten Aktivierung von Calcineurin/NFAT blockt. Losartan ist ein AT<sub>1</sub>R-Blocker, der zur kompetitiven Hemmung von Ang II führt. Spironolacton ist ein Mineralokortikoidrezeptor-Antagonist und wirkt damit den Wirkungen von Aldosteron entgegen. Losartan und Spironolacton würden also die vorgeschlagene FGF23-vermittelte kardiale Hypertrophie über eine Aktivierung des intrakardialen RAAS inhibieren. Der Anteil der jeweiligen hypertrophen Signalwege sollte über den Vergleich der RAAS-Inhibitoren mit CsA herausgestellt werden.

## 2.1 Experimentelle Umsetzung der Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit das intrakardiale RAAS bei der FGF23-vermittelten kardialen Hypertrophie (Abbildung 1B) involviert ist und damit die oben aufgeführte Arbeitshypothese geprüft werden. Im ersten Teil wurden 5/6Nx-Ratten als Modell der experimentellen Urämie in Hinblick auf die Entstehung einer LVH sowie der *Fgf23* mRNA-Expression in Herz und Knochen untersucht. Die kardiale Expression der RAAS-assoziierten Gene wurde bestimmt und mit dem Grad der LVH korreliert.

Im zweiten Teil wurden frisch isolierte NRVM für 48 Stunden mit rekombinantem FGF23 (rFGF23) stimuliert und die Induktion der RAAS-Gene im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen quantifiziert. Um zwischen der FGF23-vermittelten Aktivierung der Calcineurin/NFAT- und der RAAS-Kaskade unterscheiden zu können, wurden Kostimulationen mit rFGF23 und CsA bzw. Losartan oder Spironolacton durchgeführt. *Outcome*-Parameter der Hypertrophie *in vitro* waren die Größe der NRVM sowie die mRNA-Expression der prohypertrophen Marker *ANP* und *BNP*.

## 2.2 Erklärung zur Publikation der Daten

Die Ergebnisse dieses Projektes (Ineke Böckmann) und einer weiteren medizinischen Doktorarbeit (Jonas Lischka) wurden im September 2019 unter geteilter Erstautorenschaft im Peer Reviewed Journal *International Journal of Molecular Sciences* (IF 4,556) publiziert. Die experimentelle Durchführung erfolgte eigenständig und unabhängig voneinander in zwei aufeinanderfolgenden StrucMed-Programmen 2017 und 2018.

Ineke Böckmann hat wie folgt zur Publikation beigetragen:

- Mitarbeit an der Projekt- und Versuchsplanung
- Histologische Analyse und Quantifizierung der Fibrose in Rattenherzen
- RNA-Isolation, cDNA-Synthese und quantitative real-time PCR der Herzgewebe von Sham- und 5/6Nx-Ratten (ausschließlich bearbeitet durch Ineke Böckmann, inklusive der Untersuchung linksventrikulärer Fibrose)
- Kultivierung, Stimulation und Ernte von NRVM und NRCF (Neonatal Rat Cardiac Fibroblasts, kardiale Fibroblasten neonataler Ratten)
- Mikroskopie und Quantifizierung der Größe von NRVM
- RNA-Isolation, cDNA-Synthese und *quantitative real-time PCR* der NRVM und NRCF
- Analyse, statistische und graphische Auswertung sowie Darstellung der erhobenen Daten
- Erstellen von Abbildungen für das Manuskript
- Schreiben des Manuskripts

### 3. Publikation

## **“FGF23-Mediated Activation of Local RAAS Promotes Cardiac Hypertrophy and Fibrosis”**

**Ineke Böckmann<sup>1,†</sup>, Jonas Lischka<sup>1,†</sup>, Beatrice Richter<sup>1,2</sup>, Jennifer Deppe<sup>1</sup>, Anja Rahn<sup>3</sup>, Dagmar-Christiane Fischer<sup>3</sup>, Jörg Heineke<sup>4,5</sup>, Dieter Haffner<sup>1</sup>, Maren Leifheit-Nestler<sup>1</sup>**

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

<sup>2</sup> Division of Nephrology, Department of Medicine, The University of Alabama at Birmingham, Alabama, USA

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, Rostock University Medical Center, Rostock, Germany

<sup>4</sup> Department of Cardiology and Angiology, Experimental Cardiology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

<sup>5</sup> Department of Cardiovascular Research, European Center for Angiosciences, German Center for Cardiovascular Research (DZHK), Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

† These authors contributed equally to this work.



Article

# FGF23-Mediated Activation of Local RAAS Promotes Cardiac Hypertrophy and Fibrosis

Ineke Böckmann <sup>1,†</sup>, Jonas Lischka <sup>1,†</sup>, Beatrice Richter <sup>1,2</sup>, Jennifer Deppe <sup>1</sup>, Anja Rahn <sup>3</sup>,  
Dagmar-Christiane Fischer <sup>3</sup>, Jörg Heineke <sup>4,5</sup>, Dieter Haffner <sup>1</sup>  and Maren Leifheit-Nestler <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department of Pediatric Kidney, Liver and Metabolic Diseases, Pediatric Research Center, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany; boeckmann.ineke@mh-hannover.de (I.B.); lischka.jonas@mh-hannover.de (J.L.); beatricerichter@uabmc.edu (B.R.); deppe.jennifer@mh-hannover.de (J.D.); haffner.dieter@mh-hannover.de (D.H.)

<sup>2</sup> Division of Nephrology, Department of Medicine, The University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35294, USA

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, Rostock University Medical Center, 18057 Rostock, Germany; anja.rahn@med.uni-rostock.de (A.R.); dagmar-christiane.fischer@med.uni-rostock.de (D.-C.F.)

<sup>4</sup> Department of Cardiology and Angiology, Experimental Cardiology, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany; joerg.heineke@medma.uni-heidelberg.de

<sup>5</sup> Department of Cardiovascular Research, European Center for Angiosciences, German Center for Cardiovascular Research (DZHK), Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, 68167 Mannheim, Germany

\* Correspondence: leifheit-nestler.maren@mh-hannover.de; Tel.: +49-511-532-7815

† These authors contributed equally to this work.

Received: 30 July 2019; Accepted: 16 September 2019; Published: 18 September 2019



**Abstract:** Patients with chronic kidney disease (CKD) are prone to developing cardiac hypertrophy and fibrosis, which is associated with increased fibroblast growth factor 23 (FGF23) serum levels. Elevated circulating FGF23 was shown to induce left ventricular hypertrophy (LVH) via the calcineurin/NFAT pathway and contributed to cardiac fibrosis by stimulation of profibrotic factors. We hypothesized that FGF23 may also stimulate the local renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) in the heart, thereby further promoting the progression of FGF23-mediated cardiac pathologies. We evaluated LVH and fibrosis in association with cardiac FGF23 and activation of RAAS in heart tissue of 5/6 nephrectomized (5/6Nx) rats compared to sham-operated animals followed by in vitro studies with isolated neonatal rat ventricular myocytes and fibroblast (NRVM, NRCF), respectively. Uremic rats showed enhanced cardiomyocyte size and cardiac fibrosis compared with sham. The cardiac expression of *Fgf23* and RAAS genes were increased in 5/6Nx rats and correlated with the degree of cardiac fibrosis. In NRVM and NRCF, FGF23 stimulated the expression of RAAS genes and induced *Ngal* indicating mineralocorticoid receptor activation. The FGF23-mediated hypertrophic growth of NRVM and induction of NFAT target genes were attenuated by cyclosporine A, losartan and spironolactone. In NRCF, FGF23 induced *Tgfb* and *Ctgf*, which were suppressed by losartan and spironolactone, only. Our data suggest that FGF23-mediated activation of local RAAS in the heart promotes cardiac hypertrophy and fibrosis.

**Keywords:** fibroblast growth factor 23; left ventricular hypertrophy; cardiac fibrosis; renin-angiotensin-aldosterone system; chronic kidney disease

## 1. Introduction

Chronic kidney disease (CKD) is a global health issue [1] affecting over 850 million people worldwide according to the International Society of Nephrology (ISN). One of the major causes of

death in this patient population are cardiovascular events [2,3], which are partially attributed to rising fibroblast growth factor 23 (FGF23) serum levels in CKD [4]. FGF23 is a phosphaturic hormone, mainly produced in osteocytes and osteoblasts [5]. Clinical studies in CKD patients showed a correlation of elevated FGF23 levels to left ventricular hypertrophy (LVH) [6,7]. Experimental research has further revealed that FGF23 directly induces LVH independently of its co-factor klotho by activation of FGF receptor 4 and subsequent calcineurin/nuclear factor of activated T cells (NFAT) signaling in vitro and in vivo [8,9]. Moreover, FGF23 is expressed by cardiomyocytes [10], and cardiac FGF23 expression is increased in uremic rats [11], transverse aortic constriction-operated mice [12] or mice after myocardial infarction [13] as well as in patients with CKD [14] and heart failure [15].

Activation of the renin–angiotensin–aldosterone system (RAAS) exacerbates renal failure [16] and contributes to LVH [17] in patients with CKD. When being less perfused, the juxtaglomerular apparatus secretes renin (REN), an enzyme that is responsible for cleaving liver-derived angiotensinogen (AGT) to angiotensin I (AngI), which is then further metabolized by angiotensin converting enzyme (ACE) to angiotensin II (AngII). Amongst other effects, AngII leads to peripheral vasoconstriction, activation of sympathetic nervous system and secretion of aldosterone from the adrenal glands by activating angiotensin II receptor type 1 (AT<sub>1</sub>R). Aldosterone enhances Na<sup>+</sup> and H<sub>2</sub>O reabsorption in the distal tubules, effectively increasing blood pressure [18]. Apart from the systemic RAAS, various tissues, including the heart, show local RAAS expression [19]. Although the expression of RAAS in the heart remains controversial, Agt as well as Ren have been detected in both neonatal rat ventricular myocytes (NRVM) and cardiac fibroblasts (NRCF) [20], whereas ACE, AngI, AngII and AT<sub>1</sub>R have been shown in myocardial tissue [19]. Furthermore, experimental and clinical studies have revealed both AngII and aldosterone induce LVH in rodents and patients and lead to cardiac fibrosis in mice [21–25]. Recently, FGF23 has been linked to RAAS. On the one hand, AngII and aldosterone increase FGF23 serum levels in rodents [21,26] and AngII enhances, although to a lesser extent compared to the bone, cardiac specific FGF23 expression in wild-type mice [21]. On the other hand, FGF23 is discussed to activate RAAS by inhibiting renal expression of ACE2 [27], an enzyme converting AngII to the vasodilative and cardioprotective Ang 1–7 [28]. Additionally, FGF23-mediated reduction of 1,25-dihydroxy vitamin D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) levels [29] leading to the activation of renin, which is physiologically inhibited by active vitamin D [30]. In addition, we recently showed increased expression of AGT in myocardial tissue of CKD patients on dialysis and in cultured NRVM stimulated with FGF23 using fibrosis profiler PCR array analysis [31]. Although, the underlying molecular mechanisms are unknown, we hypothesized that FGF23-induced activation of the local RAAS contributes to cardiac pathologies in CKD.

Here, we investigated whether FGF23-mediated activation of endogenous cardiac RAAS contributes to cardiac hypertrophy and fibrosis by using the well-established 5/6 nephrectomy (5/6Nx) rat model of experimental uremia followed by in vitro analyses in NRVM and NRCF.

## 2. Results

### 2.1. Cardiac Hypertrophy and Left Ventricular (LV) Fibrosis Are Enhanced in Experimental Uremia and Associated with Increased FGF23 Synthesis in Heart and Bone

Cardiac hypertrophy and fibrosis are common comorbidities in CKD patients [32] and it is well-established that FGF23 directly promotes LVH via calcineurin/NFAT signaling activation in uremia [9,33]. Whether FGF23 contributes to the development of cardiac fibrosis is still controversial [31,34]. Here, we used 5/6Nx to induce CKD in rats and investigated LVH and LV fibrosis in association with FGF23. As published before [11], 5/6Nx rats showed increased heart weight to body weight ratio accompanied with enhanced cardiomyocyte size, enhanced mRNA expression of *Fgf23* in heart and bone tissue and significantly decreased phosphorylation of NFAT suggesting FGF23-mediated activation of calcineurin/NFAT pathway due to uremia (Table 1). Moreover, cardiac *Fgf23* expression significantly correlated with the cardiomyocyte cross-sectional area ( $r = 0.680$ ;

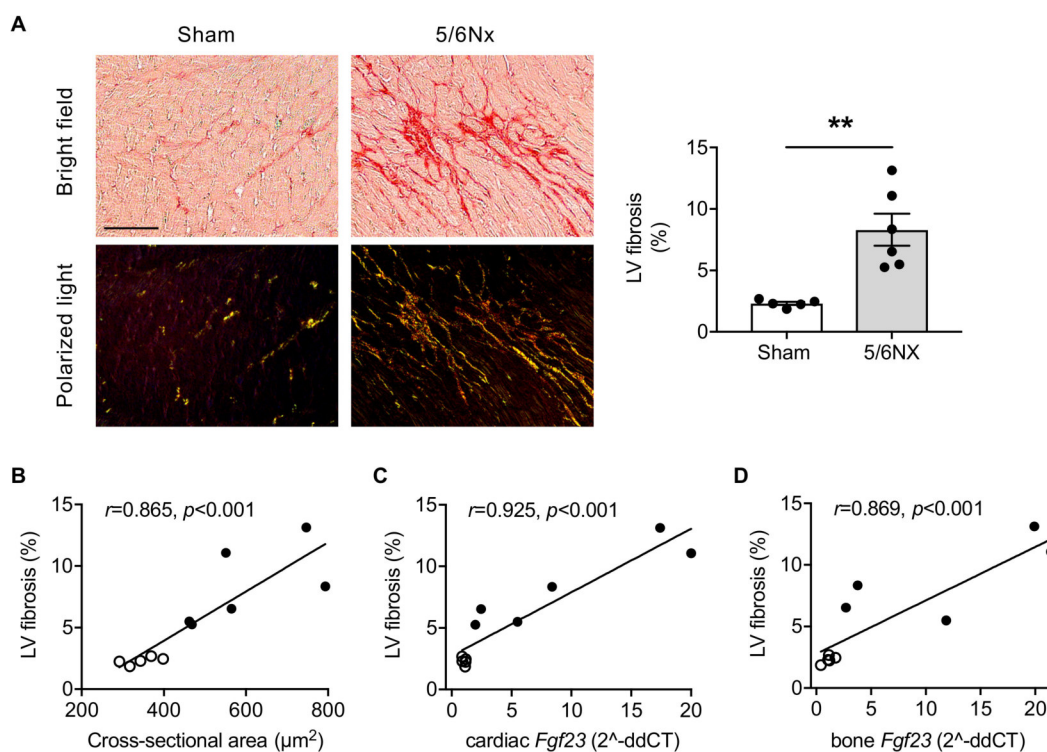
$p = 0.011$ ), while the expression of *Fgf23* in the bone just missed a statistically significant correlation with the cardiomyocyte size ( $r = 0.546$ ;  $p = 0.051$ ).

**Table 1.** Characteristics of sham and 5/6 nephrectomized (5/6Nx) rats.

Characteristics	Sham	5/6Nx	<i>p</i> Value
Number of rats ( <i>n</i> )	6	6	
Heart weight/body weight (mg/g)	2.8 ± 0.1	3.7 ± 0.2	0.0005
Cardiomyocyte size (μm <sup>2</sup> )	344 ± 19	598 ± 57	0.0038
Cardiac <i>Fgf23</i> mRNA (2 <sup>-ddCT</sup> )	1.00 ± 0.07	9.29 ± 3.15	0.0250
Bone <i>Fgf23</i> mRNA (2 <sup>-ddCT</sup> )	1.00 ± 0.20	11.93 ± 3.91	0.0129
Cardiac <i>Fgfr1</i> mRNA (2 <sup>-ddCT</sup> )	1.00 ± 0.06	7.91 ± 2.49	0.0196
Cardiac <i>Fgfr4</i> mRNA (2 <sup>-ddCT</sup> )	1.00 ± 0.07	21.91 ± 10.56	0.0022
Cardiac pNFAT protein (fold change)	1.00	0.27 ± 0.18	0.0291

Values are presented as mean ± standard error of mean using data from a rat cohort published before [11].

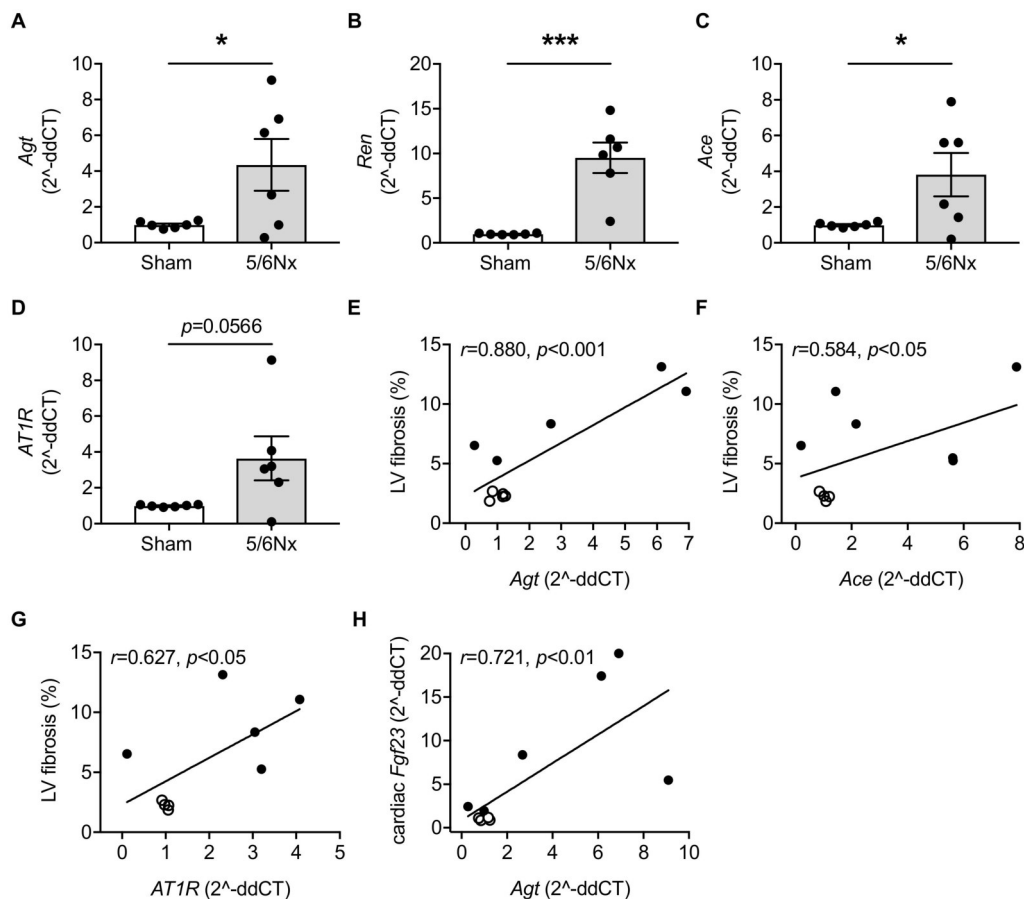
In addition to LVH, 5/6Nx rats developed severe LV fibrosis compared with sham as indicated by picosirius red stained myocardial tissue and quantification of collagen matrix deposition (Figure 1A). The amount of LV fibrosis correlated with the cross-sectional area of cardiomyocytes (Figure 1B) and with both cardiac and bone *Fgf23* mRNA expression (Figure 1C,D).



