

Aus dem Department für Biomedizinische Wissenschaften
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
Institut für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie
(Leiter: Univ. -Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Reinhold Erben)

**Die Rolle des FGF23-Signalwegs in der Pathogenese von
renaler und cardialer Fibrose in einem chronischen
Niereninsuffizienz-Modell in der Maus**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Felix Valentin Kempf

Wien, im Juni 2020

BetreuerIn: Ass. -Prof. Dr. rer. nat. Olena Andrukova,

Univ. -Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Reinhold Erben

GutachterIn: Dr. Sabine Lager

Echtheitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Diplomarbeit eigenständig verfasst habe und jede Quelle und Unterstützung vermerkt habe. Ich erkläre zusätzlich, dass die essenzielle Arbeit von mir selbst erledigt worden ist und jeder Zuarbeitende erwähnt wird.

Darüber hinaus erkläre ich, dass ich diese Arbeit nirgends anders veröffentlicht oder einem anderen Prüfungsausschuss vorgelegt habe.

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Fibroblast-Growth-Factor 23.....	2
1.2 Klotho und FGF-Rezeptoren.....	2
1.3 Funktion und Regulation von FGF23	4
1.4 Renale Effekte von FGF23	6
1.4.1 Proximaler Tubulus	6
1.4.2 Distaler Tubulus.....	10
1.5 FGF23 bei chronischer Niereninsuffizienz	13
1.6 Ziel dieser Arbeit	16
2. Materialien & Methoden	17
2.1 Tiere.....	17
2.2 Chronisches Niereninsuffizienz Modell	17
2.3 Behandlung der Tiere	18
2.4 Histologie der Herzen	18
2.5 Histologie der Nieren.....	19
2.6 Morphologische Evaluation der Herzen und der Nieren.....	19
2.7 RNA Isolation und RT-qPCR	20
2.8 Statistische Analyse	21
3. Ergebnisse	22
3.1 Analyse des Kollagengehaltes der Nieren	22
3.2 Analyse des Kollagengehaltes der Herzen	25
3.3 mRNA Expression nach Behandlung mit Closantel	27
4. Diskussion	31
5. Zusammenfassung	35
6. Summary	36

7. Referenzen	37
8. Liste der Abbildungen	45
9. Abkürzungen	46
10. Danksagung	48

1. Einleitung

Die Prävalenz von chronischer Niereninsuffizienz (CNI) in der Weltbevölkerung beträgt fast 10 % (Eckardt et al. 2013, Murphy et al. 2016). Der Anteil der Menschen, die sich im Endstadium einer CNI befinden, Dialyse erhalten und versterben, liegt in den USA etwa bei 20 % jedes Jahr. Davon lässt sich etwas mehr als die Hälfte auf kardiovaskuläre Erkrankungen zurückführen (Go et al. 2004). Weitere Komplikationen, die mit CNI einhergehen, sind Mineralisierungsstörungen und Anämie. Jedoch sind kardiovaskuläre Erkrankungen die Hauptursache für das Versterben von CNI Patienten. Die häufigste Kardiovaskuläre Komplikation im Zusammenhang mit CNI ist eine linksventrikuläre Hypertrophie (LVH), welche zu diastolischer Dysfunktion, kongestivem Herzversagen, Arrhythmien und plötzlichem Herzversagen führen kann (Eckardt et al. 2013).

Bei Patienten, die an CNI leiden, konnte eine signifikant erhöhte Menge von Fibroblast-growth-factor-23 (FGF23) im Serum nachgewiesen werden (Larsson et al. 2003). Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die Serumkonzentration von FGF23 mit dem Verlust der Nierenfunktion schrittweise ansteigt (Wolf 2013). Die genaue Ursache für den Anstieg von FGF23 zu Beginn einer CNI ist jedoch noch nicht ganz geklärt (Isakova et al. 2011). Es hat sich herausgestellt, dass erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen zu einem erhöhten Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen und einer erhöhten Mortalität bei CNI Patienten führen (Gutiérrez et al. 2008). Eine weitere Studie zeigte, dass erhöhte FGF23 Serum-Konzentrationen, unabhängig von Klotho, mit einer erhöhten Inzidenz und Prävalenz von LVH korrelieren (Faul et al. 2011).

Dennoch gibt es noch Unklarheiten über die Mechanismen, wie erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen die Progression von CNI und damit LVH beeinflussen. Daher haben wir in dieser Studie versucht, die Rolle von FGF23 in der Pathogenese von induzierter CNI besser zu verstehen. Dazu haben wir genetische Modelle und pharmakologische Ansätze genutzt. Dies beinhaltete sowohl *Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* Mäuse als auch die pharmakologische Inhibition des FGF23 Signalwegs durch den WNK-Inhibitor Closantel.

1.1 Fibroblast-Growth-Factor 23

Im Jahr 2000 wurde FGF23 in ventrolateralen Thalamuskernen in Gehirnen von Mäusen erstmals entdeckt (Yamashita et al. 2000). Es ist Teil der FGF Familie, welche insgesamt aus 22 Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen besteht (Itoh und Ornitz 2004). FGF23 ist ein etwa 32-kD (251 Aminosäuren) großes Protein, bestehend aus einer FGF-Homologie-Domäne am N-Terminus und einem für FGF23 spezifischen 71 Aminosäuren langen C-Terminus. Zusammen mit *fgf21* und den orthologen Genen *fgf15* und *fgf19* bildet *fgf23* phylogenetisch die *fgf19* Untergruppe. Ihnen gemeinsam ist eine durch FGF-Rezeptoren (FGFR) vermittelte, endokrine Wirkung (Yamashita et al. 2000, Itoh und Ornitz 2004).

1.2 Klotho und FGF-Rezeptoren

Das Gen *klotho* wurde 1997 entdeckt. Ein Defekt in der Expression des *klotho* Gens führt zu vermindertem Wachstum, einer verkürzten Lebenszeit, Unfruchtbarkeit, Arteriosklerose, Hautatrophie, Osteoporose, ektopischen Verkalkungen und Lungenemphysemen. Da diese Symptome dem menschlichen Altern ähneln, nahm man zunächst an, dass Klotho ein Anti-Aging Faktor sei (Kuro-o et al. 1999). Von dieser Hypothese leitete sich auch der Name Klotho ab: Es wurde nach der griechischen Göttin benannt, die den Lebensfaden spinnt.

Unter physiologischen Umständen zeigt FGF23 eine geringe Affinität für alle Isoformen der FGF-Rezeptoren (FGFR) (Yu et al. 2005). Unterstützt von dem Fakt, dass *Fgf23*^{-/-} Mäuse einen ähnlichen Phänotyp wie *Klotho*^{-/-} Mäuse zeigen, führte dies zu der Entdeckung, dass α Klotho einen obligaten Co-Rezeptor für die Funktion von FGF23 darstellt, indem es kanonische FGFR in für FGF23 spezifische Rezeptoren umwandelt (Kurosu et al. 2006, Urakawa et al. 2006). Dadurch sind physiologische hormonale Wirkungen von FGF23 auf Gewebe beschränkt, die *klotho* exprimieren. Dieser Rezeptor-Komplex ist in Abbildung 1 dargestellt. *Klotho* wird hauptsächlich in den distalen Tubuli contorti der Nieren und der Plexus Chorioideus im Gehirn (Kuro-o et al. 1999) exprimiert. Darüber hinaus wird *klotho* in geringeren Mengen in den proximalen Nierentubuli und den Nebenschilddrüsen exprimiert (Hu et al. 2010, Andrukhova et al. 2012).

Klotho kodiert für α Klotho, ein Single-Pass Transmembranprotein, dessen extrazelluläre Domäne aus zwei homologen Typ 1 Beta-Glykosidase Domänen (KL1 und KL2) besteht (Tohyama et al. 2004). Die extrazelluläre Domäne kann von der Zelloberfläche durch membranständige proteolytische Enzyme gelöst werden und so in die systemische Zirkulation

gelangen (Imura et al. 2007). Darüber hinaus kann eine lösliche Isoform von Klotho durch alternatives Splicing der Klotho mRNA erzeugt werden (Matsumura et al. 1998).

Es wird angenommen, dass lösliches Klotho unabhängig von FGF23 die Aktivität von verschiedenen Ionen-Kanälen und Transportern reguliert. Obwohl lösliches Klotho in der Lage ist, Komplexe mit FGFR zu bilden, scheint es dennoch unwahrscheinlich, dass lösliches Klotho FGF23-abhängige Signalkaskaden vermittelt, da diese durch lösliches Klotho erheblich schwächer aktiviert werden als durch membranständiges Klotho (Kurosu et al. 2006, Kuro-o 2019).

Die Signalweiterleitung der verschiedenen FGF-Liganden wird durch vier verschiedene ubiquitäre FGFR vermittelt (FGFR 1-4), welche alle Tyrosinkinase-Rezeptoren sind. Mittels alternativem RNA-Splicing werden verschiedene FGFR Isoformen synthetisiert. Die extrazelluläre Domäne von FGFR1 und FGFR2 besteht aus zwei bis drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen, an die der FGF-Ligand bindet. Klotho bindet mit unterschiedlicher Affinität an die verschiedenen FGFR. Es hat eine geringere Affinität zu FGFR2 als zu den c-Isoformen von FGFR1, FGFR3 und FGFR4. Die endokrinen FGF-Liganden, wie FGF23 besitzen keine Heparan-Sulfat-bindende Domäne und sind daher auf die Anwesenheit des membranständigen Klotho als Co-Rezeptor für die FGFR angewiesen. Wenn Klotho mit einem der FGFR einen Komplex gebildet hat, steigt die Affinität dieses Komplexes für FGF23 an. Die maximale Signalübertragungsstärke durch FGF23 konnte durch Bindung an den FGFR1c-Klotho-Komplex festgestellt werden (Kuro-o 2006, Kurosu et al. 2006, Urakawa et al. 2006). Die Aktivierung von FGFR führt zur Phosphorylierung nachfolgender Signalmoleküle (Ornitz und Itoh 2015). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass physiologische Wirkungen von FGF23 in den Nieren durch Binden an den FGFR1c ausgelöst werden, welcher zugleich der FGFR ist und Klotho als Kofaktor braucht, um eine ausreichende Affinität zu seinem Liganden zu entwickeln (Erben 2018). FGF23 kann aber auch Klotho-unabhängig auf Gewebe wirken, welche FGFR3 oder FGFR4 exprimieren, wie z.B. das Myokard, Leber oder Knochen (Grabner et al. 2015, Singh et al. 2016, Andrukhova et al. 2018). Letzteres spielt vor allem in Situationen eine Rolle, in denen FGF23 chronisch erhöht ist und pathologische Wirkungen sichtbar werden (Richter und Faul 2018).

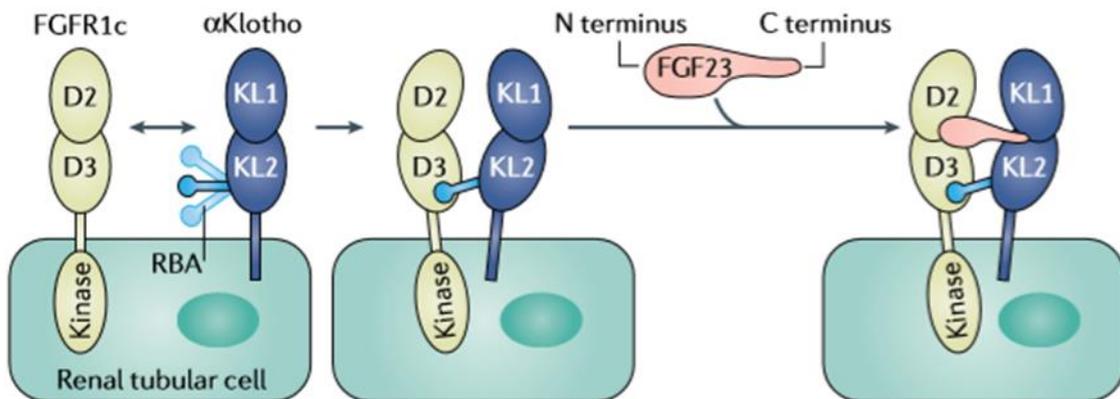


Abbildung 1: FGF23- α Klotho-FGFR1c-Komplex. Fibroblast-growth-factor-Rezeptoren bestehen aus zwei bis drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen (D2 und D3) und einer intrazellulären Kinase-Domäne. α Klotho besteht aus zwei homologen Domänen (KL1 und KL2). Die KL2 Domäne bindet mit ihrem Rezeptor-bindendem-Arm (RBA) an die D3 Domäne des Fibroblast-growth-factor-receptor 1c (FGFR1c). In den von α Klotho und FGFR1c gebildeten Zwischenraum kann nun Fibroblast-growth-factor-23 binden, indem er mit seinem C-Terminus an α Klotho und mit seinem N-Terminus an die D2-Domäne des FGFR1c bindet. Grafik entnommen aus (Kuro-o 2019).

1.3 Funktion und Regulation von FGF23

FGF23 ist ein aus Knochen freigesetztes Hormon, welches durch erhöhte renale Phosphatausscheidung und einer verminderten Synthese von aktivem Vitamin D an der Regulierung des Phosphatserumspiegels maßgeblich beteiligt ist (Shimada et al. 2001, 2004a, 2004b). Unter physiologischen Bedingungen stellen Knochen die Hauptquelle für FGF23 dar. Dort wird es von Osteoblasten und Osteozyten gebildet (Yoshiko et al. 2007, Martin et al. 2012). Die Ausschüttung von FGF23 ist dabei abhängig von Vitamin D und dem Phosphatserumspiegel (Saito et al. 2005). Wie bereits beschrieben, ist die Spezifität von FGF23 von der Verteilung der Klotho-FGFR-Komplexe in den Geweben abhängig. Da Klotho vorwiegend in den Nieren exprimiert wird, sind diese zugleich das Hauptzielorgan für FGF23 (Kuro-o et al. 1999, Tacer et al. 2010).

Der zugrundeliegende Mechanismus durch den ein erhöhter Phosphatserumspiegel dazu führt, dass Osteozyten vermehrt FGF23 produzieren, ist noch unklar. Ein Erklärungsversuch wäre, dass Osteozyten möglicherweise einen Phosphat-Sensing-Rezeptor synthetisieren,

ähnlich wie die Zellen der Nebenschilddrüse für Kalzium (Brown et al. 1993). Es hat sich gezeigt, dass bei Hypokalzämie ein Ansteigen des Phosphatserumspiegels nicht zu einer vermehrten FGF23 Ausschüttung führt und vice versa. Es gibt Evidenzen, dass die Ausschüttung von FGF23 nicht nur vom Phosphatserumspiegel alleine abhängig ist, sondern auch vom Kalziumserumspiegel (Rodriguez-Ortiz et al. 2012, Quinn et al. 2013).

Erhöhte Serumkonzentrationen von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ erhöhen die Produktion von FGF23, welches wiederum die Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ herunterreguliert, indem es das Enzymlevel der 1α -Hydroxylase herunterreguliert, welches das Schlüsselenzym für die Umwandlung von $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ darstellt. Wenn $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ an den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) bindet, führt dies über Vitamin-D-responsive-Elemente (VDRE) in der Promotorregion von *fgf23* zu dessen Aktivierung (Liu et al. 2006, Masuyama et al. 2006).

Parathormon (PTH) reguliert die Expression von *fgf23* herauf und erhöht damit die Serumkonzentration an FGF23. Durch Binden von PTH an den Parathormon-Rezeptor (PTHrP) wird Protein-Kinase-A (PKA) aktiviert, was durch Suppression von Sklerostin, zu WNT-abhängigen Signalkaskaden führt, die letztendlich die *fgf23* Expression erhöhen (Lavi-Moshayoff et al. 2010, Rhee et al. 2011). Im Gegenzug dazu unterdrückt FGF23 die Synthese und Sekretion von PTH (Ben-Dov et al. 2007). Obwohl die Nebenschilddrüsen *klotho* exprimieren, haben Studien gezeigt, dass FGF23 mittels einer Calcineurin-abhängigen Signalkaskade, PTH auch unabhängig von membranständigem Klotho unterdrücken kann (Olauson et al. 2013).

Eine Studie, in der Mäuse entweder mit Deoxycorticosteronacetat behandelt oder auf eine salzarme Diät gesetzt wurden, hat gezeigt, dass ein erhöhtes Level an Aldosteron bei Mäusen einen Anstieg an FGF23 bewirkt. Diese erhöhte *fgf23* Expression wurde unter anderem durch die Gabe von Withaferin A, einem NF κ B-Inhibitoren, verhindert (Zhang et al. 2016). Da die Promotorregion von *fgf23* ein Nuclear factor κ B (NF κ B) responsives Element enthält, könnte die durch Aldosteron verursachte Aktivierung von NF κ B für die erhöhte Expression von *fgf23* verantwortlich sein. Unter dieser Annahme könnten auch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und Tumor-Nekrose-Faktor, durch eine Aktivierung von NF κ B, eine Erhöhung der *fgf23* Expression bewirken (Kuro-o 2019).

In Abbildung 2 sind die endokrinen Feedback Schleifen zwischen FGF23, PTH und Vitamin D zusammengefasst, die die Mineralhomöostase maßgeblich regulieren.

