

Universitätsklinikum des Saarlandes

Innere Medizin III Kardiologie, Angiologie und internistische Intensivmedizin

Klinische und Experimentelle Medizin Homburg/ Saar

Prof. Dr. Michael Böhm

Auswirkung von Dialyseserum auf die Fibrosemarker TGF- β und CTGF in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität des Saarlandes

2025

vorgelegt von: Sarah Oberkircher (geborene Lothschütz)

Geb. 23.11.1993 in Homburg (Saar)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	5
Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	8
1. Zusammenfassung.....	10
Abstract.....	12
2. Einleitung	14
2.1 Das Kardiorenale Syndrom	14
2.2 Urämisches Syndrom und Urämische Toxine	15
2.2.1 Indoxylsulfat	16
2.2.2 Entstehung von Indoxylsulfat.....	17
2.3 Vorhofflimmern.....	19
2.4 Myokardiale Fibrose.....	20
2.4.1 Die Rolle von TGF- β , CTGF und Ang II bei der Fibroseinduktion	21
2.5 Ziele der Arbeit:.....	23
3. Materialien:.....	24
3.1 Antikörper	24
3.1.1 Primärantikörper	24
3.1.2 Sekundärantikörper	24
3.2 Sonden für RT-PCR.....	24
3.3 Enzyme, Kits.....	25
3.4 Lösungen, Medien, Puffer	26
3.5 Sonstige Substanzen	28
3.6 Verbrauchsmaterialien	30
3.7 Geräte.....	31
3.8 Auswertprogramme.....	33
4. Methoden	34
4.1.1 Tierversuchsanzeige	34
4.1.2 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten neonataler Ratten	34
4.2 Proteinisolation für Western Blot	35

4.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry	35
4.4 Western Blot Analyse.....	36
4.4.1 Gelelektrophorese	36
4.4.2 Proteintransfer	37
4.4.3 Proteindetektion	37
4.5 Durchflusszytometrische Analyse.....	38
4.5.1 Analyse von Apoptose und Nekrose	38
4.6 Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR).....	40
4.6.1 RNA-Isolation	40
4.6.2 Reverse Transkription	40
4.6.3 Real Time PCR	41
4.7 Zellkultur	42
4.7.1 Fibroblasten passagieren	42
4.8 Zellbehandlungen	42
4.8.1 Patientencharakteristika	42
4.8.2 Behandlung der isolierten neonatalen kardialen Fibroblasten mit Dialyseseren und gesunden Seren	43
4.8.3 Behandlung der isolierten neonatalen Kardiomyozyten mit Dialyseseren und gesunden Seren	43
4.8.4 Behandlung der kardialen Fibroblasten mit Indoxylsulfat	43
4.8.5 Behandlung der Kardiomyozyten mit Indoxylsulfat.....	44
4.8.6 Stimulation der Kardiomyozyten und Behandlung mit Dialyseseren	44
4.8.7 Behandlung der kardialen Fibroblasten mit Medium der stimulierten und mit Dialyseserum behandelten Kardiomyozyten.....	45
4.9 Statistik:	46
5. Ergebnisse	48
5.1 Behandlung von Kardiomyozyten mit Dialyseseren.....	48
5.1.1 Die Behandlung der Kardiomyozyten führt konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der Expression des Fibrosemarkers TGF- β	48
5.1.2 Die Behandlung der Kardiomyozyten mit Dialyseseren und gesundem Serum führt nicht zu einer Zunahme der Apoptose und der Nekroserate.	49

5.1.3 Die Behandlung der Kardiomyozyten mit Dialyseserum führt zu einer Zunahme der Expression der Fibrosemarker TGF- β und CTGF.....	51
5.2 Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Dialyseseren	52
5.2.1 Die Behandlung der kardialen Fibroblasten mit Dialyseserum führt zu einer Zunahme der Fibrosemarker TGF- β und CTGF.	52
5.2.2 Die Behandlung der kardialen Fibroblasten mit Dialyseserum führt zu einer Zunahme der Kollagenexpression.	53
5.3 Dialyseserum und gesundes Kontrollserum haben vergleichbare TGF- β Konzentrationen. Ausschluss einer Kontamination durch das verwendete Serum.....	54
5.4 Behandlung von Kardiomyozyten mit Indoxylsulfat	55
5.4.1 Die Behandlung von Kardiomyozyten mit Indoxylsulfat führt zu keiner Zunahme der Apoptose und Nekroserate.	55
5.4.2 Die Behandlung von Kardiomyozyten mit Indoxylsulfat führt zu einer Zunahme der Protein Expression des Fibrosemarkers TGF- β , aber nicht von CTGF.	57
5.5 Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Indoxylsulfat	59
5.5.1 Die Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Indoxylsulfat führt zu keiner Zunahme der Proteinexpression und der mRNA-Expression der Fibrosemarker CTGF und TGF- β	59
5.5.2 Die Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Indoxylsulfat führt zu keiner Zunahme der Protein- und mRNA-Expression von Kollagen 1A1 und Kollagen 3A1.	61
5.6 Kombination von Vorhofflimmern und chronischer Niereninsuffizienz zur Untersuchung des Einflusses der beiden Komorbiditäten auf die pro-fibrotische Genexpression in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten.....	63
5.6.1 Additiver Effekt einer arrhythmischen Stimulation in Gegenwart von Dialyseserum auf die Proteinexpression von TGF- β in neonatalen Kardiomyozyten.....	63
5.6.2 Effekt einer arrhythmischen Stimulation in Gegenwart von Dialyseserum auf die Proteinexpression von TGF- β in neonatalen Kardiomyozyten bei Vergleich der Probenpaare untereinander.....	64
5.6.3 Die Behandlung von Kardiomyozyten mit Dialyseserum führt zu einer Zunahme der mRNA-Expression des Ryanidin-Receptor 2 (Ryr2).	66
5.6.4 Die Behandlung von Kardiomyozyten mit Dialyseseren führt zu einer Zunahme der mRNA-Expression von ANP und BNP unabhängig von einer arrhythmischen Stimulation.	67

5.7 Die Stimulation von kardialen Fibroblasten mit Medium aus einer Kardiomyozytenkultur mit Dialyseserum und arrhythmischer Stimulation induziert die Proteinexpression des Fibrosemarkers TGF- β und Col1A1.	68
5.8 Ergebnisschemen	71
6. Diskussion.....	72
6.1 Zusammenhänge zwischen Dialyseseren und kardialer Fibrose	72
6.2 Die Rolle der serumfreien Kontrolle.....	73
6.3 Zusammenhänge zwischen BNP-Erhöhung in Kardiomyozyten und Dialyseseren.....	74
6.4 Zusammenhänge zwischen RyR-2 und kardialer Fibrose	75
6.5 Zusammenhänge zwischen arrhythmischer Stimulation, Behandlung mit Dialyseserum und kardialer Fibrose	75
6.6 Zusammenhänge zwischen Indoxylsulfat und kardialer Fibrose	76
6.7 Einschränkungen:	77
6.8 Zusammenfassungen der Ergebnisse	78
7. Literaturverzeichnis	79
8. Dank.....	94
9. Lebenslauf.....	95

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
VHF	Vorhofflimmern
Ang II	Angiotensin II
ACR	Albumin Creatinine Ratio
AER	Albumin Excretion Rate
AT1	Angiotensin II Typ 1
ANP	atrial natriuretic peptide
AR	Arrhythmisch stimuliert
BNP	brain natriuretic peptide
CNI	Chronische Niereninsuffizienz
Col1A1	Kollagen1A1
Col3A1	Kollagen3A1
CRS	Kardio-renales Syndrom

CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CVD	Herz-Kreislauf-Erkrankungen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DS	Dialyseserum
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fätales Kälberserum
FGF 23	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 23
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HCL	Chlorwasserstoffsäure, Salzsäure
HK2-Zellen	Homo sapiens Kidney 2 Zellen
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HZ	Hertz
IL-1 β	Interleukin-1beta
IL-6	Interleukin 6
IS	Indoxylsulfat
kDa	Kilodalton
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
KF	kardialen Fibroblasten
KM	Kardiomyozyten
KS	Kontrollserum
LV-Masse	Links-ventrikuläre Masse
min	Minute
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCS	newborn calf serum
NRVM	Neonatale Kardiomyozyten
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered saline
PCS	Paracresylsulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	Rhythmisch stimuliert

RAA-System	Renin-Angiotensin-Aldosteron System
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RyR-2	Ryanodin-Rezeptor 2
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor-beta
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TGF β R	Transformierender Wachstumsfaktor-beta-Rezeptor
β -MHC	Myosin Heavy Chain Beta
μ M	Mikromol
μ l	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abb.1: Schematische Darstellung der Synthese von Indoxylsulfat und dessen Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System (Modifiziert aus [43]).....	18
Abb.2: Fibrotische Signalmechanismen zwischen verschiedenen Zellpopulationen im Herzen (Mod. aus [87]).....	22
Abb.3: Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse im Dot blot von Apoptose und Nekrose.....	39
Abb.4: Schematische Darstellung der Behandlung der Kardiomyozyten.....	45
Abb.5: Schematische Darstellung der Behandlung der kardialen Fibroblasten	46
Abb.6: Konzentrationsabhängiger Effekt des Dialysates auf die Expression der Fibrosemarker TGF- β in Kardiomyozyten.....	49
Abb.7: Kein Effekt von Dialysat auf kardiomyozytäre Apoptose und Nekrose	50
Abb.8: Effekt des Dialysates auf die Expression der Fibrosemarker TGF- β und CTGF in Kardiomyozyten	52
Abb.9: Effekt des Dialysates auf die Expression der Fibrosemarker TGF- β und CTGF in neonatalen kardialen Fibroblasten	53

Abb.10: Zunahme der Kollagensynthese durch Dialyseserum in kardialen Fibroblasten	54
Abb.11: Dialyseserum und gesundes Kontrollserum haben vergleichbare TGF- β Konzentrationen. Ausschluss einer Kontamination durch das verwendete Serum	55
Abb.12: Kein Effekt von Indoxylsulfat auf die kardiomyozytäre Apoptose und Nekrose.....	56
Abb.13: Effekt von Indoxylsulfat auf die Expression der Fibrosemarker TGF- β und CTGF in neonatalen Kardiomyozyten.....	58
Abb.14: Indoxylsulfat induziert nicht die Expression der Fibrosemarker TGF- β und CTGF in neonatalen kardialen Fibroblasten	60
Abb.15: Kein Effekt von Indoxylsulfat auf die Kollagen Expression in kardialen Fibroblasten.....	62
Abb.16: Effekt des Pacings mit Dialyseserum und gesundem Serum auf Fibrosemarker TGF- β in Kardiomyozyten.....	64
Abb.17: Effekt der Stimulation mit Dialyseserum und gesundem Serum auf den Fibrosemarker TGF- β in Kardiomyozyten.....	65
Abb.18: Effekt des Dialyseserums und gesunden Serums mit rhythmischer und arrhythmischer Stimulation auf die Genexpression von Ryr-2 in Kardiomyozyten	66
Abb.19: Effekt des Dialyseserums und gesunden Serums mit rhythmischer und arrhythmischer Stimulation auf die Genexpression von ANP und BNP in Kardiomyozyten	68
Abb.20: Effekt des Mediums der Kardiomyozytenkulturen, die stimuliert und mit Dialyseserum behandelt wurden, auf den Fibrosemarker TGF- β und die Col1A1 Expression in kardialen Fibroblasten	70
Abb.21: Ergebnisschema. Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit.....	71