**Figure 1.** The 5/6 nephrectomized (5/6Nx) rats develop left ventricular (LV) fibrosis, which correlates with fibroblast growth factor 23 (*Fgf23*) expression. (A) Representative bright field and polarized light microscopy images of picosirius red-stained myocardial tissue of 5/6Nx and sham-operated rats and quantification of interstitial collagen fiber deposition demonstrating increased LV fibrosis in 5/6Nx rats (scale bar, 50 μm). (B–D) Pearson’s correlations of LV fibrosis with cross-sectional area of cardiomyocytes, and cardiac and bone *Fgf23* mRNA expression as determined by quantitative real-time PCR using *Gapdh* as housekeeping gene. Clear dots, sham-operated rats; black dots, 5/6Nx rats. All values are shown as mean ± SEM; \*\*  $p < 0.01$ ;  $n = 5–6$  rats per group.

## 2.2. Cardiac Expression of RAAS-Associated Genes is Increased in 5/6Nx Rats and Correlates with LV Fibrosis

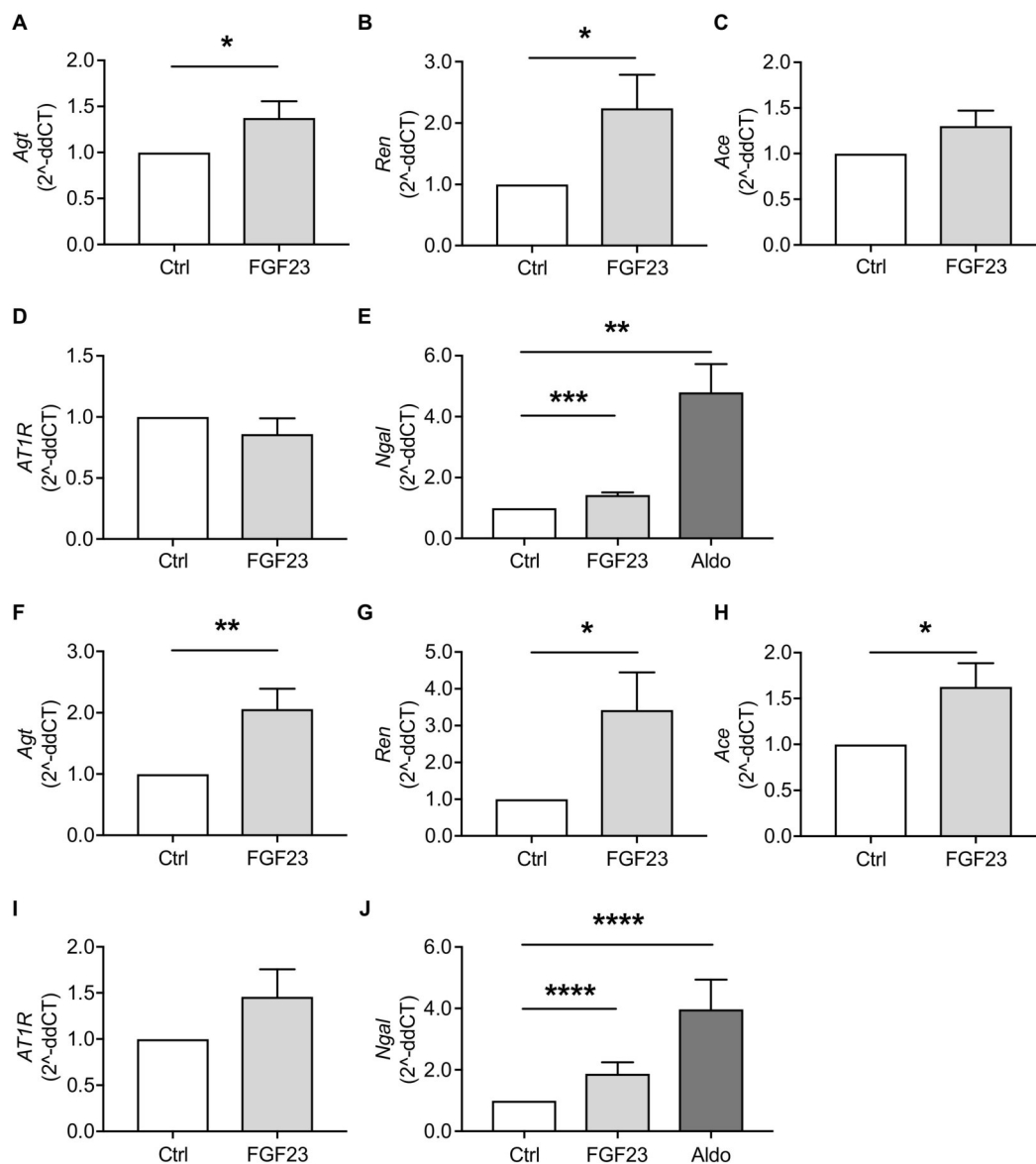
Studies conducted in neonatal rat hearts and autopsied human hearts postulate the presence of endogenous RAAS in the heart [20,35], which contributes to cardiac hypertrophy and diastolic dysfunction [36,37]. Next, we investigated the local expression of RAAS-associated genes in heart tissue of 5/6Nx rats compared to sham and determined whether induction of uremia modulated the activation of RAAS. Cardiac-specific expression of *Agt*, *Ren*, *Ace* and *AT1R* were induced in 5/6Nx rats, although the latter did not reach statistical significance (Figure 2A–D). Remarkably, enhanced cardiac expression of *Agt*, *Ace* and *AT1R* correlated with the degree of LV fibrosis (Figure 2E–G), indicating the interaction of local RAAS activation and fibrotic remodeling in hearts of CKD rats. Interestingly, uremia-induced cardiac *Fgf23* significantly correlated with endogenous *Agt* mRNA expression (Figure 2H) as first parameter of the RAAS pathway. As we have shown previously, cardiomyocyte size, cardiac *Fgf23* synthesis and expression of *Fgfr4* were negatively associated with pNFAT in 5/6Nx rats [11]. In the present study, LV fibrosis did not correlate with *Fgfr4* ( $r = 0.144$ ,  $p = 0.346$ ) and activation of NFAT ( $r = -0.359$ ,  $p = 0.154$ ), indicating that LV fibrosis in 5/6Nx rats was not mediated via FGF23-activated FGFR4/calcineurin/NFAT pathway. Taken together, these in vivo results suggest a direct relationship between FGF23, local RAAS and the progression of LV fibrosis in experimental uremia.



**Figure 2.** Here, 5/6 nephrectomy (5/6Nx) in rats induces cardiac expression of renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)-associated genes that correlates with left ventricular (LV) fibrosis. (A–C) Quantitative real-time PCR analyses in 5/6Nx rats show cardiac-specific induction of angiotensinogen (*Agt*), renin (*Ren*) and angiotensin converting enzyme (*Ace*), while (D) cardiac angiotensin II receptor type 1 (*AT1R*) mRNA expression is not significantly induced. (E–G) Pearson’s correlations of LV fibrosis with cardiac expression of *Agt*, *Ace* and *AT1R*, and (H) of cardiac *Fgf23* with *Agt* mRNA expression. Clear dots, sham-operated rats; black dots, 5/6Nx rats. All values are shown as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ;  $n = 5$ –6 rats per group.

### 2.3. FGF23 Activates Local RAAS in Cardiomyocytes and Cardiac Fibroblasts in vitro by Increasing Expression of *Agt*, *Ren*, *Ace* and *Ngal*

To verify the activation of RAAS, we analyzed the impact of FGF23 on RAAS-associated genes in NRVM and NRCF individually. *Agt*, *Ren*, *Ace* and *AT1R* were all clearly expressed in both cardiac cell types. In NRVM, FGF23 stimulation induced *Agt* and *Ren* (Figure 3A,B) and slightly increased *Ace* expression, although the latter did not reach statistical significance ( $p = 0.0705$ ) (Figure 3C). On the contrary, FGF23 treatment did not alter mRNA expression levels of *AT1R* in NRVM (Figure 3D). However, as an indirect approach to determine FGF23-mediated production of AngII and aldosterone, we quantified the expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (*Ngal*), which is a direct marker for mineralocorticoid receptor (MR) activation [38]. In NRVM, *Ngal* was induced in response to treatments with FGF23 and aldosterone as positive control (Figure 3E).



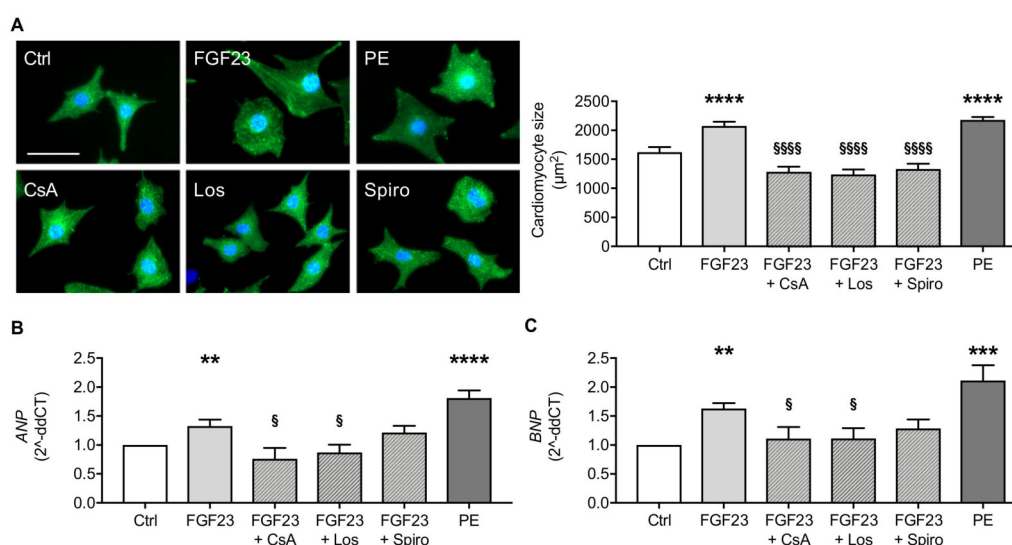
**Figure 3.** FGF23 induces RAAS-associated genes in neonatal rat ventricular myocytes (NRVM) and cardiac fibroblasts (NRCF) in vitro as shown by quantitative real-time PCR. (A–D) In NRVM, FGF23 treatment increases the mRNA expression of angiotensinogen (*Agt*) and renin (*Ren*), whereas the effects of FGF23 on angiotensin converting enzyme (*Ace*) and angiotensin II receptor type 1 (*AT1R*) expression levels are not statistically significant. (E) FGF23 and aldosterone (Aldo) induce the mRNA expression

of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (*Ngal*) in NRVM. (F–I) In NRCE, *Agt*, *Ace* and *Ren* mRNA expressions are enhanced after FGF23 treatment, but FGF23 does not significantly induce *AT1R*. (J) *Ngal* mRNA expression is elevated upon FGF23 and aldosterone stimulation. All values are shown as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  versus control;  $n = 6$ –8 independent cell isolations.

In NRCE, *Agt*, *Ren* and *Ace* were markedly induced by FGF23 (Figure 3F–H). A potential influence of FGF23 on *AT1R* mRNA expression was not statistically significant ( $p = 0.1801$ ; Figure 3I). Nevertheless, consistent with FGF23-mediated effects observed in NRVM, *Ngal* expression in NRCE was stimulated by FGF23 and aldosterone (Figure 3J). In summary, these data affirmed our recent findings on FGF23-enhanced cardiac expression of *Agt* [31] and suggest that FGF23 further stimulates RAAS by induction of *Ren* and *Ace* in cardiomyocytes and cardiac fibroblasts in vitro. Moreover, the elevation of *Ngal* mRNA levels points towards an increased aldosterone activity because of FGF23 treatment in both cardiac cell types.

#### 2.4. FGF23-Induced Hypertrophy in Cultured Cardiomyocytes is Prevented by Cyclosporine A, Losartan and Spironolactone

In order to distinguish between FGF23-mediated cardiac hypertrophy via induction of calcineurin/NFAT pathway or activation of RAAS, we stimulated NRVM with FGF23 in the presence and absence of calcineurin inhibitor cyclosporine A (CsA), angiotensin receptor blocker losartan (Los) and steroidal mineralocorticoid receptor (MR) antagonist spironolactone (Spiro) followed by quantification of cardiomyocyte cell size as demonstrated by fluorescent-labeled sarcomeric  $\alpha$ -actinin staining and expression of prohypertrophic NFAT target genes. In line with previous experimental studies [8,9], FGF23 stimulation resulted in hypertrophic growth of NRVM and induction of atrial natriuretic peptide (*ANP*) and brain natriuretic peptide (*BNP*), well-established markers for cardiac hypertrophy [39], which were inhibited by co-treatment with CsA (Figure 4A–C). Importantly, blockade of  $AT_1R$  by Los and MR by Spiro also prevented FGF23-mediated cardiomyocyte cell hypertrophy to the same extent as CsA (Figure 4A). Moreover, the induction of *ANP* and *BNP* by FGF23 was clearly suppressed in the presence of Los, whereas inhibition of hypertrophic genes by co-treatment with Spiro did not reach statistical significance (Figure 4B,C). Phenylephrine served as positive control for cardiac hypertrophy and induction of *ANP* and *BNP* [40]. Taken together, besides the established activation of calcineurin/NFAT pathway by FGF23, our data suggest a RAAS-mediated signaling cascade of FGF23-induced cardiac hypertrophy.

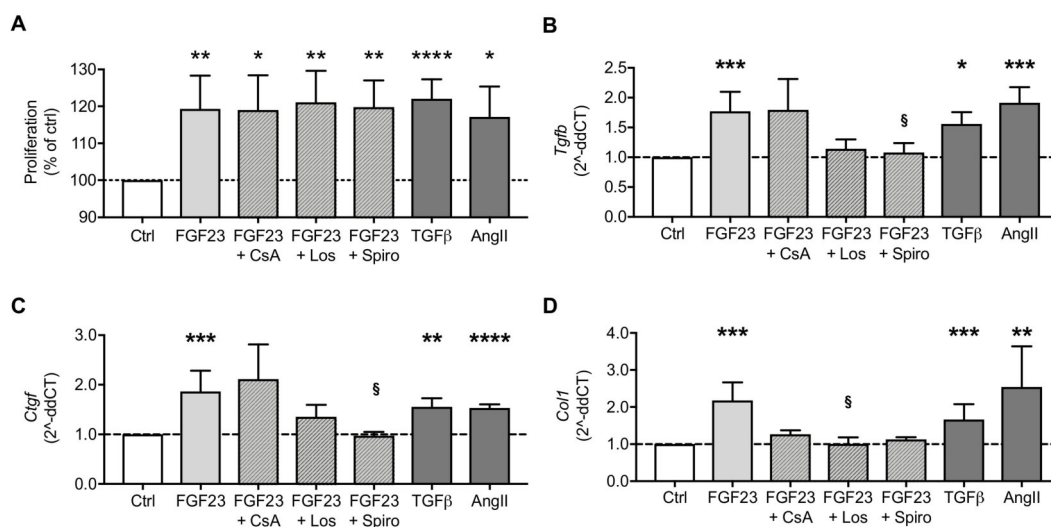


**Figure 4.** FGF23-induced hypertrophy in cultured NRVM is prevented by cyclosporine A (CsA),

losartan (Los) and spironolactone (Spiro). (A) Representative immunofluorescent images of NRVM stained with sarcomeric  $\alpha$ -actinin (green) and DAPI (blue) (scale bar, 50  $\mu$ m), and quantification of NRVM size show significant induction of hypertrophic growth after treatment with FGF23, which is ameliorated by co-treatment with CsA, Los and Spiro. Phenylephrine (PE) served as positive control. (B,C) Quantitative real-time PCR analyses reveal FGF23-mediated increase of mRNA expression of prohypertrophic markers *ANP* and *BNP*, which is inhibited by CsA, Los and Spiro. *Gapdh* served as housekeeping gene. All values are shown as mean  $\pm$  SEM; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  versus control; §  $p < 0.05$ , §§§§  $p < 0.0001$  versus FGF23;  $n = 5-9$  independent cell isolations.