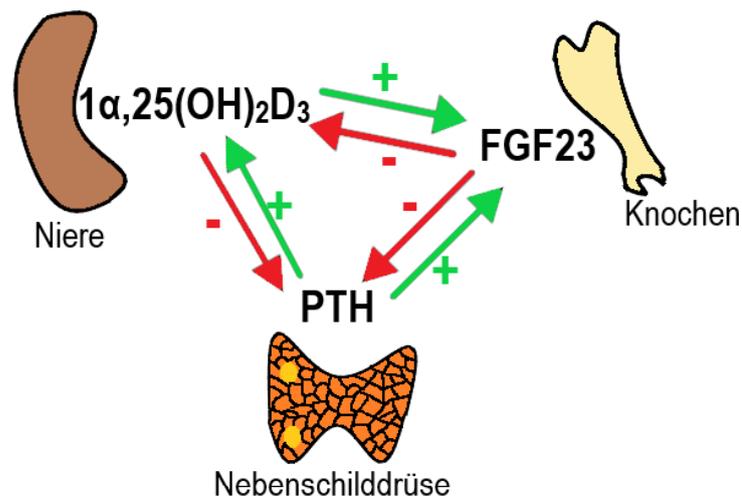


Abbildung 2: FGF23 – PTH – Vitamin D – Achse. PTH stimuliert in den Nieren die vermehrte Bildung und Freisetzung von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, dessen steigende Serumkonzentrationen im Gegenzug dazu, die weitere Freisetzung von PTH supprimieren. Darüber hinaus führt PTH zu einer vermehrten Expression von *fgf23* und dadurch zu einer verstärkten Freisetzung von FGF23 aus den Knochen in die systemische Zirkulation. Steigende FGF23 Serumkonzentrationen haben eine inhibitorische Wirkung auf die Synthese von PTH. Des Weiteren führt FGF23 zu einer verminderten Aktivität der 1 α -Hydroxylase, wodurch die Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aus $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ supprimiert wird. Im Gegensatz dazu führen höhere Serumkonzentrationen von $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ im Sinne einer negativen Feedback-Schleife zu einer erhöhten Freisetzung von FGF23 aus den Knochen.

1.4 Renale Effekte von FGF23

Da die Nieren, wie weiter oben bereits erwähnt, die Organe sind, in denen FGF23 vornehmlich seine Wirkung entfaltet, wird den renalen Effekten im folgenden Abschnitt besondere Beachtung geschenkt.

1.4.1 Proximaler Tubulus

Die Reabsorption von Phosphat aus dem Urin findet durch Natrium-abhängige Transportproteine im proximalen Tubulus statt. Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit FGF23 sind dabei die Natrium-Phosphat-Kotransporter (NaPi) –2a und –2c. Als phosphaturisches Hormon unterdrückt FGF23 die Phosphatreabsorption im proximalen Tubulus, indem es die Menge an NaPi-2a und NaPi-2c Molekülen an der luminalen Membran reduziert (Shimada et al. 2004a, 2004b, 2005). Unter physiologischen Bedingungen scheint NaPi-2c bei Mäusen jedoch eine untergeordnete Rolle bezüglich der Phosphat Homöostase

zu spielen, da die phosphaturische Wirkung von FGF23 fast ausschließlich durch eine verminderte Expression von NaPi-2a hervorgerufen wird (Myakala et al. 2014).

Obwohl die Zellen des proximalen Tubulus alle FGFR, bis auf FGFR2, synthetisieren, hat sich gezeigt, dass FGFR1 der Hauptverantwortliche für den Signalweg von FGF23 und damit die phosphaturische Wirkung von FGF23 ist (Gattineni et al. 2009, Andrukhova et al. 2012). Dennoch scheint FGFR4 auch eine Rolle bezüglich des renalen Phosphathandlings zu spielen, auch wenn diese untergeordneter Natur sein mag, da eine Ablation von FGFR1 und FGFR4 notwendig ist, um die phosphaturische Wirkung von FGF23 bei Mäusen komplett zu verhindern (Gattineni et al. 2014, Erben und Andrukhova 2017).

Es hat sich gezeigt, dass Zellen des proximalen Tubulus, den für den FGF23 Signalweg notwendigen Kofaktor Klotho, synthetisieren und das FGF23 eine Signalkaskade über die Extrazellulär-regulierte-Kinase 1/2 (ERK1/2) und die Serum/Glukokortikoid-regulierte-Kinase-1 (SKG1) aktiviert, welche wiederum nachfolgend zu einer Phosphorylierung des Na⁺/H⁺ exchange-regulatory-cofactor-1 (NHERF-1) führt (Andrukhova et al. 2012). Diese Phosphorylierung von NHERF-1 führt in weiterer Folge zur Internalisierung und Degradation von NaPi-2a und somit zu einer verminderten Phosphat Reabsorption (Weinman et al. 2007, 2011).

Die phosphaturische Wirkung von PTH ist ebenfalls durch eine verminderte Membranexpression von NaPi-2a im proximalen Tubulus bedingt. Die Bindung von PTH an den PTHR führt über Phosphorylierung durch Protein Kinase A (PKA) und Protein Kinase C (PKC) ebenfalls zur Phosphorylierung von NHERF-1 (Déliot et al. 2005). Diese Gemeinsamkeiten im Signalweg könnten eine Erklärung dafür liefern, weshalb basale PTH Konzentrationen für eine adäquate phosphaturische Wirkung von FGF23 notwendig sind und umgekehrt (Erben und Andrukhova 2017).

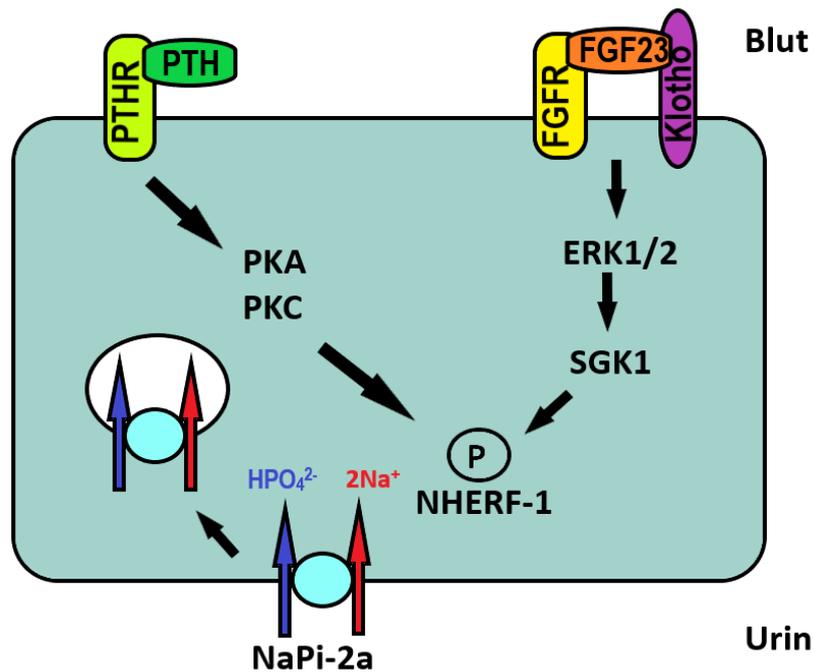


Abbildung 3: Phosphatreabsorption im proximalen Nierentubulus. FGF23 befindet sich in der systemischen Zirkulation und dockt an der Zelloberfläche an einen Komplex an, welcher aus FGFR und Klotho besteht. Dies führt zur Aktivierung von ERK1/2, welches nachfolgend SGK1 aktiviert, die dann NHERF-1 phosphoryliert und somit aktiviert. NHERF-1 sorgt für eine Internalisierung und Degradierung von NaPi-2a aus der luminalen Membran und damit zu einer gesteigerten renalen Phosphatexkretion. Die Phosphorylierung von NHERF-1 kann auch durch Binden von PTH an den PTHR ausgelöst werden, welches die Kinasen PKA und PKC aktiviert.

Zusätzlich zu diesen Effekten auf die renale Phosphatregulierung, ist FGF23 auch in den Vitamin D Metabolismus des proximalen Tubulus involviert. Unter physiologischen Umständen sind die Nieren der Hauptbildungsort von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, der biologisch aktiven Form von Vitamin D (Fraser 1980).

FGF23 sorgt für eine verringerte Expression von *Cyp27b1*, welches für 1α -Hydroxylase, das Schlüsselenzym für die Umwandlung von $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, kodiert (Shimada et al. 2004a). 1α -Hydroxylase wird hauptsächlich in den Zellen des proximalen Tubulus exprimiert (Brunette et al. 1978). Ähnlich wie FGF23 bewirkt auch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ eine Verringerung der Synthese und Aktivität der 1α -Hydroxylase, wohingegen PTH diese stimuliert (Verstuyf et al. 2010). Mäuse mit *fgf23*^{-/-} und *klotho*^{-/-} Mutationen zeigen trotz Hyperkalzämie und niedrigen PTH Serumkonzentrationen eine erhöhte Synthese der 1α -Hydroxylase (Yoshida et al. 2002,

Shimada et al. 2004b). Diese Tatsache verdeutlicht die Wichtigkeit der inhibitorischen Wirkung von FGF23 auf die Aktivität der 1α -Hydroxylase und suggeriert sogleich die Notwendigkeit von Klotho in diesem Zusammenspiel. Daher scheint es aktuell so, dass die Wirkung von FGF23 auf die 1α -Hydroxylase im proximalen Tubulus, von Klotho abhängig ist. Dabei sind die Rezeptoren FGFR 1,3 und 4 involviert, wobei FGFR1 wahrscheinlich den Wichtigsten in diesem Zusammenhang darstellen könnte (Han et al. 2016b, Erben und Andrukhova 2017). Die genauen intrazellulären Mechanismen, durch die der FGF23 Signalweg zu einer Verminderung der Synthese und Aktivität der 1α -Hydroxylase führt, sind jedoch bis auf die Beteiligung von ERK1/2 noch unbekannt (Ranch et al. 2011).

Gleichzeitig könnte FGF23 die Expression von *Cyp24a1*, welches für das Enzym 24-Hydroxylase kodiert, erhöhen. 24-Hydroxylase ist als wichtigster Faktor, für die Umwandlung von $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, einer inaktiven Form von Vitamin D, verantwortlich (Jones et al. 2012). Jedoch stellt sich aufgrund der Tatsache, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ein sehr potenter Stimulator der 24-Hydroxylase ist, die Frage, ob FGF23 einen eigenständigen Effekt auf die 24-Hydroxylase hat. Diese Fragestellung ist schwer *in vivo* zu beantworten und bisher noch unklar (Jones et al. 2012, Erben und Andrukhova 2017). Die durch FGF23 verringerten Serumkonzentrationen an $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ unterstützen wesentlich die phosphatsenkenden Effekte von FGF23, da dadurch weniger Phosphat im Gastrointestinaltrakt aufgenommen wird.

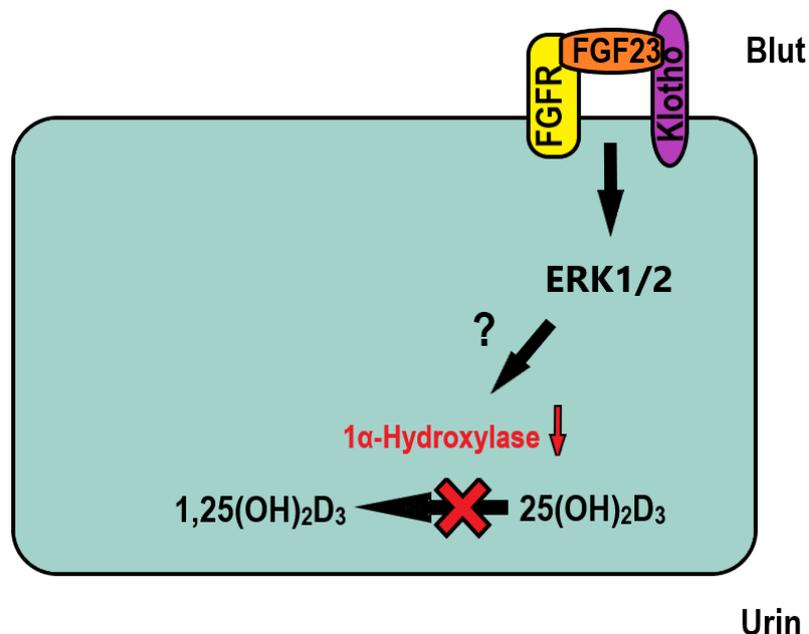


Abbildung 4: Regulation der $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Produktion im proximalen Nierentubulus. FGF23 aus der systemischen Zirkulation bindet an einen Komplex, bestehend aus FGFR und Klotho, was zu einer

Signalkaskade führt, die über ERK1/2 zu einer verminderten Aktivität der 1α -Hydroxylase und damit zu einer reduzierten Bildung von $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aus $25(\text{OH})_2\text{D}_3$ führt. Die genauen intrazellulären Signalmechanismen, welche auf ERK1/2 folgen, sind jedoch noch unbekannt.

1.4.2 Distaler Tubulus

Wie bereits weiter oben beschrieben, ist der Signalweg von FGF23 auf Komplexe bestehend aus FGFR und membranständigem Klotho als Kofaktor angewiesen. Obwohl die distalen Nierentubuli als der Ort identifiziert wurden, an denen *klotho* vorwiegend exprimiert wird, hat man dennoch angenommen, dass sich die Wirkungen von FGF23 in den Nieren auf die Phosphatreabsorption und den Vitamin D Metabolismus im proximalen Tubulus beschränken (Farrow et al. 2009). Den löslichen Isoformen von Klotho wurde eine kalziumkonservierende Wirkung im distalen Tubulus zugesprochen (Chang et al. 2005).

Da jedoch unklar war, wie die löslichen Isoformen von Klotho, die aufgrund ihres Molekülgewichtes für den glomerulären Filter impermeabel sind, in den distalen Tubulus gelangen sollten, um dort ihre angeblich Kalziumkonservierende Wirkung auszuüben, führte dies zu weiteren Untersuchungen. Diese zeigten, dass die Kalziumreabsorption im distalen Tubulus in diesem Zusammenhang durch FGF23 reguliert wird, indem es an einen Rezeptorkomplex aus FGFR und membranständigem Klotho bindet (Andrukhova et al. 2014b). Daher wird aktuell angenommen, dass FGF23 über einen Signalweg, welcher ERK1/2, SGK1 und With-No-Lysin-Kinase-4 (WNK4) beinhaltet, die Membranexpression von NCC und TRPV5 und damit das renale Natrium und Kalzium Handling im distalen Tubulus reguliert (Andrukhova et al. 2014a, 2014b).

Sowohl im proximalen als auch im distalen Tubulus löst das Binden von FGF23 an einen FGFR-Klotho-Komplex die ERK1/2 SGK-1 Signalkaskade aus. Im distalen Tubulus resultiert FGF23-Signaling zusätzlich in einer Phosphorylierung von WNK4, welche sich als essenziell für die natrium- und kalziumkonservierende Wirkung von FGF23 herausgestellt hat (Andrukhova et al. 2012, 2014a, 2014b).

WNK-Kinasen kontrollieren den intrazellulären Transport von Membranproteinen. Dabei wirken sie als Komplex aus zumindest drei verschiedenen Kinasen: WNK1, WNK2 und WNK4 (McCormick et al. 2008). In den distalen Nierentubuli führt eine Aktivierung von SGK1 zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung von WNK4 (Ring et al. 2007). WNK4 reguliert im distalen Tubulus unter anderem Ionenkanäle wie $\text{Na}^+:\text{Cl}^-$ -Cotransporter (NCC), Renal-Outer-

Medullar-K⁺-Channel (ROMK1) und Transient-Rezeptor-Potential-Vannilloid-5 (TRPV5) (Ring et al. 2007, Andrukhova et al. 2014b).

Der transzelluläre Kalziumtransport und damit die Reabsorption von Kalzium aus dem Urin wird durch die Membranexpression von TRPV5 an Zellen des distalen Tubulus limitiert. Dadurch bilden die Anzahl an TRPV5 Glykoproteinen und ihr Öffnungszustand die Grundlage für die hormonelle Regulation der Kalziumreabsorption aus dem Urin (Lambers et al. 2006). Wie weiter oben bereits angedeutet, führt der FGF23 Signalweg im distalen Tubulus, unabhängig von Vitamin D, über eine Aktivierung von WNK4 zu einer deutlich erhöhten Expression von TRPV5, erhöhtem transzellulärem Ca²⁺ Transport und dadurch letztendlich zu einer massiv verringerten renalen Kalziumausscheidung (Abbildung 5). (Andrukhova et al. 2014b). Nachdem dieser Mechanismus auch in isolierten Segmenten des distalen Tubulus nachgewiesen werden konnte, gibt es Evidenz, dass dies eine eigenständige, direkte Wirkung von FGF23 auf Zellen des distalen Tubulus ist (Andrukhova et al. 2014b).