Tabellenverzeichnis

Tab.1: Kriterien für eine CNI (Modifiziert aus: [145]).....	14
Tab.2: Liste der genutzten Primärantikörper.....	24

Tab.3: Liste der genutzten Sekundärantikörper.....	24
Tab.4: Liste der TaqMan Sonden für RT-PCR.....	24
Tab.5: Liste der genutzten Enzyme und Kits.....	25
Tab.6: Liste der genutzten Lösungen, Medien und Puffer.....	26
Tab.7: Liste der sonstigen Substanzen.....	28
Tab.8: Liste der genutzten Verbrauchsmaterialien.....	30
Tab.9: Liste der genutzten Geräte.....	31
Tab.10: Liste der genutzten Auswertprogramme.....	33
Tab.11: Zusammensetzung der 10%igen SDS-Tris-GlycinPolyacrylamid-Gele.....	36
Tab.12: Zusammensetzung des Mix zur Reversen Transkription.....	40
Tab.13: Aufreihung der genutzten Proben (Kontrollprobanden und Dialysepatienten.....	42
Tab.14: Liste der genutzten statistischen Auswertung und statistischen Tests.....	46

1. Zusammenfassung

Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (CNI) zeigen ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko [131], unter anderem durch die Entwicklung einer Myokardialen Fibrosierung [65]. Führt eine bestehende Niereninsuffizienz direkt oder indirekt zu einer Herzerkrankung, so spricht man von einem renokardialen Syndrom [81]. Vorhofflimmern stellt die häufigste Arrhythmie bei CNI dar [28]. Gleichzeitig führt Vorhofflimmern per se zu einer atrialen Herzfibrosierung [140]. Myokardiale Fibrose kann neben Arrhythmien [7,18,87], auch zu einer Herzinsuffizienz führen [87]. Das Urämietoxin Indoxylsulfat (IS) wurde als mögliches Bindeglied in der renokardialen Verbindung vorgeschlagen [53], da IS eine pro-fibrotische Wirkung auf das Herz gezeigt hat [75,118]. Inwieweit Urämtoxine die Entstehung von Vorhofflimmern bei CNI begünstigt, ist jedoch nur unzureichend untersucht.

Ziele dieser Arbeit waren es, die Auswirkungen von Dialyseseren auf die Expression des Fibrosemarkers Transforming Growth Factor beta (TGF- β), des Connective Tissue growth Factors (CTGF), sowie auf die Kollagen 1A1 (Col1A1) und 3A1 (Col3A1) Expression in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten zu untersuchen.

Mittels in vitro Zellkulturexperimenten wurden neonatale Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten der Ratten für 24 Stunden mit humanem gesunden- und Dialyseseren behandelt. Die Inkubation der kardialen Fibroblasten mit Dialyseserum führte zu einer zunehmenden Proteinexpression von CTGF um $39,8 \pm 11,3\%$ ($p=0,008$), von Col1A1 um $112,9 \pm 22,6\%$ ($p<0,001$) und von Col3A1 um $105,2 \pm 22\%$ ($p<0,001$) im Vergleich zu gesundem Serum. Für den Fibrosemarker TGF- β konnte keine Veränderung der Proteinexpression der kardialen Fibroblasten festgestellt werden.

In isolierten neonatalen Kardiomyozyten bewirkte eine Behandlung mit Dialyseserum im Vergleich zu gesundem Serum eine TGF- β -Protein Expressionszunahme um $105,2 \pm 22\%$ ($p<0,001$) und eine CTGF-Protein Expressionszunahme um $526,6 \pm 194\%$ ($p=0,05$). Neben der Aktivierung der pro-fibrotischen Signalkaskade durch die Dialyseserumbehandlung, konnte zudem eine 1,8-fach erhöhte Genexpression des Hypertrophiemarkers BNP ($p=0,001$) gezeigt werden. Auch für den Ryanoid Rezeptor 2 (RyR2) konnte bei Behandlung mit Dialyseserum eine Expressionszunahme um $1,7 \pm 0,3$ ($p<0,001$) nachgewiesen werden.

Neonatale Kardiomyozyten zeigten sich zudem responsiv auf eine Stimulation mit $100 \mu\text{mol/L}$ Indoxylsulfat. Dabei induzierte IS nach 24-stündiger Inkubation eine Zunahme der TGF- β Proteinexpression um $65,9 \pm 19,6\%$ ($p=0,03$) im Vergleich zu unbehandelten Kardiomyozyten. Dieser Effekt konnte in kardialen Fibroblasten nicht beobachtet werden.

Um im Zellkulturmodell die Auswirkungen von Vorhofflimmern (VHF) und CNI in Kombination auf die kardiale Fibrose zu untersuchen, wurden diese beiden Komorbiditäten kombiniert. Hierzu wurden neonatale Ratten-Kardiomyozyten in Dialyseserum inkubiert und gleichzeitig wurde Vorhofflimmern simuliert, indem die Kardiomyozyten mit Hilfe von Elektroden arrhythmisch stimuliert wurden. Als Kontrolle dienten Kardiomyozyten, welche in gesundes Serum (Kontrollserum) inkubiert und rhythmisch stimuliert wurden. Die Kombination aus arrhythmischer Stimulation und Behandlung mit Dialyseseren für 24h, führte in Kardiomyozyten zu einer Zunahme von TGF- β um $185,1 \pm 43,2\%$ ($p=0,002$ gegen rhythmische Stimulation und Behandlung mit gesundem Serum). Um die Auswirkungen von VHF und CNI auf neonatale kardiale Fibroblasten im Zellkulturmodell zu untersuchen, wurden zunächst Kardiomyozyten für 24 Stunden mit Dialyseserum behandelt und arrhythmisch stimuliert. Nach 24-stündiger Behandlung wurde das Medium genutzt, um damit kardiale Fibroblasten zu behandeln. Nach 24 Stunden konnte eine Zunahme der TGF- β Proteinexpression um $436,4 \pm 82,8\%$ ($p<0,001$ gegen die Behandlung mit rhythmisch stimuliertem gesundem Serum) und für die Kollagen-Expression um $164,1 \pm 33,4$ ($p<0,001$ gegen die Behandlung mit rhythmisch stimuliertem gesundem Serum) beobachtet werden.

Zusammenfassend führt Dialyseserum in Kardiomyozyten zu einer zunehmenden Expression der Fibrosemarker CTGF und TGF- β , was mutmaßlich in kardialen Fibroblasten eine vermehrte Kollagenexpression induziert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass pro-fibrotischen Wirkungen von Dialyseseren, noch stärker ausgeprägt sind, wenn diese mit arrhythmischer Stimulation kombiniert werden.

Abstract

An elevated cardiovascular risk is observed in patients with chronic kidney disease (CKD) [131], which is partly attributed to the occurrence of myocardial fibrosis [65]. If pre-existing kidney dysfunction leads directly or indirectly to cardiac disease, this is referred to as the cardiorenal syndrome [81]. Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia observed in CKD [28] and, in turn, AF itself promotes atrial cardiac fibrosis [140]. Myocardial fibrosis can lead not only to arrhythmias [7,18,87] but also to heart failure [87]. The uremic toxin indoxyl sulfate (IS) has been proposed as a potential link in the cardiorenal connection [53], as IS has been shown to exert pro-fibrotic effects on the heart [75,118]. However, the extent to which uremic toxins contribute to the development of atrial fibrillation in CKD remains insufficiently investigated.

The aim of this study was to investigate the effects of dialysis serum on the expression of the fibrosis marker transforming growth factor beta (TGF- β), connective tissue growth factor (CTGF), as well as collagen 1A1 (Col1A1) and 3A1 (Col3A1) in cardiomyocytes and cardiac fibroblasts.

In vitro cell culture experiments were conducted using neonatal rat cardiomyocytes and cardiac fibroblasts treated for 24 hours with either healthy human serum or dialysis serum. Incubation of cardiac fibroblasts with dialysis serum led to a significant increase in CTGF protein expression by $39.8 \pm 11.3\%$ ($p=0.008$), Col1A1 by $112.9 \pm 22.6\%$ ($p<0.001$), and Col3A1 by $105.2 \pm 22\%$ ($p<0.001$), compared to treatment with healthy serum. No changes were observed in TGF- β protein expression in cardiac fibroblasts.

In isolated neonatal cardiomyocytes, treatment with dialysis serum resulted in a TGF- β protein expression increase of $105.2 \pm 22\%$ ($p<0.001$) and CTGF protein expression increase of $526.6 \pm 194\%$ ($p=0.05$), compared to healthy serum. Beyond activation of pro-fibrotic signaling pathways, dialysis serum also induced a 1.8-fold increase in the gene expression of the hypertrophy marker BNP ($p=0.001$). Furthermore, expression of the ryanodine receptor 2 (RyR2) was significantly upregulated by 1.7 ± 0.3 -fold ($p<0.001$).

Neonatal cardiomyocytes also responded to stimulation with $100 \mu\text{mol/L}$ indoxyl sulfate. After 24 hours of incubation, IS induced an increase in TGF- β protein expression by $65.9 \pm 19.6\%$ ($p=0.03$) compared to untreated cardiomyocytes. This effect was not observed in cardiac fibroblasts.

To investigate the combined effects of atrial fibrillation (AF) and CKD on cardiac fibrosis in a cell culture model, both comorbidities were simulated. Neonatal rat cardiomyocytes were incubated with dialysis serum and simultaneously exposed to arrhythmic stimulation using electrodes to simulate AF. As a control, cardiomyocytes were treated with healthy serum and stimulated rhythmically. The combination of arrhythmic stimulation and dialysis serum

treatment for 24 hours resulted in a TGF- β expression increase of $185.1 \pm 43.2\%$ ($p=0.002$ vs. rhythmic stimulation and healthy serum treatment).

To examine the impact of AF and CKD on neonatal cardiac fibroblasts in this model, cardiomyocytes were first treated for 24 hours with dialysis serum and arrhythmic stimulation. The conditioned medium was then used to treat cardiac fibroblasts. After another 24 hours, a significant increase in TGF- β protein expression by $436.4 \pm 82.8\%$ ($p<0.001$ vs. treatment with rhythmically stimulated healthy serum) and collagen expression by $164.1 \pm 33.4\%$ ($p<0.001$) was observed.

In summary, dialysis serum induces increased expression of the fibrosis markers CTGF and TGF- β in cardiomyocytes, which likely stimulates enhanced collagen expression in cardiac fibroblasts. This study demonstrates that the pro-fibrotic effects of dialysis serum are further amplified when combined with arrhythmic stimulation.