### 2.5. FGF23-Mediated Induction of Profibrotic Markers *TGF $\beta$* , *CTGF* and *Collagen 1* is Attenuated by Inhibition of *AT<sub>1</sub>R* and MR

Due to stress stimuli or cardiac injury, AngII and aldosterone are induced and promote the differentiation of cardiac fibroblasts into activated myofibroblasts [23,41]. Myofibroblasts proliferate and migrate within the cardiac tissue and induce collagen synthesis and extracellular matrix (ECM) remodeling, which finally results in fibrosis and cardiac dysfunction. On the molecular level, AngII binds to *AT<sub>1</sub>R* and induces the expression of ECM proteins, transforming growth factor  $\beta$  (*TGF $\beta$* ) and endothelin-1 among others via activation of different signaling mediators. *TGF $\beta$*  binds to a heterodimer complex of *TGF $\beta$*  receptors and the fibrotic effect is further enhanced [42]. By using fibrosis PCR array analysis, we recently showed that FGF23 stimulated above-mentioned fibrosis-associated factors in NRVM and NRCF [31]. However, it is unclear whether FGF23 induces cardiac fibrosis via calcineurin/NFAT signaling [43] or through activation of RAAS. Thus, we stimulated NRCF with FGF23 in the presence or absence of CsA, Los and Spiro and investigated proliferation, *TGF $\beta$*  and connective tissue growth factor (*CTGF*) induction as key mediators of fibrotic remodeling [42] and collagen (*COL*) production as functional endpoint of fibrosis [44]. *TGF $\beta$*  and AngII served as positive controls for induction of profibrotic markers [23,42] as well as for proliferation of NRCF [45,46]. FGF23 promoted the proliferation of NRCF to the same extent as *TGF $\beta$*  and AngII but FGF23-mediated proliferation was neither suppressed by inhibition of calcineurin nor by Los or Spiro co-treatment (Figure 5A). FGF23 enhanced *Tgfb* and *Ctgf* mRNA levels, which were reduced by pharmacological blockade of *AT<sub>1</sub>R* and MR (Figure 5B,C). However, only the latter reached levels of statistical significance. Interestingly, FGF23-stimulated *Col1* expression was attenuated by inhibition of calcineurin through CsA and blockade of RAAS by co-treatment with Los and Spiro (Figure 5D). These data indicate that FGF23 mediates the induction of fibrotic remodeling mediators mainly through the activation of RAAS followed by AngII and aldosterone synthesis.



**Figure 5.** FGF23 stimulates the proliferation of NRCF and induces the expression of the profibrotic

markers collagen 1 (*Col1*), transforming growth factor beta 1 (*Tgfb*) and connective tissue growth factor (*Ctgf*). (A) The proliferation of NRCF increases in response to stimulation with FGF23, which was not inhibited in the presence of cyclosporine A (CsA), losartan (Los) or spironolactone (Spiro) as demonstrated by MTS-based proliferation assay. (B–D) The mRNA expression of *Tgfb*, *Ctgf* and *Col1* in NRCF is increased upon FGF23 stimulation as measured by quantitative real-time PCR. Co-treatment with Los and Spiro inhibits the induction of fibrotic markers by FGF23, while CsA has lesser effects. TGF $\beta$  and angiotensin II (AngII) served as positive controls. Horizontal dotted lines represent the level of controls. All values are shown as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$  versus control; §  $p < 0.05$  versus FGF23;  $n = 5$ –9 independent cell isolations.

### 3. Discussion

One of the main causes of CVD in CKD are the increased circulating FGF23 levels, which were shown to induce LVH via the calcineurin/NFAT pathway [9,33] and to contribute to cardiac fibrosis through the activation of profibrotic factors [31,34]. In addition, both clinical and experimental research has shown increased activation of systemic RAAS in CKD [47,48], e.g., due to increased sympathetic activity [49] and reduced glomerular filtration rate leading to increased blood volume [50], which might further promote LVH and fibrosis in these patients. Whether a stimulated local RAAS in the heart contributes to CVD in CKD has not yet been extensively investigated. Although, FGF23 is discussed to stimulate RAAS [27,29,31], which may be an alternative mechanism for the progression of FGF23-mediated cardiac pathologies, the underlying molecular mechanisms are not well understood, yet. The present study showed that experimental uremia and FGF23 stimulation induced the activation of cardiac RAAS promoting LVH and cardiac fibrosis, which could be pharmacologically blocked by losartan and spironolactone in vitro. In particular, we showed considerable induction of RAAS genes in heart tissue of 5/6Nx rats, which correlated with the degree of LV fibrosis. Thus, local RAAS activation potentially contributes to the progression of CVD as comorbidity in renal failure. The local induction of RAAS genes in the heart supported recently published data from Beraldo et al. showing enhanced expression of *AGT*, *ACE*, and *AT1R* in heart tissue of 5/6Nx rats [51]. However, the expression levels of all three genes were higher in the present study which might be due to a longer CKD progression (twelve weeks versus eight weeks) and a different 5/6 renal ablation (two-step versus single-step surgery). Our data further complies with findings on increased *Agt* formation and elevated levels of local AngII in hearts of uremic rats and heart failure patients [52,53]. In the present study, cardiac *Fgf23* correlated with *Agt* expression in experimental uremia and FGF23 increased expression of RAAS-associated genes in both NRVM and NRCF in vitro, confirming previous work of our research group [31]. In NRVM and NRCF, FGF23 stimulated *Ren* mRNA most likely by direct effects. However, the increased *Ren* expression in myocardial tissue of 5/6Nx rats might also result indirectly from FGF23-mediated inhibition of active vitamin D synthesis in CKD. FGF23 decreases renal 1,25(OH) $_2$ D $_3$  levels by both promoting its degradation and downregulating its synthesis [29], whereas active vitamin D in turn has been shown to decrease *Ren* mRNA levels in kidney-derived cells in vitro [30], and specifically in the heart of vitamin D receptor knockout mice [54]. Moreover, Freundlich et al. attributed cardioprotective effects of the vitamin D analog paricalcitol to the suppression of cardiac *Agt* and *Ren* expression in 5/6Nx rats [52]. In consideration of FGF23-induced downregulation of vitamin D [29], these findings suggest another molecular mechanism of FGF23-triggered myocardial RAAS activation that promotes LVH. Nevertheless, it has to be further proven whether the FGF23-mediated induction of *Ren* in cardiac cells results from a local downregulation of 1,25(OH) $_2$ D $_3$  synthesis.

Although AT $_1$ R was not regulated on transcriptional level in NRVM and NRCF, *Ngal*, as target of the MR and indirect surrogate marker for aldosterone activity, was significantly induced upon FGF23 stimulation in vitro. These data suggest that FGF23 stimulated the activation of RAAS and thereby, resulting in enhanced AngII and aldosterone synthesis to further trigger cardiac hypertrophy and fibrosis. However, *Ngal* per se also correlates with the progression of CVD in CKD patients [55,56] and mediates cardiac fibrosis in mice after myocardial ischemia [57]. The present study supports these findings by demonstrating a protective role of MR inhibition by spironolactone on FGF23-mediated

hypertrophic growth of NRVM, induction of prohypertrophic genes and fibrosis-associated factors TGF $\beta$ , CTGF and collagen I.

Multiple *in vivo* and *in vitro* studies demonstrated that FGF23-induced LVH is mediated by FGFR4 and successive phospholipase C $\gamma$ /calcineurin/NFAT signaling [8,9,14]. This is further consolidated by the present data on hypertrophic growth of NRVM and induction of fetal NFAT target genes *ANP* and *BNP* in response to FGF23 treatment. Furthermore, our findings confirm that FGF23-induced hypertrophy is prevented by pharmacological inhibition of calcineurin *in vitro*. It was shown in mice and patients that AngII and aldosterone induce LVH through inflammatory processes, which then is attenuated by treatment with angiotensin receptor blocker (ARB) and mineralocorticoid receptor antagonists (MRA), respectively [22,23,25]. Mhatre et al. recently showed that FGF23 and AngII induce a Ca<sup>2+</sup> release from nucleoplasmic Ca<sup>2+</sup> stores in NRVM, which was associated with cellular hypertrophy [58]. In addition, they demonstrated the inhibition of FGF23-induced cellular hypertrophy by losartan. Furthermore, FGF23 stimulation induced intracellular synthesis and secretion of AngII in NRVM [58], indicating that AngII mediates FGF23-triggered hypertrophy *in vitro*. In addition to the findings of Mhatre et al., inhibition of MR and ARB, in the present study, exerted similar protective effects on FGF23-mediated NRVM hypertrophy on cellular and gene expression level. Beyond that, our findings further point to an interaction of FGF23 and activated RAAS in cardiac fibrosis.

Pathological LVH is accompanied by cardiac fibrosis, which is enhanced in patients with CKD [59]. Accordingly, experimental uremia induced by 5/6Nx in rats enhanced LV fibrosis, which correlated with cardiomyocyte size. FGF23-mediated LVH is well documented [8,9,11,14,33], whereas the association to cardiac fibrosis is controversial [31,34]. Recently, FGF23 has been found to promote fibrosis in injury-primed renal fibroblasts through activation of both TGF $\beta$ /Smad and FGFR4/PLC $\gamma$ /calcineurin/NFAT signaling [60,61], and to cause cardiac fibrosis by upregulating  $\beta$ -catenin and TGF $\beta$  *in vitro* and after myocardial infarction *in vivo* [34]. Using a fibrosis RT-PCR array in myocardial tissue of CKD patients on dialysis, *AGT*, TGF $\beta$  receptor/Smad complexes, *TGFB* and *CTGF* were significantly enhanced compared to controls, accompanied with more pronounced interstitial collagen fiber deposition, whereas in NRCF stimulated with FGF23 show no alteration of, *Agt*, *Tgfb* and *Ctgf*. However, FGF23 induced TGF $\beta$  receptor/Smad complexes, collagen synthesis and extracellular matrix remodeling factors *in vitro* [31]. Whether FGF23 induces profibrotic processes in the heart and whether this is mediated via calcineurin/NFAT or additional pathways still remains unclear. Here, enhanced LV fibrosis correlated with both bone and cardiac-specific *Fgf23* expression, implying a causal relation, which was further supported by *in vitro* findings on FGF23-induced *Tgfb*, *Ctgf* and *Col1* expression and proliferation of NRCF. Although, *Col1* was slightly reduced, *Tgfb* and *Ctgf* were not suppressed by inhibition of calcineurin through CsA in NRCF, which is in contrast to FGF23-triggered fibrosis in the kidney via calcineurin/NFAT [61]. Alternatively, our data suggest FGF23 promotes cardiac fibrosis by activating local RAAS, since LV fibrosis of 5/6Nx rats significantly correlated with enhanced cardiac mRNA expression levels of *Agt*, *Ace* and *AT1R*, and FGF23-induced fibrotic processes were prevented by co-treatment with Los and Spiro in NRCF. Both AngII and aldosterone cause myocardial fibrosis in mice, which may be attenuated by ARB and MRA, respectively [22,23,41,50].

The inductions of *AGT*, *REN*, *ACE* and *AT1R* on transcriptional level were shown to be mediated by the transcription factor activator protein 1 (AP-1), e.g., via activation of ERK1/2 [62–65]. In addition, the induction of *AGT* was further linked to activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), glucocorticoid receptor, and CCAAT/enhancer-binding protein beta (CEBP- $\beta$ ) [66]. Interestingly, in atrial fibrillation, FGF23 mediated profibrotic response via Stat3 and Smad pathways in cardiac fibroblasts [67], and CEBP- $\beta$  was significantly upregulated in myocardial tissue of patients on dialysis, which showed enhanced LVH and LV fibrosis [31]. Since FGF23 directly induced genes of RAAS in NRVM and NRCF, specific signaling mediators and transcription factors should be investigated in future studies.

One limitation of the present study is the associative nature of the *in vivo* data. Moreover, the removal of one kidney and the excision of 2/3 of the other kidney cause a large amount of kidney bleeding and infection, which on the one hand, increase the postoperative mortality of the animals, and on the other hand, can induce side effects such as inflammation, which might affect the investigated results. However, the 5/6Nx rat model of CKD is a well-established model of experimental uremia and widely used for several decades. Thereby it was shown that 5/6Nx in rodents shares features with the progression of human CKD, e.g., progressive loss of glomerular filtration rate, glomerulosclerosis, tubulointerstitial fibrosis, and proteinuria [68]. Thus, it is an excellent animal model for the translation to human disease, because 5/6Nx to rats and mice is a good stimulation of renal failure after loss of kidney function in humans [69,70].

Taking all results into account, our findings elucidate clinically observed interactions of elevated FGF23 levels and efficacy of RAAS inhibitors. In the Prevention of Events with Angiotensin Converting Enzyme Inhibition (PEACE) trial, FGF23 levels were associated with increased risk of cardiovascular death or heart failure even when adjusted for renal function and established cardiovascular markers, and, intriguingly, ACE inhibition by trandolapril significantly reduced these risks, but only for patients in the top quartile of FGF23 plasma concentrations [71]. These insights in patients with stable ischemic heart disease were also noticed in heart failure patients, who only benefited from ACE inhibition in case of elevated FGF23 levels [72].

In summary, we demonstrated an activation of endogenous cardiac RAAS in experimental uremia correlating with the progression of LV fibrosis and in response to FGF23 treatment in cardiomyocytes and cardiac fibroblasts *in vitro*. Our data confirm that FGF23-induced hypertrophic growth of cardiomyocytes is mediated by calcineurin/NFAT signaling and support the hypothesis that FGF23-mediated activation of local RAAS in the heart promotes cardiac hypertrophy and fibrosis *in vitro* and *in vivo*. These findings may at least partly explain why increased FGF23 plasma levels are associated with a better response to ACE inhibitor therapy in stable ischemic heart disease and chronic systolic heart failure [71,72].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Animal Experiments

The 5/6 nephrectomy (5/6Nx) and sham operation was performed in each  $n = 6$  male Sprague Dawley rats as described previously [73]. Twelve weeks after surgery, animal weights were recorded, hearts were isolated and weighted, cardiac mid-chamber sections were fixed in 4% paraformaldehyde followed by paraffin-embedding for histological analysis, and residual cardiac tissue was snap-frozen in liquid nitrogen for molecular analysis. All experimental procedures were performed in accordance with the 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 Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei (LALLF) Mecklenburg-Vorpommern (LALLF M-V/TSD/7221.3-1.1-024/06). The description of the rat cohort and the determination of cardiac hypertrophy and FGF23/FGFR4 signaling pathway inducing LVH was published before [11].

### 4.2. Picrosirius Red Staining and Quantification of Myocardial Fibrosis

After deparaffinization in xylene followed by hydration in descending alcohol series, three  $\mu\text{m}$  thick cardiac mid-chamber sections were incubated in picrosirius red solution in 1.2% picric acid. For determination of cardiac fibrosis, five pictures per rat were taken using a 20 $\times$  objective on a Zeiss Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss Microscopy, Goettingen, Germany) and quantification of interstitial collagen fibers were performed with Image J software [74,75].

#### 4.3. Isolation and Culture of Neonatal Rat Ventricular Myocytes (NRVM) and Cardiac Fibroblasts (NRCF)

Cells were isolated from one-day-old neonatal Sprague-Dawley rats by Percoll gradient as described previously [76]. In brief, hearts were extracted and digested in collagenase II (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA) and pancreatin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) solution. Cells were then separated into an upper phase of NRCF and a lower phase of NRVM by centrifugation in Percoll gradient. Then  $6 \times 10^5$  NRVM were seeded on 6 cm cell culture plates coated with 0.5% gelatin in NRVM plating medium including DMEM (Biochrom, Berlin, Germany) with 20% M199 (Pantech Biosolutions, Ruggel, Liechtenstein), 5% fetal bovine serum (FBS) (Serana Europe, Pessin, Germany) and 10% horse serum. Likewise,  $6 \times 10^5$  NRCF were seeded on 6 cm cell culture plates using NRCF plating medium (DMEM with 10% FBS). NRVM were used on the second day after isolation and NRCF were used from passage 1–2.

#### 4.4. Stimulation of Isolated NRVM and NRCF

NRVM and NRCF were starved overnight in DMEM with 20% M199 and DMEM with 1% FBS, respectively. The next day, NRVM and NRCF were stimulated for 48 h with recombinant human FGF23 (NRVM, 100 ng/mL; NRCF, 10 ng/mL; R&D Systems, Wiesbaden, Germany) alone and in combination with 100 nM cyclosporine A (CsA), 1  $\mu$ M losartan (Los) or 10  $\mu$ M spironolactone (Spiro). Angiotensin II (AngII) at 100 nM, aldosterone (Aldo) at 100 nM, transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ ) at 0.5 ng/mL, and phenylephrine (PE) at 20  $\mu$ M (all from Bio-Techne/Tocris, Wiesbaden, Germany) served as positive controls.

#### 4.5. Immunofluorescence Staining and Morphometry of Cultured NRVM

For immunofluorescence-based quantification of NRVM size, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in DPBS and permeabilized by 0.25% Triton X-100. Cells were incubated with mouse monoclonal antibody against sarcomeric  $\alpha$ -actinin at 3  $\mu$ g/mL (EA-53; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) in 2.5% BSA in DPBS for 1 h followed by secondary Cy3-conjugated goat anti-mouse antibody at 2  $\mu$ g/mL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) in 2.5% BSA in DPBS for 30 min. For visualization of nuclei, NRVM were incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole at 200 ng/mL (DAPI; Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) in DPBS for 12 min. Images of NRVM were taken on a Zeiss Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss Microscopy, Goettingen, Germany) with a 20 $\times$  objective. Average cardiomyocyte cell size was quantified by measuring at least 100 cells per group using Carl Zeiss Zen software.

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

For total RNA isolation from cells and rat hearts, the RNeasy Mini Kit was used according to the manufacturer's protocol. 500 ng mRNA was transcribed into cDNA according to the data sheet of the QuantiTect Reverse Transcription Kit. Real-time polymerase chain reaction was run in triplets on a 7900 HT Fast RT-PCR System (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) using the QuantiFAST SYBR Green PCR Kit (all kits from Qiagen, Hilden, Germany). For rat primer sequences see Table 2. Relative gene expression levels of stimulated cells compared to control-treated cells were calculated by the use of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method using SDS Software v2.4 (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) and *Gapdh* served as a housekeeping gene.