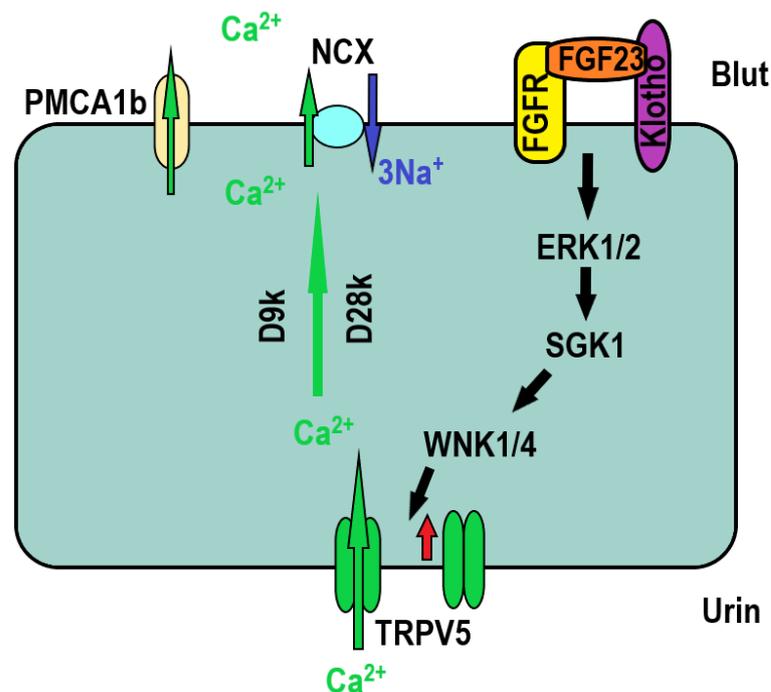


Abbildung 5: Regulation der Kalziumreabsorption im distalen Tubulus durch FGF23. FGF23 aus der systemischen Zirkulation bindet an den FGFR-Klotho Komplex, was zur Auslösung der ERK1/2-SGK1 Signalkaskade und in weiterer Folge zur Komplexbildung von WNK1/4 mit TRPV5 führt. Daraus resultiert, dass mehr vollständig glykolisierte TRPV5 Moleküle vom Golgi-Apparat in die luminal Membran eingebaut werden und somit die Kalziumreabsorption aus dem Primärharn erhöht wird. Intrazelluläres Ca²⁺ wird an Calbindine (D9k, D28k) gebunden und auf Seiten der basolateralen

Membran durch NCX (Na-Ca-Exchanger) und PMCA1b (Plasmamembran CaATPase) aus der Zelle blutseitig ausgeschleust.

Die Natriumreabsorption im distalen Nephron findet vorwiegend über NCC und epitheliale Na⁺ Kanäle (ENaC) statt. FGF23 reguliert im distalen Nephron die Membranexpression und Aktivität von NCC. Nach Bindung an einen FGFR1c- α Klotho-Komplex führt die Phosphorylierung von WNK4 zu einer Aktivierung von NCC. Dadurch erhöht der FGF23 Signalweg im distalen Tubulus die Membranexpression von NCC und führt zu einer vermehrten Natriumreabsorption (Abbildung 6) (Andrukhova et al. 2014a).

Durch die Bindung an Mineralokortikoidrezeptoren (MR) reguliert Aldosteron durch erhöhte Synthese der alpha-Untereinheit des ENaC, dessen Membranexpression und damit die Natriumreabsorption im distalen Nephron (May et al. 1997). Ähnlich wie FGF23 kann Aldosteron jedoch auch NCC aktivieren. Der Signalweg dafür beinhaltet unter anderem SGK1, WNK4 und STE20/SPS-1-related Proline/Alanine-rich-Kinase (SPAK) (Abbildung 6) (Ko et al. 2013). SGK1 nimmt im Zusammenspiel mit Aldosteron und FGF23 eine Schlüsselposition im renalen Natrium Handling ein (Lang et al. 2009). Jedoch führt eine Aktivierung von SGK1 durch FGF23 nicht zu einer erhöhten ENaC Expression im distalen Tubulus. Der Grund dafür ist noch unklar (Andrukhova et al. 2014a).

Letztere Studie zeigte zudem, dass die erhöhte NCC Expression nach Applikation von rekombinantem FGF23, zu erhöhtem Blutvolumen, erhöhtem Blutdruck und Herzhypertrophie führt. Weitere Erkenntnisse in diesem Zusammenhang waren, dass eine natriumarme Diät die durch FGF23 verursachte Hypertension zusätzlich verschlimmert (Andrukhova et al. 2014a). Ein möglicher Grund dafür könnte sein, dass geringe Natriumserumkonzentrationen zu einer vermehrten Aldosteron Freisetzung führen. Dabei könnten FGF23 und Aldosteron, die beide SGK1 aktivieren, synergistische Wirkungen auf die Aktivierung von NCC und die Volumen Homöostase haben (Erben und Andrukhova 2017).

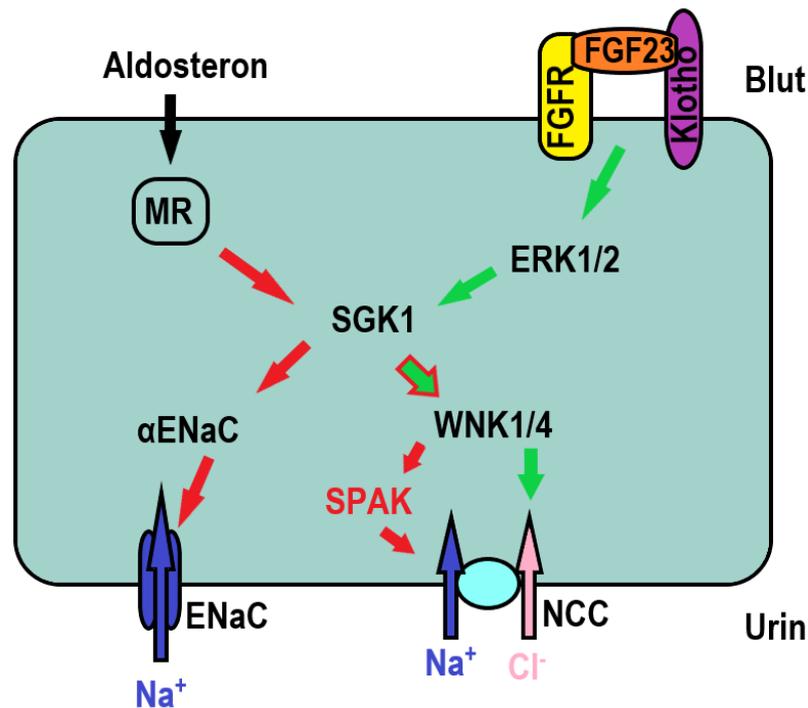


Abbildung 6: Regulation der renalen Natriumreabsorption im distalen Tubulus. Aldosteron führt durch Bindung an den Mineralokortikoidrezeptor zu einer erhöhten Expression von ENaC in der luminalen Membran und damit zu einer gesteigerten renalen Natriumreabsorption. FGF23 aus der systemischen Zirkulation bindet an einen Komplex, bestehend aus FGFR und Klotho, was zu einer Signalkaskade über ERK1/2, SGK1 und WNK4 zu einer erhöhten Membranexpression von NCC führt. Aldosteron kann aber auch über Aktivierung von SGK1, WNK1/4 und nachfolgend SPAK die luminalen Membranexpression von NCC erhöhen. Dadurch erhöhen Aldosteron und FGF23 über NCC die Natriumreabsorption aus dem Primärharn. In dieser Grafik ist der FGF23 Signalweg mit grünen Pfeilen, der Aldosteron Signalweg mit roten Pfeilen und der gemeinsame Signalweg dargestellt.

1.5 FGF23 bei chronischer Niereninsuffizienz

Wie bereits weiter oben erwähnt, können bei Patienten, die an CNI leiden, erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen nachgewiesen werden. Bei CNI kommt es ungeachtet ihres Auslösers zu einer Abnahme der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) und dadurch zu einer verminderten renalen Phosphatausscheidung und zur Hyperphosphatämie. Da erhöhte Phosphatserumkonzentrationen wiederum die Ausschüttung von FGF23 stimulieren, steigt das FGF23 Level während CNI mit Abnahme der GFR progressiv an (Larsson et al. 2003, Wolf 2013). Es ist jedoch unklar, weshalb es in frühen Stadien der CNI zu diesem FGF23 Anstieg kommt, da die FGF23 Serumkonzentration bereits ansteigt, bevor sich PTH und Phosphat

Mengen im Blut erhöhen (Isakova et al. 2011). Aktuelle Studien legen den Schluss nahe, dass erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen in frühen Stadien der CNI dabei helfen die renale Phosphatexkretion pro verbleibendem Nephron zu erhöhen und so vor den dramatischen Folgen einer Hyperphosphatämie zu schützen (Jüppner et al. 2010). Ergänzend dazu könnte die natriumkonservierende Wirkung von FGF23 im distalen Tubulus dem Natriumverlust, hervorgerufen durch Internalisierung und Degradierung der NaPi-2a/2c im proximalen Tubulus, gegensteuern (Andrukhova et al. 2014a). Darüber hinaus könnte die kalziumkonservierende Wirkung von FGF23 in späteren Stadien der CNI, bei denen Vitamin D erniedrigt ist, dazu beitragen, die Kalziumserumkonzentration zu regulieren (Andrukhova et al. 2014b). Sobald jedoch in späteren CNI Stadien eine ausgeprägte Hyperphosphatämie vorhanden ist, könnte die durch FGF23 verursachte Kalziumreabsorption zum Entstehen von vaskulären Verkalkungen beitragen (Erben und Andrukhova 2017). Ob erhöhte Serumkonzentrationen an FGF23 jedoch zu einer verstärkten Aktivierung des WNK-Signalwegs führen, ist aktuell noch unbekannt.

In fortgeschrittenen Stadien der CNI kann FGF23 jedoch Serumkonzentrationen erreichen, die bis zu 1000-fach oberhalb des Normalniveaus liegen (Gutiérrez 2010). Daher sind ungeachtet zu den vermeintlich protektiven Wirkungen von FGF23 in letzter Zeit auch immer mehr pathologische Wirkungen von erhöhten FGF23 Konzentrationen in den Fokus gerückt.

Als Überbegriff für die verschiedenen Entgleisungen der Mineralhomöostase und des Knochenmetabolismus bei CNI wurde der Begriff „chronic kidney disease-mineral and bone disorder“ (CKD-MBD) eingeführt. Dabei sind eine beeinträchtigte Knochenmineralisierung und eine erhöhte Freisetzung von FGF23 aus dem Knochen wesentliche Kennzeichen von CKD-MBD. Es wurde gezeigt, dass FGF23 unabhängig von Klotho über FGFR3 autokrin/parakrin die Expression der Tissue-Nonspecific-Alkaline-Phosphatase (TNAP) in Knochenzellen supprimiert, was letztendlich zu einer Akkumulation von Pyrophosphat, einem Inhibitor der Knochenmineralisierung, führt (Murali et al. 2016, Andrukhova et al. 2018).

Erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen korrelieren bei CNI Patienten positiv mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie LVH, Gefäßverkalkungen und einer erhöhten Mortalitätsrate (Faul et al. 2011). LVH ist die Folge einer erhöhten Vor-/Nachlast im Herzen und ist charakterisiert durch eine reaktive interstitielle und perivaskuläre Fibrose. Wenn das Herz über einen längeren Zeitraum zu hoher Arbeitsbelastung ausgesetzt ist, führt dies zum Absterben der Kardiomyozyten, welche dann durch Bindegewebe ersetzt werden (Hein et al.

2003). Dadurch gelten LVH und kardiale Fibrose als unabhängige Prädiktoren für kardiovaskuläre Mortalität (Dweck et al. 2011).

Es hat sich herausgestellt, dass FGF23 einen direkten, von Klotho unabhängigen Effekt auf Kardiomyozyten hat und hypertrophe strukturelle Veränderungen im Herzmuskel auslöst (Faul et al. 2011). In weiterführenden Untersuchungen wurde gezeigt, dass diese negativen Effekte von FGF23 auf das Herz durch FGFR4 mediiert werden (Grabner et al. 2015). Eine selektive Blockade des FGFR4 zeigte sich als geeignet, die durch CNI induzierte LVH rückgängig zu machen (Grabner et al. 2017).

Es gibt aber auch Evidenz, dass Patienten, die an Krankheiten leiden, welche durch chronisch erhöhte FGF23 Konzentrationen charakterisiert sind, wie die FGF23-medierte hypophosphatämische Rachitis, keine erhöhte Inzidenz von LVH aufweisen (Takashi et al. 2017). Dies wurde zudem unabhängig auch bei Hyp Mäusen, einem Mausmodell, welches x-linked Hypophosphatämie (XLH) aufweist, bestätigt. Eine Studie mit diesen Mäusen konnte, trotz erhöhter FGF23 Serumkonzentrationen, weder histologische kardiale Veränderungen noch Abweichungen in der Echokardiographie zeigen (Liu et al. 2018).

Des Weiteren wurden nach Applikation von rekombinanten FGF23 eine erhöhte NCC Synthese in den distalen Nierentubuli beobachtet. Da CNI per se schon zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) führt und eine amplifizierende Wirkung von Aldosteron auf FGF23 möglich scheint, könnten erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen, wie sie bei CNI vorkommen, eine wichtige Rolle bezüglich Hypervolämie, Hypertension und der Entwicklung von LVH bei CNI spielen (Lattanzio und Weir 2010, Andrukhova et al. 2014a).

Bei Patienten mit frühen CNI Stadien konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhten FGF23 Serumkonzentrationen und pro-inflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-6 (IL6) oder C-reaktivem Protein (CRP) festgestellt werden. FGF23 induziert über FGFR4, unabhängig von Klotho, die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in Hepatozyten. Entzündungsprozesse verstärken wiederum die Freisetzung von FGF23 aus dem Knochen, was eine Aufwärtsspirale zur Folge haben könnte (Vervloet 2019). Darüber hinaus wurden weitere proinflammatorische Wirkungen von FGF23 auf Makrophagen und vorgeschädigten Fibroblasten beschrieben (Han et al. 2016a, Smith et al. 2017). Ob diese proinflammatorischen Wirkungen von FGF23 eine Rolle in der Progression von CNI spielen, ist aber noch unbekannt.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Zahlreiche Studien bestätigen einen Zusammenhang zwischen erhöhten FGF23 Serumkonzentrationen in Patienten mit CNI und der Entstehung von LVH. Jedoch ist LVH bei Patienten mit FGF23-medierter hypophosphatämischer Rachitis, welche durch chronisch erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen charakterisiert ist, keine übliche Begleiterscheinung. Im Verlauf von CNI kann FGF23 Serumkonzentrationen erreichen, die weit über dem Normalniveau liegen. FGF23 führt zu einer verstärkten renalen Phosphatexkretion. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Phosphatausscheidung aus den Nieren tubuläre Schäden induziert. Des Weiteren gibt es Studien, die nahe legen, dass FGF23 pro-inflammatorische Effekte auf vorgeschädigte Fibroblasten in den Nieren hat. Dennoch ist es immer noch nicht vollständig geklärt, ob FGF23 einen Biomarker für eine entgleiste Phosphathomöostase darstellt oder ob es ein aktiver Modulator von pathologischen Prozessen bei der Progression von CNI ist. Aufgrund kontroverser Daten gibt es Unklarheiten, ob und in welchem Zusammenhang erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen und die Entstehung von LVH stehen.

Daher war das Ziel dieser Arbeit die Rolle von FGF23 bei der Entstehung von interstitieller Fibrose in Nieren und Herzen durch eine experimentell induzierte CNI näher zu charakterisieren. Die Hypothese dieser Arbeit war, dass FGF23 bei CNI zu einer verstärkten peritubulären Fibrose in den Nieren und interstitieller Fibrose im linken Ventrikel und somit zur Progression der CNI und zur Entstehung von LVH bei CNI beiträgt. Dafür wurde der Kollagengehalt in Herzen und Nieren von *Fgf23*^{-/-}/*VDR*^{ΔΔ} mit WT Mäusen verglichen, nachdem bei den Mäusen eine CNI durch 5/6 Nx induziert wurde.

Des Weiteren gibt es Evidenz, dass FGF23 über den WNK Signalweg in gesunden Nieren die Kalzium- und Natriumreabsorption durch eine verstärkte Expression von NCC und TRPV5 im distalen Tubulus erhöht. Deshalb wurde in dieser Arbeit getestet, ob die prophylaktische Administration des WNK-Signalweg-Inhibitoren Closantel, zu einer verminderten Expression von NCC und TRPV5 in Nieren von WT Mäusen mit induzierter CNI führt.