2. Einleitung

2.1 Das Kardiorenale Syndrom

Eine CNI ist eine sehr weit verbreitete Erkrankung, die 8-16% der weltweiten Bevölkerung betrifft und häufig von Patienten und Ärzten unerkannt bleibt [22,52,64,113]. Nach Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) ist eine chronische Niereninsuffizienz als eine Anomalität der Nierenstruktur- oder Nierenfunktion, die länger als drei Monate bestehen und Auswirkungen auf die Gesundheit haben, definiert [145]. Laut KDIGO 2013 muss eines dieser Kriterien für mindestens drei Monate vorhanden sein, um von einer CNI zu sprechen [145]:

Marker für Nierenschädigung (mind. Eins)	Albuminurie (AER $\geq$ 30mg/ 24h; ACR $\geq$ 30mg/g Anomalitäten des Urinsediments Elektrolytanomalien aufgrund einer tubulären Störung Histologische Anomalien Durch eine Bildgebung festgestellte strukturelle Anomalien Anamnese einer Nierentransplantation
Verminderte GFR	GFR< 60ml/ min/ 1,73m ²

Tabelle 1: Kriterien für eine chronische Niereninsuffizienz [145]; AER=Albumin Excretion Rate; ACR=Albumin Creatinine Ratio; GFR: Glomeruläre Filtrationsrate;

Neben Komplikationen wie Anämie, Elektrolytstörungen, Mineral- und Knochenstörungen [59], führt eine CNI zu einer erhöhten Inzidenz an kardiovaskulären Erkrankungen [131]. Gleichzeitig sind etwa 50% der Todesursachen bei CNI Patienten auf schwerwiegende kardiale Ereignisse zurückzuführen [51]. Der Begriff des kardiorenalen Syndroms (CRS) beschreibt, dass Herz und Niere in der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen eng miteinander verbunden sind [26]. Die CRS-Klassifikation beinhaltet die zwei Hauptgruppen des kardiorenalen und des renokardialen Syndrom. Die Grundlage der Einteilung leitet sich vom zuerst erkrankten Organ ab [26,115]. Als chronisch renokardiales Syndrom, nach der CRS Definition Typ 4, werden kardiovaskuläre Komplikationen bei Patienten mit CNI bezeichnet [26,115,119].

So können chronische Nierenerkrankungen direkt (Verschlimmerung einer ischämischen Herzerkrankung) und indirekt (Druck und Volumenüberlastung, die zur linksventrikulären Hypertrophie führt) zu einer Herzerkrankung beitragen [81]. Als Zeichen der Myokardzellschädigung ist bei Patienten mit CNI das natriuretische Peptid vom B-Typ (BNP) erhöht [88]. Zudem können Patienten mit CNI ähnlich wie Patienten mit hypertensiver und

chronisch ischämischer Herzkrankheit eine myokardiale Fibrose entwickeln [65]. Daneben besteht ein höheres Risiko für Herzrhythmusstörungen und dem plötzlichen Herztod [26]. Insbesondere bei Patienten unter Hämodialyse sind kardiovaskuläre Komplikationen sehr häufig und treten mit einer Prävalenz von 80% auf [27]. So ist für Patienten unter Hämodialyse ein hohes Risiko für Vorhofflimmern und ventrikuläre Tachyarrhythmien beschrieben [26]. Die bestehenden Elektrolytanomalie, sowie die Veränderungen des Blutdrucks und Blutvolumens können zu den Arrhythmien beitragen [16,26].

Letztendlich sind die Mechanismen, die zu dem erhöhten kardiovaskulären Risiko bei Patienten mit CNI führen, noch nicht abschließend geklärt. Verschiedene Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Bluthochdruck und Dyslipidämie hängen stark mit der Entwicklung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen (CVD) zusammen [117]. Die herkömmlichen kardiovaskulären Risikofaktoren reichen jedoch nicht aus, um das kardiovaskuläre Risiko von CNI Patienten ausreichend vorherzusagen [119]. Go et al. stellten fest, dass die Mortalitätsrate mit kardiovaskulären Ereignissen nach abnehmendem GFR-Intervall ansteigt und dass die GFR ein unabhängiger Risikofaktor für die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität ist [44].

2.2 Urämisches Syndrom und Urämische Toxine

Neben der entscheidenden Rolle der Niere in der Flüssigkeitshomöostase [112], ist auch die Ausscheidung von metabolischen Endprodukten eine zentrale renale Funktion [2]. Das Versagen der Niere, diese Aufgaben zu erfüllen, manifestiert sich im klinischen Syndrom Urämie [2]. Das Wort "Urämie" wurde verwendet, um den Zustand zu beschreiben, der mit einer erhöhten Retention stickstoffhaltiger Verbindungen verbunden ist und mit einer erhöhten Konzentration von Harnstoff im Blut einhergeht [2]. Im weiteren Verlauf stellte sich jedoch heraus, dass eine Vielzahl an gelösten Stoffen retinieren [134]. Bis jetzt konnte noch kein einzelner gelöster Stoff, bzw. eine Gruppe an gelösten Stoffen mit Sicherheit als Ursache der urämischen Erkrankung benannt werden [97]. Dieser Umstand, schränkt die Fähigkeit zur therapeutischen Optimierung des Urämischen Syndroms ein [97]. Genau wie die Zahl an retinierten Stoffen, sind die Symptome des urämischen Syndroms variabel und vielfältig [2]. Das Syndrom kann sich mit Gefäßerkrankungen, Bluthochdruck, Anämie, gastrointestinalen Syndromen, Mineral- und Knochenerkrankungen, Störungen des Elektrolyt- und Wasserhaushalts, endokriner Dysfunktion, immunologischen- und neurologischen Erkrankungen bis hin zum urämischen Koma, präsentieren [2]. Aber auch eine urämische Kardiomyopathie ist eine mögliche Manifestation, die mit einer linksventrikulären Hypertrophie einhergeht und eng mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist [31,86,104,109,110]. Über die Pathogenese der urämischen Kardiomyopathie ist noch wenig bekannt [47].

Die Retention von gelösten Stoffen, die bei physiologischer Nierenfunktion ausgeschieden werden, ist in einem zunehmenden Nierenfunktionsverlust begründet [134]. Wenn sich diese Verbindungen negativ auf die biologische Funktion auswirken, werden diese als urämische Toxine bezeichnet [43]. Die alleinige Exposition von urämischen Toxinen kann per se zu einem Verlust der Nierenfunktion führen [1,125,133,142]. Insbesondere die therapeutische Entfernung von proteingebundenen urämischen Toxinen ist weniger effizient, als die Entfernung von kleineren, wasserlöslichen Bestandteilen [133].

Insgesamt wurden 90 urämische Retentionsverbindungen in die EUTox 2003 aufgenommen [134]. In weiteren Veröffentlichungen wurde die Liste 2007 um 14 Verbindungen [94] und 2012 um weitere 56 Verbindungen ergänzt [32]. Urämische Retentionsverbindungen werden aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften in drei Gruppen eingeteilt [79]. Zu der ersten Gruppe gehören freie wasserlösliche niedermolekulare oder kleine wasserlösliche Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 500 Dalton, wie Harnstoff, Kreatinin und Phosphor. Moleküle in dieser Größe werden zur Abschätzung der Effizienz der Nierenfunktion genutzt [79]. Zu der zweiten Gruppe gehören mittel große Moleküle mit einem Molekulargewicht von 500-32.000 Dalton, wie β 2-Mikroglobulin, Parathormon und FGF 23. Die Entfernung der Moleküle wird durch die Hämodialyse limitiert, eine Verbesserung der Beseitigung kann durch Verwendung von Hochflussmembranen oder von Konvektionstransport gewährleistet werden [25,89,96]. Zu der dritten Gruppe gehören proteingebundene Moleküle, wie Indoxylsulfat (IS), Homocystein oder Paracresylsulfat (PCS). In der Regel besitzen diese ein Molekulargewicht unter 500 Dalton und sind an Albumin gebunden [79]. Die Entfernung der proteingebundenen Moleküle ist durch die konventionelle Hämodialyse und die Hochfluss-Hämodialyse stark eingeschränkt [79]. Insbesondere die Frage nach der Toxizität der proteingebundenen urämischen Toxine rückt immer mehr in den Vordergrund. Dies scheint mit dem Problem der nicht-Dialysierbarkeit und den anhaltenden urämischen Syndromen bei dialyseabhängigen CNI-Patienten assoziiert zu sein [79]. Vor allem IS hat zunehmend an Aufmerksamkeit gewonnen. Sowohl in vitro [75], als auch in vivo [76] konnten pro-fibrotische Wirkungen von IS auf das Myokard beobachtet werden. Wohingegen andere proteingebundene Urämietoxine nur geringe oder keine pro-fibrotischen kardialen Wirkungen zeigten [77].

2.2.1 Indoxylsulfat

Als repräsentatives urämisches proteingebundenes Toxin kumuliert Indoxylsulfat (IS) bei eingeschränkter Nierenfunktion im Blut und im Gewebe [43]. Die Konzentration vom gesamten IS kann bei Patienten mit fortgeschrittenem Nierenfunktionsverlust bis zu 500 $\mu\text{mol/L}$ betragen. Bei der gesunden Bevölkerung liegt zum Vergleich eine Konzentration von 0,1-2,39 $\mu\text{mol/L}$ vor [75]. Die derzeitige konventionelle Hämodialyse ist bei der Entfernung dieses Toxins unwirksam [75], da 90% des IS an Albumin gebunden ist [124]. Der IS-Albumin Komplex ist

größer als die Poren der Dialysemembran [106], sodass 90% des IS auch nach der Dialyse bei urämischen Patienten zirkuliert [75]. Die freie Form von IS kann bei gesunden Probanden im Wesentlichen nicht nachgewiesen werden [105]. Es ist bekannt, dass IS eine pro-fibrotische Signalkaskade in der Niere induziert, was auch das Voranschreiten der CNI beschleunigt [98,106]. Lekawanvijit et al. konnten zudem pro-fibrotische Signalkaskaden durch IS auf das Myokard nachweisen [75]. Ebenso beschrieben diese eine pro-hypertrophe Wirkung von IS auf Kardiomyozyten und eine entzündungsfördernde Wirkung von IS [75]. Die pro-fibrotische Wirkung wurde durch eine vermehrte Kollagen Expression nach 48-stündiger Behandlung von kardialen Fibroblasten mit IS von 0,1 nmol/L bis 200 µmol/L gezeigt, wobei die pro-fibrotische Wirkung von 3 µmol/L bis 200 µmol/L nachzuweisen war [75]. Zudem wurde eine Monozyten Zelllinie genutzt und eine erhöhte Expression von TNF alpha, IL-6 und IL-1β beobachtet, was sowohl pro-fibrotische, als auch pro-hypertrophe Wirkung auf Kardiomyozyten zur Folge hat [75]. Yang et al. detektierten die pro-hypertrophe Wirkung von IS, indem neonatale Kardiomyozyten für 48h mit 500 µmol/L IS behandelt wurden, was zu einer erhöhten mRNA Expression der Hypertrophiemarker ANP, BNP und β-MHC führte [143].

In einer Studie von 2017 konnte auch durch Paracresylsulfat (PCS), ein ebenfalls zu 90% an Albumin gebundenes Urämie Toxin [75,84], die Induktion von pro-hypertrophen Genen in Kardiomyozyten und die Induktion von pro-fibrotischen Genen in kardialen Fibroblasten nachgewiesen werden [118]. So konnte für IS (10 µmol/L) und PCS (100 µmol/L) nach 18-stündiger Behandlung eine erhöhte Expression der Fibrosemarker TGF-β und CTGF in kardialen Fibroblasten und HK2-Zellen festgestellt werden [118]. Fujii et al. zeigten einen Zusammenhang zwischen Indoxylsulfat und oxidativen Stressmarkern im Herzgewebe [41]. Auch eine Urämie führt bei bestehender urämischer Kardiomyopathie, zu oxidativem Stress [69], weshalb die Rolle von IS am urämischen Syndrom zu diskutieren ist. Es konnte festgestellt werden, dass ein hoher Indoxylsulfatspiegel im Serum mit einer QT-Zeit Verlängerung assoziiert ist, was wiederum das Risiko für ventrikuläre Arrhythmien erhöht [127]. In isolierten Kaninchenvorhöfen konnte zudem ein proarrhythmogener Effekt von Indoxylsulfat durch oxidativen Stress nachgewiesen werden [17].