#### 4.7. Cell Proliferation Assay

Firstly, 5000 NRCF per well were seeded on a 96-well plate in quadruplicates per group. After stimulation for 48 h, 20  $\mu$ L of MTS-based CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Mannheim, Germany) was added per well and incubated for 4 h followed by measuring the absorbance at 490 nm with a Tecan M200 Infinite Pro 96-well plate reader

(Tecan, Crailsheim, Germany). Values of absorbance were presented as percent proliferation of control cells.

**Table 2.** Rat primer sequences for quantitative real-time PCR analysis.

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Gapdh</i>	ACTCCACGACATACTCAGCAC	CATCAACGACCCCTTCATT
<i>Agt</i>	CAGCAGACTTCTGACTTGGAT	GGATGCTGTGA GAACCTCTCCCA
<i>Ren</i>	AGGATCAGTGCTGAATGGGGTGA	GGTTGTGAATCTCACAGGCAGTGT
<i>Ace</i>	TGCCTAGATCCCAAGGTGACTTTGA	CAACTTCATGGCATCTGCCAGCA
<i>AT1R</i>	GCTCTGCCACATTCCCTGAGTTA	CTTGGGGCAGTCATCTTGGATTCT
<i>Ngal</i>	GATGTTGTTATCCTTGAGGCC	CACTGACTACGACCAGTTTGCC
<i>ANP</i>	AAATCCCGTATACAGTGC	GGAGGCATGACCTCATCTC
<i>BNP</i>	CCAGAACAATCCACGATGC	TCGAAGTCTCTCTGGATCC
<i>Col1</i>	AAGGGTCCTTCTGGAGAACC	TGGAGAGCCAGGGAGACCCA
<i>Tgfb</i>	GCAACAACGCAATCTATGAC	CCCTGTATCCGTCTCCTT
<i>Ctgf</i>	CTGGAAGACACATTTGGCC	CAGAAGGTATTGTCATTGGT

#### 4.8. Statistical Analysis

Values are presented as mean  $\pm$  standard error of mean (SEM) using GraphPad Prism software 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Gaussian's distribution was analyzed by Shapiro Wilk or D'Agostino Pearson test and differences between groups were compared by the use of 2-tailed t-test or Mann–Whitney U test, respectively. Correlation analyses between parameter in sham and 5/6Nx rats were done by Pearson's correlation using SPSS software version 25 (IBM, Armonk, NY, USA). *p* values <0.05 were considered as statistically significant.

**Author Contributions:** I.B. collaborated in project planning, performed NRVM and NRCF cell culture, did quantification of NRVM size, conducted qPCR of NRVM, NRCF and rat heart tissue, analyzed and quantified cardiac fibrosis in rat hearts, analyzed data, and contributed to writing the manuscript. J.L. isolated NRVM and NRCF and performed NRVM and NRCF cell culture, conducted qPCR of NRVM and NRCF, did IF staining and quantification of NRVM size, established and performed proliferation assay, analyzed data, and was a major contributor in writing the manuscript. B.R. established and performed qPCR of RAAS genes in rat heart tissue and analyzed data, edited the manuscript and made linguistic correction. J.D. performed microscopy of rat heart tissue. A.R. and D.-C.F. performed 5/6 nephrectomy on rats. J.H. provided NRVM and NRCF for the first part of the study. D.H. collaborated on project planning, interpreted data, and edited the manuscript. M.L.-N. conceived and coordinated the project, analyzed data, was responsible for statistical analysis, created the figures, and was a major contributor in writing the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Acknowledgments:** The authors thank Laura Hermann for evaluation of LVH in rats as published before [11] and Nour Zeaiter for participating in cell culture, stimulation, harvesting and RNA isolation of NRVM and NRCF.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

- Hill, N.R.; Fatoba, S.T.; Oke, J.L.; Hirst, J.A.; O'Callaghan, C.A.; Lasserson, D.S.; Hobbs, F.D.R. Global Prevalence of Chronic Kidney Disease—A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Thompson, S.; James, M.; Wiebe, N.; Hemmelgarn, B.; Manns, B.; Klarenbach, S.; Tonelli, M. Cause of Death in Patients with Reduced Kidney Function. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2015**, *26*, 2504–2511. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Go, A.S.; Chertow, G.M.; Fan, D.; McCulloch, C.E.; Hsu, C.-Y. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *351*, 1296–1305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Isakova, T.; Wahl, P.; Vargas, G.S.; Gutiérrez, O.M.; Scialla, J.; Xie, H.; Appleby, D.; Nessel, L.; Bellorch, K.; Chen, J.; et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int.* **2011**, *79*, 1370–1378. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pool, L.R.; Wolf, M. FGF23 and Nutritional Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **2017**, *37*, 247–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6. Mitsnefes, M.M.; Betoko, A.; Schneider, M.F.; Salusky, I.B.; Wolf, M.S.; Jüppner, H.; Warady, B.A.; Furth, S.L.; Portale, A.A. FGF23 and Left Ventricular Hypertrophy in Children with CKD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2018**, *13*, 45–52. [[CrossRef](#)]
7. Gutiérrez, O.M.; Januzzi, J.L.; Isakova, T.; Laliberte, K.; Smith, K.; Collerone, G.; Sarwar, A.; Hoffmann, U.; Coglianese, E.; Christenson, R.; et al. Fibroblast growth factor 23 and left ventricular hypertrophy in chronic kidney disease. *Circulation* **2009**, *119*, 2545–2552. [[CrossRef](#)]
8. Faul, C.; Amaral, A.P.; Oskouei, B.; Hu, M.-C.; Sloan, A.; Isakova, T.; Gutiérrez, O.M.; Aguillon-Prada, R.; Lincoln, J.; Hare, J.M.; et al. FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *J. Clin. Invest.* **2011**, *121*, 4393–4408. [[CrossRef](#)]
9. Grabner, A.; Amaral, A.P.; Schramm, K.; Singh, S.; Sloan, A.; Yanucil, C.; Li, J.; Shehadeh, L.A.; Hare, J.M.; David, V.; et al. Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metab.* **2015**, *22*, 1020–1032. [[CrossRef](#)]
10. Richter, M.; Lautze, H.-J.; Walther, T.; Braun, T.; Kostin, S.; Kubin, T. The failing heart is a major source of circulating FGF23 via oncostatin M receptor activation. *J. Heart Lung Transplant.* **2015**, *34*, 1211–1214. [[CrossRef](#)]
11. Leifheit-Nestler, M.; Grabner, A.; Hermann, L.; Richter, B.; Schmitz, K.; Fischer, D.-C.; Yanucil, C.; Faul, C.; Haffner, D. Vitamin D treatment attenuates cardiac FGF23/FGFR4 signaling and hypertrophy in uremic rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* **2017**, *32*, 1493–1503. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Slavic, S.; Ford, K.; Modert, M.; Becirovic, A.; Handschuh, S.; Baierl, A.; Katica, N.; Zeitz, U.; Erben, R.G.; Andrukhova, O. Genetic Ablation of Fgf23 or Klotho Does not Modulate Experimental Heart Hypertrophy Induced by Pressure Overload. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11298. [[CrossRef](#)]
13. Andrukhova, O.; Slavic, S.; Odörfer, K.I.; Erben, R.G. Experimental Myocardial Infarction Upregulates Circulating Fibroblast Growth Factor-23. *J. Bone Miner. Res.* **2015**, *30*, 1831–1839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Leifheit-Nestler, M.; Große Siemer, R.; Flasbart, K.; Richter, B.; Kirchhoff, F.; Ziegler, W.H.; Klintschar, M.; Becker, J.U.; Erbersdobler, A.; Aufricht, C.; et al. Induction of cardiac FGF23/FGFR4 expression is associated with left ventricular hypertrophy in patients with chronic kidney disease. *Nephrol. Dial. Transpl.* **2016**, *31*, 1088–1099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Richter, M.; Polyakova, V.; Gajawada, P. Oncostatin M Induces FGF23 Expression in Cardiomyocytes. *J. Clin. Exp. Cardiol.* **2012**, *9*, 1–6. [[CrossRef](#)]
16. Remuzzi, G.; Perico, N.; Macia, M.; Ruggenenti, P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.* **2005**, S57–S65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Glassock, R.J.; Pecoits-Filho, R.; Barberato, S.H. Left ventricular mass in chronic kidney disease and ESRD. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *4* (Suppl. 1), S79–S91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ames, M.K.; Atkins, C.E.; Pitt, B. The renin-angiotensin-aldosterone system and its suppression. *J. Vet. Intern. Med.* **2019**, *33*, 363–382. [[CrossRef](#)]
19. Paul, M.; Poyan Mehr, A.; Kreutz, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 747–803. [[CrossRef](#)]
20. Dostal, D.E.; Rothblum, K.N.; Chernin, M.I.; Cooper, G.R.; Baker, K.M. Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: A localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart. *Am. J. Physiol.* **1992**, *263*, C838–C850. [[CrossRef](#)]
21. Pi, M.; Ye, R.; Han, X.; Armstrong, B.; Liu, X.; Chen, Y.; Sun, Y.; Quarles, L.D. Cardiovascular Interactions between Fibroblast Growth Factor-23 and Angiotensin II. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 12398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Xu, J.; Carretero, O.A.; Liao, T.-D.; Peng, H.; Shesely, E.G.; Xu, J.; Liu, T.S.; Yang, J.J.; Reudelhuber, T.L.; Yang, X.-P. Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2010**, *299*, H1328–H1338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Sopel, M.J.; Rosin, N.L.; Lee, T.D.G.; Légaré, J.-F. Myocardial fibrosis in response to Angiotensin II is preceded by the recruitment of mesenchymal progenitor cells. *Lab. Invest.* **2011**, *91*, 565–578. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kagiya, S.; Matsumura, K.; Fukuhara, M.; Sakagami, K.; Fujii, K.; Iida, M. Aldosterone-and-salt-induced cardiac fibrosis is independent from angiotensin II type 1a receptor signaling in mice. *Hypertens. Res.* **2007**, *30*, 979–989. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Catena, C.; Colussi, G.; Brosolo, G.; Novello, M.; Sechi, L.A. Aldosterone and Left Ventricular Remodeling. *Horm. Metab. Res.* **2015**, *47*, 981–986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Zhang, B.; Umbach, A.T.; Chen, H.; Yan, J.; Fakhri, H.; Fajol, A.; Salker, M.S.; Spichtig, D.; Daryadel, A.; Wagner, C.A.; et al. Up-regulation of FGF23 release by aldosterone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *470*, 384–390. [[CrossRef](#)]
27. Dai, B.; David, V.; Martin, A.; Huang, J.; Li, H.; Jiao, Y.; Gu, W.; Quarles, L.D. A comparative transcriptome analysis identifying FGF23 regulated genes in the kidney of a mouse CKD model. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e44161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Patel, V.B.; Zhong, J.-C.; Grant, M.B.; Oudit, G.Y. Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. *Circ. Res.* **2016**, *118*, 1313–1326. [[CrossRef](#)]
29. Quarles, L.D. Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: Implications in chronic kidney disease. *Exp. Cell Res.* **2012**, *318*, 1040–1048. [[CrossRef](#)]
30. Yuan, W.; Pan, W.; Kong, J.; Zheng, W.; Szeto, F.L.; Wong, K.E.; Cohen, R.; Klopot, A.; Zhang, Z.; Li, Y.C. 1,25-dihydroxyvitamin D3 suppresses renin gene transcription by blocking the activity of the cyclic AMP response element in the renin gene promoter. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 29821–29830. [[CrossRef](#)]
31. Leifheit-Nestler, M.; Kirchhoff, F.; Nespore, J.; Richter, B.; Soetje, B.; Klintschar, M.; Heineke, J.; Haffner, D. 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.* **2018**, *33*, 1722–1734. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Segall, L.; Nistor, I.; Covic, A. Heart failure in patients with chronic kidney disease: A systematic integrative review. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 937398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Grabner, A.; Schramm, K.; Silswal, N.; Hendrix, M.; Yanucil, C.; Czaya, B.; Singh, S.; Wolf, M.; Hermann, S.; Stypmann, J.; et al. FGF23/FGFR4-mediated left ventricular hypertrophy is reversible. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hao, H.; Li, X.; Li, Q.; Lin, H.; Chen, Z.; Xie, J.; Xuan, W.; Liao, W.; Bin, J.; Huang, X.; et al. FGF23 promotes myocardial fibrosis in mice through activation of  $\beta$ -catenin. *Oncotarget* **2016**, *7*, 64649–64664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Endo-Mochizuki, Y.; Mochizuki, N.; Sawa, H.; Takada, A.; Okamoto, H. Expression of renin and angiotensin-converting enzyme in human hearts. *Heart Vessel.* **1995**, *10*, 285–293. [[CrossRef](#)]
36. Lear, W.; Ruzicka, M.; Leenen, F.H. ACE inhibitors and cardiac ACE mRNA in volume overload-induced cardiac hypertrophy. *Am. J. Physiol.* **1997**, *273*, H641–H646. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Schunkert, H.; Jackson, B.; Tang, S.S.; Schoen, F.J.; Smits, J.F.; Apstein, C.S.; Lorell, B.H. Distribution and functional significance of cardiac angiotensin converting enzyme in hypertrophied rat hearts. *Circulation* **1993**, *87*, 1328–1339. [[CrossRef](#)]
38. Latouche, C.; El Moghrabi, S.; Messaoudi, S.; Nguyen Dinh Cat, A.; Hernandez-Diaz, I.; La Alvarez de Rosa, D.; Perret, C.; López Andrés, N.; Rossignol, P.; Zannad, F.; et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension* **2012**, *59*, 966–972. [[CrossRef](#)]
39. Gardner, D. Natriuretic peptides: Markers or modulators of cardiac hypertrophy? *Trends Endocrinol. Metab.* **2003**, *14*, 411–416. [[CrossRef](#)]
40. Kerkelä, R.; Ulvila, J.; Magga, J. Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events. *J. Am. Heart Assoc.* **2015**, *4*, e002423. [[CrossRef](#)]
41. Lijnen, P.; Petrov, V. Induction of cardiac fibrosis by aldosterone. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2000**, *32*, 865–879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Leask, A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc. Res.* **2007**, *74*, 207–212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Tokudome, T.; Horio, T.; Kishimoto, I.; Soeki, T.; Mori, K.; Kawano, Y.; Kohno, M.; Garbers, D.L.; Nakao, K.; Kangawa, K. Calcineurin-nuclear factor of activated T cells pathway-dependent cardiac remodeling in mice deficient in guanylyl cyclase A, a receptor for atrial and brain natriuretic peptides. *Circulation* **2005**, *111*, 3095–3104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. An, Z.; Yang, G.; Zheng, H.; Nie, W.; Liu, G. Biomarkers in patients with myocardial fibrosis. *Open Life Sci.* **2017**, *12*, 2711. [[CrossRef](#)]
45. Lu, M.; Qin, Q.; Yao, J.; Sun, L.; Qin, X. Induction of LOX by TGF- $\beta$ 1/Smad/AP-1 signaling aggravates rat myocardial fibrosis and heart failure. *IUBMB Life* **2019**, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Olson, E.R.; Naugle, J.E.; Zhang, X.; Bomser, J.A.; Meszaros, J.G. Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2005**, *288*, H1131–H1138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Graciano, M.L.; Cavaglieri, R.d.C.; Dellê, H.; Dominguez, W.V.; Casarini, D.E.; Malheiros, D.M.A.C.; Noronha, I.L. Intrarenal Renin-Angiotensin system is upregulated in experimental model of progressive renal disease induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 1805–1815. [[CrossRef](#)]
48. Del Prete, D.; Gambaro, G.; Lupo, A.; Anglani, F.; Brezzi, B.; Magistroni, R.; Graziotto, R.; Furci, L.; Modena, F.; Bernich, P.; et al. Precocious activation of genes of the renin-angiotensin system and the fibrogenic cascade in IgA glomerulonephritis. *Kidney Int.* **2003**, *64*, 149–159. [[CrossRef](#)]
49. Schlaich, M.P.; Socratous, F.; Hennebry, S.; Eikelis, N.; Lambert, E.A.; Straznicki, N.; Esler, M.D.; Lambert, G.W. Sympathetic activation in chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2009**, *20*, 933–939. [[CrossRef](#)]
50. Tesch, G.H.; Young, M.J. Mineralocorticoid Receptor Signaling as a Therapeutic Target for Renal and Cardiac Fibrosis. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8*, 313. [[CrossRef](#)]
51. Beraldo, J.I.; Benetti, A.; Borges-Júnior, F.A.; Arruda-Júnior, D.F.; Martins, F.L.; Jensen, L.; Dariolli, R.; Shimizu, M.H.; Seguro, A.C.; Luchi, W.M.; et al. Cardioprotection Conferred by Sitagliptin Is Associated with Reduced Cardiac Angiotensin II/Angiotensin-(1-7) Balance in Experimental Chronic Kidney Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Freundlich, M.; Li, Y.C.; Quiroz, Y.; Bravo, Y.; Seeherunvong, W.; Faul, C.; Weisinger, J.R.; Rodriguez-Iturbe, B. Paricalcitol downregulates myocardial renin-angiotensin and fibroblast growth factor expression and attenuates cardiac hypertrophy in uremic rats. *Am. J. Hypertens.* **2014**, *27*, 720–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Wollert, K. The renin–angiotensin system and experimental heart failure. *Cardiovasc. Res.* **1999**, *43*, 838–849. [[CrossRef](#)]
54. Xiang, W.; Kong, J.; Chen, S.; Cao, L.-P.; Qiao, G.; Zheng, W.; Liu, W.; Li, X.; Gardner, D.G.; Li, Y.C. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: Role of the systemic and cardiac renin-angiotensin systems. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **2005**, *288*, e125–e132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Hasegawa, M.; Ishii, J.; Kitagawa, F.; Takahashi, H.; Sugiyama, K.; Tada, M.; Kanayama, K.; Takahashi, K.; Hayashi, H.; Koide, S.; et al. Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Predictor of Cardiovascular Events in Patients with Chronic Kidney Disease. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 8761475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Solak, Y.; Yilmaz, M.I.; Siriopol, D.; Saglam, M.; Unal, H.U.; Yaman, H.; Gok, M.; Cetinkaya, H.; Gaipov, A.; Eyileten, T.; et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin is associated with cardiovascular events in patients with chronic kidney disease. *Int. Urol. Nephrol.* **2015**, *47*, 1993–2001. [[CrossRef](#)]
57. Martínez-Martínez, E.; Buonafina, M.; Boukhalfa, I.; Ibarrola, J.; Fernández-Celis, A.; Kolkhof, P.; Rossignol, P.; Girerd, N.; Mulder, P.; López-Andrés, N.; et al. Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through NFκB Pathway. *Hypertension* **2017**, *70*, 1148–1156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Mhatre, K.N.; Wakula, P.; Klein, O.; Bisping, E.; Völkl, J.; Pieske, B.; Heinzl, F.R. Crosstalk between FGF23- and angiotensin II-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in pathological cardiac hypertrophy. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 4403–4416. [[CrossRef](#)]
59. Zannad, F.; Rossignol, P. Cardiorenal Syndrome Revisited. *Circulation* **2018**, *138*, 929–944. [[CrossRef](#)]
60. Smith, E.R.; Tan, S.-J.; Holt, S.G.; Hewitson, T.D. FGF23 is synthesised locally by renal tubules and activates injury-primed fibroblasts. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 3345. [[CrossRef](#)]
61. Smith, E.R.; Holt, S.G.; Hewitson, T.D. FGF23 activates injury-primed renal fibroblasts via FGFR4-dependent signalling and enhancement of TGF-β autoinduction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2017**, *92*, 63–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Han, M.; Li, A.-Y.; Meng, F.; Dong, L.-H.; Zheng, B.; Hu, H.-J.; Nie, L.; Wen, J.-K. Synergistic co-operation of signal transducer and activator of transcription 5B with activator protein 1 in angiotensin II-induced angiotensinogen gene activation in vascular smooth muscle cells. *FEBS J.* **2009**, *276*, 1720–1728. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