2. Materialien & Methoden

2.1 Tiere

Heterozygote $VDR^{+/Δ}$ Mäuse (Erben et al. 2002) wurden mit heterozygoten $fgf23^{+/-}$ (Sitara et al. 2004) Mäusen gepaart, um doppelt heterozygote Tiere zu erzeugen. Die dafür verwendeten Mäuse wurden zuvor auf den genetischen Hintergrund C57BL/6 zurückgekreuzt. Die durch diese Verpaarungen erhaltenen doppelt heterozygoten Nachkommen wurden untereinander gekreuzt, um Wild-Typ (WT), $VDR^{Δ/Δ}$, $fgf23^{-/-}$ und $fgf23^{-/-}/VDR^{Δ/Δ}$ Mäuse zu erhalten. Die genomische DNA der Mäuse wurde mittels Schwanzbiopsien gewonnen und mit einer Multiplex PCR wie bereits beschrieben genotypisiert (Hesse et al. 2007). Alle Experimente wurden an drei Monate alten männlichen Mäusen durchgeführt. Die Mäuse wurden bei 22-24 °C und einem 12 Std./12 Std. Licht/Dunkelheit Rhythmus gehalten. Ihnen wurde freier Zugang zu normalem Nagerfutter, Leitungswasser und einer Rescue Diät gewährt. Die Rescue Diät (Ssniff, Soest, Deutschland) enthielt 2,0 % Calcium, 1,25 % Phosphor, 20 % Laktose und 600-IE Vitamin D/kg. Sie wurde ab Tag 16 post partum gefüttert und zwar lebenslang. Diese Diät zeigte sich als geeignet, die Mineralhomöostase von VDR ablatierten Mäusen zu normalisieren (Erben et al. 2002). Zum Zwecke der Organgewinnung wurden die Mäuse acht Wochen nach Induktion der CNI durch 5/6 Nephrektomie mittels Entbluten aus der V. cava caudalis euthanasiert. Dies fand unter Allgemeinanästhesie mit Ketamin/Medetomidin (50/0,5 mg/kg s. c.) statt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Alle Tierversuche wurden von den Ethikkommissionen der Veterinärmedizinischen Universität Wien und des Bundesministeriums für Bildung, Wissenschaft und Forschung genehmigt (BMWF-68.205/0054-II/3b/2013).

2.2 Chronisches Niereninsuffizienz Modell

Die chronische Niereninsuffizienz (CNI) wurde durch eine 5/6 Nephrektomie (5/6 NX) ausgelöst. Dies beinhaltete einen zweistufigen Prozess (Leelahavanichkul et al. 2010), in welchem zuerst Teile der linken Niere entfernt wurden und sieben Tage später die gesamte rechte Niere. Dies ist die gebräuchlichste Methode, um die humane CNI nachzustellen (Hewitson et al. 2009). Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Operation drei Monate alt. Vor Beginn der Operation wurde den Tieren Metamizol (200 mg/kg s. c.) und Ketamin/Medetomidin (15/0,2 mg/kg s. c.) als Analgesie verabreicht. Die Operation fand unter Allgemeinanästhesie mit Isofluran statt. Im ersten Schritt wurde die Kapsel der linken Niere gelöst und der craniale und caudale Nierenpol entfernt. Der Zugang fand dabei über die linke

Flanke statt. Anfallende Blutungen wurden mit fibrillärer Kollagen Hämostase (Gelaspon, Chauvin Ankerpharm) gestillt. Eine Woche nach dem Eingriff wurde nach Ligation der Nierenarterie, Nierenvene und des Ureters im zweiten Schritt die gesamte rechte Niere entfernt. Der Zugang wurde über die rechte Flanke gewählt.

Bei den scheinoperierten (*Sham*) Kontrollmäusen erfolgte die Operation wie folgt: Im ersten Schritt wurde die linke Flanke eröffnet, cranialer und caudaler Pol der linken Niere ermittelt und dann die Inzision wieder verschlossen. Im nächsten Schritt wurde eine Inzision in der rechten Flanke vorgenommen, die rechte Nierenarterie identifiziert und die Inzision daraufhin wieder verschlossen. Zum Verschluss der Inzisionen wurde jeweils die Bauchwand genäht.

Zum postoperativen Schmerzmanagement wurde den Mäusen 72 Stunden lang das Analgetikum Piritramid über das Trinkwasser verabreicht. Dazu wurde ein Fläschchen Piritramid mit 10 ml 10%iger Glukose Lösung in 250 ml Leitungswasser gegeben. Die ersten 24 Stunden nach der Operation wurden die Mäuse kontinuierlich überwacht.

2.3 Behandlung der Tiere

Für einen Versuch wurde WT Mäusen, welche zuvor scheinoperiert oder eine 5/6 Nx erhalten haben, eine Closantel-haltige Diät gefüttert. Dazu wurde Closantel (Abcam) in 100 % Ethanol gelöst und unter das Futter gemischt. Begonnen wurde mit einer Closantel Konzentration von 30 mg/kg Futter, um eine Initialdosis von 5 mg/kg Körpermasse zu erhalten. Hierbei wurde von einer durchschnittlichen Futteraufnahme von 5 g/Tag/Maus und einer Bioverfügbarkeit von 50 % ausgegangen. Danach wurde Closantel einmal wöchentlich verabreicht, um die Plasmakonzentration konstant zu halten. Die Initialdosis Closantel wurde den Mäusen am ersten Tag nach der 5/6 Nx gegeben. Die letzte Dosis wurde an Tag 50 post-OP verabreicht. Alle Mäuse in diesem Versuch wurden acht Wochen nach Induktion der CNI euthanasiert.

2.4 Histologie der Herzen

Die Mausherzen wurden ursprünglich im Ganzen in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Vor der Bearbeitung wurden die Mausherzen für mindestens drei Stunden bei -20 °C gelagert. Die Herzen wurden gedrittelt und die Apex cordis verworfen. Mittels Kryostat (Leica CM1520) und Fixation durch Cryo-Gel (Leica OCT # 39475237) wurden die Blöcke in 15 µm Schritten getrimmt, um eine gerade Schnittfläche zu erhalten. Es wurden bei einer Temperatur von -18 bis -20 °C 6 µm dicke Schnitte angefertigt und 3-5 Schnitte auf jeden Objektträger gegeben. Die fertigen Kryoschnitte wurden bis zur Färbung auf -80 °C tiefgekühlt gelagert. Zur Darstellung von Kollagen im Gewebe wurden Kryoschnitte von Herzen mittels Picro-Sirius-

Red-Färbung (0,5 g Sirius Red F3B und 500 ml 1,3 % Pikrinsäure-Solution) angefärbt. Die bei -80 °C tiefgekühlten Kryoschnitte wurden zwei Stunden luftgetrocknet und wieder bei -20 °C über Nacht zwischengelagert. Darauf erfolgte die Fixierung mit Aceton für 90 Sekunden und anschließendem Trocknen bei Raumtemperatur für fünf Minuten. Die Färbung mit Picro-Sirius-Red-Solution wurde lichtgeschützt durchgeführt und umfasste für die Kryoschnitte der Herzen eine Dauer von 90 Minuten. Die Schnitte wurden danach mehreren Waschschrinen unterzogen. Als erstes lichtgeschützt und auf einem Rüttler, dreimal für jeweils drei Minuten in angesäuertes Wasser (0,83 ml konzentrierter HCL (37 %) in einem Liter destilliertem Wasser). Daraufhin wurden die Objektträger zweimal für jeweils drei Minuten in Isopropanol gegeben und zweimal für jeweils 21 Minuten in Xylol. Danach wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckt und lichtgeschützt bis zur mikroskopischen Evaluierung gelagert.

2.5 Histologie der Nieren

Als Vorbereitung für die Histologie wurden die Nieren über Nacht in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und dann 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Zur Darstellung von Kollagen im Gewebe wurden Paraffinschnitte von Nieren mittels Picro-Sirius-Red-Färbung angefärbt. Für die Entparaffinierung wurden die Schnitte zuerst zweimal für je 15 Minuten in Xylol gegeben. Danach jeweils fünf Minuten in Isopropanol, 70%igen Ethanol und 40%igen Ethanol, in genannter Reihenfolge. Abschließend wurden die Schnitte zweimal für jeweils zweieinhalb Minuten in destilliertes Wasser gegeben. Die Färbung mit Picro-Sirius-Red Solution wurde lichtgeschützt durchgeführt und umfasste für die Paraffinschnitte der Nieren eine Dauer von 90 Minuten. Die Schnitte wurden danach mehreren Waschschrinen unterzogen: als erstes lichtgeschützt, zweimal jeweils drei Minuten in angesäuertem Wasser. Die Objektträger wurden manuell getrocknet und anschließend zweimal jeweils drei Minuten in Isopropanol und zweimal für jeweils sieben Minuten in Xylol gegeben. Danach wurden die Schnitte mit DePeX eingedeckt und lichtgeschützt bis zur mikroskopischen Evaluierung gelagert.

2.6 Morphologische Evaluation der Herzen und der Nieren

Der Kollagengehalt in Nieren und Herzen wurde mit einem Mikroskop (Zeiss, Axioscope) und der Software Zen pro (Version 2.3) ermittelt. Zur Aufnahme der Bilder wurde mit 200 x Vergrößerung und einer Lichtintensität von 6,8 für die Nieren und 10,0 für die Herzen gearbeitet. Dafür wurden bei den Nieren vier Regionen, verteilt über den gesamten Kortex, ausgewählt. Bei den Herzen wurden ebenfalls vier Regionen, aus dem linken Ventrikel und dem Septum, ausgewählt. Anschließend wurde die PSR-positive Fläche mit ImageJ (Version

2.0.0) quantifiziert. Die PSR-positive Fläche wurde in Bezug auf das gesamte Nierengewebe, beziehungsweise auf das Herzgewebe des linken Ventrikels und Septums, ausgedrückt.

2.7 RNA Isolation und RT-qPCR

Zur Vorbereitung für die RNA Extraktion wurden Nieren mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und in einer Schwingmühle (Retsch, MM200) bei einer Frequenz von 30,0 Hz über eine Zeit von 20 Sekunden homogenisiert. Dem homogenisierten Nierengewebe wurden 700 µl Trifast (VWR, peqGOLD, 100 ml, # 30-2010) zugegeben. Nach dem Auftauen wurden die Proben in autoklavierte 1,5 ml Eppendorf Gefäße pipettiert und auf Trockeneis gelagert.

In einem weiteren Arbeitsschritt wurden die Proben zum Auftauen auf normales Eis gegeben. Danach wurden sie für zehn Minuten bei 4 °C mit 12.000 x g zentrifugiert und der Überstand in neue autoklavierte Gefäße überführt. Im nächsten Schritt wurde den Proben 75 µl 1-Bromo-3-Chloropropan (BCP) pro 1 ml Trifast hinzugegeben. Die Proben wurden gevortext und auf Raumtemperatur acht Minuten inkubiert. Als nächstes wurden die Proben für 15 Minuten bei 4 °C mit 12000 x g zentrifugiert und die wässrige Phase in neue autoklavierte Gefäße überführt. Die organische Phase, welche DNA und Proteine enthielt, wurde verworfen. Den übrigen Proben wurden nun 375 µl Isopropanol pro 1 ml Trifast hinzugefügt, die Gemische für 5 10 Sekunden gevortext und für 30 Minuten bei -20 °C in den Gefrierschrank gegeben. Danach wurden die Proben für acht Minuten bei 4 °C mit 12000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die folgenden zwei Waschschriffe wurden doppelt ausgeführt: Jeder Probe wurde 1 ml 75%iges Ethanol pro 1 ml Trifast hinzugegeben, das Gemisch für 5 Minuten mit 12000 x g zentrifugiert, danach das Ethanol dekantiert und das übergebliebene RNA Pellet für 8 Minuten luftgetrocknet. Abschließend wurde die erhaltene RNA in RNase-freiem Wasser gelöst.

Die Konzentration und die Reinheit der RNA wurden spektrometrisch bestimmt (NanoDrop 2000, Thermo Scientific). Die Reverse Transkription wurde mit Hilfe eines Reverse-Transkription-Kits (High – Capacity cDNA Kit # 6368813, Life Tech) durchgeführt. Dafür wurden 1 µg RNA pro Ansatz verwendet. Die RT- qPCR wurde mit einem Vii 7 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Dazu wurde ein 5x HOT FIREPOL Eva Green qPCR Mix (#08-25-00020, Medibena) und jeweils 1 µl cDNA verwendet. Eine Melting Curve Analyse wurde durchgeführt, um sicherzustellen, dass bei der qPCR Reaktion keine Nebenprodukte amplifiziert wurden. Die Expression der Gene wurde im Verhältnis zu dem Housekeeping Gen OAZ1 (Ornithine Decarboxylase Antizyme 1) analysiert.

Tabelle 1: Primer der qRT-PCR

Primer	Forward	Reverse
Col1a1	AGGTCCCAAGGGTAACAG	CTTTGGCACCAGTGTCTC
Col3a1	CCCAACCCAGAGATCCCATT	GAAGCACAGGAGCAGGTGTAGAA
Col4a1	CTGGCTTCTGCTGCTCTTCG	CAGCCAGAGCCACCACAATC
Fgfr1	AGATGATGACGACGACGATGACT	CATGCAGTTTCTTCTCCATTTTCTC
Trpv5	TCAGAGACCAAGACTGGAACCA	TCTAAGCAGTGGAGACTCCCAA
SLC12A3 (NCC)	CCATCGTAGACCCCATCAATG	TGGCCAGCAGCACAGTGA
OAZ1	TCCCTGCAGCGGATCCT	GTGGCGCTGCGTTTGTC

2.8 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse wurde GraphPad Prism (Version 8.1.1) genutzt. Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit einem Zweiseitigem t-Test durchgeführt. Drei oder mehrere Gruppen wurden mit Hilfe einer Einfaktoriellen Varianzanalyse (1-way-ANOVA) und darauffolgendem Student-Newman-Keuls-Test als post-hoc-Analyse verglichen. P-Werte mussten geringer als 0.05 sein, um als signifikant angesehen zu werden. Alle Daten sind als Mittelwert +/- Standardfehler gegeben.

3. Ergebnisse

Die häufigste Ursache für erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen bei humanen Patienten ist CNI und prospektive Studien haben gezeigt, dass erhöhte FGF23 Level unabhängig mit der Progression von CNI und der Entwicklung von kardialen Pathologien, assoziiert sind (Wolf 2013). Dennoch ist unklar, inwiefern FGF23 maßgeblich an der Modulation von pathologischen Prozessen beteiligt ist, die die Progression der CNI oder das Entstehen von LVH in CNI Patienten vorantreiben. Interstitielle Fibrose ist ein histologisches Charakteristikum von voranschreitender CNI und LVH. Daher wurde im Folgendem der Kollagengehalt in histologischen Schnitten von Herzen und Nieren quantifiziert. Diese wurden zuvor mit Picro-Sirius-Red gefärbt, da sich diese Färbung als eine der verlässlichsten Methoden herausgestellt hat, um Kollagenfasern in Geweben zu detektieren (Rich und Whittaker 2005). Es war nötig *Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* Doppelmutanten für dieses Versuchsdesign zu verwenden, da *Fgf23^{-/-}* Mäuse aufgrund der fehlenden Suppression der 1 α -Hydroxylase durch FGF23 sehr hohe 1,25(OH)₂D₃ Werte im Serum haben und dadurch an Hyperkalzämie und Hyperphosphatämie leiden, die in metastatischen Verkalkungen der Eingeweide und einer Lebensspanne von nur wenigen Wochen resultieren (Shimada et al. 2004a, Sitara et al. 2004). Es ist aber bekannt, dass *Fgf23^{-/-}* Mäuse mit einem nicht-funktionalen VDR gesund sind und bis ins hohe Alter untersucht werden können (Streicher et al. 2012). Dafür ist jedoch eine Rescue Diät nötig, welche mit Kalzium, Phosphat und Laktose angereichert ist, da diese die Mineralhomöostase in VDR ablatierten Mäuse normalisiert (Erben et al. 2002).

3.1 Analyse des Kollagengehaltes der Nieren

Um die Frage zu beantworten, ob FGF23 eine Rolle bei der Fibrosierung des Nierengewebes spielt und damit einen negativen Effekt auf die Progression der CNI hat, haben wir Wildtyp und *Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* Doppelmutanten Mäuse, bei welchen wir eine CNI durch 5/6 Nx induziert haben, verglichen. Dazu wurden Paraffinschnitte von Nieren mittels Picro-Sirius-Red gefärbt und der Kollagengehalt gegen das Gesamtnierengewebe quantifiziert.

***Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* Ablation führt zu verminderter peritubulärer Fibrose bei Mäusen mit induzierter CNI**

Der Kollagengehalt der Nieren von WT Mäusen, bei denen die CNI durch 5/6 Nx ausgelöst wurde, war signifikant höher als in der scheinoperierten WT Gruppe. Dies zeigt, dass die 5/6

Nx geeignet war, um fibrotische Änderungen im Nierengewebe, entsprechend der Progression von CNI, auszulösen. Generell konnte bei WT Mäusen mit induzierter CNI eine signifikant stärkere Fibrose des Nierengewebes im Vergleich zu allen anderen Gruppen festgestellt werden. Innerhalb der CNI Gruppe gab es einen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der peritubulären Fibrose zwischen *Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* Mäusen und WT Mäusen. Dabei führte die Abwesenheit der beiden Gene zu einer signifikant verringerten peritubulären Fibrose. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die *Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* Mäuse zumindest partiell vor der durch 5/6 Nephrektomie induzierten peritubulären Fibrose geschützt waren. Dieses Ergebnis wird nochmals durch die Tatsache unterstrichen, dass zwischen *Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* Mäusen der CNI Gruppe und WT Mäusen der Sham Gruppe zwar der Trend zu einer geringgradigen stärkeren Fibrose bei *Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* CNI Mäusen zu beobachten war, dieser jedoch nicht statistisch signifikant war (Abbildung 7).