Aufgrund der eben genannten Wirkungen von Indoxylsulfat auf das Herz, die ebenfalls in der Pathogenese des renokardiale Syndrom eine entscheidende Rolle spielen, wurde Indoxylsulfat als potenziell fehlendes Glied in der renokardialen Verbindung vorgeschlagen [53,78] .

2.2.2 Entstehung von Indoxylsulfat

Nachdem die Aminosäure Tryptophan mit der Nahrung aufgenommen wurde und den Dickdarm erreicht hat, wird diese von Darmmikrobiotika in Indol umgewandelt und in den

Blutkreislauf aufgenommen [136] (siehe **Abb.1**). Es wurden mindestens 85 verschiedene Indol produzierende Bakterienarten identifiziert [34]. Indol wird in der Leber weiter oxidiert und sulfatiert, um IS zu bilden, welches durch tubuläre Sekretion ausgeschieden wird [43]. Nach der Verabreichung von Breitbandantibiotikum konnte eine geringere Ausscheidung von Indoxylsulfat im Urin detektiert werden, was vermutlich auf eine Verringerung der indolbildenden Darmmikrobiotika zurückzuführen war [80]. Aronov et al. verglichen Plasma von Patienten unter Hämodialyse mit vorhandenem Colon und Patienten ohne Colon und stellten fest, dass IS bei Patienten ohne Colon nahezu nicht vorhanden war [5]. Diese Ergebnisse liefern also Hinweise darauf, dass insbesondere der mikrobielle Dickdarmstoffwechsel als Hauptquelle für Indoxylsulfat dient [43].

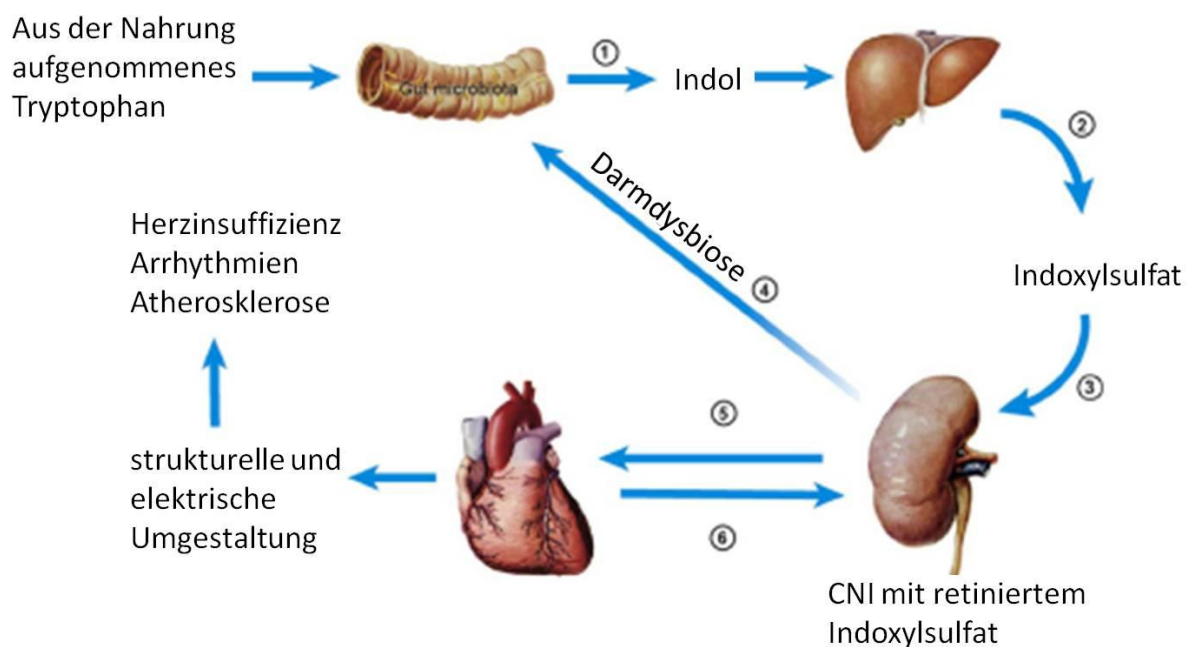


Abb. 1: Schematische Darstellung der Synthese von Indoxylsulfat und dessen Auswirkungen auf das Herz-Kreislauf-System (Modifiziert aus [43]). Mit der Nahrung aufgenommenes Tryptophan wird durch Darmmikrobiotika (1) zu Indol metabolisiert. Indol wird aus dem Darm in das Blut aufgenommen und in der Leber zu Indoxylsulfat metabolisiert (2). Das zirkulierende Indoxylsulfat wird normalerweise durch renale tubuläre Sekretion ausgeschieden und sammelt sich bei chronischer Niereninsuffizienz (CNI) an (3). CNI und urämische Toxine können zur Darmdysbiose beitragen (4). Indoxylsulfat verursacht strukturelle und elektrische Umbauten im Herz und trägt damit zur Herzinsuffizienz, Arrhythmie und atheroskleriotischen Erkrankungen bei (5). Umgekehrt fördern Herz-Kreislauserkrankungen das Voranschreiten einer Niereninsuffizienz (6) [43].

2.3 Vorhofflimmern

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende Arrhythmie, von der derzeit über 33 Millionen Menschen betroffen sind [19]. Da das Risiko von VHF mit zunehmendem Alter steigt, wird erwartet, dass sich die Prävalenz, aufgrund der Bevölkerungsdemographie in den nächsten 40 Jahren mehr als verdoppelt [71]. VHF tritt häufig bei Patienten mit Hämodialyse auf [122] und stellt gleichzeitig die häufigste Arrhythmie bei Patienten mit CNI dar [144]. Die Arrhythmie ist mit einem erhöhten Risiko für Schlaganfall, Thrombembolie und einer erhöhten Mortalität verbunden [15,108,144]. Die Richtlinien des American College of Cardiology definieren Vorhofflimmern als „Supraventrikuläre Tachyarrhythmie mit unkoordinierter Vorhofaktivierung und daraus resultierender Verschlechterung der atrialen Kontraktion“ [14,24,42,63]. Zu den Merkmalen im Elektrokardiogramm gehören unregelmäßige RR-Intervalle, das deutliche Fehlen einer Wiederholung von P-Wellen und eine unregelmäßige elektrische Aktivität [63].

Verschiedene Schlüsselkonzepte für die Induktion und Aufrechterhaltung von VHF sind beschrieben. So kann VHF durch schnelle und anhaltende ektopische Aktivität aufrechterhalten werden, oder durch den Wiedereintritt von elektrischer Aktivität entstehen. In normalem Herzgewebe ist es weniger wahrscheinlich, dass die elektrischen Eigenschaften des Atriums den Wiedereintritt einer elektrischen Aktivität unterstützen. Es kommt jedoch im Verlauf zu einer strukturellen Umgestaltung, die durch mikroskopische Prozesse, wie der Fibrosierung und durch makroskopische Prozesse, wie der atrialen Dilatation gekennzeichnet sind. Durch dieses atriale Remodelling wird der Wiedereintritt und die Entstehung von elektrischer Aktivität und ektopen Schlägen gefördert [30,140].

Die myokardiale Fibrose spielt also eine zentrale Rolle in dem Pathomechanismus des Vorhofflimmerns. Durch die Fibrosierung wird die normale elektrische Weiterleitung gestört, was einen proarrhythmischen Effekt auslöst [102]. Die Tatsache, dass VHF Fibrose induziert [140], passt zu der Annahme, dass VHF selbst ein atriales Remodelling induziert, was zur Aufrechterhaltung des Vorhofflimmerns beiträgt [60]. Dies stimmt mit den klinischen Beobachtungen überein, dass paroxysmales VHF häufig in ein permanentes VHF übergeht [140]. Auch in Zellkulturmodellen konnte der Zusammenhang von VHF und kardialer Fibrose belegt werden. In *in vitro* Studien simulierten Slawik et al. Arrhythmien durch arhythmische Stimulation und zeigten dabei eine Zunahme der Kollagen I und Kollagen III Expression in kardialen Fibroblasten. Der zu Grunde liegende Mechanismus wurde in einer ebenfalls erhöhten Expression der Fibrosemarker CTGF und TGF- β begründet [121].

Zusammenfassend kann die myokardiale Fibrose als gemeinsamer Pathomechanismus, sowohl des Vorhofflimmerns [140], als auch der CNI [144] angesehen werden, wobei die CNI

und das Vorhofflimmern selbst, neben der Fibroseentwicklung, durch vielfältige, oben genannte Mechanismen, zur Entwicklung bzw. Aufrechterhaltung eines Vorhofflimmerns beitragen.

2.4 Myokardiale Fibrose

Fibrose ist eine übermäßige und schlecht organisierte Bildung von Matrixproteinen im Interstitium von Organen. Eine beeinträchtigte Wundheilungsreaktion auf Grund von Gewebeschaden oder Infektionen kann dieser zu Grunde liegen [21]. Viele Daten zeigen, dass Fibrose durch überschießende Reparaturprozesse entsteht [39,91,100]. Aus einer Vielfalt an chronischen Erkrankungen kann sich nach vielen Jahren Latenz eine Fibrose entwickeln, was die Gewebefunktion nachträglich erheblich beeinträchtigt [21]. Auf vielfältige Reize hin, kann es zu einer vorübergehenden Aktivierung von Fibroblasten kommen, was zu deren Proliferation und einer Produktion an extrazellulärer Matrix (ECM) führt [58]. Bei der Fibrose ist die ECM-Bildung durch eine unverhältnismäßige Anreicherung von Kollagen und anderen Matrixproteinen, die die Herstellung einer normalen Gewebefunktion und -Architektur verhindern, gekennzeichnet. Ein progredientes Organversagen ist häufig die Folge [21]. In gesundem Bindegewebe wird die Produktion, Ablagerung und Organisation von extrazellulären Matrixmolekülen durch den Abbau von vorhandener ECM ausgeglichen [21].

Während der klassischen Wundheilung lagern Fibroblasten hauptsächlich fibrilläre Kollagene vom Typ I und III in der entstehenden Matrix ab. Strukturelle Unterschiede zwischen einer gesunden ECM und einer pathologischen, bestehen v.a. in der unterschiedlicher Anordnung der Kollagenfasern [21].

Myokardiale Fibrose kann ebenso durch zahlreiche schädigende Reize ausgelöst werden [70], was in einer Veränderung der Herzarchitektur und einer Funktionsstörung gipfelt. Eine myokardiale Fibrose erhöht die Steifheit des linken Ventrikels und behindert so die Kontraktion und Entspannung des Herzens. Zudem beeinträchtigt die kardiale Fibrose die mechanoelektrische Kopplung und führt somit zu Arrhythmien [7,18,87]. Myofibroblasten sezernieren Wachstumsfaktoren, welche eine Herzhypertrophie induzieren [90], was wiederum eine Herzinsuffizienz begünstigt [87].