63. Eyries, M.; Agrapart, M.; Alonso, A.; Soubrier, F. Phorbol ester induction of angiotensin-converting enzyme transcription is mediated by Egr-1 and AP-1 in human endothelial cells via ERK1/2 pathway. *Circ. Res.* **2002**, *91*, 899–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Huang, J.; Siragy, H.M. Regulation of (pro)renin receptor expression by glucose-induced mitogen-activated protein kinase, nuclear factor-kappaB, and activator protein-1 signaling pathways. *Endocrinology* **2010**, *151*, 3317–3325. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Liu, D.; Gao, L.; Roy, S.K.; Cornish, K.G.; Zucker, I.H. Neuronal angiotensin II type 1 receptor upregulation in heart failure: Activation of activator protein 1 and Jun N-terminal kinase. *Circ. Res.* **2006**, *99*, 1004–1011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Rana, A.; Jain, S.; Puri, N.; Kaw, M.; Sirianni, N.; Eren, D.; Mopidevi, B.R.; Kumar, A. The transcriptional regulation of the human angiotensinogen gene after high-fat diet is haplotype-dependent: Novel insights into the gene-regulatory networks and implications for human hypertension. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0176373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Dong, Q.; Li, S.; Wang, W.; Han, L.; Xia, Z.; Wu, Y.; Tang, Y.; Li, J.; Cheng, X. FGF23 regulates atrial fibrosis in atrial fibrillation by mediating the STAT3 and SMAD3 pathways. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 19502–19510. [[CrossRef](#)]
68. Hanifa, M.A.; Skott, M.; Maltesen, R.G.; Rasmussen, B.S.; Nielsen, S.; Frøkiaer, J.; Rimg, T.; Wimmer, R. Tissue, urine and blood metabolite signatures of chronic kidney disease in the 5/6 nephrectomy rat model. *Metabolomics* **2019**, *15*, 112. [[CrossRef](#)]
69. Ma, L.J.; Fogo, A.B. Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: Importance of genetic background. *Kidney Int.* **2003**, *64*, 350–355. [[CrossRef](#)]
70. Lim, B.J.; Yang, H.C.; Fogo, A.B. Animal models of regression/progression of kidney disease. *Drug Discov. Today Dis. Models* **2014**, *11*, 45–51. [[CrossRef](#)]
71. Udell, J.A.; Morrow, D.A.; Jarolim, P.; Sloan, S.; Hoffman, E.B.; O'Donnell, T.F.; Vora, A.N.; Omland, T.; Solomon, S.D.; Pfeffer, M.A.; et al. Fibroblast growth factor-23, cardiovascular prognosis, and benefit of angiotensin-converting enzyme inhibition in stable ischemic heart disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2014**, *63*, 2421–2428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Wohlfahrt, P.; Melenovsky, V.; Kotrc, M.; Benes, J.; Jabor, A.; Franekova, J.; Lemaire, S.; Kautzner, J.; Jarolim, P. Association of Fibroblast Growth Factor-23 Levels and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Chronic Systolic Heart Failure. *JACC Heart Fail.* **2015**, *3*, 829–839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Haffner, D.; Hoher, B.; Müller, D.; Simon, K.; König, K.; Richter, C.-M.; Eggert, B.; Schwarz, J.; Godes, M.; Nissel, R.; et al. Systemic cardiovascular disease in uremic rats induced by 1,25(OH)2D3. *J. Hypertens.* **2005**, *23*, 1067–1075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I.; Frise, E.; Kaynig, V.; Longair, M.; Pietzsch, T.; Preibisch, S.; Rueden, C.; Saalfeld, S.; Schmid, B.; et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 676–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Rueden, C.T.; Schindelin, J.; Hiner, M.C.; DeZonia, B.E.; Walter, A.E.; Arena, E.T.; Eliceiri, K.W. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinform.* **2017**, *18*, 529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Wollert, K.C.; Taga, T.; Saito, M.; Narazaki, M.; Kishimoto, T.; Glembotski, C.C.; Vernallis, A.B.; Heath, J.K.; Pennica, D.; Wood, W.I.; et al. Cardiotrophin-1 activates a distinct form of cardiac muscle cell hypertrophy. Assembly of sarcomeric units in series VIA gp130/leukemia inhibitory factor receptor-dependent pathways. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9535–9545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## 4. Ergebnisse und Diskussion

Die im Folgenden kursiv geschriebenen Angaben von Abbildungen und Tabellen beziehen sich auf die Daten in der Publikation.

Bei Patienten mit CKD liegen stark erhöhte FGF23-Serumspiegel vor,<sup>28</sup> die mit der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen, LVH und Fibrose des Herzens assoziiert sind.<sup>8,24</sup> Das chronische renokardiale Syndrom, auch kardioresnales Syndrom Typ 4, führt durch Flüssigkeitsüberschuss zu erhöhter Vor- und Nachlast, zu kardialem Remodeling, LVH und zahlreichen weiteren pathologischen Veränderungen von Herz und Niere.<sup>15</sup> Die chronische Aktivierung des RAAS bei CKD<sup>38</sup> trägt zur Entwicklung der kardialen Hypertrophie und Fibrose bei.<sup>40,67</sup> Zusätzlich zum systemischen RAAS existiert im Herzen ein lokales RAAS<sup>51-53</sup>, jedoch wurden bisher noch nicht alle Komponenten dessen in den einzelnen Zelltypen des Herzens untersucht. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich in PCR-Array-Analysen eine verstärkte Expression von *Agt* in NRVM nach FGF23-Stimulation zeigen.<sup>54</sup> Parallel fanden Mhatre et al. Hinweise dafür, dass FGF23 über Ang II zur Hypertrophie von NRVM führt.<sup>68</sup> In dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob FGF23 zusätzlich zum bekannten Signalweg über Calcineurin/NFAT auch über eine Aktivierung des intrakardialen RAAS eine kardiale Hypertrophie auslöst.

### 4.1 FGF23 führt in 5/6Nx-Ratten über die Calcineurin/NFAT-Signalkaskade zur kardialen Hypertrophie

Wie zuvor beschrieben,<sup>36</sup> zeigten die 5/6Nx-Ratten 10 Wochen nach Urämiebeginn ein erhöhtes relatives Herzgewicht, vergrößerte Kardiomyozyten, eine erhöhte mRNA-Expression von *Fgf23* in Herz- und Knochengewebe sowie eine verringerte Phosphorylierung von NFAT, was auf eine Aktivierung des Calcineurin/NFAT-Signalwegs durch die Urämie hinweist (*Tabelle 1*). Dabei korrelierte die Größe der Kardiomyozyten mit der Expression von *Fgf23* im Herzgewebe, was auf FGF23 als Auslöser der kardialen Hypertrophie bei stark verringerter Nierenfunktion hindeutet. Zusätzlich zur LVH entwickelten die 5/6Nx-Ratten eine linksventrikuläre Fibrose, die mit der *Fgf23*-Expression in Herz und Knochen und der Kardiomyozytengröße korrelierte (*Abbildung 1*). Letzteres deutet darauf hin, dass es sich bei der vorliegenden LVH um eine pathologische Hypertrophie handelt und nicht um eine Anpassung an

physiologische Stimuli, wie etwa vermehrte körperliche Aktivität.<sup>69</sup> Auch und gerade bei Patienten mit CKD tritt das fibrotische Remodeling zeitgleich mit der LVH auf.<sup>70</sup> Die Korrelation der *Fgf23*-Expression in Herz und Knochen mit der linksventrikulären Fibrose deutet darauf hin, dass ein bisher kontrovers diskutierter Zusammenhang zwischen FGF23 und der Entwicklung einer kardialen Fibrose<sup>54,71</sup> bestehen könnte.

#### 4.2 Die intrakardiale Expression von *Agt*, *Ren*, *Ace* und *AT1R* ist bei Ratten nach 5/6-Nephrektomie erhöht und korreliert mit der Ausbildung der linksventrikulären Fibrose

Um unserer Hypothese, dass FGF23 auch über eine Aktivierung des kardialen RAAS zur LVH führt, nachzugehen, bestimmten wir die Expression von *Agt*, *Ren*, *Ace* und *AT1R* im Herzgewebe der 5/6Nx-Ratten im Vergleich zu den Sham-operierten Kontrolltieren. Die intrakardiale Expression der vier Faktoren des RAAS war in allen Tieren nachweisbar, wobei die mRNA-Level von *Agt*, *Ren* und *Ace* in den urämischen Ratten signifikant höher waren als in der korrespondierenden Sham-Gruppe (*Abbildung 2A-C*). Die Expression von *AT1R* stieg in den 5/6Nx-Ratten ebenfalls an, verpasste mit  $p=0,0566$  die statistische Signifikanz allerdings knapp (*Abbildung 2D*). Diese Daten passen zu einer kurz von unserer Arbeit veröffentlichten Studie von Beraldo et al., die ebenfalls eine LVH und kardiale Fibrose sowie eine erhöhte mRNA-Expression von *Agt*, *Ace* und *AT1R* im Herzgewebe von 5/6Nx-Ratten acht Wochen nach Induktion der Urämie zeigen konnten.<sup>50</sup> Einen Bezug zur FGF23-Synthese in den urämischen Ratten stellten Beraldo et al. dabei nicht her. Die Induktion von *Agt*, *Ace* und *AT1R* nach 5/6-Nephrektomie korrelierte in unserer Studie mit dem Grad der linksventrikulären Fibrose (*Abbildung 2E-G*) und die *Fgf23*-Expression im Herzgewebe korrelierte mit der mRNA-Expression von *Agt* (*Abbildung 2H*). Diese Daten deuten darauf hin, dass das kardiale FGF23 Einfluss auf die Induktion des Ausgangspunktes des RAAS hat und so zur Ausbildung eines pathologischen Herzphänotyps beitragen kann. Dies bestätigt die Daten einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe, in der eine erhöhte *AGT*-Expression im Herzgewebe von CKD-Patienten sowie in FGF23-stimulierten NRVM gezeigt wurde.<sup>54</sup>

Die Erhöhung der *Ren*-Expression in den Herzen der urämischen Tiere kann neben einer direkten Stimulation durch FGF23 auch dadurch bedingt sein, dass die Hemmung von Renin durch das in der Urämie reduzierte Vitamin D<sup>58</sup> verringert wird.

Eine erhöhte Konzentration von FGF23 kann so indirekt zur Aktivierung des RAAS und damit zur Entstehung einer LVH und Fibrose führen. Diese Theorie wird davon unterstützt, dass Paricalcitol, ein Agonist des Vitamin D-Rezeptors, in 5/6Nx-Ratten sowie CKD-Patienten die Urämie-bedingte kardiale Hypertrophie verringert.<sup>72</sup>

#### 4.3 *Agt, Ren, Ace* und *AT1R* werden in NRVM und NRCF exprimiert und teilweise durch FGF23-Stimulation induziert

Zur Verifizierung der FGF23-induzierten pathologischen Hypertrophie in Hinblick auf die Beteiligung eines intrakardialen RAAS ohne im Rattenmodell eventuell vorliegende systemische Confounder führten wir *in vitro*-Studien mit NRVM und NRCF durch. In beiden Zelltypen konnten wir die Expression von *Agt, Ren, Ace* und *AT1R* nachweisen (*Abbildung 3A-D und F-I*). Die Expression von *Agt* und *Ren* in NRVM und NRCF ist vorbeschrieben,<sup>52</sup> *ACE* und *AT1R* wurden bisher in Herzgewebe von Mensch und Ratte nachgewiesen,<sup>53</sup> nicht jedoch in isolierten Herzzelltypen. Somit konnten wir die Existenz eines lokalen kardialen RAAS bestätigen und um das Vorkommen in unterschiedlichen kardialen Zelltypen ergänzen.

Die Expression von *Agt* und *Ren* stieg unter Stimulation mit rFGF23 in beiden Zelltypen an (*Abbildung 3 A-B und F-G*). Die erhöhte Expression von *Agt* in NRVM nach FGF23-Stimulation wurde von unserer Arbeitsgruppe zuvor schon beschrieben.<sup>54</sup> Unsere Beobachtungen, dass außerdem die Expression von *Ren* ansteigt und beide Gene auch in NRCF durch FGF23 induziert werden, sind hingegen neu. Zudem zeigte sich in NRCF eine Induktion der *Ace*-Expression (*Abbildung 3H*). Auch wenn die mRNA-Expression des *AT1R* in NRVM und NRCF durch die Behandlung mit rFGF23 unverändert blieb (*Abbildung 3D und I*), konnten wir eine Induktion von *Ngal* nachweisen (*Abbildung 3E und J*). Das Neutrophilengelatinase-assoziierte Lipocalin (NGAL) ist ein Glycoprotein, das von neutrophilen Granulozyten als Reaktion auf Inflammation freigesetzt wird.<sup>73,74</sup> Da NGAL auch durch eine vermehrte Aldosteronsynthese von neutrophilen Granulozyten ausgeschüttet wird, gilt es als Marker für die Aktivität des Mineralokortikoidrezeptors (MR).<sup>75</sup> So liegt im Herzgewebe von doppelt-transgenen Mäusen mit einer Kardiomyozyten-spezifischen MR-Überexpression und von Wildtyp-Mäusen nach Gabe von Aldosteron sowie in Aldosteron-stimulierten klonalen Kardiomyozyten von Ratten-Embryonen eine erhöhte Expression von *Ngal* vor.<sup>76</sup>

Zusammenfassend zeigen unsere *in vitro*-Daten aus den NRVM und NRCF eine FGF23-vermittelte Induktion der RAAS-Komponenten und deuten auf eine erhöhte Aldosteronaktivität hin. Daraus lässt sich schließen, dass die erhöhte kardiale und ossäre Synthese von FGF23 auch im Tiermodell der experimentellen Urämie eine vermehrte Aktivierung des intrakardialen RAAS bedingen könnte.

#### 4.4 FGF23 führt durch die Aktivierung des intrakardialen RAAS zum hypertrophen Wachstum von NRVM *in vitro*

Um den Einfluss der FGF23-vermittelten Aktivierung des intrakardialen RAAS im Vergleich zum Calcineurin/NFAT-Signalweg bewerten zu können, führten wir in NRVM Kostimulationen mit rFGF23 und CsA, dem Angiotensin-Rezeptorblocker (ARB) Losartan sowie dem MR-Blocker Spironolacton durch. Wie bereits in experimentellen Studien vorbeschrieben,<sup>23,24</sup> führte die Stimulation der NRVM mit rFGF23 zu einem hypertrophen Wachstum der Kardiomyozyten und einer gesteigerten Expression der prohypertrophen Marker *ANP* und *BNP*. Beides konnte durch Kostimulation von rFGF23 mit CsA gehemmt werden (*Abbildung 4A-C*). Die Kostimulation mit Losartan konnte sowohl das FGF23-induzierte hypertrophe Zellwachstum als auch die gesteigerte *ANP*- und *BNP*-Expression der NRVM in gleichem Ausmaß wie CsA hemmen. Auffällig war, dass die Kostimulation mit Spironolacton das hypertrophe Wachstum durch FGF23 ebenfalls unterdrücken konnte, während sie auf die Expression der hypertrophen Marker keinen statistisch signifikanten Einfluss hatte (*Abbildung 4A-C*). Diese Ergebnisse bestätigen unsere Forschungshypothese, dass FGF23 abgesehen vom gut beschriebenen Calcineurin/NFAT-Signalweg auch über die Aktivierung des intrakardialen RAAS eine kardiale Hypertrophie auslösen kann. Die Aktivierung des lokalen RAAS im Herzgewebe könnte demnach auch zur Ausbildung kardiovaskulärer Erkrankungen bei CKD beitragen. Die Hemmung der kardialen Hypertrophie durch Spironolacton *in vitro* unterstreicht die zuvor beschriebene Korrelation von NGAL mit dem kardialen Remodeling nach Myokardinfarkt in Wildtyp-Mäusen, die Korrelation zwischen erhöhtem Serum-NGAL und einer reduzierten Ejektionsfraktion des linken Ventrikels bei Patienten mit stattgehabtem Myokardinfarkt<sup>77</sup> sowie die Assoziation von erhöhtem NGAL im Plasma mit dem gehäuftten Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen bei Patienten mit CKD.<sup>78</sup> Ob der ARB Losartan im Gegensatz zu Spironolacton die FGF23-induzierte

Expression prohypertropher Gene effektiver reduzieren kann, weil es die Wirkung von Ang II vermindert, Aldosteron weniger freigesetzt wird und der Ansatzpunkt nicht wie bei Spironolacton erst am MR liegt, muss in folgenden Studien genauer untersucht werden. Die Ergebnisse von Mhatre et al., die eine Verbindung der FGF23-induzierten Hypertrophie mit einer erhöhten Produktion und Sekretion von Ang II statuieren,<sup>68</sup> würden diese Hypothese unterstützen. Sie zeigten in NRVM, dass sowohl Ang II als auch FGF23 über eine erhöhte Calcium-Freisetzung aus dem nukleoplasmatischen Calcium-Speicher eine kardiale Hypertrophie induzieren, die mit Losartan geblockt werden konnte.