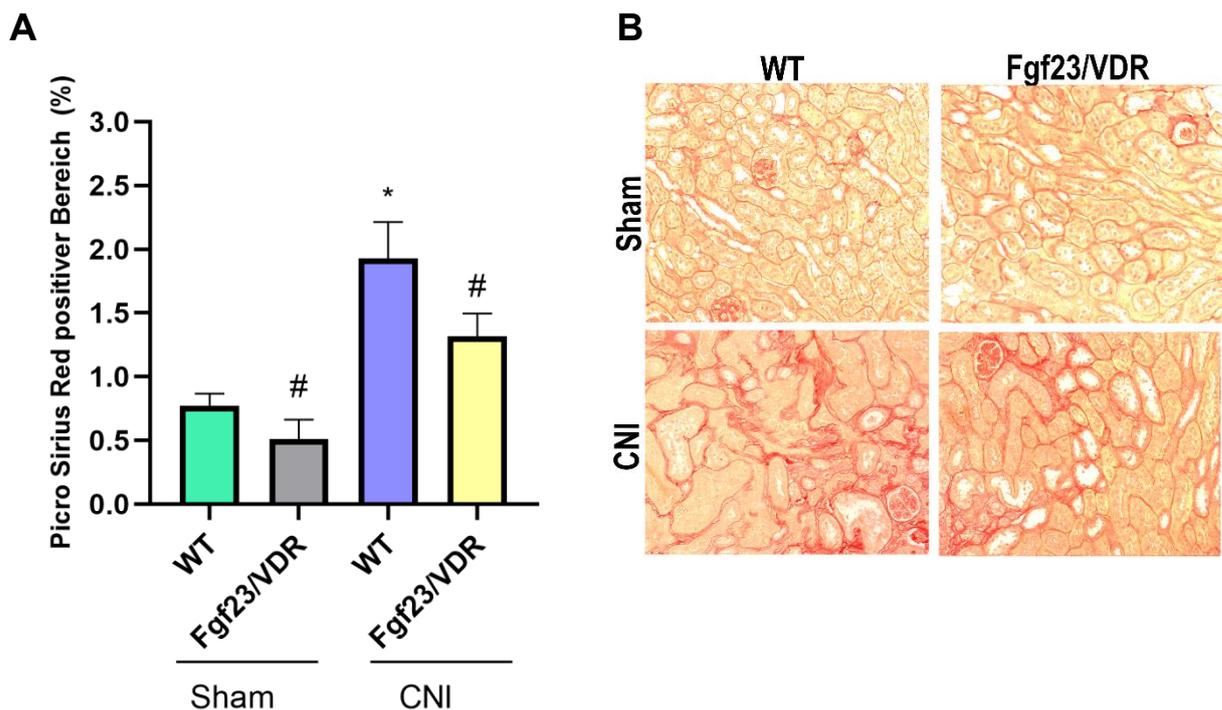


Abbildung 7: Verminderte peritubuläre renale Fibrose bei induzierter CNI durch Abwesenheit von *Fgf23/VDR*. Quantifizierung der peritubulären renalen Fibrose, ausgedrückt durch Picro-Sirius-Red positiv angefärbte Bereiche in % (A) und repräsentative Bilder (B) der Paraffinschnitte von Nieren von Sham und 5/6 Nx WT und *Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* Doppelmutanten Mäusen, welche eine Rescue Diät erhalten haben, acht Wochen post Op. Jeder Datenpunkt in (A) repräsentiert den Mittelwert +/- den

Standardfehler von 4-15 Mäusen. * bedeutet < 0,05 vs. WT Sham, # bedeutet < 0,05 vs. WT CNI. Zur statistischen Analyse wurde eine One-way-Anova mit darauffolgendem Student-Newman-Keuls-Test als post hoc Test genutzt.

Unveränderte peritubuläre Fibrose im Vergleich von $VDR^{\Delta\Delta}$ mit WT Mäusen in experimenteller CNI

Es könnte zu den vorherigen Ergebnissen der Einwand gebracht werden, dass die signifikant geringere Fibrose, die bei $Fgf23^{-/-}/VDR^{\Delta\Delta}$ Mäusen beobachtet wurde, dem nicht funktionierenden VDR zuzuschreiben ist und nicht der Abwesenheit von Fgf23. Daher wurde als nächstes untersucht, ob es einen Unterschied bezüglich der Fibrose zwischen WT und $VDR^{\Delta\Delta}$ Mäusen innerhalb der CNI Gruppe gibt. In Abbildung 8 ist zu sehen, dass kein signifikanter Unterschied bezüglich der peritubulären Fibrose in Abwesenheit eines funktionierenden VDR Rezeptors nachzuweisen war. $VDR^{\Delta\Delta}$ hat also keinen Einfluss auf die peritubuläre Fibrose in CNI. Daher ist die vorherige Beobachtung, dass $Fgf23^{-/-}/VDR^{\Delta\Delta}$ Mäuse eine geringere durch 5/6 Nx induzierte peritubuläre Fibrose haben, dem $Fgf23$ Knockout zuzuschreiben. Dies bestätigt die Hypothese, dass FGF23 zu einer verstärkten renalen Fibrose bei CNI beiträgt.

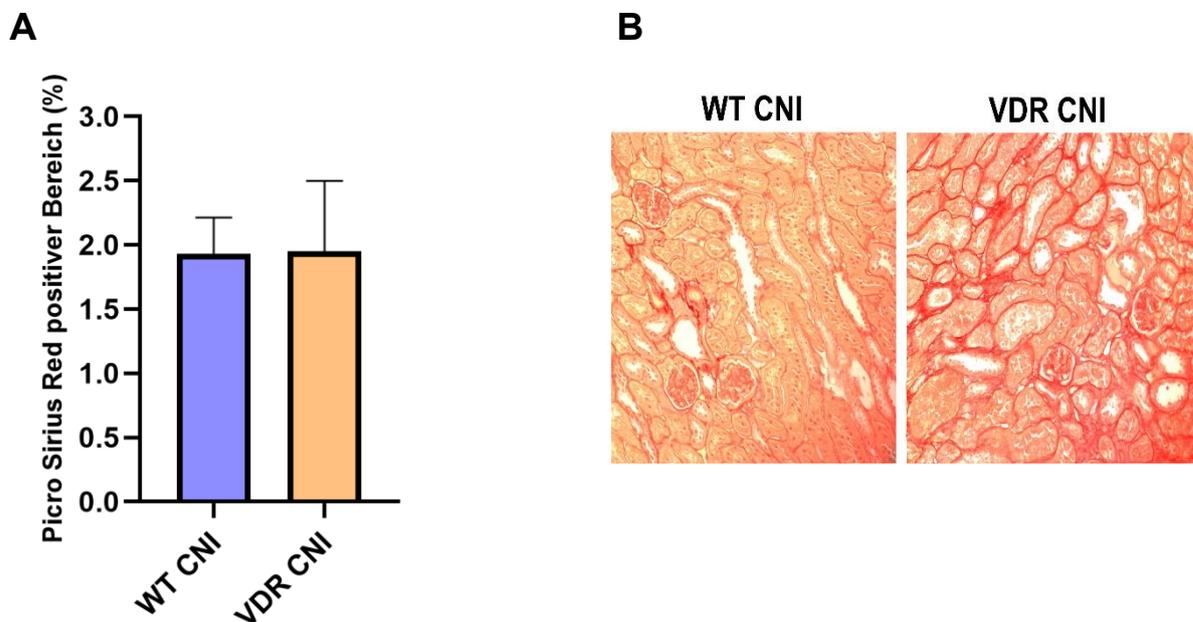


Abbildung 8: Unveränderte peritubuläre Fibrose beim Vergleich von $VDR^{\Delta\Delta}$ CNI mit WT CNI Mäusen. Quantifizierung der peritubulären renalen Fibrose, ausgedrückt durch Picro-Sirius-Red positiv

angefärbte Bereiche in % (A) und repräsentative Bilder (B) der Paraffinschnitte von Nieren von 5/6 Nx WT und VDR^{ΔΔ} Mäusen, welche eine Rescue Diät erhalten haben, acht Wochen post-OP. Jeder Datenpunkt in (A) repräsentiert den Mittelwert +/- den Standardfehler von 4-10 Mäusen. Zur statistischen Analyse wurde ein two-tailed t-test genutzt.

3.2 Analyse des Kollagengehaltes der Herzen

Um die Frage zu beantworten, ob FGF23 in induzierter CNI einen Einfluss auf die Fibrose in Herzen hat, wurden Kryo-Schnitte von Herzen von scheinoperierten WT und *Fgf23*^{-/-}/VDR^{ΔΔ} Mäusen mit WT und *Fgf23*^{-/-}/VDR^{ΔΔ} Mäusen verglichen, bei denen eine CNI induziert wurde. Diese wurden mit Picro-Sirius-Red gefärbt und der Kollagengehalt wurde gegen das Gesamtgewebe des linken Ventrikels und des Septums quantifiziert.

Fgf23/VDR Ablation führt zu verminderter Fibrose in den Herzen bei Mäusen mit induzierter CNI

Bei WT Mäusen mit induzierter CNI konnte ein signifikant höheres Niveau an Kollagen im linken Ventrikel gegenüber allen scheinoperierten Gruppen festgestellt werden. Dies zeigt, dass die induzierte CNI durch 5/6 NX in diesem Versuch, zu einer verstärkten interstitiellen und perivaskulären Fibrose im linken Herzen beiträgt. Die Abwesenheit von Fgf23/VDR führte innerhalb der CNI Gruppe zu einer signifikant verringerten Fibrose im Vergleich zu WT Mäusen. Darüber hinaus konnte aber bei *Fgf23*^{-/-}/VDR^{ΔΔ} Mäusen, bei welchen eine CNI induziert wurde signifikant mehr Fibrose gegenüber den WT und *Fgf23*^{-/-}/VDR^{ΔΔ} Mäusen der Sham Gruppe festgestellt werden. Zwischen *Fgf23*^{-/-}/VDR^{ΔΔ} und WT Mäusen innerhalb der Sham Gruppe gab es keine Unterschiede im Kollagengehalt (Abbildung 9).

Diese Ergebnisse führen zusammengefasst zu der Erkenntnis, dass der Genotyp *Fgf23*^{-/-}/VDR^{ΔΔ} zwar das Kollagenniveau im Vergleich zu WT Mäusen innerhalb der CNI Gruppe verringert, aber insgesamt nur partiellen Schutz vor der durch CNI induzierten interstitiellen und perivaskulären Fibrose im linken Ventrikel bietet.

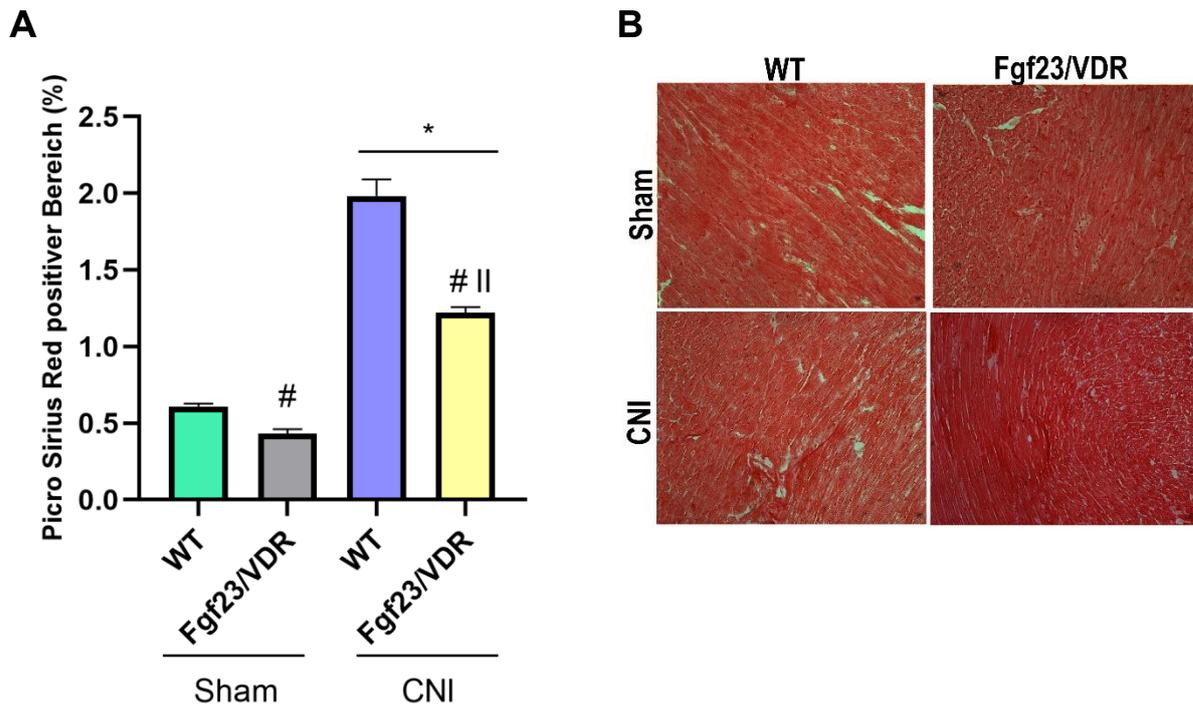


Abbildung 9: Verminderte interstitielle linksventrikuläre Fibrose bei induzierter CNI durch Abwesenheit von Fgf23/VDR. Quantifizierung der interstitiellen und perivaskulären kardialen Fibrose im linken Ventrikel, ausgedrückt durch Picro-Sirius-Red positiv angefärbte Bereiche in % (A) und repräsentative Bilder (B) der Kryoschnitte von Herzen von Sham und 5/6 Nx WT und Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ} Doppelmutanten Mäusen, welche eine Rescue Diät erhalten haben, acht Wochen post-OP. Jeder Datenpunkt in (A) repräsentiert den Mittelwert +/- den Standardfehler von 3-11 Mäusen. * bedeutet < 0,05 vs. WT Sham, # bedeutet < 0,05 vs. WT CNI, II bedeutet < 0,05 vs Fgf23/VDR Sham. Zur statistischen Analyse wurde eine One-way-Anova mit darauffolgendem Student-Newman-Keuls-Test als post-hoc Test genutzt.

VDR^{ΔΔ} in experimenteller CNI hat keinen Einfluss auf die Fibrose im Herzen

Um auch bei der Analyse des Kollagengehaltes der Herzen einen Einfluss des nicht funktionierenden VDRs auszuschließen, haben wir WT Mäuse mit VDR^{ΔΔ} Mäusen nach induzierter CNI verglichen. Wie in Abbildung 10 zu sehen, ist die interstitielle und perivaskuläre Fibrose durch VDR^{ΔΔ} unverändert im Vergleich zu WT Mäusen. Dies zeigt zum einen, dass die verringerte Fibrose von Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ} Mäusen tatsächlich auf die Abwesenheit von FGF23 zurückzuführen ist und zum anderen, dass die Abwesenheit eines funktionierenden VDR keinen Einfluss auf die linksventrikuläre Fibrose in einem Modell von induzierter CNI hat.

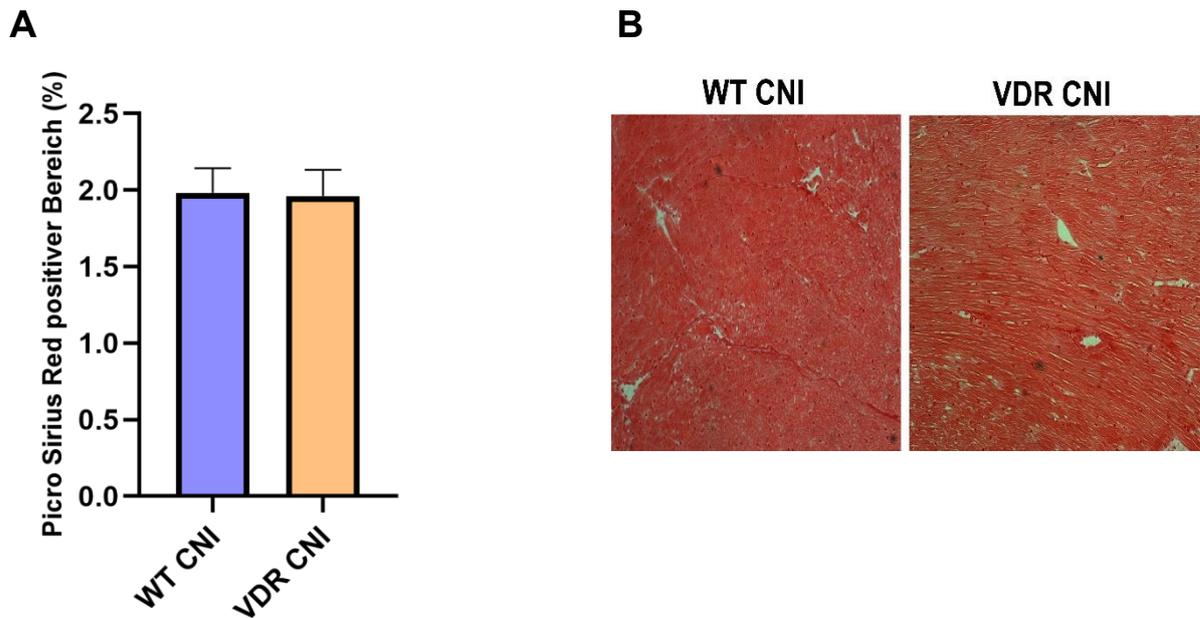


Abbildung 10: Unveränderte linksventrikuläre Fibrose beim Vergleich von VDR^{ΔΔ} CNI mit WT CNI Mäusen. Quantifizierung der interstitiellen und perivaskulären kardialen Fibrose, ausgedrückt durch Picro-Sirius-Red positiv angefärbte Bereiche in % (A) und repräsentative Bilder (B) der Kryoschnitte von Herzen von 5/6 Nx WT und VDR^{ΔΔ} Mäusen, welche eine Rescue Diät erhalten haben, acht Wochen post Op. Jeder Datenpunkt in (A) repräsentiert den Mittelwert +/- den Standardfehler von 4-6 Mäusen. Zur statistischen Analyse wurde ein Two-tailed t-test genutzt.