Schädigende Stimuli, wie z.B. VHF [140] oder Urämietoxine [75] lösen eine Freisetzung von pro-fibrotischen Wachstumsfaktoren und Zytokinen aus [70]. Dies führt zu einer Aktivierung von verschiedenen Signalwegen und Transkriptionsfaktoren. Diese Prozesse haben eine Umwandlung von Fibroblasten in Myofibroblasten, die das hochkontraktile alpha-SMA exprimieren, sowie die Bildung und Freisetzung von weiteren pro-fibrotischen Wachstumsfaktoren und Zytokinen in Myofibroblasten, zur Folge. Grundsätzlich können die

Zytokine und Wachstumsfaktoren, die von kardialen Fibroblasten, Kardiomyozyten, oder Entzündungszellen gebildet werden, erneut auf Kardiomyozyten oder auf kardiale Fibroblasten wirken, zu einer positiven Rückkopplung führen und wiederum die Fibrose verstärken [40,70,87] (siehe **Abbildung 2**).

Aktuell existieren noch keine evidenzbasierten Therapien, die eine signifikante Wirksamkeit bei myokardialer Fibrose zeigen. Was vor allem darin begründet wird, dass der vollständig zugrunde liegende Mechanismus der Fibrose immer noch unklar ist [87].

2.4.1 Die Rolle von TGF- β , CTGF und Ang II bei der Fibroseinduktion

Durch eine Vielzahl an Zytokinen wird die vorübergehende Aktivierung der Fibroblasten reguliert [20]. Insbesondere für TGF- β wurde nachgewiesen, dass dieser die Proliferation von Fibroblasten und die Ablagerung von ECM, unter anderem über eine Erhöhung der Kollagen I und III Expression, aktiviert [10,93]. TGF- β , ein homodimeres Polypeptid mit 25kDa [6], gilt als einer der stärksten profibrotischen Stimuli für Fibroblasten [58]. Außerdem sind über TGF- β vermittelte Signaltransduktionen bekannt, welche den Abbau der ECM inhibieren [120]. Auch bei der myokardialen Fibrose ist TGF- β einer der bekanntesten fibrinogenen Wachstumsfaktoren [87], was viele Studien durch eine erhöhte Expression bei einer kardialen Fibrose belegen [74,137]. Es wird zudem angenommen, dass TGF- β die Transformation von Fibroblasten zu Myofibroblasten induziert [23]. Einige Autoren beschreiben, dass TGF- β durch Myofibroblasten freigesetzt wird und dann parakrin auf Kardiomyozyten wirkt und zu Hypertrophie und Apoptose dieser führt [62] (siehe **Abbildung 2**). Nach Freisetzung des Wachstumsfaktors kann dieser wiederum in einer positiven Rückkopplungsschleife zu einer Aktivierung und Proliferation von Fibroblasten beitragen [67]. Andere Studien belegen aber auch die entscheidende Rolle der Kardiomyozyten bei der Fibroseentwicklung. Kuwahara et al. zeigten, dass es beim Verlust der kardiomyozytenspezifischen TGF- β Signalübertragung, nach Induktion einer Druckbelastung im Herzen, zu einer geringeren myokardialen Fibrosierung kam [74]. Auch der Bindegewebswachstumsfaktor (Connective Tissue Growth Factor; CTGF), ein Cystein-reiches Peptid mit 36-38kDA [13], induziert das Fibroblastenwachstum und die ECM Bildung [58]. So konnte eine erhöhte Kollagen-I mRNA Expression in Fibroblasten nach CTGF Behandlung beobachtet werden [38]. CTGF ist ein dem TGF- β nachgeschalteter Mediator und kann viele der profibrotischen Aktionen von TGF- β vermitteln [13,55,58]. Das Ausmaß der CTGF Expression scheint zudem mit dem Grad der Fibrose zu korrelieren [56,57]. Andere Studien weisen jedoch darauf hin, dass CTGF nur eine begrenzte Fähigkeit zur Induktion von kardialer Fibrose aufweist. Es zeigte sich, dass es bei einer CTGF Überexpression zu keiner vermehrten myokardialen Fibrose in Ratten- und Mäuseherzen kam [98]. Bei Induktion einer Herzschädigung in CTGF-überexprimierenden

Mäusen kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe nur zu einer vergleichbaren kardialen Fibrose [46].

Ebenso wird Angiotensin II (Ang II) als ein zentraler Mediator bei der kardialen Fibrose beschrieben [87]. AngII ist ein Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems, welches eine zentrale Rolle für das Voranschreiten einer Nierenschädigung und auch für das Voranschreiten einer Herzinsuffizienz spielt [36]. Das Wachstum, die Adhäsion und die ECM Bildung von kardialen Fibroblasten kann durch Ang II induziert werden [68]. Zudem vermittelt AngII die kardiomyozytäre Hypertrophie und die Freisetzung von profibrotischen Wachstumsfaktoren durch Kardiomyozyten [66,116]. Auch TGF- β spielt in dieser Signalkaskade eine entscheidende Rolle, da zahlreiche Wirkungen von AngII über TGF- β angestoßen werden [68].

Zusammenfassend steht also fest, dass vor allem TGF- β eine zentrale Rolle bei der kardialen Fibroseentwicklung [87] und Aufrechterhaltung einnimmt [120]. Die Rolle von CTGF, als dem TGF- β nachgeschalteter Mediator bei der Fibrogenese, ist umstritten [13,46,55,58].

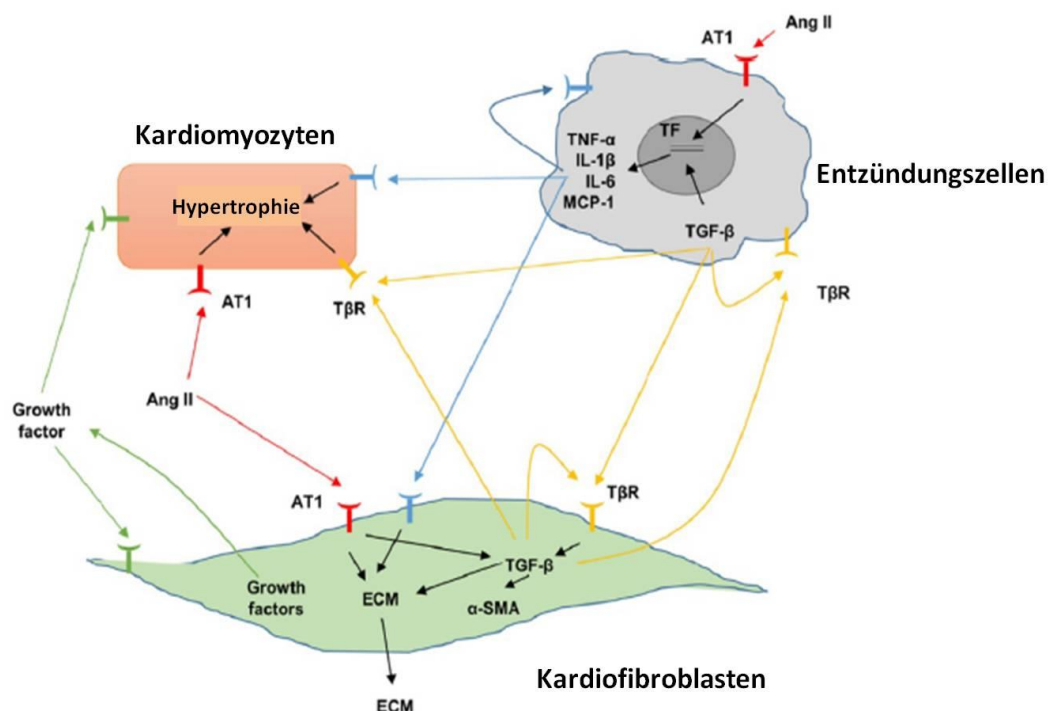


Abb. 2: Fibrotische Signalmechanismen zwischen verschiedenen Zellpopulationen im Herzen (Modifiziert nach [87]). Die Fibrose kann durch proinflammatorische Zytokine und profibrotische Moleküle, die zur Kommunikation zwischen Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten und Entzündungszellen dienen, vermittelt werden [87]. Ang II (Angiotensin II); AT1 (Angiotensin II Typ1 Rezeptor); ECM (extrazelluläre Matrix), IL (Interleukin); TGF- β (transformierender Wachstumsfaktor- β); T β R (TGF- β -Rezeptor);

2.5 Ziele der Arbeit:

Martin et al. zeigten anhand eines Tiermodells mit einem milden Nierenfunktionsverlust, dass sich nach einem 4-wöchigen Intervall eine myokardiale Fibrose entwickelte [92]. Diese Beobachtungen könnten durch das Urämietoxin Indoxylsulfat ausgelöst worden sein, da IS insbesondere auf kardiale Fibroblasten pro-fibrotische Wirkungen gezeigt hat [75]. Eine myokardiale Fibrose ist klinisch von großer Relevanz, da diese in Arrhythmien [7,18,87], oder einer Herzinsuffizienz gipfeln kann [87]. Vorhofflimmern selbst kann zu einer kardialen Fibrose führen [140] und stellt gleichzeitig die häufigste Arrhythmie bei CNI dar [144].

Insgesamt fehlen Studien, die die direkte Auswirkung von dialysepflichtiger CNI auf die myokardiale Fibrose beschreiben. Diese wären nötig um signifikant wirksame Therapien für die myokardiale Fibrose zu entwickeln, die aktuell noch fehlen [87].

Somit soll in dieser Arbeit gezeigt werden:

1. Die Auswirkungen von Dialyseseren auf die Expression der Fibrosemarker TGF- β , CTGF und Kollagen in isolierten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten der Ratte.
2. Die Auswirkungen von Indoxylsulfat auf die Fibrosemarker TGF- β , CTGF und Kollagen in isolierten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten der Ratte.
3. Die Auswirkungen einer arrhythmischen elektrischen Stimulation in Kombination mit Dialyseseren (Komorbiditätenmodell) auf die Expression von TGF- β und auf Kollagen in isolierten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten der Ratte, sowie auf ANP, BNP und auf RyR2 in Kardiomyozyten als Hypertrophiemarker.