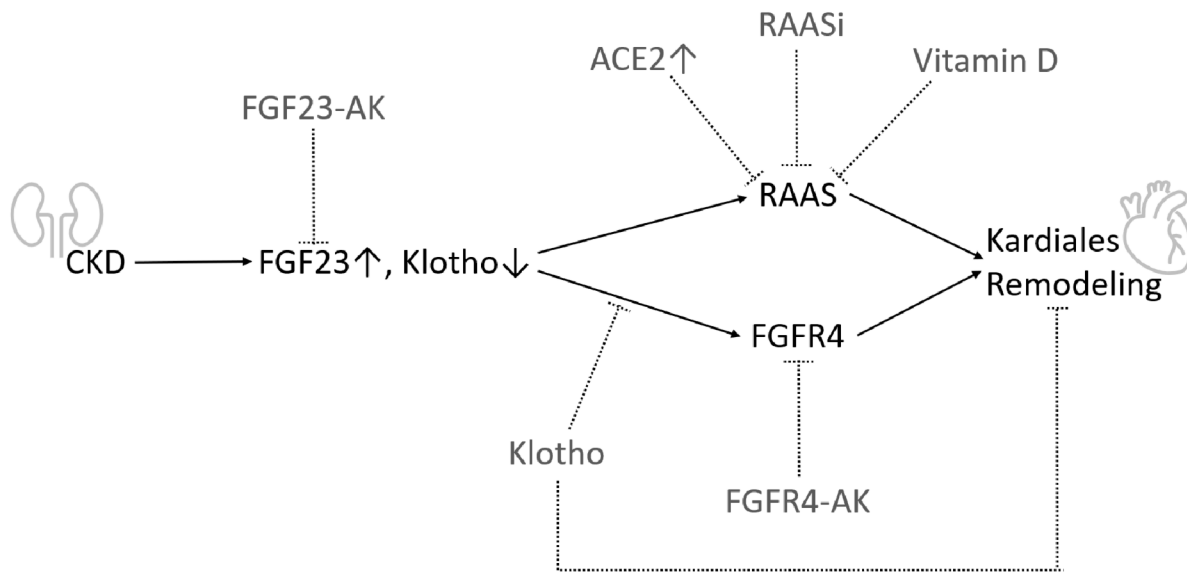
#### 4.5 Neue Erkenntnisse unserer Studie

Wir konnten in dieser Arbeit erstmalig die vollständige Existenz eines lokalen kardialen RAAS mit den Komponenten Agt, Ren, ACE und AT1R im Rattenherzgewebe *in vivo* sowie in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten neonataler Ratten *in vitro* zeigen. Des Weiteren ist das intrakardiale RAAS sowohl nach experimenteller Urämie in der Ratte als auch durch Stimulation mit rFGF23 in NRVM und NRCF erhöht und kann zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie beitragen. Unsere Daten deuten darauf hin, dass die Hemmung des FGF23-induzierten intrakardialen RAAS durch ARB und MR-Antagonisten den gleichen antihypertrophen Effekt zeigt wie der Einsatz von Calcineurin-Inhibitoren. Zusammenfassend wird damit unsere Forschungshypothese bestätigt, dass FGF23 nicht nur über den Calcineurin/NFAT-Signalweg, sondern auch über die Aktivierung des intrakardialen RAAS eine kardiale Hypertrophie begünstigt, wodurch sich ein weiterer möglicher Ansatzpunkt einer Therapie oder Prophylaxe der LVH bei CKD ergibt.

#### 4.6 Therapiemöglichkeiten der FGF23-ausgelösten kardiovaskulären Erkrankungen bei CKD

Erhöhte FGF23-Plasmaspiegel korrelieren mit einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und Herzinsuffizienz bei Patienten mit und ohne CKD.<sup>7,13</sup> Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom ist die FGF23-Plasmakonzentration mit dem Risiko erneuter kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert.<sup>79</sup> Wie in Abbildung 6

gezeigt, gibt es einige denkbare therapeutische Optionen der FGF23-vermittelten hypertrophen Signalkaskade.



**Abbildung 6.** Darstellung möglicher therapeutischer Optionen, um ein FGF23-induziertes kardiales Remodeling bei CKD zu verringern oder dem vorzubeugen. Die verschiedenen Ansätze werden im folgenden Text genauer beschrieben und ihre Wirksamkeit diskutiert. AK=Antikörper.

#### 4.6.1 Direkte Inhibition von FGF23

Die globale Inhibition von FGF23, die mittels Burosumab bei erwachsenen und pädiatrischen Patienten mit X-linked Hypophosphatämie gute Therapieergebnisse zeigt,<sup>80</sup> ist zur Linderung der LVH bei Patienten mit milder bis moderater CKD keine Option. Die Hemmung von FGF23 mit neutralisierenden Antikörpern im urämischen Rattenmodell reduzierte zwar den CKD-assoziierten Hyperparathyreoidismus, allerdings konnte die Antikörper-Behandlung die Urämie-induzierte LVH sowie hämodynamische Parameter nicht verbessern und die behandelten Tiere zeigten eine erhöhte Mortalität bei erhöhtem Serum-Phosphat und Kalzifizierung der Aorta.<sup>81</sup> Studien mit Inhibitoren von oder Antikörpern gegen FGF23 wurden mit CKD-Patienten noch nicht durchgeführt. Bei Patienten unter Dialysetherapie könnten die Hyperphosphatämie und die Gefäßkalzifizierung durch die Ultrafiltration von Phosphat mittels Dialyse geringer ausfallen und die protektiven Effekte einer Behandlung mit FGF23-Antikörpern überwiegen. Klinische Studien zu dieser Hypothese stehen noch aus und ein Tiermodell der Dialyse, das die Ultrafiltration umfasst, wurde noch nicht entwickelt.

Eine Hemmung aller FGFRs mittels Pan-FGFR-Antikörper führte in urämischen Ratten und der Zellkultur zur Reduktion der LVH.<sup>24</sup> In Ratten mit einer normalen Nierenfunktion löste die Pan-FGFR-Inhibition allerdings eine Hyperphosphatämie, die Kalzifizierung von Weichteilgewebe und eine kardiovaskuläre Dysfunktion aus.<sup>82</sup> Eine Inhibition des spezifischen FGF23-Rezeptors auf Kardiomyozyten, des FGFR4, verhindert im Tiermodell mit urämischen Ratten sowie in zellkulturellen Versuchen mit NRVM die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie.<sup>23</sup> Ein FGFR4-Inhibitor, der gerade in einer Phase I/II-Studie an Patienten mit Leberzellkarzinom untersucht wird, zeigte eine gute Verträglichkeit.<sup>83</sup> Studien zur Wirksamkeit von FGFR-Inhibitoren bei CKD-Patienten wurden noch nicht durchgeführt.

#### 4.6.2 RAAS-Inhibitoren

Die Ergebnisse unserer Studie stellen eine mögliche molekulare Erklärung für den klinisch beobachteten Zusammenhang von erhöhten FGF23-Konzentrationen und der Effektivität von RAAS-Inhibitoren dar. Erhöhte zirkulierende FGF23-Spiegel sind mit dem Risiko für kardiovaskuläres Versterben und Herzinsuffizienz bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (KHK) assoziiert und eine Behandlung mit ACE-Inhibitoren reduziert diese Risiken nur signifikant bei Patienten mit FGF23-Plasmakonzentrationen im obersten Quartil.<sup>84</sup> In einer weiteren Studie profitierten Patienten mit einer Herzinsuffizienz besonders dann von der Medikation mit ACE-Hemmern, wenn bei ihnen eine hohe FGF23-Konzentration vorlag.<sup>85</sup> Aus der Zusammenschau dieser Daten und unserer Studienergebnisse kann geschlossen werden, dass die Hemmung des RAAS die kardiovaskulären Risiken besonders effektiv bei Patienten mit hohen FGF23-Werten senken könnte, da diese zusätzlich zur Aktivierung des systemischen RAAS eine verstärkte FGF23-vermittelte Induktion des intrakardialen RAAS aufweisen, das synergistisch zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Fibrose beiträgt.

Die Daten zur Wirksamkeit von RAAS-Inhibitoren bezüglich kardiovaskulärer Dysfunktion bei CKD sind nicht eindeutig. Die Behandlung von urämischen Mäusen mit einem ACE-Hemmer führte zu einem rückläufigen kardialen Remodeling.<sup>86</sup> Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz zeigten unter Einnahme eines ACE-Hemmers den Trend zu weniger kardiovaskulären Events ohne eine Hyperkaliämie zu entwickeln.<sup>87</sup> In einer weiteren Studie mit CKD-Patienten unterschiedlicher Stadien

traten weniger renale und kardiovaskuläre Events unter Gabe von ACE-Inhibitoren oder AT1R-Blockern auf und ACE-Inhibitoren führten zusätzlich zu einer geringeren Gesamtmortalität.<sup>88</sup> In einer weiteren Studie mit CKD-Patienten im Stadium 3 zeigte die Gabe von ACE-Hemmern allerdings keinen Einfluss auf die Gesamtmortalität oder das Auftreten kardiovaskulärer Events.<sup>89</sup> Auch die Kombination von Aldosteron-Antagonisten mit ACE-Hemmern oder ARB wies keinen Vorteil bezüglich kardiovaskulärer Events, Nierenversagen oder Mortalität auf. Die Kombinationstherapie konnte zwar eine Proteinurie und den systolischen Blutdruck verringern, führte aber zu erhöhten Risiken für die Entwicklung einer Hyperkaliämie und eines akuten Nierenversagens sowie zu erhöhten Phosphat-Spiegeln.<sup>90</sup> Eine Metaanalyse zur pharmakologischen Behandlung der Herzinsuffizienz bei Patienten mit Herzinsuffizienz und CKD ergab unsichere Effekte von ACE-Hemmern und ARB auf die Mortalität und Hospitalisationsrate der Patienten, allerdings ohne Berücksichtigung der CKD-Stadien oder FGF23-Spiegel.<sup>91</sup>

#### 4.6.3 Induktion der ACE2-Achse des RAAS

Neue therapeutische Ansätze der Hypertonie-Behandlung sind der Einsatz von Ang 1-7 oder ACE2-Aktivatoren. Die Behandlung mit Ang 1-7 hatte im Tiermodell bei Ratten und Mäusen eine antihypertensive kardioprotektive Wirkung.<sup>92</sup> Der Einsatz des ACE2-Aktivators Diminazenaceturat führte bei Ratten nach einem Myokardinfarkt zu reduziertem kardialen Remodeling, hatte allerdings keinen Einfluss auf die Hypertrophie der Kardiomyozyten.<sup>93</sup> Im CKD-Mausmodell führten hohe FGF23-Spiegel zur Inhibition von ACE2 und aktivierten so indirekt das RAAS.<sup>60</sup> Die Therapie mit ACE2-Aktivatoren könnte demnach auch der pathologischen LVH bei CKD-Patienten entgegenwirken, da damit ein Signalweg der FGF23-vermittelten kardialen Hypertrophie in seinen Anfängen gehemmt würde. Inwiefern die Steigerung der katalytischen Aktivität von ACE2 allerdings überhaupt zur Reduktion der Hauptachse des RAAS beitragen kann, muss in weiteren Studien genauer geklärt werden.

Potenzielle Nebenwirkungen dürfen dabei nicht außer Acht gelassen werden. Ein aktuelles Beispiel, wie es zu Nebenwirkungen einer Therapie mit ACE2 kommen könnte, ist der Infektionsweg des *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2), das ausgehend von einem Lebensmittelmarkt in Wuhan in China Ende des Jahres 2019 zu einer weltweiten Pandemie führte. Dabei dient

membrangebundenes ACE2 als Eintrittsweg für SARS-CoV-2 in die Wirtszelle,<sup>94,95</sup> genauso wie für SARS-CoV, das 2003 eine Pandemie auslöste.<sup>96</sup> Transgene Mäuse mit einer Überexpression von humanem ACE2 zeigten einen schwereren Krankheitsverlauf bei Infektion mit SARS-CoV als Wildtyp-Mäuse<sup>97</sup> und ein Anti-ACE2-Antikörper führte in der Zellkultur zur Hemmung der viralen Replikation von SARS-CoV.<sup>96</sup> Auch SARS-CoV-2 konnte in transgenen Mäusen mit humanem ACE2 eine schwere Infektion auslösen.<sup>98</sup> Umgekehrt zeigte sich in SARS-CoV-infizierten Mäusen eine reduzierte Expression von ACE2, die zur verstärkten Lungenschädigung führte.<sup>99</sup> In der Zellkultur mit Vero-Zellen sowie in Nieren- und Blutgefäß-Organoiden führte die Zugabe von rekombinantem löslichem ACE2 zu einer reduzierten Vermehrung von SARS-CoV-2.<sup>100</sup> Eine protektive Wirkung von löslichem ACE2 scheint im Beispiel von SARS-CoV und SARS-CoV-2 also dennoch möglich. Da die paradoxen Wirkungen von ACE2 bei einer Infektion allerdings noch nicht abschließend geklärt sind, müssen eventuelle Wechselwirkungen einer ACE2-Therapie mit Virusinfektionen berücksichtigt werden.

#### 4.6.4 Therapieoptionen mittels indirekter RAAS-Hemmung: Vitamin D und Klotho

Einen weiteren therapeutischen Ansatz des erhöhten Risikos kardialer Erkrankungen bei CKD könnte die medikamentöse Gabe von aktivem Vitamin D, das indirekt über die Hemmung von Renin inhibierend auf das RAAS wirkt, darstellen. In 5/6Nx-Ratten zeigte sich nach Calcitriol-Gabe eine supprimierte intrakardiale Expression von RAAS-Genen, eine verminderte LVH mit reduzierter kardialer Fibrose und eine normalisierte renale Expression von *Klotho*. Letzteres allerdings nur nach hochdosierter Calcitriol-Gabe über zehn Wochen.<sup>36,101</sup> Auch die Gabe von Paricalcitol, einem Analogon der aktiven Form von Vitamin D<sub>2</sub>, führte bei urämischen Ratten zur geringeren kardialen Expression von *Agt* und *AT1R*.<sup>72</sup> Bei Patienten mit einem primären Hyperaldosteronismus führte die Medikation mit Calcitriol zu verringerten Plasmakonzentrationen von Aldosteron.<sup>102</sup> Bei einer pädiatrischen Patientin mit Rachitis Typ 1 normalisierten sich die zuvor erhöhten RAAS-Komponenten im Plasma unter Calcitriol-Gabe und die Patientin entwickelte bis zum 12. Lebensjahr keine LVH, was auf eine kardioprotektive Wirkung von Calcitriol durch die RAAS-Inhibition schließen lässt.<sup>103</sup> In zwei Metaanalysen randomisierter kontrollierter Studien mit CKD-Patienten der Stadien 2-5 führte die Einnahme von Paricalcitol zu weniger

kardiovaskulären Events. Allerdings verbesserte sich die pathologische Herzstruktur durch die Einnahme von Paricalcitol nicht und das Risiko einer Hyperkalzämie stellte einen limitierenden Faktor der Therapie dar.<sup>104,105</sup> In einer aktuellen randomisierten kontrollierten Studie mit pädiatrischen CKD-Patienten führte die Therapie mit Calcitriol zu keiner Verbesserung der bestehenden LVH und der verringerten Klotho-Serumspiegel.<sup>101</sup>

Die Daten zur möglichen Kardioprotektion durch Vitamin D bleiben kontrovers. Aus welchen Gründen die Daten aus Zellkultur- und Tierversuchen experimenteller Urämie den klinischen Studien bei CKD-Patienten widersprechen, ist bis dato ungeklärt. Eventuell könnten eine nebenwirkungsbedingte Dosisbegrenzung und eine fortgeschrittenere CKD in den Patienten-Studien Gründe für diese Unterschiede sein.

Das membranständige Klotho ist der Kofaktor für die physiologischen Wirkungen von FGF23 an der Niere<sup>21</sup> und liegt bei CKD verringert vor.<sup>31</sup> Die lösliche Form *soluble Klotho* (sKlotho) kann ebenfalls als Kofaktor wirken und löst FGF23-unabhängig kardioprotektive Effekte aus.<sup>106,107</sup> Die Gabe von sKlotho scheint einen hemmenden Effekt auf das RAAS zu haben und könnte dadurch kardioprotektive Wirkungen entfalten. In Wildtyp-Mäusen konnte sKlotho die Entstehung einer AngII-ausgelösten Hypertrophie, Fibrose und kardialen Dysfunktion verhindern.<sup>56</sup> Die Blockade von AngII führte in Mäusen mit experimenteller Urämie zu einer verringerten renalen Klotho-Defizienz und die renale Klotho-Expression korrelierte negativ mit der renalen Expression von *Agt* und *Ren*.<sup>108</sup> In Mäusen mit einem haplodefizienten Klotho-Gen zeigten sich die Aldosteron-Plasmaspiegel erhöht.<sup>109</sup> Bei Frühgeborenen ist Klotho im Blut verringert<sup>110</sup> und es liegt ein erhöhtes Verhältnis von AngII zu Ang 1-7 vor.<sup>111</sup>

Studien mit CKD-Patienten und Nierengesunden ergaben allerdings keine Korrelation zwischen gemessenem sKlotho und der kardiovaskulären Dysfunktion.<sup>112,113</sup> Studien, die parenterale sKlotho-Gaben bezüglich kardioprotektiver Effekte bei CKD-Patienten untersuchen, liegen nicht vor.