3.3 mRNA Expression nach Behandlung mit Closantel

Wie bereits eingangs beschrieben, gibt es Evidenz dafür, dass FGF23 in den distalen Nierentubuli über eine WNK4-Signalkaskade, die Expression von TRPV5 und NCC in gesunden Nieren erhöht. Eine verstärkte Natriumreabsorption durch erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen, wie sie typischerweise bei CNI vorkommen, könnte demnach zu einer Volumenüberladung, erhöhtem Blutdruck und in weiterer Folge zu linksventrikulärer Hypertrophie führen (Andrukhova et al. 2014a, 2014b). Das bisher als Antiparasitikum genutzte Medikament Closantel wurde kürzlich als Inhibitor der STE20/SPS-1-related-Proline/Alanine-rich-Kinase (SPAK) und damit des WNK-Signalwegs entdeckt (Kikuchi et al. 2015). Um weitere Einblicke zu erhalten, welchen Einfluss die Inhibierung des WNK-Signalwegs in CNI hat, haben wir Sham und 5/6 Nx WT Mäusen prophylaktisch Closantel oder Vehikel (Veh), als Kontrolle, mit dem Futter verabreicht. In weiterer Folge wurde RNA aus den Nieren der Mäuse isoliert und die mRNA Expression von Kollagen 1, Kollagen 3, Kollagen 4, FGFR1, NCC und TRPV5 gemessen.

Prophylaktische Closantel Administration zeigt einen Trend zu verminderter NCC und TRPV5 Expression bei WT Mäusen mit induzierter CNI

Die NCC Expression von Mäusen der CNI Gruppe war signifikant geringer als in Sham Mäusen, welche Vehikel erhalten haben. Innerhalb der CNI Gruppe konnte durch die Closantel Behandlung ein Trend zu einer verminderten Expression von NCC gesehen werden, welcher jedoch nicht statistisch signifikant war. Die Aussagekraft davon ist jedoch nur bedingt, da die Mäuse der CNI Veh Gruppe eine geringere NCC Expression als die Mäuse der Sham Gruppe gezeigt haben, was im Kontrast zu einschlägiger Evidenz steht, dass erhöhte FGF23 Konzentrationen, wie sie bei CNI vorkommen, zu einer erhöhten NCC Expression führen.

Bezüglich der TRPV5 Expression konnte bei den Mäusen, die Vehikel bekommen haben, kein Unterschied zwischen der Sham und der CNI Gruppe festgestellt werden. Mäuse mit induzierter CNI, welche Closantel erhalten haben, zeigten den Trend zu einer verminderten TRPV5 Expression. Dieser war jedoch nicht statistisch signifikant.

Unter physiologischen Bedingungen wirkt FGF23 in den Nieren vorzugsweise über einen Rezeptorkomplex der FGFR1 enthält. Daher wurde nachfolgend die mRNA Expression von FGFR1 gemessen. Es ist ein Trend zu sehen, dass unabhängig von der Behandlung, Mäuse mit induzierter CNI eine geringgradig höhere Expression von FGFR1 gegenüber den Mäusen der Sham Veh Gruppe haben. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

Prophylaktische Closantel Administration zeigt den Trend, die Kollagenexpression bei induzierter CNI zu erhöhen

Um zu testen, ob die Inhibierung des WNK Signalwegs einen Einfluss auf die Fibrose der Nieren haben könnte, wurde in dieser Studie die Expression verschiedener Kollagentypen untersucht. Es gab einen Trend, dass Tiere mit experimentell induzierter CNI mehr Kollagen 1 exprimieren. Dieses Ergebnis war jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung innerhalb der CNI Gruppen nicht statistisch signifikant. Bezüglich Kollagen 3 konnte bei Mäusen die Closantel erhalten haben, eine signifikant höhere Expression von Kollagen 3 gegenüber Mäusen der CNI Veh und Sham Veh Gruppen festgestellt werden. Die Expression von Kollagen 4 war bei Mäusen mit CNI, ungeachtet der Behandlung, signifikant erhöht im Vergleich zu Sham Mäusen. Insgesamt konnte bei den verschiedenen Kollagentypen ein Trend zu einer vermehrten Expression durch Administration von Closantel innerhalb der CNI Gruppen beobachtet werden. Dieser Trend konnte statistisch jedoch nur bei der Expression von Kollagen 3 bestätigt werden (Abbildung 11).

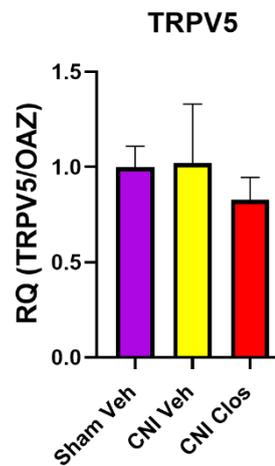
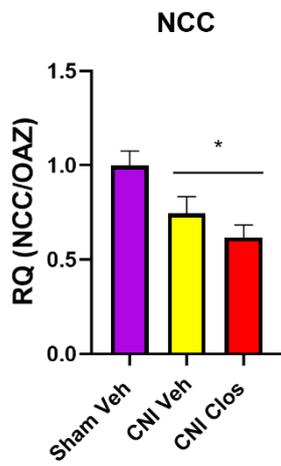
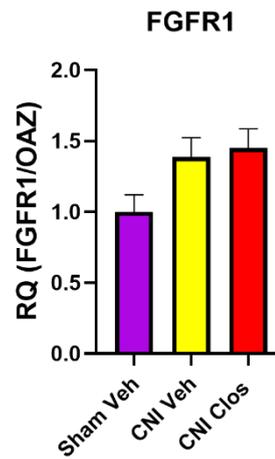
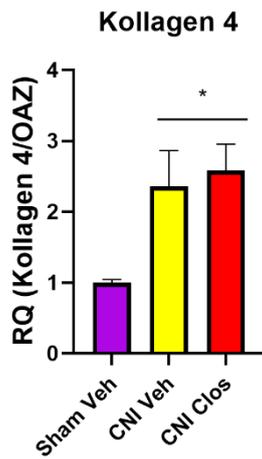
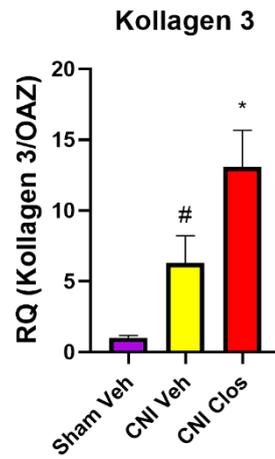
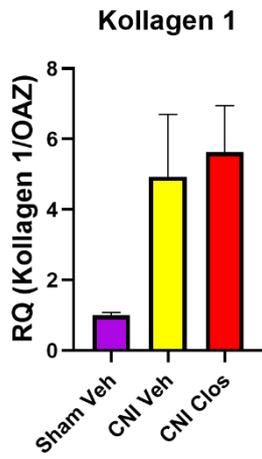


Abbildung 11: Relative mRNA Expression von Kollagen 1, 3, 4, FGFR1, NCC und TRPV5. Quantifizierung der mRNA Expression von Kollagen 1,3 und 4, FGFR1, NCC und TRPV5 in homogenisierten Nieren von scheinoperierten und 5/6 Nx WT Mäusen, welche acht Wochen lang Closantel einmal wöchentlich mit dem Futter erhalten haben, acht Wochen post OP. Die Daten wurden in Bezug auf OAZ1 standardisiert. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert von 5-8 Mäusen +/- Standardfehler. * bedeutet < 0,05 vs. Sham Veh, # bedeutet < 0,05 vs. CKD Clos. Zur statistischen Analyse wurde eine One-way-Anova mit darauffolgendem Student-Newman-Keuls-Test als post hoc Test genutzt.

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Abwesenheit von Fgf23/VDR in einem Mausmodell mit experimenteller CNI die peritubuläre renale Fibrose verringert. Dadurch haben wir FGF23 als wesentlichen Faktor identifiziert, der die histologischen Veränderungen während der Progression der CNI verstärkt. Diese Erkenntnis wird von Ergebnissen einer Studie unterstützt, in der eine direkte profibrotische Wirkung von FGF23 auf vorgeschädigte Fibroblasten in Nieren nachgewiesen wurde (Smith et al. 2017). Ob erhöhte FGF23 Konzentrationen jedoch auch profibrotisch auf nicht vorgeschädigte Nieren wirken, ist aktuell noch unklar. Es wurde gezeigt, dass Patienten, die an XLH leiden, eine Erkrankung, welche durch chronisch erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen charakterisiert ist, keine erhöhte Inzidenz von CNI haben (Eddy et al. 1997). Daher scheint es unwahrscheinlich, dass FGF23 in gesunden Nieren zu einer verstärkten renalen Fibrose führt. Bei vorbestehender Nierenschädigung haben wir FGF23 jedoch als einen potenten Stimulator der interstitiellen renalen Fibrosierung identifiziert. Unterstützt durch den Fakt, dass Entzündungsprozesse die Freisetzung von FGF23 aus dem Knochen stimulieren, könnte FGF23 eine Schlüsselposition in der Pathophysiologie der Progression von CNI einnehmen, indem es einen sich selbst verstärkenden Prozess auslöst. Die *Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* Mäuse in unserem Versuch waren allerdings nicht vollkommen vor der Entwicklung der peritubulären renalen Fibrose geschützt. Es scheint daher wahrscheinlich, dass noch andere Faktoren einen Einfluss auf die Fibrosierung des Nierengewebes bei CNI haben könnten. Als Einschränkungen dieser Ergebnisse könnte gesehen werden, dass alle *Fgf23^{-/-}* Mäuse gleichzeitig einen nicht funktionierenden VDR hatten, um die frühe Letalität zu vermeiden. *VDR^{ΔΔ}* Mäuse haben zwar im Vergleich mit WT Mäusen, bei induzierter CNI, keinen Unterschied bezüglich der interstitiellen Fibrose gezeigt, aber dennoch kann der Einfluss des fehlenden Vitamin D-Signalings nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurden nephroprotektive Effekte von α Klotho beschrieben (Kuro-o 2019). Bei CNI ist α Klotho typischerweise runterreguliert (Mencke et al. 2017). Daher ist zudem ein Einfluss von einer möglicherweise unterschiedlichen Klotho Expression in WT und *Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* Mäusen mit induzierter CNI nicht gänzlich auszuschließen.

Zahlreiche Studien haben eine Korrelation zwischen erhöhtem FGF23 Serumkonzentrationen bei CNI und kardiovaskulären Risikofaktoren, wie der Entwicklung von LVH, Gefäßverkalkungen und erhöhter Mortalität gezeigt (Faul et al. 2011). Die häufigste kardiovaskuläre Komplikation stellt bei CNI in diesem Zusammenhang die LVH dar (Eckardt

et al. 2013). Auf der anderen Seite gibt es Evidenz, dass Patienten mit FGF23-mediierter hypophosphatämischer Rachitis keine erhöhte Inzidenz von LVH aufweisen (Takashi et al. 2017). Eine Tatsache, die auch bei Hyp Mäusen beobachtet wurde, da diese trotz erhöhtem FGF23 Serumlevel keine kardialen Veränderungen zeigen (Liu et al. 2018). In dieser Arbeit haben wir das Kollagenniveau im linken Ventrikel von Mäusen mit induzierter CNI quantifiziert und sind zu dem Ergebnis gekommen, dass bei *Fgf23*^{-/-}/*VDR*^{ΔΔ} Mäuse eine signifikant verringerte linksventrikuläre interstitielle Fibrose gegenüber WT Mäusen festzustellen war. Dadurch haben wir FGF23 als einen Faktor identifiziert, welcher, zumindest im Rahmen einer experimentellen CNI, die Fibrosierung des kardialen Gewebes vorantreibt und somit zur Entstehung von LVH in CNI beiträgt. Unsere Ergebnisse werden dabei von einer Studie unterstützt, welche direkte hypertrophische Wirkungen von FGF23 auf Kardiomyozyten zeigte. In dieser Studie wurde ebenfalls ein 5/6 Nx CNI Modell genutzt, jedoch bei Ratten, welche Antikörper gegen FGFR4 bekamen und dadurch vor der Entwicklung von kardialer Fibrose und LVH geschützt waren (Grabner et al. 2015). Im Gegensatz dazu stehen jedoch die Ergebnisse einer anderen Arbeit, welche zeigte, dass FGF23 keinen Einfluss auf die Entwicklung von LVH in einem Modell mit experimentell induzierter transversaler Aorten Konstriktion (TAC) hat. In dieser Studie konnte kein Unterschied in der Entwicklung von LVH nach TAC zwischen *Fgf23*^{-/-}/*VDR*^{ΔΔ} und WT Mäusen beobachtet werden (Slavic et al. 2017). Diese Diskrepanzen könnten sich eventuell durch Unterschiede in der Art der Arbeitsbelastung des Herzens erklären lassen (Slavic et al. 2017). In CKD ist die Volumenüberladung hauptverantwortlich für die kardiovaskulären Pathologien (Hung et al. 2015). Zudem lösen Volumenüberladung und zu hohe Druckbelastung unterschiedliche Signalkaskaden bei der Entstehung von LVH aus (Mohamed et al. 2016). Die natriumkonservierenden Wirkungen im distalen Tubulus der Niere könnten eine Brücke schlagen, um dies zu erklären. Die Studie, die FGF23 als Regulator der NCC Membranexpression identifizierte, zeigte zudem, dass erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen in Hyp Mäusen oder die Applikation von rekombinantem FGF23 zu Volumenüberladung, Hypertension und Herzhypertrophie führen (Andrukhova et al. 2014a). Dieser Erklärungsversuch wird von Studien unterstützt, die erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen während der Progression von CNI in Zusammenhang mit Hypernatriämie und Hyperkalzämie gebracht haben (Pavik et al. 2013).

Um die Rolle von FGF23 in diesem Zusammenhang näher zu charakterisieren, haben wir die mRNA Expression von NCC und TRPV5 in homogenisierten Nieren von Mäusen mit induzierter CNI bestimmt. Da sich die stimulierenden Wirkungen von FGF23 auf die NCC und

TRPV5 Expression als abhängig von einem WNK4 beinhaltenden Signalweg herausgestellt haben, testeten wir dabei den Einfluss des WNK-Signalweg-Inhibitoren Closantel (Andrukhova et al. 2014a, 2014b). Wir konnten zeigen, dass es bei induzierter CNI einen Trend zu einer geringeren NCC Expression durch prophylaktische Administration von Closantel gab. Dies würde den Erklärungsversuch unterstützen, bei dem erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen bei CNI zu einer erhöhten Vorlast und damit zu LVH führen. Leider war aber bei Mäusen, die Vehikel als Kontrolle bekommen haben, ebenfalls eine geringere NCC Expression im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollmäusen festzustellen. Letzteres steht im Kontrast zu einschlägiger Evidenz, dass erhöhte FGF23 Konzentrationen zu einer verstärkten Expression von NCC in den Nieren führen (Andrukhova et al. 2014a, Furusho et al. 2020). Entsprechend dessen, dass FGF23 über den WNK Signalweg die TRPV5 Expression erhöht, konnten wir bei Mäusen mit induzierter CNI, welche Closantel erhalten haben, einen Trend zu einer geringeren TRPV5 Expression beobachten (Andrukhova et al. 2014b). Dadurch könnten erhöhte FGF23 Konzentrationen auch in die Entwicklung der Hyperkalzämie bei CNI involviert sein. Laut aktuellem Wissensstand werden alle physiologischen Wirkungen von FGF23 in den Nieren durch einen Rezeptorkomplex bestehend aus FGFR1c und membranständigem Klotho vermittelt (Erben 2018). Daher haben wir die mRNA Expression von FGFR1 bestimmt. Wir konnten nur einen geringgradigen Trend zu einer höheren FGFR1 Expression bei CNI feststellen, welcher aber nicht statistisch signifikant war. In den Studien, welche die pathologischen Wirkungen von FGF23 auf das Herz oder auf vorgeschädigte Fibroblasten gezeigt haben, wirkte FGF23 unabhängig von Klotho über FGFR4 (Grabner et al. 2015, Smith et al. 2017). Daher ist es möglich, dass pathologische FGF23 Wirkungen in den Nieren ebenfalls über FGFR4 vermittelt werden. Dies würde zu der Tatsache passen, dass bekannte pathologische Wirkungen von FGF23 vornehmlich über FGFR3 und FGFR4 vermittelt werden (Richter und Faul 2018). Darüber hinaus konnten wir unter Closantel Behandlung keine verminderte Expression von Kollagen 1, 3 oder 4 in den Nieren von Mäusen mit induzierter CNI feststellen. Es konnte sogar ein Trend zu einer höheren Kollagenexpression durch Closantel Administration innerhalb der CNI Gruppen beobachtet werden. Dies zeigt, dass die WNK-Signalweg-Inhibition nicht geeignet war, die interstitielle renale Fibrose zu verbessern. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Inhibierung des WNK-Signalwegs eine reaktive Erhöhung der FGF23 Serumkonzentrationen zur Folge hätte und FGF23 direkt profibrotisch wirkt. Diese Hypothese wird durch eine Studie, in der eine direkte profibrotische Wirkung von FGF23 auf bereits vorgeschädigte Fibroblasten nachgewiesen wurde und unsere Ergebnisse, dass *Fgf23*^{-/-}/*VDR*^{ΔΔ} Mäuse eine signifikant verringerte interstitielle Fibrose

aufweisen, noch bestärkt. (Smith et al. 2017). Jedoch muss berücksichtigt werden, dass wir in diesem Versuchsdesign keine scheinoperierten Mäuse mit Closantel behandelt haben. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass Closantel per se fibrotische Veränderungen auslöst.