3.Materialien:

3.1 Antikörper

3.1.1 Primärantikörper

Tab.2: Liste der genutzten Primärantikörper:

Col1A1	Santa Cruz Biotechnology
Col3A1	Santa Cruz Biotechnology
CTGF (L-20)	Santa Cruz Biotechnology
TGF- β 1	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH (6C5)	Santa Cruz Biotechnology

3.1.2 Sekundärantikörper

Tab. 3: Liste der genutzten Sekundärantikörper:

Goat Anti-Rabbit IgG-Peroxidase				Sigma-Aldrich Chemie
Goat	Anti-Mouse	IgG	Konjugat	(H+L) -HRP Bio-Rad Laboratories
Rabbit Anti-Goat IgG-Peroxidase				Sigma-Aldrich Chemie

3.2 Sonden für RT-PCR

Tab. 4: Liste der TaqMan Sonden für RT-PCR:

ANP (Rn00664637_g1)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
BNP (Rn00580641_m1)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Col1A1 (Rn01463848_m1)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Col3A1(Rn01437681_m1)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA

CTGF (Rn01537279_g1)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
HPRT (Rn01527840_m1)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
RyR2 (Rn01470303_m1)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
TGF- β 1 (Rn00572010_m1)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA

3.3 Enzyme, Kits

Tab.5: Liste der genutzten Enzyme und Kits:

Substanz	Hersteller
Collagenase Typ 2	Worthington Biochemical, Cell Systems
DC Protein Assay Reagent A	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
DC Protein Assay Reagent B	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Developer G 153 A	Agfa, Mortsel, Belgien
Developer G 153 B	Agfa, Mortsel, Belgien
ECL Western Blotting Detection GE, Reagents	Healthcare, München
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit
Pankreatin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Rapid Fixer G 354	Agfa, Mortsel, Belgien
TaqMan TM FastUniversal PCR Master Mix (fast Master Mix)	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA

3.4 Lösungen, Medien, Puffer

Tab.6: Liste der genutzten Lösungen, Medien und Puffer:

Lösung, Medium, Puffer	Zusammensetzung
ADS-Puffer	6,78 g/l NaCL 4,76 g/l HEPES 8 ml/l Na ₂ HPO ₄ (0,1 M in A. dest.) 1 g/l Glukose 0,4 g/l KCL 8 ml/l MgSO ₄ x 7 H ₂ O (0,1 M in A. dest.) Aqua dest.
Binding Buffer für FACS-Analyse	119,15 mg Hepes 409,08 mg NaCl 18,3775 mg CaCl ₂ 50 ml Aqua dest. pH 7,4
Elektrophoresepuffer (10x)	144 mg/ml Glycin 30,3 mg/ml Tris 10 mg/ml SDS Aqua dest.
Enzym-Mix für Kardiomyozyten-Isolation	80 ml ADS-Puffer 48 mg Pankreatin (= 0,6 mg/ml) 40 mg Collagenase (= 0,5 mg/ml)
Kardiomyozyten-Hungermedium	F 10 (HAM + Glutamin) + 1% Penicillin/Streptomycin
Kardiomyozyten-Nährmedium	F 10 (HAM + Glutamin) + 10 % Horse-Serum + 5 % Fetal calf serum (Kälberserum) + 1 % Penicillin/Streptomycin
Hungermedium kardialer Fibroblasten	DMEM + 1 % Penicillin/Streptomycin +Refobacin 40mg

Nährmedium kardialer Fibroblasten	DMEM + 10 % Fetal calf serum (Kälberserum) + 1 % Penicillin/Streptomycin +Refobacin 40mg
Ladepuffer für Western Blot	5 ml 50% Glycerol 1,25 g 10% SDS 2,5 ml 0,625 M Tris 125 µl/ml 1 M DTT Aqua dest. pH 7,6
Lysepuffer für Proteine	5 ml 1M Tris pH 6 20 ml 10% SDS 10 ml Glycerol 15 ml Aqua dest. Vor der Proteinernte Zugabe von: 1 µl Leupeptin (10mg/ml) pro ml Lysepuffer 1 µl PMSF (100mM) pro ml Lysepuffer 0,6 µl Aprotinin (10mg/ml) pro ml Lysepuffer
PBS (10x)	Aqua dest. NaCl 80 g/l KCl 2 g/l Na ₂ HPO ₄ 14,4 g/l KH ₂ PO ₄ 2,4 g/l pH 7,4
PBS-Tween (10x)	PBS (10x) 1% Tween 20 pH 7,4
Transferpuffer für Western Blot (5x)	29 mg/ml Tris 145 mg/ml Glycin 5 mg/ml SDS Aqua dest.
Transferpuffer für Western Blot (1x)	200 ml 5x-Transferpuffer 200 ml Methanol

	600 ml Aqua dest.
5% Trockenmilch-Lösung	50 ml 1x PBS-Tween 2,5 g Trockenmilchpulver

3.5 Sonstige Substanzen

Tab. 7: Liste der sonstigen Substanzen:

Substanz	Hersteller
Acrylamid Electrophoresis Reagent 30%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Ammoniumpersulfat	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
Annexin V-FITC Apoptosis detection kit	BD Biosciences
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie, München
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMEM Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Dithiothritol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ethanol	Merck, Darmstadt
FACS Clean	BD Biosciences
FACS Rinse	BD Biosciences
F 10 Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
FKS (Fetales Kälberserum)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

Glucose	Sigma-Aldrich Chemie, München
Glycerol	Sigma-Aldrich Chemie, München
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie, München
Horse Serum	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Indoxylsulfat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumphosphat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie, München
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie, München
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich Chemie, München
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
NCS (Neonatal Calf Serum)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Ponceau-Rot	SERVA, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethansulfonfluorid)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Propidiumiodid	BD Biosciences
Propanol-2	Merck, Darmstadt

Refobacin	Merck, Darmstadt
RNA Isolation Reagent (RNA pure)	Sigma-Aldrich Chemie, München
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	VWR International, Darmstadt
TEMED (Tetramethylethylen-diamid)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Tris-hydroxyethyl-aminoethan	VWR International, Darmstadt
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypsin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt

3.6 Verbrauchsmaterialien

Tab. 8: Liste der genutzten Verbrauchsmaterialien:

Material	Hersteller
Cell Scraper	Sarstedt, Inc., Newton, USA
Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5, 2ml)	Sarstedt, Inc., Newton, USA
EASYstrainerTM	Greiner bio-one, Frickenhausen
FACS-Röhrchen	BD Falcon
Falcon (50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Falcon Cell Strainer 70µm	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Glas-Pipettenspitzen (5, 10, 25 ml)	Greiner-bio. one, Frickenhausen

High Performance autoradiography film	GE Healthcare, München
Mini-Trans-Blot Filterpapier	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Objektträger	VWR International, Darmstadt
Optical Adhesive Film	Applied Biosystems- Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Reaction Plate(0,1ml), 96 well (PCR-Platte)	Applied Biosystems- Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Zellkulturschale (6 bzw. 10 x 2 cm)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale P6 Primaria	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA

3.7 Geräte

Tab. 9: Liste der genutzten Geräte:

Gerät	Hersteller
Autoklaviergerät Tuttnauer 3850 EL	Tuttnauer Europe B. V., Breda, Niederlande
Eismaschine Scotsman Frimont MF 22	Scotsman Frimont, Milano, Italien
Entwicklungsautomat Curix 60	Agfa, Mortsel, Belgien
FACS-Gerät, FACSCalibur	Becton Dickinson
Heracell 150 Cell Culture Incubator	Heraeus Holding, Hanau
Metallblockthermostat HTMR-133	HLC Biotech, Bovenden
Mikroskop Olympus CK 2	Olympus

Materialien

Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini-Protean Gelgießstand	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Mini Trans-Blot System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Pac 200 Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Real Time PCR System, Step One Plus	Applied Biosystems- Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Röntgenkassette (24 x 30 cm)	Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Scanner CanoScan D1250 V2F	Canon, Krefeld, Deutschland
Schüttel- und Mischgerät Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelwasserbad Typ 1086	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwendel
Sicherheitswerkbank Heraeus HS 12	Heraeus Holding, Hanau
Sicherheitswerkbank Heraeus KS 12	Heraeus Holding, Hanau
Spectrophotometer, NanoDrop 2000	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Thermal Cycler for PCR	Thermo Electron Corp. Massachusetts, USA
Überkopfschüttler REAX 2	Heidolph Instruments, Schwabach
Vortexer VV3	VWR International Darmstadt

Waagen:

ALC-Series, 0.0001 g Analytical	Acculab UK, Edgewood, NY Balances
---------------------------------	-----------------------------------

VIC-Series 0.01 g Precision Balances	Acculab UK, Edgewood, NY

Zentrifugen:

Biofuge pico	Heidolph Instruments, Schwabach
Kühlzentrifuge 1 K 15	SIGMA Laborzentrifugen, Osterode am Harz
Megafuge 1,0	Heraeus Holding, Hanau
Ultrazentrifuge L7-55	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Zentrifuge NAPCO 2019R	

3.8 Auswertprogramme

Tab. 10: Liste der genutzten Auswertprogramme:

Anwendungsgebiet	Auswertprogramm
Betriebssystem	Microsoft Windows Vista
Western Blot Bandenanalyse	UVP Lab works Version 4.6 Image Studio Light

4. Methoden

4.1.1 Tierversuchsanzeige

Die Tierversuchsanzeige erfolgte am 24.07.2017 nach §4 Absatz 3 Tierschutzgesetz.

4.1.2 Isolation ventrikulärer Kardiomyozyten neonataler Ratten

Zur Isolation wurden 3-5 Tage alte Sprague Dawley Ratten (Charles River) benutzt. Zu Beginn wurden diese mittels einer Schere dekapitiert und der Körper mit 70-prozentigem Ethanol gespült. Daraufhin wurde der Thorax mit einer weiteren Schere eröffnet und damit das Herz freigelegt und von Gefäßen getrennt. In einer im Durchmesser 10cm großen Petrischale mit ADS-Puffer (siehe Tab.6) wurden die Herzen gesammelt und von Gefäßen, sowie von den Vorhöfen getrennt. Die übriggebliebenen Ventrikel wurden mittels eines Cutters in kleine Stücke geschnitten. Nachdem der ADS-Puffer ohne Gewebestücke entfernt wurde, wurde 10ml Enzym-Mix in der Schale hinzugegeben und das Ganze in einer sterilen Flasche gesammelt. Der Mix wurde dann bei 37 Grad Celsius für 10 Minuten im Schüttel- Wasserbad bei 90U/min inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Überstand verworfen und erneut 10ml Enzym-Mix hinzugegeben und wieder nach dem obigen Procedere im Wasserbad für 20 Minuten inkubiert. Nach erneuter Inkubation wurde der Überstand in einem 50ml Reaktionsgefäß mit 2 ml NCS (Serum von neugeborenen Kälbern) gesammelt, um den Verdau zu beenden. Das Reaktionsgefäß wurde daraufhin bei Raumtemperatur mit 700rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum übriggebliebenen Pellet wurden 4ml NCS hinzugegeben und das Pellet durch leichtes Schütteln gelöst. Bis zum Ende der Isolation wurde das 50ml Reaktionsgefäß in dem Brutschrank bei 37 Grad Celsius und 5% CO₂ mit leicht aufgesetztem Deckel, um den Gasaustausch zu ermöglichen, inkubiert. Während der Zentrifugation wurde die Inkubation des übrigen Ventrikel Gewebes mit 10 ml Enzym Mix im Schüttel-Wasserbad wiederholt. Das oben beschriebene Vorgehen wurde weitere 5mal mit jeweils absteigenden Inkubationszeiten (25min., 25min., 15min., 10min., 10min.) durchgeführt. Die daraus entstandenen Reaktionsgefäße mit gelöstem Pellet mit NCS wurden im Brutschrank bis zum Ende der Isolation inkubiert. Daraufhin wurden die Zellsuspensionen aller Falcons zusammen pipettiert und erneut wie oben für 5min bei 700rpm zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde erneut entfernt und dem verbleibenden Pellet wurde 2ml Kardiomyozyten Nährmedium hinzugegeben. Das Pellet wurde durch leichtes Schütteln im Nährmedium gelöst. Die so entstandene Zellsuspension wurde mittels Filter, der nur für Zellen bis 70µm durchlässig ist, filtriert und auf 3 Petrischalen ausgesät. Für 60 Minuten wurden die Petrischalen im Brutschrank bei 37 Grad Celsius und 5%CO₂ inkubiert. Während diesem Procedere adhärten die Fibroblasten am Boden der Schale. Nach 60 Minuten

Inkubation wurden die Überstände der Petrischalen, welche Kardiomyozyten enthalten, zusammen pipettiert und die Petrischalen mit den adhärenierten Fibroblasten wieder mit 2ml Kardiomyozyten-Medium gefüllt und im Brutschrank inkubiert. Zur Zellzählung wurden 10 µl Kardiomyozyten-Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Dabei stellen sich die intakten Kardiomyozyten im Mikroskop farblos da, während membrangeschädigte Zellen sich durch das Trypanblau dunkelblau darstellen. Nach der Zellzählung konnten nun die Kardiomyozyten in gewünschter Dichte in Six-Wellplates mit 2 ml Kardiomyozytenmedium ausgesät werden.