#### 4.7 Bedeutung der Studie für die Klinik

Die Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen bei CKD-Patienten ist sinnvoll, da eine myokardiale Dysfunktion bei Mäusen bereits vor dem kardialen Remodeling auftritt<sup>114</sup> und bei Kindern mit einer CKD eine systolische Dysfunktion noch vor dem Beginn

kardialer Symptome detektiert werden konnte.<sup>115</sup> Außerdem wurde eine systolische und diastolische Dysfunktion auch schon bei Erwachsenen mit milder Niereninsuffizienz ohne kardiale Symptome beobachtet.<sup>116</sup> Darüber hinaus führt die Einnahme der bei CKD leitliniengerechten Medikation mit Vitamin D und Erythropoetin zu erhöhten FGF23-Serumspiegeln,<sup>65,117</sup> was eine frühe Prävention der negativen Effekte von FGF23 bei CKD-Patienten noch wichtiger erscheinen lässt. Wie oben aufgezählt, ist bisher nicht klar, ob und wie eine spezifische Therapie bei FGF23-Exzess möglich ist. Die verschiedenen Ansatzpunkte innerhalb der Signalkaskade von FGF23 zum kardialen Remodeling zeigen unsichere Effekte und haben ein hohes Nebenwirkungspotenzial.

Die Gabe von RAAS-Inhibitoren bei CKD zur Prophylaxe kardialer Erkrankungen wurde bisher noch nicht in Subgruppen unterschiedlicher CKD-Stadien untersucht. Dies erscheint sinnvoll aufgrund der kardioprotektiven Wirksamkeit von RAAS-Inhibitoren bei KHK und Herzinsuffizienz bei Vorliegen hoher FGF23-Spiegel<sup>84,85</sup> und in urämischen Mäusen<sup>86</sup> sowie aufgrund unserer Daten, die auf einen Zusammenhang zwischen FGF23, dem kardialen RAAS und kardialem Remodeling hindeuten. Die Vermutung, dass RAAS-Inhibitoren bei CKD-Patienten mit hohen FGF23-Spiegeln einen kardioprotektiven Effekt haben könnten, liegt nach Betrachtung unserer Studienergebnisse nahe und könnte auch bei CKD-Patienten ohne Hypertonie zu einer Verringerung der kardialen Dysfunktion sowie zu einer erhöhten Lebensqualität beitragen. Ein Therapieansatz über eine Hemmung des RAAS hätte mit RAAS-Inhibitoren den Vorteil eines langjährigen Einsatzes bei Patienten, einer dementsprechend guten Untersuchung der Wirkweise und Sicherheit dieser Medikamente sowie einer geringen finanziellen Belastung des Gesundheitssystems bei breiter Anwendung.<sup>118</sup>

#### 4.8 Limitationen der Studie

Als Limitation ist anzusehen, dass die beobachtete Entwicklung einer LVH bei 5/6Nx-Ratten auch durch andere Faktoren als die durch CKD erhöhten FGF23-Spiegel ausgelöst sein könnte. Eine 5/6-Nephrektomie bei Ratten kann zu Blutungen, Infektionen und inflammatorischen Reaktionen führen. Zum einen wird die Inflammation selbst als kardiovaskulärer Risikofaktor angesehen,<sup>119</sup> zum anderen wird auch eine durch inflammatorische Zytokine ausgelöste FGF23-Erhöhung diskutiert,<sup>120</sup>

sodass Inflammation ein Trigger der LVH in diesem Modell sein kann. Zusätzlich könnte auch die postoperative Anämie ein Auslöser der LVH sein, da die Infusion von Eisenzitrat mit folgend ansteigendem Hämoglobingehalt des Blutes von 5/6Nx-Ratten die urämisch getriggerte kardiale Hypertrophie und Fibrose mildert.<sup>121</sup> Dennoch ist das Urämie-Modell der 5/6-nephrektomierten Ratte ein etabliertes und gut auf Patienten übertragbares Modell mit Entwicklung einer Proteinurie, Glomerulosklerose, tubulointerstitieller Fibrose sowie im Verlauf progredient sinkender GFR und ähnlichen Retentionsparametern wie bei CKD-Patienten.<sup>122</sup>

Trotz der positiven Effekte von Losartan und Spironolacton auf die zelluläre Hypertrophie *in vitro* weist die vorliegende Studie auch hier einige Limitationen auf. Die Bedingungen isolierter Herzzellen in der Zellkultur unterscheiden sich naturgemäß wesentlich von denen im Zellverband eines Herzens *in vivo*. Außerdem stimulierten wir nur mit FGF23, um isoliert die Auswirkungen dieses Proteins auf die Herzzellen zu untersuchen. Weitere Urämie-Toxine, die bei CKD in Tieren und Patienten vorliegen, kamen nicht zum Einsatz. Um den realen Bedingungen etwas näher zu kommen, wäre die Etablierung einer Co-Kultur von NRVM und NRCF für folgende Projekte sinnvoll. In Ergänzung zu den Genexpressionsanalysen müssen Proteinaktivierungsstudien in Zukunft weiter Aufschluss über die zugrundeliegenden Signalkaskaden zwischen FGF23, RAAS-Aktivierung und LVH liefern. Die Aldosteronaktivität konnten wir anhand der Induktion von *Ngal* nachweisen und damit indirekt eine FGF23-vermittelte RAAS-Aktivierung zeigen. Die FGF23-abhängige Aktivierung des AT<sub>1</sub>R auf Proteinebene würde zusätzlich Aufschluss über die Synthese von Ang II geben.

Bezüglich der Bedeutung unserer Studie für die Klinik limitiert die selektive Einsetzbarkeit von RAAS-Inhibitoren die aktuellen Therapiemöglichkeiten. Bei CKD-Patienten besteht unter Einnahme von RAAS-Inhibitoren ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Hyperkaliämie, allerdings befinden sich dazu aktuell Kaliumbindende Medikamente in klinischen Studien.<sup>123</sup> Bei Patienten, die mit einer akuten Herzinsuffizienz hospitalisiert wurden, zeigte sich auch bei bestehender Hyperkaliämie ein besseres 180-Tage-Überleben, wenn die Dosis der RAAS-Inhibitoren nicht reduziert wurde.<sup>124</sup>

## 5. Zusammenfassung

Die chronische Niereninsuffizienz (Chronic Kidney Disease, CKD) ist eine global häufig auftretende Erkrankung, die durch erhöhte Serumspiegel des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 23 (Fibroblast Growth Factor 23, FGF23) zu kardiovaskulären Erkrankungen und Todesfällen führt. FGF23 führt unabhängig von seinem Kofaktor Klotho am Herzen über die Aktivierung der Calcineurin/NFAT-Signalkaskade zur linksventrikulären Hypertrophie (LVH). Zusätzlich zu erhöhten FGF23-Spiegeln liegt bei CKD-Patienten eine chronische Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) vor. Es wird diskutiert, dass FGF23 die RAAS-Aktivierung über die Hemmung des Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) und über die verminderte Bildung von aktivem Vitamin D verstärkt. ACE2 führt zur Umwandlung von Angiotensin I und II in die vasodilatativ und kardioprotektiv wirksamen Formen Angiotensin 1-7 und Angiotensin 1-9. Vitamin D hemmt das RAAS durch die Inhibition von Renin und zeigt im Tiermodell der experimentellen Urämie kardioprotektive Effekte trotz gleichbleibend hoher FGF23-Spiegel.

Wir stellten die Hypothese auf, dass FGF23 über eine Aktivierung des intrakardialen RAAS zur Ausbildung einer LVH und Fibrose bei experimenteller Urämie beiträgt und *in vitro* nicht nur über Calcineurin/NFAT, sondern auch über die Aktivierung des lokalen kardialen RAAS zum hypertrophen Wachstum von Kardiomyozyten und zur Induktion profibrotischer Faktoren in kardialen Fibroblasten neonataler Ratten führt.

Zunächst wiesen wir das Vorliegen eines intrakardialen RAAS im Herzgewebe von Ratten und in neonatalen Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten nach. Wir zeigten, dass sowohl bei urämischen Ratten als auch in rFGF23-stimulierten Kardiomyozyten *in vitro* eine verstärkte Expression der RAAS-Gene vorliegt und eine Induktion der Aldosteronaktivität über die verstärkte Expression von *Ngal* nachweisbar war. Die Kostimulation von rFGF23 mit dem Angiotensin-Rezeptor-Blocker Losartan und dem Mineralokortikoidrezeptor-Antagonisten Spironolacton führte in gleichem Ausmaß zu einer Reduktion der FGF23-induzierten zellulären Hypertrophie wie die zuvor beschriebene Kostimulation mit dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A.

In Zusammenschau unserer Ergebnisse können wir unsere Hypothese, dass FGF23 nicht nur über Calcineurin/NFAT, sondern auch über die Aktivierung des lokalen kardialen RAAS zur LVH führt, bestätigen. Unsere Daten sprechen für den Einsatz von RAAS-Inhibitoren als kardioprotektive Medikation bei CKD-Patienten.

## 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. doi:10.1371/journal.pone.0158765.
- 2 Naghavi M, Wang H, Lozano R, et al. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2015;385(9963):117-171. doi:10.1016/S0140-6736(14)61682-2.
- 3 Stevens PE, Levin A. Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease: Synopsis of the Kidney Disease: Improving Global Outcomes 2012 Clinical Practice Guideline. *Annals of Internal Medicine*. 2013;158(11):825-830. doi:10.7326/0003-4819-158-11-201306040-00007.
- 4 Webster AC, Nagler EV, Morton RL, Masson P. Chronic Kidney Disease. *The Lancet*. 2017;389(10075):1238-1252. doi:10.1016/S0140-6736(16)32064-5.
- 5 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.
- 6 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;10:1108. doi:10.3389/fphys.2019.01108.
- 7 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.
- 8 Leifheit-Nestler M, Haffner D. Paracrine Effects of FGF23 on the Heart. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:278. doi:10.3389/fendo.2018.00278.
- 9 Navarro-García JA, Delgado C, Fernández-Velasco M, et al. Fibroblast growth factor-23 promotes rhythm alterations and contractile dysfunction in adult ventricular cardiomyocytes. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(11):1864-1875. doi:10.1093/ndt/gfy392.
- 10 Czaya B, Faul C. The Role of Fibroblast Growth Factor 23 in Inflammation and Anemia. *Int J Mol Sci*. 2019;20(17). doi:10.3390/ijms20174195.
- 11 Andrukhoval 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.
- 12 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.
- 13 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):e000936. doi:10.1161/JAHA.114.000936.
- 14 Tranæus Lindblad Y, Olauson H, Vavilis G, et al. The FGF23-Klotho axis and cardiac tissue Doppler imaging in pediatric chronic kidney disease—a prospective cohort study. *Pediatr Nephrol*. 2018;33(1):147-157. doi:10.1007/s00467-017-3766-5.
- 15 Ronco C, Bellasi A, Di Lullo L. Cardiorenal Syndrome: An Overview. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2018;25(5):382-390. doi:10.1053/j.ackd.2018.08.004.
- 16 Bacchetta J, Bardet C, Prié D. Physiology of FGF23 and overview of genetic diseases associated with renal phosphate wasting. *Metabolism*. 2020;103S:153865. doi:10.1016/j.metabol.2019.01.006.
- 17 Pool LR, Wolf M. FGF23 and Nutritional Metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2017;37:247-268. doi:10.1146/annurev-nutr-071816-064620.

- 18 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.
- 19 Kuro-O M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature.* 1997;390(6655):45-51. doi:10.1038/36285.
- 20 Hu MC, Shi M, Gillings N, et al. Recombinant  $\alpha$ -Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy. *Kidney Int.* 2017;91(5):1104-1114. doi:10.1016/j.kint.2016.10.034.
- 21 Richter B, Faul C. FGF23 Actions on Target Tissues-With and Without Klotho. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:189. doi:10.3389/fendo.2018.00189.
- 22 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.
- 23 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.
- 24 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.
- 25 Leifheit-Nestler M, Große Siemer R, 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.
- 26 Isakova T, Wahl P, Vargas GS, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2011;79(12):1370-1378. doi:10.1038/ki.2011.47.
- 27 Wolf M, White KE. Coupling fibroblast growth factor 23 production and cleavage: iron deficiency, rickets, and kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2014;23(4):411-419. doi:10.1097/01.mnh.0000447020.74593.6f.
- 28 Vogt I, Haffner D, Leifheit-Nestler M. FGF23 and Phosphate-Cardiovascular Toxins in CKD. *Toxins (Basel).* 2019;11(11). doi:10.3390/toxins11110647.
- 29 Gao S, Xu J, Zhang S, Jin J. Meta-Analysis of the Association between Fibroblast Growth Factor 23 and Mortality and Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients. *Blood Purif.* 2019;47 Suppl 1:24-30. doi:10.1159/000496220.
- 30 Akhabue E, Vu T-HT, Vaidya A, et al. Fibroblast Growth Factor-23, Heart Failure Risk, and Renin-Angiotensin-Aldosterone-System Blockade in Hypertension: The MESA Study. *Am J Hypertens.* 2019;32(1):18-25. doi:10.1093/ajh/hpy142.
- 31 Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(1):124-136. doi:10.1681/ASN.2009121311.
- 32 Di Zou, Wu W, He Y, Ma S, Gao J. The role of klotho in chronic kidney disease. *BMC Nephrol.* 2018;19(1):285. doi:10.1186/s12882-018-1094-z.
- 33 Richter M, Lautze H-J, Walther T, Braun T, Kostin S, Kubin T. The failing heart is a major source of circulating FGF23 via oncostatin M receptor activation. *J Heart Lung Transplant.* 2015;34(9):1211-1214. doi:10.1016/j.healun.2015.06.007.
- 34 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:10.1016/j.carpath.2019.02.001.
- 35 Matsui I, Oka T, Kusunoki Y, et al. Cardiac hypertrophy elevates serum levels of fibroblast growth factor 23. *Kidney Int.* 2018;94(1):60-71. doi:10.1016/j.kint.2018.02.018.

- 36 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.
- 37 Schrier RW, Masoumi A, Elhassan E. Aldosterone: role in edematous disorders, hypertension, chronic renal failure, and metabolic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(6):1132-1140. doi:10.2215/CJN.01410210.
- 38 Ku E, Lee BJ, Wei J, Weir MR. Hypertension in CKD: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis*. 2019;74(1):120-131. doi:10.1053/j.ajkd.2018.12.044.
- 39 Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2005;(99):S57-65. doi:10.1111/j.1523-1755.2005.09911.x.
- 40 Glasscock RJ, Pecoits-Filho R, Barberato SH. Left ventricular mass in chronic kidney disease and ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4 Suppl 1:S79-91. doi:10.2215/CJN.04860709.
- 41 Pi M, Ye R, Han X, et al. Cardiovascular Interactions between Fibroblast Growth Factor-23 and Angiotensin II. *Sci Rep*. 2018;8(1):12398. doi:10.1038/s41598-018-30098-1.
- 42 Xu J, Carretero OA, Liao T-D, et al. Local angiotensin II aggravates cardiac remodeling in hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(5):H1328-38. doi:10.1152/ajpheart.00538.2010.
- 43 Sopel MJ, Rosin NL, Lee TDG, Légaré J-F. Myocardial fibrosis in response to Angiotensin II is preceded by the recruitment of mesenchymal progenitor cells. *Lab Invest*. 2011;91(4):565-578. doi:10.1038/labinvest.2010.190.
- 44 Azibani F, Fazal L, Chatziantoniou C, Samuel J-L, Delcayre C. Aldosterone mediates cardiac fibrosis in the setting of hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2013;15(4):395-400. doi:10.1007/s11906-013-0354-3.
- 45 Catena C, Colussi G, Brosolo G, Novello M, Sechi LA. Aldosterone and Left Ventricular Remodeling. *Horm Metab Res*. 2015;47(13):981-986. doi:10.1055/s-0035-1565055.
- 46 Leon SJ, Tangri N. The Use of Renin-Angiotensin System Inhibitors in Patients With Chronic Kidney Disease. *Can J Cardiol*. 2019;35(9):1220-1227. doi:10.1016/j.cjca.2019.06.029.
- 47 The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators, Yusuf S, Sleight P, et al. Effects of an Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibitor, Ramipril, on Cardiovascular Events in High-Risk Patients // Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2000;342(3):145-153. doi:10.1056/NEJM200001203420301.
- 48 Ruggenenti P, Iliev I, Costa GM, et al. Preventing left ventricular hypertrophy by ACE inhibition in hypertensive patients with type 2 diabetes: a prespecified analysis of the Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT). *Diabetes Care*. 2008;31(8):1629-1634. doi:10.2337/dc08-0371.
- 49 Guo L, Yin A, Zhang Q, Zhong T, O'Rourke ST, Sun C. Angiotensin-(1-7) attenuates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy via a Sirt3-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312(5):H980-H991. doi:10.1152/ajpheart.00768.2016.
- 50 Beraldo JI, Benetti A, Borges-Júnior FA, et al. Cardioprotection Conferred by Sitagliptin Is Associated with Reduced Cardiac Angiotensin II/Angiotensin-(1-7) Balance in Experimental Chronic Kidney Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(8). doi:10.3390/ijms20081940.
- 51 Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab*. 2007;18(5):208-214. doi:10.1016/j.tem.2007.05.001.
- 52 Dostal DE, Rothblum KN, Chernin MI, Cooper GR, Baker KM. Intracardiac detection of angiotensinogen and renin: a localized renin-angiotensin system in neonatal rat heart.