Insgesamt könnte FGF23 einen Schlüsselfaktor bezüglich der Progression von CNI und der Entstehung von LVH in CNI darstellen. Die Abwesenheit von Fgf23/VDR führte in unseren Versuchen sowohl zu einer verringerten peritubulären Fibrose in den Nieren als auch zu einer verminderten interstitiellen Fibrose im linken Ventrikel. Die genauen molekularen Mechanismen dahinter sind noch unklar, aber da die Tiere in unserem Versuch nur partiell vor Entwicklung der interstitiellen Fibrose geschützt waren, liegt es nahe, dass noch andere Faktoren die Progression der CNI und das Entstehen von LVH unterstützen. Da wir ein *in vivo* Modell genutzt haben, könnte die verminderte interstitielle Fibrose in den Nieren eine Verlangsamung der Progression der CNI bedeuten und die verminderte linksventrikuläre Fibrose unter anderem darauf zurückzuführen sein. Darüber hinaus wurden bereits andere Faktoren bei CNI beschrieben, die an der Entwicklung von LVH beteiligt sind, zum Beispiel urämische Toxine wie Indoxylsulfat (Lekawanvijit et al. 2012). Zudem könnten die natriumkonservierenden Wirkungen von FGF23, welche eine Volumenüberladung bedingen einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung von LVH in CNI haben (Andrukhova et al. 2014a).

Zusammengefasst liefern wir mit dieser Arbeit Hinweise darauf, dass FGF23 ein wesentlicher Faktor sein könnte, um die interstitielle Fibrosierung sowohl des Nierengewebes als auch des linken Ventrikels in einem Mausmodell der 5/6 Nx induzierten CNI voranzutreiben.

5. Zusammenfassung

Fibroblast-growth-factor-23 (FGF23) ist ein aus Knochen freigesetztes Hormon, welches durch erhöhte renale Phosphatausscheidung und einer verminderten Synthese von aktivem Vitamin D an der Regulierung des Phosphatserumspiegels maßgeblich beteiligt ist. Darüber hinaus erhöht FGF23 über eine Signalkaskade, in die unter anderem With-No-Lysin-Kinase-4 (Wnk4) involviert ist, durch erhöhte Membranexpression von Na⁺:Cl⁻-Cotransporter (NCC) und Transient-Rezeptor-Potential-Vannilloid-5 (TRPV5), die Natrium- und Kalziumreabsorption im distalen Tubulus der Nieren. Bei chronischer Niereninsuffizienz (CNI) kommt es durch Abnahme der glomerulären Filtrationsrate (GFR) zu einem progressiven Anstieg der FGF23 Serumkonzentrationen, die dann bis zu einem Vielfachen über dem Normalniveau liegen können. Erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen bei CNI führen zu einem erhöhten Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen und korrelieren mit einer erhöhten Inzidenz und Prävalenz von linksventrikulärer Hypertrophie (LVH). Auf der anderen Seite sind CNI und LVH bei Patienten, die an Krankheiten leiden, welche durch primär chronisch erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen charakterisiert sind, keine typischen Begleiterscheinungen. Daher ist es immer noch nicht vollständig geklärt, ob FGF23 einen Biomarker für eine entgleiste Phosphathomöostase darstellt oder ob es ein aktiver Modulator von pathologischen Prozessen bei der Progression von CNI ist. Des Weiteren gibt es aufgrund kontroverser Daten Unklarheiten, ob und in welchem Zusammenhang erhöhte FGF23 Serumkonzentrationen und die Entstehung von LVH stehen. Wir konnten zeigen, dass in mit Picro-Sirius-Red gefärbten histologischen Präparaten, von Nieren und Herzen von Mäusen, in welchen zuvor durch 5/6 Nephrektomie (5/6 Nx) eine CNI induziert wurde, der Genotyp *Fgf23^{-/-}/VDR^{ΔΔ}* signifikant geringere Kollagenniveaus gegenüber WT bedingte. Bezüglich *VDR^{ΔΔ}* Mäusen und WT Mäusen mit induzierter CNI war kein Unterschied im Kollagengehalt feststellbar. Dadurch konnten wir FGF23 als einen wesentlichen Faktor identifizieren, welcher die interstitielle Fibrosierung sowohl des Nierengewebes als auch des linken Ventrikels in einem Mausmodell der 5/6 Nx induzierten CNI vorantreibt.

6. Summary

Fibroblast-growth-factor-23 (FGF23) is a bone-derived hormone causing an augmented renal phosphate excretion and the suppression of the synthesis of active vitamin D in the kidney. Therefore, it is a major regulator of the phosphate homeostasis. In distal renal tubules, FGF23 activates a with-no-lysine-kinase-4 (Wnk4) signalling pathway leading to an augmented membrane expression of Na⁺:Cl⁻-cotransporter (NCC) and transient-receptor-potential-vannilloid-5 (TRPV5) and therefore to an increased urinary sodium and calcium retention. In chronic kidney disease (CKD) the decrease in glomerular filtration rate (GFR) leads to a progressive accumulation of FGF23. In the process of CKD FGF23 can reach several-fold higher serum levels as in physiological circumstances. Increased FGF23 serum levels are correlated positively with higher risk of cardiovascular diseases and higher incidence and prevalence of left ventricular hypertrophy (LVH). In contrast, CKD and LVH are not common findings in diseases which are characterised by primary chronically elevated FGF23 levels. Therefore, it is still uncertain whether FGF23 is just a biomarker of an inadequate phosphate homeostasis or a modulator of pathological processes during the progression of CKD. Furthermore, there are controversial data describing the role of FGF23 in the development of LVH. This study reveals that the genotype *Fgf23*^{-/-}/*VDR*^{ΔΔ} leads to a significant reduced renal and cardiac fibrosis compared to WT mice with 5/6 nephrectomy (5/6 Nx) -induced CKD. To measure the collagen levels, heart and kidney slices from mice were stained with picrosirius red. The amount of collagen was shown to be equal between *VDR*^{ΔΔ} and WT mice with induced CKD. Thus, FGF23 was identified as an essential factor promoting the interstitial fibrosis of renal and left ventricular cardiac tissue in a mouse model with 5/6 Nx-induced CKD.

7. Referenzen

- Andrukhova O, Zeitz U, Goetz R, Mohammadi M, Lanske B, Erben RG. 2012. FGF23 acts directly on renal proximal tubules to induce phosphaturia through activation of the ERK1/2-SGK1 signaling pathway. *Bone*, 51(3):621–628.
- Andrukhova O, Slavic S, Smorodchenko A, Zeitz U, Shalhoub V, Lanske B, Pohl EE, Erben RG. 2014a. FGF23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Molecular Medicine*, 6(6):744–759.
- Andrukhova O, Smorodchenko A, Egerbacher M, Streicher C, Zeitz U, Goetz R, Shalhoub V, Mohammadi M, Pohl EE, Lanske B, et al. 2014b. FGF23 promotes renal calcium reabsorption through the TRPV5 channel. *EMBO Journal*, 33(3):229–246.
- Andrukhova O, Schüler C, Bergow C, Petric A, Erben RG. 2018. Augmented fibroblast growth factor-23 secretion in bone locally contributes to impaired bone mineralization in chronic kidney disease in mice. *Frontiers in Endocrinology*, 9(JUN).
- Ben-Dov IZ, Galitzer H, Lavi-Moshayoff V, Goetz R, Kuro-o M, Mohammadi M, Sirkis R, Naveh-Manly T, Silver J. 2007. The parathyroid is a target organ for FGF23 in rats. *Journal of Clinical Investigation*, 117(12):4003–4008.
- Brown EM, Gambatt G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Klfor O, Suntt A, Hedlgert MA, Lyttont J, Hebertt SC. 1993. from bovine parathyroid ~ L ~ L. 366(December):575–580.
- Brunette MG, Chan M, Ferriere C, Roberts KD. 1978. Site of 1,25(OH)₂ vitamin D₃ synthesis in the kidney. *Nature*, 276(5685):287–289.
- Chang Q, Hoefs S, Van Der Kemp AW, Topala CN, Bindels RJ, Hoenderop JG. 2005. Cell signalling: The β -glucuronidase klotho hydrolyzes and activates the TRPV5 channel. *Science*, 310(5747):490–493.
- Déliot N, Hernando N, Horst-Liu Z, Gisler SM, Capuano P, Wagner CA, Bacic D, O'Brien S, Biber J, Murer H. 2005. Parathyroid hormone treatment induces dissociation of type IIa Na⁺-Pi cotransporter-Na⁺/H⁺ exchanger regulatory factor-1 complexes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 289(1 58-1):159–167.
- Dweck MR, Joshi S, Murigu T, Alpendurada F, Jabbour A, Melina G, Banya W, Gulati A, Roussin I, Raza S, et al. 2011. Midwall fibrosis is an independent predictor of mortality in patients with aortic stenosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(12):1271–1279.
- Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, Johnson RJ, Köttgen A, Levey AS, Levin A. 2013. Evolving importance of kidney disease: From subspecialty to global health burden. *The Lancet*, 382(9887):158–169.
- Eddy MC, McAlister WH, Whyte MP. 1997. X-linked hypophosphatemia: Normal renal function despite medullary nephrocalcinosis 25 years after transient vitamin D₂-induced renal azotemia. *Bone*, 21(6):515–520.
- Erben RG. 2018. Physiological actions of fibroblast growth factor-23. *Frontiers in Endocrinology*, 9(MAY).
- Erben RG, Andrukhova O. 2017. FGF23-Klotho signaling axis in the kidney. *Bone*, 100:62–68.

- Erben RG, Soegiarto DW, Weber K, Zeitz U, Lieberherr M, Gniadecki R, Möller G, Adamski J, Balling R. 2002. Deletion of deoxyribonucleic acid binding domain of the vitamin D receptor abrogates genomic and nongenomic functions of vitamin D. *Molecular Endocrinology*, 16(7):1524–1537.
- Farrow EG, Davis SI, Summers LJ, White KE. 2009. Initial FGF23-mediated signaling occurs in the distal convoluted tubule. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(5):955–960.
- Faul C, Keane MG, Wolf M, Faul C, Amaral AP, Oskouei B, Hu M, Sloan A, Isakova T, Gutiérrez OM, et al. 2011. FGF23 induces left ventricular hypertrophy Find the latest version : FGF23 induces left ventricular hypertrophy. *Journal of Clinical Investigation*, 121(11):4393–4408.
- Fraser DR. 1980. Regulation of the metabolism of vitamin D. *Physiological Reviews*, 60(2):551–613.
- Furusho T, Sohara E, Mandai S, Kikuchi H, Takahashi N, Fujimaru T, Hashimoto H, Arai Y, Ando F, Zeniya M, et al. 2020. Renal TNF α activates the WNK phosphorylation cascade and contributes to salt-sensitive hypertension in chronic kidney disease. *Kidney International*, 97(4):713–727.
- Gattineni J, Bates C, Twombly K, Dwarakanath V, Robinson ML, Goetz R, Mohammadi M, Baum M. 2009. FGF23 decreases renal NaPi-2a and NaPi-2c expression and induces hypophosphatemia in vivo predominantly via FGF receptor 1. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 297(2):282–291.
- Gattineni J, Alphonse P, Zhang Q, Mathews N, Bates CM, Baum M. 2014. Regulation of renal phosphate transport by FGF23 is mediated by FGFR1 and FGFR4. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 306(3):351–358.
- Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. 2004. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *New England Journal of Medicine*, 351(13):1296–1305.
- Grabner A, Amaral AP, Schramm K, Singh S, Sloan A, Yanucil C, Li J, Shehadeh LA, Hare JM, David V, et al. 2015. Activation of Cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 Causes Left Ventricular Hypertrophy. *Cell Metabolism*, 22(6):1020–1032.
- Grabner A, Schramm K, Silswal N, Hendrix M, Yanucil C, Czaya B, Singh S, Wolf M, Hermann S, Stypmann J, et al. 2017. FGF23/FGFR4-mediated left ventricular hypertrophy is reversible. *Scientific Reports*, 7(1):1–12.
- Gutiérrez OM. 2010. Fibroblast growth factor 23 and disordered vitamin D metabolism in chronic kidney disease: Updating the „trade-off“ hypothesis. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 5(9):1710–1716.
- Gutiérrez OM, Mannstadt M, Isakova T, Rauh-Hain JA, Tamez H, Shah A, Smith K, Lee H, Thadhani R, Jüppner H, et al. 2008. Fibroblast growth factor 23 and mortality among patients undergoing hemodialysis. *New England Journal of Medicine*, 359(6):584–592.
- Han X, Li L, Yang J, King G, Xiao Z, Quarles LD. 2016a. Counter-regulatory paracrine actions of FGF-23 and 1,25(OH) $_2$ D in macrophages. *FEBS Letters*, 590(1):53–67.
- Han X, Yang J, Li L, Huang J, King G, Quarles LD. 2016b. Conditional deletion of Fgfr1 in the

- proximal and distal tubule identifies distinct roles in phosphate and calcium transport. *PLoS ONE*, 11(2):1–20.
- Hein S, Arnon E, Kostin S, Schönburg M, Elsässer A, Polyakova V, Bauer EP, Klövekorn WP, Schaper J. 2003. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human: Heart structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation*, 107(7):984–991.
- Hesse M, Fröhlich LF, Zeitz U, Lanske B, Erben RG. 2007. Ablation of vitamin D signaling rescues bone, mineral, and glucose homeostasis in Fgf-23 deficient mice. *Matrix Biology*, 26(2):75–84.
- Hewitson TD, Ono T, Becker GJ. 2009. Small Animal Models of Kidney Disease: A Review. In: Becker GJ, Hewitson TD, Hrsg. *Kidney Research: Experimental Protocols*. 41–57, Totowa, NJ: Humana Press;
- Hu MC, Shi M, Zhang J, Pastor J, Nakatani T, Lanske B, Razzaque MS, Rosenblatt KP, Baum MG, Kuro-O M, et al. 2010. Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule. *The FASEB Journal*, 24(9):3438–3450.
- Hung SC, Lai YS, Kuo KL, Tarng DC. 2015. Volume overload and adverse outcomes in chronic kidney disease: clinical observational and animal studies. *Journal of the American Heart Association*, 4(5):1–12.
- Imura A, Tsuji Y, Murata M, Maeda R, Kubota K, Iwano A, Obuse C, Togashi K, Tominaga M, Kita N, et al. 2007. A-Klotho As a Regulator of Calcium Homeostasis. *Science*, 316(5831):1615–1618.
- Isakova T, Wahl P, Vargas GS, Gutiérrez OM, Scialla J, Xie H, Appleby D, Nessel L, Belovich K, Chen J, et al. 2011. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney International*, 79(12):1370–1378.
- Itoh N, Ornitz DM. 2004. Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends in Genetics*, 20(11):563–569.
- Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 2012. 25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): Its important role in the degradation of vitamin D. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 523(1):9–18.
- Jüppner H, Wolf M, Salusky IB. 2010. FGF-23: More than a regulator of renal phosphate handling? *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(10):2091–2097.
- Kikuchi E, Mori T, Zeniya M, Isobe K, Ishigami-Yuasa M, Fujii S, Kagechika H, Ishihara T, Mizushima T, Sasaki S, et al. 2015. Discovery of novel SPAK inhibitors that block WNK kinase signaling to cation chloride transporters. *Journal of the American Society of Nephrology*, 26(7):1525–1536.
- Ko B, Mistry AC, Hanson L, Mallick R, Wynne BM, Thai TL, Bailey JL, Klein JD, Hoover RS. 2013. Aldosterone acutely stimulates NCC activity via a SPAK-mediated pathway. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 305(5):645–652.
- Kuro-o M. 2006. Klotho as a regulator of fibroblast growth factor signaling and phosphate/calcium metabolism. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 15(4):437–441.