4.2 Proteinisolation für Western Blot

Zum Ernten der Zellen wurde 100 µl Lysepuffer (siehe **Tab.6**) pro Sixwell benötigt. Zur Stocklösung wurden vor dem Ernten 1 µl/ml Stock Lysepuffer PMSF(Phenylmethylsulfonylfluorid), 1µl/ml Stock Lysepuffer Leukopeptin und 0,6µl/ml Stock Lysepuffer Aprotinin hinzugefügt.

Zunächst wurde das Zellmedium abgesaugt und dann die Sixwells mittels 1xPBS gewaschen. Der Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nachdem pro Sixwell 100µl Lysepuffer hinzupipettiert wurde, wurden die Zellen mittels Cell-Scraper abgeschabt und dann in einem Eppendorf-Gefäß gesammelt. Die Lysate wurden für 5min bei 96 Grad Celsius in dem neuen Eppendorf-Gefäß gekocht und danach bei -20 Grad Celsius zur Aufbewahrung eingefroren oder direkt weiter genutzt.

4.3 Quantitative Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Proteinbestimmung wurden in ein 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß 2µl der zu bestimmende Probe gegeben und 198 µl Aqua dest. hinzugegeben (Verdünnung 1:10). Die Proteinbestimmung nach Lowry beruht auf zwei Reaktionen. Dabei wurde zunächst 100µl Dc Protein Assay Reagent A hinzugefügt. In dieser alkalischen Lösung kommt es zur Biuretreaktion zwischen den Peptidbindungen der Probe und das Kupfer (II)-Ionen der Lösung, wobei ein blau-violetter Komplex entsteht. Danach wurde 800 µl Dc Protein Assay Reagent B (Molybdatophosphorsäure Wolframatophosphorsäure) hinzugegeben. Dieses wird von dem oben beschriebenen biuretähnlichen Komplex wiederum reduziert und es entsteht eine intensive Blaufärbung. Die Intensität der Blaufärbung ist nun proportional zum Proteingehalt. Dies wurde zur quantitativen Proteinbestimmung genutzt und mittels Photometer bei 750nm detektiert. Dieses Prinzip wurde pro Probe als eine Dreifachbestimmung angewandt und am Ende der Mittelwert erhoben.

4.4 Western Blot Analyse

Beim Western Blot werden Proteine mittels Elektrophorese nach Größe aufgetrennt und danach auf eine Membran übertragen. Detektiert werden die Proteine schließlich mittels Antikörper. Zunächst wurde die Membran mit einem Primärantikörper inkubiert. Die entsprechenden Primärantikörper wurden dann mittels monoklonaler Peroxidase oder Fluoreszenz-gekoppelter Sekundärantikörper detektiert. Dabei ist die entstehende Bandenintensität proportional zur nachgewiesenen Proteinmenge der Probe.

4.4.1 Gelelektrophorese

Zu 20µg der verwendeten Probe wurde dieselbe Menge an 1xLadepuffer hinzugegebenen, dem zuvor DTT (Dithiothreitol 1:20) hinzugefügt wurde. DTT dient zur Denaturierung, indem die Tertiärstruktur durch Reduktion der Disulfidbrücken aufgebrochen wird. Um die Eigenladung der Proteine in der Gelelektrophorese abzuschirmen, ist im Ladepuffer SDS enthalten, sodass eine konstante negative Ladung entsteht. Anschließend erfolgte ebenfalls zur Denaturierung das Kochen bei 70°C für 7 Minuten.

Die Gelelektrophorese erfolgte nach dem Prinzip der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Es wurden 10%ige SDS-Tris-Glycin- Polyacrylamid-Gele (siehe **Tab. 11**) verwendet. Zunächst wurden die Substanzen für das Trenngel (siehe **Tab. 11**) unter dem Abzug zusammen pipettiert und schließlich mit Aqua dest. bedeckt, um eine gerade Gelgrenze zu erhalten. Nachdem Aushärten des Trenngels, wurde das nun deutlich abgrenzbare Aqua dest. entfernt. Das schon während der Aushärtung vorbereitete Sammelgel wurde, wie in Tab. 11 beschrieben mit TEMED vermischt und auf das Trenngel gegeben. Zusätzlich wurde ein Gelkamm eingesetzt, um die Bildung der Proben-Slots zu gewährleisten. Nach Aushärtung des Sammelgels wurden die Proben und ein Low-Range Marker, als Ladekontrolle, mittels Hamilton Spritze in die Slots gefüllt. Nach dem Einfüllen des Elektrophoresepuffers wurde die Elektrophorese mit einer konstanten Stromstärke von 30mA gestartet. Beendet wurde die Elektrophorese, nachdem die Proben bis zum Ende des Gels durchgelaufen waren.

Tab.11: Zusammensetzung der 10%igen SDS-Tris-GlycinPolyacrylamid-Gele

Substanz	Trenngel (10%)	Sammelgel

Aqua dest.	7,9 ml	3,4 ml
30% Acrylamid Mix	6,7 ml	0,83 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	5,0 ml	0,63 ml
10% SDS	0,2 ml	0,05 ml
10% Ammonium-Persulfat	0,2 ml	0,05 ml
TEMED	0,008 ml	0,005 ml

4.4.2 Proteintransfer

Zum Proteintransfer wurde das Mini Trans Blot System von Biorad genutzt. Der Transfer erfolgte mittels eines senkrecht zum Gel verlaufenden elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulosemembran (Biorad). Durch die negative Ladung des im Ladepuffer enthaltenen SDS wandern die Proteine zur Anode und bleiben an der Membran haften. Zuvor wurden Membran und Elektrophoresegel in Transferpuffer getränkt und die Luftblasen ausgestrichen. Zum Proteintransfer wurde eine Stromstärke von 200mA für 45min angelegt. Nach dem Transfer erfolgte als Ladekontrolle und zur Überprüfung der Methode die Ponceau-Rot Färbung. Dabei wurde Ponceau-Rot auf die Membran gegeben und die überschüssige Farbe mittels Aqua dest. entfernt. Danach wurde die Membran mit 5%iger Milch für 30min mittels Schüttelgerät geblockt, um die unspezifischen Banden zu blockieren.

4.4.3 Proteindetektion

Die Inkubation erfolgte zunächst mittels Primärantikörper in 5%iger Milch. Dieser Vorgang wurde für 12 Stunden bei 4°C durchgeführt. Dabei binden die spezifischen Antikörper an die entsprechenden Epitope. Um nach der Inkubation die nicht-oder unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen erfolgten mehrere Waschschrte (2x5min PBS-Tween, danach 2x10min PBS-Tween, dann 2x5min PBS). Danach wurde die Membran beim langsamen Schütteln mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 30min inkubiert. Während dieser Inkubation binden die Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper an die Fc-Fragmente der Primärantikörper. Um erneut die unspezifisch gebundenen und überschüssigen Sekundärantikörper zu entfernen erfolgten erneut die oben genannten Waschschrte. Danach wurde ECL (enhanced chemilumineszenz) für eine Minute bei abgedunkeltem Raum auf die Membranen gegeben, die Reste abgestrichen und durch eine Chemilumineszenzreaktion die Banden auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Je nachdem welches Protein zu detektieren war, variierten die Auflagezeiten der Röntgenfilme auf den Membranen. Zur Auswertung

wurden die entstandenen Banden eingescannt und densitometrisch mittels UVP-Lab Works Version 4.6 und Image Studio Light analysiert. Als Referenz wurde das House-Keeping Protein GAPDH genutzt.

4.5 Durchflusszytometrische Analyse

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen, die in hoher Geschwindigkeit an einem Lichtstrahl vorbeifließen, nach unterschiedlichen Eigenschaften, wie Größe, Struktur oder Färbung aufgetrennt.

Das Auftrennprinzip beruht auf unterschiedlichen Emissionen der Zellen, bei Passage eines im Gerät befindlichen Laserstrahls. Dabei passiert jede Zelle einzeln, durch einen Hüllstrom fokussiert, den Laser. Das dadurch entstehende Streulicht wird in einem Detektor ausgewertet. Die Streulicht Menge steht dabei in direktem Verhältnis zu Zellaufbau und Größe. Jeder Zelle wird dabei ein Punkt im Koordinatensystem zugeordnet. Die daraus resultierende Auswertung wird als Dot Blot bezeichnet.

In dieser Arbeit wird die durchflusszytometrische Analyse zur Bestimmung von Apoptose- und Nekroserate von Zellen aus einer Zellkultur genutzt.

4.5.1 Analyse von Apoptose und Nekrose

Zunächst wurden die Durchflusszytometrie geeigneten Röhrchen (BD Falcon) beschriftet, 1xPBS erwärmt und 1ml Trypsin pro Sixwell aufgetaut. Danach wurden die Sixwells aus dem Inkubationsschrank genommen, das Medium abgesaugt, und mit dem erwärmten 1xPBS gewaschen. Als nächstes wurde 1ml Trypsin/Well hinzupipettiert. Nachdem das Zell-Trypsingemisch für 3 Minuten im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, wurden die Zellen durch leichtes Klopfen abgelöst und der Ablösevorgang mit dem Mikroskop kontrolliert. Die proapoptotische Wirkung des Trypsins wurde durch Hinzugabe von 1ml NRVM-Medium/Well gestoppt und das Zell-Medium Gemisch in das vorbereitete Röhrchen pipettiert.

Als nächstes wurden die Röhrchen bei 700U/min für 5min zentrifugiert, um eine Sedimentation der Zellen am Boden zu gewährleisten. Der Überstand wurde ohne Zellpellet abgesaugt.

Danach wurden mittels Pipette 100µl Binding Buffer (siehe **Tab.6**) und 5µl Annexin V-FITC Apoptosis detection kit (BD Biosciences) pro Probe hinzugegeben, gevortext und für 15 Minuten inkubiert. Annexin V ist in dem Annexin V-FITC Apoptosis detection Kit an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, welcher die Detektion im Durchflusszytometer gewährleistet. Während der Inkubation bindet Annexin V an Phosphatidylserin. Der Binding Buffer liefert dabei das dazu nötige Kalzium. Phosphatidylserin befindet sich bei vitalen Zellen an der

Innenseite der Zellmembran, sodass Annexin V nicht binden kann. Bei apoptotischen Zellen wird Phosphatidylserin an die Außenseite der Membran transportiert. Bei nekrotischen Zellen wird die Zellmembran durchlässig, sodass Annexin V ebenfalls binden kann. Nur durch die Behandlung mittels Annexin V kann also nicht zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden.