- 53 Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006;86(3):747-803. doi:10.1152/physrev.00036.2005.
- 54 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.
- 55 Zhang B, Umbach AT, Chen H, et al. Up-regulation of FGF23 release by aldosterone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;470(2):384-390. doi:10.1016/j.bbrc.2016.01.034.
- 56 Ding J, Tang Q, Luo B, et al. Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy, fibrosis, and dysfunction in mice through suppression of transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2019;859:172549. doi:10.1016/j.ejphar.2019.172549.
- 57 Li YC, Kong J, Wei M, Chen Z-F, Liu SQ, Cao L-P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J. Clin. Invest.* 2002;110(2):229-238. doi:10.1172/JCI200215219.
- 58 Kovesdy CP, Quarles LD. FGF23 from bench to bedside. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2016;310(11):F1168-74. doi:10.1152/ajprenal.00606.2015.
- 59 Patel VB, Zhong J-C, Grant MB, Oudit GY. Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure. *Circ Res.* 2016;118(8):1313-1326. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.307708.
- 60 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):e44161. doi:10.1371/journal.pone.0044161.
- 61 Smith ER, Holt SG, Hewitson TD. FGF23 activates injury-primed renal fibroblasts via FGFR4-dependent signalling and enhancement of TGF- $\beta$  autoinduction. *Int J Biochem Cell Biol.* 2017;92:63-78. doi:10.1016/j.biocel.2017.09.009.
- 62 Zhang X, Guo K, Xia F, Zhao X, Huang Z, Niu J. FGF23C-tail improves diabetic nephropathy by attenuating renal fibrosis and inflammation. *BMC Biotechnol.* 2018;18(1):33. doi:10.1186/s12896-018-0449-7.
- 63 Ravani P, Malberti F, Tripepi G, et al. Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2009;75(1):88-95. doi:10.1038/ki.2008.501.
- 64 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.
- 65 Nguyen-Yamamoto L, Karaplis AC, St-Arnaud R, Goltzman D. Fibroblast Growth Factor 23 Regulation by Systemic and Local Osteoblast-Synthesized 1,25-Dihydroxyvitamin D. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(2):586-597. doi:10.1681/ASN.2016010066.
- 66 Kolek OI, Hines ER, Jones MD, et al. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 upregulates FGF23 gene expression in bone: the final link in a renal-gastrointestinal-skeletal axis that controls phosphate transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;289(6):G1036-42. doi:10.1152/ajpgi.00243.2005.
- 67 Gorini S, Kim SK, Infante M, et al. Role of Aldosterone and Mineralocorticoid Receptor in Cardiovascular Aging. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:584. doi:10.3389/fendo.2019.00584.
- 68 Mhatre KN, Wakula P, Klein O, et al. Crosstalk between FGF23- and angiotensin II-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in pathological cardiac hypertrophy. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(23):4403-4416. doi:10.1007/s00018-018-2885-x.
- 69 Lazzeroni D, Rimoldi O, Camici PG. From Left Ventricular Hypertrophy to Dysfunction and Failure. *Circ J.* 2016;80(3):555-564. doi:10.1253/circj.CJ-16-0062.

- 70** Kaesler N, Babler A, Floege J, Kramann R. Cardiac Remodeling in Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel)*. 2020;12(3). doi:10.3390/toxins12030161.
- 71** Hao H, Li X, Li Q, et al. FGF23 promotes myocardial fibrosis in mice through activation of  $\beta$ -catenin. *Oncotarget*. 2016;40(7).
- 72** Czaya B, Seeherunvong W, Singh S, et al. Cardioprotective Effects of Paricalcitol Alone and in Combination With FGF23 Receptor Inhibition in Chronic Renal Failure: Experimental and Clinical Studies. *Am J Hypertens*. 2019;32(1):34-44. doi:10.1093/ajh/hpy154.
- 73** Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, Borregaard N. Isolation and Primary Structure of NGAL, a Novel Protein Associated with Human Neutrophil Gelatinase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993;(14):10425-10432.
- 74** Kjeldsen L, Bainton DF, Sengelov H, Borregaard N. Identification of NGAL as a Novel Matrix Protein of Specific Granules in Human Neutrophils. *Blood*. 1994;(3):799-807.
- 75** Gilet A, Zou F, Boumenir M, et al. Aldosterone up-regulates MMP-9 and MMP-9/NGAL expression in human neutrophils through p38, ERK1/2 and PI3K pathways. *Exp Cell Res*. 2015;331(1):152-163. doi:10.1016/j.yexcr.2014.11.004.
- 76** Latouche C, El Moghrabi S, Messaoudi S, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a novel mineralocorticoid target in the cardiovascular system. *Hypertension*. 2012;59(5):966-972. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.187872.
- 77** Martínez-Martínez E, Buonafine M, Boukhalifa I, et al. Aldosterone Target NGAL (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin) Is Involved in Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction Through NF $\kappa$ B Pathway. *Hypertension*. 2017;70(6):1148-1156.
- 78** Hasegawa M, Ishii J, Kitagawa F, et al. Plasma Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Predictor of Cardiovascular Events in Patients with Chronic Kidney Disease. *Biomed Res Int*. 2016;2016:8761475. doi:10.1155/2016/8761475.
- 79** Bergmark BA, Udell JA, Morrow DA, et al. Association of Fibroblast Growth Factor 23 With Recurrent Cardiovascular Events in Patients After an Acute Coronary Syndrome: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol*. 2018;3(6):473-480. doi:10.1001/jamacardio.2018.0653.
- 80** Schindeler A, Biggin A, Munns CF. Clinical Evidence for the Benefits of Burosumab Therapy for X-Linked Hypophosphatemia (XLH) and Other Conditions in Adults and Children. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:338. doi:10.3389/fendo.2020.00338.
- 81** Shalhoub V, Shatzen EM, Ward SC, et al. FGF23 neutralization improves chronic kidney disease-associated hyperparathyroidism yet increases mortality. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2543-2553. doi:10.1172/JCI61405.
- 82** Yanochko GM, Vitsky A, Heyen JR, et al. Pan-FGFR inhibition leads to blockade of FGF23 signaling, soft tissue mineralization, and cardiovascular dysfunction. *Toxicol Sci*. 2013;135(2):451-464. doi:10.1093/toxsci/kft161.
- 83** Weiss A, Adler F, Buhles A, et al. FGF401, A First-In-Class Highly Selective and Potent FGFR4 Inhibitor for the Treatment of FGF19-Driven Hepatocellular Cancer. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(12):2194-2206. doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-1291.
- 84** Udell JA, Morrow DA, Jarolim P, et al. Fibroblast growth factor-23, cardiovascular prognosis, and benefit of angiotensin-converting enzyme inhibition in stable ischemic heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(22):2421-2428. doi:10.1016/j.jacc.2014.03.026.
- 85** Wohlfahrt P, Melenovsky V, Kotrc M, et al. Association of Fibroblast Growth Factor-23 Levels and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition in Chronic Systolic Heart Failure. *JACC Heart Fail*. 2015;3(10):829-839. doi:10.1016/j.jchf.2015.05.012.

- 86 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):16087. doi:10.1038/s41598-018-34216-x.
- 87 Zannad F, Kessler M, Leheret P, et al. Prevention of cardiovascular events in end-stage renal disease: results of a randomized trial of fosinopril and implications for future studies. *Kidney Int*. 2006;70(7):1318-1324. doi:10.1038/sj.ki.5001657.
- 88 Xie X, Liu Y, Perkovic V, et al. Renin-Angiotensin System Inhibitors and Kidney and Cardiovascular Outcomes in Patients With CKD: A Bayesian Network Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Am J Kidney Dis*. 2016;67(5):728-741. doi:10.1053/j.ajkd.2015.10.011.
- 89 Sharma P, Blackburn RC, Parke CL, McCullough K, Marks A, Black C. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers for adults with early (stage 1 to 3) non-diabetic chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;(10):CD007751. doi:10.1002/14651858.CD007751.pub2.
- 90 Chung EY, Ruospo M, Natale P, et al. Aldosterone antagonists in addition to renin angiotensin system antagonists for preventing the progression of chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;10:CD007004. doi:10.1002/14651858.CD007004.pub4.
- 91 Lunney M, Ruospo M, Natale P, et al. Pharmacological interventions for heart failure in people with chronic kidney disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020;2:CD012466. doi:10.1002/14651858.CD012466.pub2.
- 92 Santos RAS, Sampaio WO, Alzamora AC, et al. The ACE2/Angiotensin-(1-7)/MAS Axis of the Renin-Angiotensin System: Focus on Angiotensin-(1-7). *Physiol Rev*. 2018;98(1):505-553. doi:10.1152/physrev.00023.2016.
- 93 Castardeli C, Sartório CL, Pimentel EB, Forechi L, Mill JG. The ACE 2 activator diminazene aceturate (DIZE) improves left ventricular diastolic dysfunction following myocardial infarction in rats. *Biomed Pharmacother*. 2018;107:212-218. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.170.
- 94 Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020;181(2):271-280.e8. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
- 95 Zhou P, Yang X-L, Wang X-G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-273. doi:10.1038/s41586-020-2012-7.
- 96 Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003;426(6965):450-454. doi:10.1038/nature02145.
- 97 Xiu-hong Yang, Wei Deng, Zan Tong, et al. Mice Transgenic for Human Angiotensin-converting Enzyme 2 Provide a Model for SARS Coronavirus Infection. *Comparative Medicine*. 2007;57(5):450-459.
- 98 Golden JW, Cline CR, Zeng X, et al. Human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice infected with SARS-CoV-2 develop severe and fatal respiratory disease. *JCI Insight*. 2020;5(19). doi:10.1172/jci.insight.142032.
- 99 Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*. 2005;11(8):875-879. doi:10.1038/nm1267.
- 100 Monteil V, Kwon H, Prado P, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 Infections in Engineered Human Tissues Using Clinical-Grade Soluble Human ACE2. *Cell*. 2020;181(4):905-913.e7. doi:10.1016/j.cell.2020.04.004.
- 101 Schön A, Leifheit-Nestler M, Deppe J, et al. Active vitamin D is cardioprotective in experimental uraemia but not in children with CKD Stages 3-5. *Nephrol Dial Transplant*. 2020. doi:10.1093/ndt/gfaa227.

- 102** Ismail NA, Kamaruddin NA, Azhar Shah S, Sukor N. The effect of vitamin D treatment on clinical and biochemical outcomes of primary aldosteronism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2020;92(6):509-517. doi:10.1111/cen.14177.
- 103** Cuervo C, Abitbol CL, Zilleruelo GE, Freundlich M. Fibroblast growth factor-23 and renin-angiotensin system levels in vitamin-D-dependent rickets type I. *Pediatr Nephrol*. 2016;31(7):1189-1193. doi:10.1007/s00467-016-3356-y.
- 104** Li X-H, Feng L, Yang Z-H, Liao Y-H. Effect of active vitamin D on cardiovascular outcomes in predialysis chronic kidney diseases: A systematic review and meta-analysis. *Nephrology (Carlton)*. 2015;20(10):706-714. doi:10.1111/nep.12505.
- 105** Hu X, Shang J, Yuan W, et al. Wirkungen von Paricalcitol auf kardiovaskuläre Ergebnisse und Nierenfunktion bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung : Eine Metaanalyse. *Herz*. 2018;43(6):518-528. doi:10.1007/s00059-017-4605-y.
- 106** Hu MC, Shi M, Zhang J, et al. Renal Production, Uptake, and Handling of Circulating  $\alpha$ Klotho. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):79-90. doi:10.1681/ASN.2014101030.
- 107** Grabner A, Faul C. The role of fibroblast growth factor 23 and Klotho in uremic cardiomyopathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2016;25(4):314-324. doi:10.1097/MNH.0000000000000231.
- 108** Yoon HE, Ghee JY, Piao S, et al. Angiotensin II blockade upregulates the expression of Klotho, the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(3):800-813. doi:10.1093/ndt/gfq537.
- 109** Zhou X, Chen K, Wang Y, Schuman M, Lei H, Sun Z. Antiaging Gene Klotho Regulates Adrenal CYP11B2 Expression and Aldosterone Synthesis. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(6):1765-1776. doi:10.1681/ASN.2015010093.
- 110** Franklin AD, Saqibuddin J, Stephens K, et al. Cord blood alpha klotho is decreased in small for gestational age preterm infants with placental lesions of accelerated aging. *Placenta*. 2019;87:1-7. doi:10.1016/j.placenta.2019.08.088.
- 111** South AM, Nixon PA, Chappell MC, et al. Association between preterm birth and the renin-angiotensin system in adolescence: influence of sex and obesity. *J Hypertens*. 2018;36(10):2092-2101. doi:10.1097/HJH.0000000000001801.
- 112** Buiten MS, Bie MK de, Bouma-de Krijger A, et al. Soluble Klotho is not independently associated with cardiovascular disease in a population of dialysis patients. *BioMed Central Nephrology*. 2014;197(15). doi:10.1186/1471-2369-15-197.
- 113** Brandenburg VM, Kleber ME, Vervloet MG, et al. Soluble klotho and mortality: the Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study. *Atherosclerosis*. 2015:483-489. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.08.017.
- 114** Winterberg PD, Jiang R, Maxwell JT, Wang B, Wagner MB. Myocardial dysfunction occurs prior to changes in ventricular geometry in mice with chronic kidney disease (CKD). *Physiol Rep*. 2016;4(5). doi:10.14814/phy2.12732.
- 115** Chinali M, Matteucci MC, Franceschini A, et al. Advanced Parameters of Cardiac Mechanics in Children with CKD: The 4C Study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2015;10(8):1357-1363. doi:10.2215/CJN.10921114.
- 116** Nasir K, Rosen BD, Kramer HJ, et al. Regional left ventricular function in individuals with mild to moderate renal insufficiency: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am Heart J*. 2007;153(4):545-551. doi:10.1016/j.ahj.2006.12.025.
- 117** Hanudel MR, Eisenga MF, Rappaport M, et al. Effects of erythropoietin on fibroblast growth factor 23 in mice and humans. *Nephrol Dial Transplant*. 2019;34(12):2057-2065. doi:10.1093/ndt/gfy189.

- 118** Lurbe E, Agabiti-Rosei E, Cruickshank JK, et al. 2016 European Society of Hypertension guidelines for the management of high blood pressure in children and adolescents. *J Hypertens*. 2016;34(10):1887-1920. doi:10.1097/HJH.0000000000001039.
- 119** Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor. *Circulation*. 2004;109(21 Suppl 1):II2-10. doi:10.1161/01.CIR.0000129535.04194.38.
- 120** David V, Francis C, Babitt JL. Ironing out the cross talk between FGF23 and inflammation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;312(1):F1-F8. doi:10.1152/ajprenal.00359.2016.
- 121** Goto A, Suematsu Y, Nunes ACF, et al. Ferric Citrate Attenuates Cardiac Hypertrophy and Fibrosis in a Rat Model of CKD. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 2019;13(2).
- 122** Hanifa MA, Skott M, Maltesen RG, et al. Tissue, urine and blood metabolite signatures of chronic kidney disease in the 5/6 nephrectomy rat model. *Metabolomics*. 2019;15(8):112. doi:10.1007/s11306-019-1569-3.
- 123** Georgianos PI, Agarwal R. Revisiting RAAS blockade in CKD with newer potassium-binding drugs. *Kidney Int*. 2018;93(2):325-334. doi:10.1016/j.kint.2017.08.038.
- 124** Beusekamp JC, Tromp J, Cleland JGF, et al. Hyperkalemia and Treatment With RAAS Inhibitors During Acute Heart Failure Hospitalizations and Their Association With Mortality. *JACC Heart Fail*. 2019;7(11):970-979. doi:10.1016/j.jchf.2019.07.010.

## **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

„Die FGF23-induzierte Aktivierung des intrakardialen Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems fördert die Ausbildung einer kardialen Hypertrophie“

in der Klinik für Pädiatrische Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen der Medizinischen Hochschule Hannover unter Betreuung von Prof. Dr. Dieter Haffner, mit der Unterstützung durch PD Dr. Maren Leifheit-Nestler, ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt 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:  
International Journal of Molecular Sciences, Published: 18 September 2019

---

Ort, Datum

Unterschrift

## 9. Danksagung

Schließlich möchte ich folgenden Personen, ohne die ich diese Dissertationsschrift nicht hätte anfertigen können, danken.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Dieter Haffner für die Vergabe meines Promotionsprojektes, die persönliche Betreuung und Unterstützung sowie für die Möglichkeit, verschiedene nephrologische Kongresse zu besuchen und meine Ergebnisse dort vorzustellen.

Ein herzlicher Dank gilt PD Dr. Maren Leifheit-Nestler für ihre Betreuung und Hilfsbereitschaft während der experimentellen Bearbeitung meines Promotionsprojektes sowie der Anfertigung der gemeinsamen Publikation. Die Besprechungen meiner Daten mit ihr haben meine Motivation und Begeisterung für die Wissenschaft immer wieder bestärkt.

Ich danke der Arbeitsgruppe für Nieren-, Leber- und Stoffwechselerkrankungen im pädiatrischen Forschungszentrum für die Einarbeitung im Labor, technische Hilfestellung und ein sehr angenehmes Arbeitsklima. Vielen Dank meinen StrucMed-Kolleginnen Saskia Schwänen und Miriam Wagner sowie Nour Zeaiter für die gegenseitige Unterstützung und gut gelaunte Arbeitspausen.

Sehr dankbar bin ich auch meinem Freund Christian Streit und meiner Schwester Dr. Annkathrin Böckmann für ihre Unterstützung, Verständnis und Ablenkung.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Almuth de Buhr-Böckmann und Rolf Böckmann, die mir meine schulische und berufliche Ausbildung ermöglicht haben, mir immer beratend beiseite standen und stehen und denen ich deshalb diese Arbeit widme.