- Kuro-o M. 2019. The Klotho proteins in health and disease. *Nature Reviews Nephrology*, 15(1):27–44.
- Kuro-o M, Matsumura Y, Arawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, et al. 1999. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Chemtracts*, 12(10):703–707.
- Kurosu H, Ogawa Y, Miyoshi M, Yamamoto M, Nandi A, Rosenblatt KP, Baum MG, Schiavi S, Hu MC, Moe OW, et al. 2006. Regulation of fibroblast growth factor-23 signaling by Klotho. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10):6120–6123.
- Lambers TT, Bindels RJM, Hoenderop JGJ. 2006. Coordinated control of renal Ca²⁺ handling. *Kidney International*, 69(4):650–654.
- Lang F, Artunc F, Vallon V. 2009. The physiological impact of the serum and glucocorticoid-inducible kinase SGK1. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 18(5):439–448.
- Larsson T, Nisbeth U, Ljunggren Ö, Jüppner H, Jonsson KB. 2003. Circulating concentration of FGF-23 increases as renal function declines in patients with chronic kidney disease, but does not change in response to variation in phosphate intake in healthy volunteers. *Kidney International*, 64(6):2272–2279.
- Lattanzio MR, Weir MR. 2010. Does blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system slow progression of all forms of kidney disease? *Current Hypertension Reports*, 12(5):369–377.
- Lavi-Moshayoff V, Wasserman G, Meir T, Silver J, Naveh-Many T. 2010. PTH increases FGF23 gene expression and mediates the high-FGF23 levels of experimental kidney failure: A bone parathyroid feedback loop. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 299(4):882–889.
- Leelahavanichkul A, Yan Q, Hu X, Eisner C, Huang Y, Chen R, Mizel D, Zhou H, Wright EC, Kopp JB, et al. 2010. Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model. *Kidney International*, 78(11):1136–1153.
- Lekawanvijit S, Kompa AR, Manabe M, Wang BH, Langham RG, Nishijima F, Kelly DJ, Krum H. 2012. Chronic kidney disease-induced cardiac fibrosis is ameliorated by reducing circulating levels of a non-dialysable uremic toxin, indoxyl sulfate. *PLoS ONE*, 7(7):1–10.
- Liu ES, Thoonen R, Petit E, Yu B, Buys ES, Scherrer-Crosbie M, Demay MB. 2018. Increased circulating FGF23 does not lead to cardiac hypertrophy in the male hyp mouse model of XLH. *Endocrinology*, 159(5):2165–2172.
- Liu S, Tang W, Zhou J, Stubbs JR, Luo Q, Pi M, Quarles LD. 2006. Fibroblast growth factor 23 is a counter-regulatory phosphaturic hormone for vitamin D. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(5):1305–1315.
- Martin A, David V, Darryl Quarles L. 2012. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiological Reviews*, 92(1):131–155.
- Masuyama R, Stockmans I, Torrekens S, Van Looveren R, Maes C, Carmeliet P, Bouillon R, Carmeliet G. 2006. Vitamin D receptor in chondrocytes promotes osteoclastogenesis and regulates FGF23 production in osteoblasts. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12):3150–3159.

- Matsumura Y, Aizawa H, Shiraki-Iida T, Nagai R, Kuro-O M, Nabeshima YI. 1998. Identification of the human *klotho* gene and its two transcripts encoding membrane and secreted *klotho* protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242(3):626–630.
- May A, Puoti A, Gaeggeler HP, Horisberger JD, Rossier BC. 1997. Early effect of aldosterone on the rate of synthesis of the epithelial sodium channel α subunit in A6 renal cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 8(12):1813–1822.
- McCormick JA, Yang CL, Ellison DH. 2008. WNK kinases and renal sodium transport in health and disease: an integrated view. *Hypertension*, 51(3):588–596.
- Mencke R, Harms G, Moser J, van Meurs M, Diepstra A, Leuvenink HG, Hillebrands J-L. 2017. Human alternative *Klotho* mRNA is a nonsense-mediated mRNA decay target inefficiently spliced in renal disease. *JCI Insight*, 2(20).
- Mohamed BA, Schnelle M, Khadjeh S, Lbik D, Herwig M, Linke WA, Hasenfuss G, Toischer K. 2016. Molecular and structural transition mechanisms in long-term volume overload. *European Journal of Heart Failure*, 18(4):362–371.
- Murali SK, Andrukhova O, Clinkenbeard EL, White KE, Erben RG. 2016. Excessive Osteocytic Fgf23 Secretion Contributes to Pyrophosphate Accumulation and Mineralization Defect in Hyp Mice. *PLoS Biology*, 14(4):1–24.
- Murphy D, McCulloch CE, Lin F, Banerjee T, Bragg-Gresham JL, Eberhardt MS, Morgenstern H, Pavkov ME, Saran R, Powe NR, et al. 2016. Trends in prevalence of chronic kidney disease in the United States. *Annals of Internal Medicine*, 165(7):473–481.
- Myakala K, Motta S, Murer H, Wagner CA, Koesters R, Biber J, Hernando N. 2014. Renal-specific and inducible depletion of NaPi-IIc/Slc34a3, the cotransporter mutated in HHRH, does not affect phosphate or calcium homeostasis in mice. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 306(8):833–843.
- Olauson H, Lindberg K, Amin R, Sato T, Jia T, Goetz R, Mohammadi M, Andersson G, Lanske B, Larsson TE. 2013. Parathyroid-Specific Deletion of *Klotho* Unravels a Novel Calcineurin-Dependent FGF23 Signaling Pathway That Regulates PTH Secretion. *PLoS Genetics*, 9(12):4–13.
- Ornitz DM, Itoh N. 2015. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(3):215–266.
- Pavik I, Jaeger P, Ebner L, Wagner CA, Petzold K, Spichtig D, Poster D, Wüthrich RP, Russmann S, Serra AL. 2013. Secreted *Klotho* and FGF23 in chronic kidney disease Stage 1 to 5: A sequence suggested from a cross-sectional study. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 28(2):352–359.
- Quinn SJ, Thomsen ARB, Pang JL, Kantham L, Bräuner-Osborne H, Pollak M, Goltzman D, Brown EM. 2013. Interactions between calcium and phosphorus in the regulation of the production of fibroblast growth factor 23 in vivo. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 304(3):310–320.
- Ranch D, Zhang MYH, Portale AA, Perwad F. 2011. Fibroblast growth factor 23 regulates renal 1,25-dihydroxyvitamin D and phosphate metabolism via the MAP kinase signaling pathway in Hyp mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(8):1883–1890.
- Rhee Y, Bivi N, Farrow E, Lezcano V, Plotkin LI, White KE, Bellido T. 2011. Parathyroid

- hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 in vitro and in vivo. *Bone*, 49(4):636–643.
- Rich L, Whittaker P. 2005. Collagen and picosirius red staining: a polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. *Braz. j. morphol. sci*, 22:97–104.
- Richter B, Faul C. 2018. FGF23 actions on target tissues-with and without Klotho. *Frontiers in Endocrinology*, 9(MAY).
- Ring AM, Leng Q, Rinehart J, Wilson FH, Kahle KT, Hebert SC, Lifton RP. 2007. An SGK1 site in WNK4 regulates Na⁺ channel and K⁺ channel activity and has implications for aldosterone signaling and K⁺ homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(10):4025–4029.
- Rodriguez-Ortiz ME, Lopez I, Muñoz-Castañeda JR, Martinez-Moreno JM, Ramírez AP, Pineda C, Canalejo A, Jaeger P, Aguilera-Tejero E, Rodriguez M, et al. 2012. Calcium deficiency reduces circulating levels of FGF23. *Journal of the American Society of Nephrology*, 23(7):1190–1197.
- Saito H, Maeda A, Ohtomo SI, Hirata M, Kusano K, Kato S, Ogata E, Segawa H, Miyamoto KI, Fukushima N. 2005. Circulating FGF-23 is regulated by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and phosphorus in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 280(4):2543–2549.
- Shimada T, Mizutani S, Muto T, Yoneya T, Hino R, Takeda S, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. 2001. Cloning and characterization of FGF23 as a causative factor of tumor-induced osteomalacia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(11):6500–6505.
- Shimada T, Hasegawa H, Yamazaki Y, Muto T, Hino R, Takeuchi Y, Fujita T, Nakahara K, Fukumoto S, Yamashita T. 2004a. FGF-23 is a potent regulator of vitamin D metabolism and phosphate homeostasis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 19(3):429–435.
- Shimada T, Kakitani M, Yamazaki Y, Hasegawa H, Takeuchi Y, Fujita T, Fukumoto S, Tomizuka K, Yamashita T. 2004b. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, 113(4):561–568.
- Shimada T, Yamazaki Y, Takahashi M, Hasegawa H, Urakawa I, Oshima T, Ono K, Kakitani M, Tomizuka K, Fujita T, et al. 2005. Vitamin D receptor-independent FGF23 actions in regulating phosphate and vitamin D metabolism. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 289(5 58-5):1088–1095.
- Singh S, Grabner A, Yanucil C, Schramm K, Czaya B, Krick S, Czaja MJ, Bartz R, Abraham R, Di Marco GS, et al. 2016. Fibroblast growth factor 23 directly targets hepatocytes to promote inflammation in chronic kidney disease. *Kidney International*, 90(5):985–996.
- Sitara D, Razzaque MS, Hesse M, Yoganathan S, Taguchi T, Erben RG, Jüppner H, Lanske B. 2004. Homozygous ablation of fibroblast growth factor-23 results in hyperphosphatemia and impaired skeletogenesis, and reverses hypophosphatemia in PheX-deficient mice. *Matrix Biology*, 23(7):421–432.
- Slavic S, Ford K, Modert M, Becirovic A, Baierl A, Katica N, Zeitz U, Erben RG. 2017. Genetic Ablation of Fgf23 or Klotho Does not Modulate Experimental Heart Hypertrophy Induced by Pressure Overload. *Scientific Reports*, (August):1–12.

- Smith ER, Tan SJ, Holt SG, Hewitson TD. 2017. FGF23 is synthesised locally by renal tubules and activates injury-primed fibroblasts. *Scientific Reports*, 7(1):1–14.
- Streicher C, Zeitz U, Andrukhova O, Rupprecht A, Pohl E, Larsson TE, Windisch W, Lanske B, Erben RG. 2012. Long-term Fgf23 deficiency does not influence aging, glucose homeostasis, or fat metabolism in mice with a nonfunctioning vitamin D receptor. *Endocrinology*, 153(4):1795–1805.
- Tacer KF, Bookout AL, Ding X, Kurosu H, John GB, Wang L, Goetz R, Mohammadi M, Kuro-o M, Mangelsdorf DJ, et al. 2010. Research resource: Comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Molecular Endocrinology*, 24(10):2050–2064.
- Takashi Y, Kinoshita Y, Hori M, Ito N, Taguchi M, Fukumoto S. 2017. Patients with FGF23-related hypophosphatemic rickets/osteomalacia do not present with left ventricular hypertrophy. *Endocrine Research*, 42(2):132–137.
- Tohyama O, Imura A, Iwano A, Freund JN, Henrissat B, Fujimori T, Nabeshima YI. 2004. Klotho Is a Novel β -Glucuronidase Capable of Hydrolyzing Steroid β -Glucuronides. *Journal of Biological Chemistry*, 279(11):9777–9784.
- Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, Fujita T, Fukumoto S, Yamashita T. 2006. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*, 444(7120):770–774.
- Verstuyf A, Carmeliet G, Bouillon R, Mathieu C. 2010. Vitamin D: A pleiotropic hormone. *Kidney International*, 78(2):140–145.
- Vervloet M. 2019. Renal and extrarenal effects of fibroblast growth factor 23. *Nature Reviews Nephrology*, 15(2):109–120.
- Weinman EJ, Biswas RS, Peng Q, Shen L, Turner CL, E X, Steplock D, Shenolikar S, Cunningham R. 2007. Parathyroid hormone inhibits renal phosphate transport by phosphorylation of serine 77 of sodium-hydrogen exchanger regulatory factor-1. *Journal of Clinical Investigation*, 117(11):3412–3420.
- Weinman EJ, Steplock D, Shenolikar S, Biswas R. 2011. Fibroblast growth factor-23-mediated inhibition of renal phosphate transport in mice requires sodium-hydrogen exchanger regulatory factor-1 (NHERF-1) and synergizes with parathyroid hormone. *Journal of Biological Chemistry*, 286(43):37216–37221.
- Wolf M. 2013. Update on FGF-23 in CKD. *Kidney Int.*, 82(7):737–747.
- Yamashita T, Yoshioka M, Itoh N. 2000. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-23, preferentially expressed in the ventrolateral thalamic nucleus of the brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 277(2):494–498.
- Yoshida T, Fujimori T, Nabeshima YOI. 2002. Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1α -hydroxylase gene. *Endocrinology*, 143(2):683–689.
- Yoshiko Y, Wang H, Minamizaki T, Ijuin C, Yamamoto R, Suemune S, Kozai K, Tanne K, Aubin JE, Maeda N. 2007. Mineralized tissue cells are a principal source of FGF23. *Bone*, 40(6):1565–1573.
- Yu X, Ibrahimi OA, Goetz R, Zhang F, Davis SI, Garringer HJ, Linhardt RJ, Ornitz DM,

- Mohammadi M, White KE. 2005. Analysis of the biochemical mechanisms for the endocrine actions of fibroblast growth factor-23. *Endocrinology*, 146(11):4647–4656.
- Zhang B, Umbach AT, Chen H, Yan J, Fakhri H, Fajol A, Salker MS, Spichtig D, Daryadel A, Wagner CA, et al. 2016. Up-regulation of FGF23 release by aldosterone. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 470(2):384–390.

8. Liste der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: FGF23- α Klotho-FGFR1c-Komplex	4
Abbildung 2: FGF23 – PTH – Vitamin D – Achse	6
Abbildung 3: Phosphatreabsorption im proximalen Nierentubulus.....	8
Abbildung 4: Regulation der 1,25(OH) ₂ D ₃ Produktion im proximalen Nierentubulus.....	9
Abbildung 5: Regulation der Kalziumreabsorption im distalen Tubulus durch FGF23	11
Abbildung 6: Regulation der renalen Natriumreabsorption im distalen Tubulus.....	13
Abbildung 7: Verminderte peritubuläre renale Fibrose bei induzierter CNI durch Abwesenheit von Fgf23/VDR	23
Abbildung 8: Unveränderte peritubuläre Fibrose beim Vergleich von VDR ^{ΔΔ} CNI mit WT CNI Mäusen.....	24
Abbildung 9: Verminderte interstitielle linksventrikuläre Fibrose bei induzierter CNI durch Abwesenheit von Fgf23/VDR.....	26
Abbildung 10: Unveränderte linksventrikuläre Fibrose beim Vergleich von VDR ^{ΔΔ} CNI mit WT CNI Mäusen.....	27
Abbildung 11: Relative mRNA Expression von Kollagen 1, 3, 4, FGFR1, NCC und TRPV5.	30
Tabelle 1: Primer der qRT-PCR.....	21

9. Abkürzungen

BCP	1-Bromo-3-Chloropropan
CKD-MBD	Chronic kidney disease-mineral and bone disorder
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
CRP	C-reaktives Protein
ENaC	Epitheliale Na ⁺ Kanäle
ERK1/2	Extrazellulär-regulierte-Kinase-1/2
FGF23	Fibroblast Growth Factor 23
FGFR	Fibroblast Growth Factor Rezeptoren
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
IL	Interleukin
LVH	Linksventrikuläre Hypertrophie
MR	Mineralokortikoidrezeptor
NaPi	Natrium-Phosphat-Kotransporter
NCC	Na ⁺ :Cl ⁻ -Cotransporter
NCX	Na-Ca-Exchanger
NFκB	Nuclear factor κB
NHERF-1	Na ⁺ /H ⁺ exchange-regulatory-cofactor-1
OAZ1	Ornithine Decarboxylase Antizyme 1
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Protein-Kinase-A
PKC	Protein Kinase C
PMCA1b	Plasmamembran CaATPase

PTH	Parathormon
PTHr	Parathormon-Rezeptor
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBA	Rezeptor-bindendem-Arm
ROMK1	Renal-Outer-Medullar-K ⁺ -Channel
Sham	Scheinoperiert
SKG1	Serum/Glukokortikoid-regulierte-Kinase-1
SPAK	STE20/SPS-1-related Proline/Alanine-rich-Kinase
TAC	Transversale Aorten Konstriktion
TNAP	Tissue-Nonspecific-Alkaline-Phosphatase
TRPV5	Transient-Rezeptor-Potential-Vannilloid-5
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VDRE	Vitamin-D-responsive-Elemente
VEH	Vehikel
WNK4	With-No-Lysin-Kinase-4
WT	Wildtyp
XLH	X-linked Hypophosphatämie

10. Danksagung

Mein größter Dank gilt Ass. -Prof. Dr. rer. nat. Olena Andrukova, die mich als Diplomanden angenommen hat und es mir so ermöglicht hat an diesem großartigen Projekt mitzuwirken. Vielen Dank für diese Möglichkeit und Ihr Vertrauen. Darüber hinaus möchte ich mich bei Univ. -Prof. Dr. med. Dr. med. vet. Reinhold Erben bedanken, der anschließend die Betreuung meiner Arbeit übernommen hat und mir viel konstruktiven Input gegeben hat. Vielen Dank, dass Sie immer als Ansprechpartner Zeit für mich gefunden haben und mir bei der Lösung von anfallenden Problemen geholfen haben.

Weiteres gilt mein Dank dem gesamten Team der Abteilung für Physiologie, Pathophysiologie und experimentelle Endokrinologie. Dabei besonders hervorheben möchte ich Mag.rer.nat Nikole Ginner, Dipl.-Biol. Christiane Schüller, Dipl. -Ing. Alexandra Petric, Claudia Bergow, Kristopher Ford, Dr. med. Vet. Ute Zeitz, für die technische und fachliche Unterstützung.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie und meiner Freundin Julia Costea bedanken, welche mich über die Zeit meines Studiums und während dem Verfassen dieser Arbeit immer unterstützt haben.