Daher wurden nach den 15-minütigen Inkubationen 10µl Propidium-Iodid und 200µl Binding Buffer hinzugegeben und gevortext. Das fluoreszierende Propidium-Iodid dringt nur in nekrotische Zellen mit durchlässiger Zellmembran ein und interkaliert mit DNA und RNA. Dabei wird das Fluoreszenzsignal verstärkt, was bei der durchflusszytometrischen Analyse detektiert werden kann. Annexin V und Propidium-Iodid positive Zellen wurden zur Nekroserate gezählt. Annexin V positive und Propidium-Iodid negative Zellen zählten zur Apoptoserate. Die Angabe erfolgte hierbei in Prozent zur Gesamtzellrate. Bei einer analysierten Zellzahl von 25.000 wurde die Messung beendet. Die Messergebnisse wurden graphisch in verschiedenen Quadranten dargestellt. Dabei entsprach UR (=upper right) dem rechten oberen Quadranten, also den Annexin V und Propidium-Iodid positiven Zellen (nekrotisch). LR (=lower right) entsprach dem rechten unteren Quadranten und damit den Annexin V positiven und Propidiumiodid negativen Zellen (apoptotisch) (siehe **Abb. 3**).

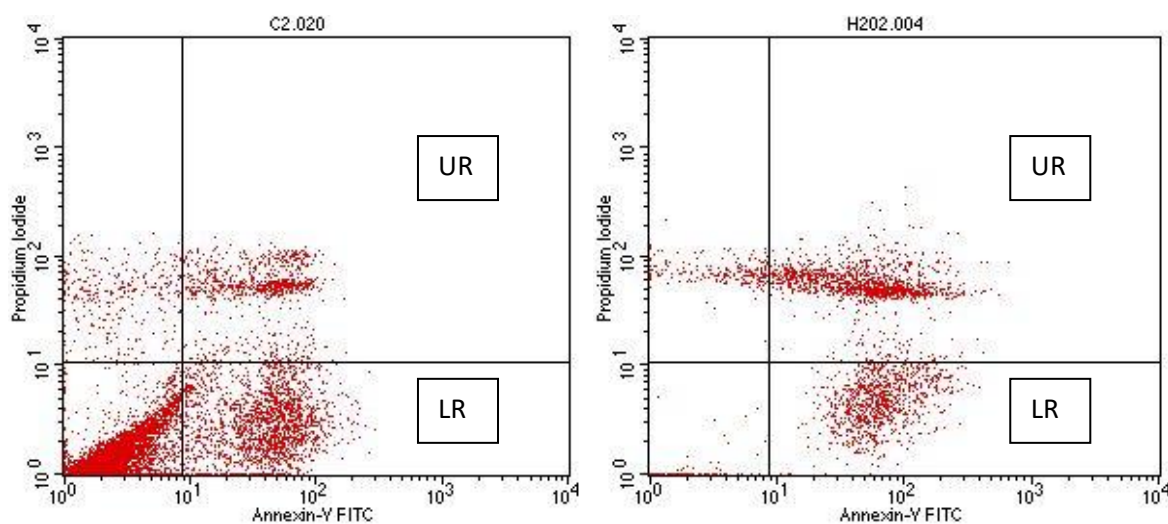


Abb. 3: Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse im Dot blot von Apoptose und Nekrose; links: native neonatale Kardiomyozyten; rechts: Positiv-Kontrolle nach 60-minütiger Inkubation mit 500µM H₂O₂; (gezeigt sind eigene Daten)

4.6 Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

4.6.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte aus isolierten Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten aus der Zellkultur. Dabei wurde zunächst das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden, um Zellreste und tote Zellen zu entfernen, mit 1xPBS gewaschen und dann pro Schale 1ml RNA pure (Sigma-Aldrich Chemie) hinzugefügt. Dieses Einreagensystem dient der Isolierung der Gesamt-RNA und der Denaturierung von RNasen. Die Zellen wurden mittels eines Cell scraper vom Schalenboden gelöst und in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Nachdem 300µl Chloroform, welches die Proteine denaturiert, hinzugefügt wurde, wurden die Proben gevortext und bei 4 Grad Celsius für 30min mit 14000U/min zentrifugiert. Dabei kam es zu einer Auftrennung in eine RNA-, DNA- und Proteinphase. Die wässrige obere RNA-Phase wurde in 500µl Propanol-2 pro Eppendorf-Reaktionsgefäß über Nacht bei -20 Grad Celsius gefällt. Zur weiteren Fällung wurde die Probe zentrifugiert, der Überstand verworfen und 800µl eisgekühltes 70%iges Ethanol hinzugegeben. Das weiße RNA-Pellet konnte nach erneuter Zentrifugation gut abgegrenzt werden. Der Überstand wurde verworfen und nach dem Trocknen der Pellets wurde die RNA in 20µl Bidestilliertes Wasser für eine Minute resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation im 65 Grad Celsius warmen Heizblock, konnte die RNA-Konzentration der Proben mittels NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) spektralphotometrisch gemessen werden. Die Reinheit der Nukleinsäure wurde dabei mittels eines Absorptionsverhältnis von 260/280nm gemessen. Einer reinen Lösung entspricht dabei ein Quotient von 1,8-2,0.

4.6.2 Reverse Transkription

Mittels reverser Transkription wird RNA in cDNA (complementary DNA), welche bei der Real Time PCR amplifiziert werden kann, umgeschrieben. Die reverse Transkription wird genutzt, um die mRNA-Expression der Zellen nachweisen zu können. Zunächst wurde die RNA-Konzentration der Probe gemessen und so viel Probe vorgelegt, dass 2µg RNA vorhanden war. Zur Reversen Transkription wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) verwendet. Gemäß Hersteller wurde der Mix wie folgt zusammen pipettiert:

Tab. 12: Zusammensetzung des Mix zur Reversen Transkription:

Puffer	2µl/Probe
DNTP-Mix	0,8µl/Probe

Random-Primer	2µl/Probe
Reverse Transkriptase	1µl/Probe
Rnase-Inhibitor	1µl/Probe
Aqua dest.	3,2 µl/ Probe

Die zur reversen Transkription nötigen Wärmeschritte wurden durch den Thermal Cycler (Thermo Electron Corp) automatisch generiert. Zunächst wurde dabei der Ansatz erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA zu denaturieren und daraufhin wieder abgekühlt. Dabei lagerten sich die zufälligen Primer, die als Ausgangspunkt der neuen cDNA dienten, an die komplementären RNA-Abschnitte an. Diese wurden unter Erwärmung mittels des Enzyms reverse Transkriptase verlängert. Die Polymerase synthetisierte dabei RNA oder DNA abhängig den neuen cDNA-Strang. Als Substrat dienten die ebenfalls im Ansatz enthaltenen Nukleotide.

4.6.3 Real Time PCR

Bei der Real Time PCR wurde die cDNA als Template genutzt. Zunächst wurde die cDNA 1:10 mit Aqua dest. verdünnt. Danach wurde der Mix pro Probe wie folgt vorbereitet:

10µl fast Master Mix (Fisher Scientific)

1µl Sonde entsprechend des zu amplifizierenden Templates

8µl Aqua dest.

In die PCR-Platten (Applied Biosystems- Fisher Scientific) wurde zuerst 1µl Probe und dann 19µl Mix pipettiert. Pro Probe erfolgte hierbei eine Doppelbestimmung. Nach Zentrifugation der Platte wurde diese in das Real Time PCR System (StepOne Plus, Applied Biosystems) gestellt. Zur Amplifikation wurden verschiedene Temperaturstufen vom Gerät automatisch vorgegeben. Dabei wurde zunächst die Temperatur zur Denaturierung hoch gewählt. Im ersten Schritt erfolgte eine Erhitzung auf 50°C für 2 Minuten, danach wurde die Temperatur für 10 Minuten auf 95°C gesteigert. Zum Anlagern der Sonden wurde die Temperatur auf 60°C für 1 Minute gesenkt. Zur Elongation wurde die Temperatur, dem Temperaturoptimum der Polymerase entsprechend, höher gewählt. Die DNA-Polymerase, die die cDNA amplifiziert, war genauso wie die Nukleotide, die als Substrat dienten, im fast Master Mix vorhanden. Da Hprt1 konsekutiv exprimiert wird, wurde dieses als Referenz genutzt.

4.7 Zellkultur

4.7.1 Fibroblasten passagieren

Nach der Isolation der kardialen Fibroblasten wurden die Schalen täglich mikroskopisch auf die Zelldichte kontrolliert. Bei dicht gewachsenen Zellen wurden diese auf weitere Schalen aufgeteilt. Dazu wurde zunächst Trypsin aufgetaut, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden pro Schale 3 Minuten mit 1,5ml Trypsin zum Ablösen der Fibroblasten vom Schalenboden im Brutschrank bei 37 Grad Celsius inkubiert. Zur Unterstützung des Ablösevorgangs wurde kräftig an den Rand der Schalen geklopft und 2 ml Medium pro Schale hinzugegeben, um die Reaktion des Trypsins abzustoppen. Der Zell-Mediummix wurde mittels Stabpipette in einen Falcon pipettiert und für 5min bei 1000U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, ohne das Pellet zu entfernen und die Fibroblasten in NCF-Medium unter leichtem Schütteln resuspendiert. 2ml NCF-Medium wurde in den neuen Schalen vorgelegt und das gelöste Pellet in jeweils 1ml Medium auf die neuen Schalen verteilt. Aus einer dicht bewachsenen Schale wurden drei Schalen passagiert. Nach der 2. Passage erfolgte in der Regel die Zellbehandlung.

4.8 Zellbehandlungen

4.8.1 Patientencharakteristika

Die Seren der Patienten unter Hämodialyse wurden an dem Dialysetag vor der Dialyse abgenommen. Nach Zentrifugation wurde das Serum abpipettiert und die Proben bei -80 Grad Celsius weggefroren. Vor Behandlung wurden die Seren aufgetaut und je nach Aliquotgröße gegebenenfalls erneut weggefroren. Die Patienten, die als gesunde Kontrollgruppe dienten wurden Alters- und geschlechtsabhängig ausgesucht. Alle der unten aufgeführten gesunden Patienten hatten keine bekannte Nierenerkrankung.

Tab.13: Aufreihung der genutzten Proben (Kontrollprobanden und Dialysepatienten):

Gesunde Kontrollprobanden		Dialysepatienten	
Geschlecht	Geburtsdatum	Geschlecht	Geburtsdatum
M	21.01.1952	M	15.03.1955
M	16.03.1964	M	09.04.1950
W	28.08.1938	W	20.04.1935
M	21.01.1937	M	10.02.1940
M	26.07.1978	M	03.06.1982

M	03.06.1956		M	11.12.1955
M	20.05.1949		M	24.03.1947
W	28.07.1928		W	13.02.1930

4.8.2 Behandlung der isolierten neonatalen kardialen Fibroblasten mit Dialyseseren und gesunden Seren

Nachdem die Zellen zum zweiten Mal passagiert wurden, wurde mikroskopisch die Dichte der Platten kontrolliert. Sobald die Platten dicht bewachsen waren, wurde das Medium gewechselt und die Fibroblasten mit sterilem PBS gewaschen. Nun wurden diese mit 3ml Fibroblastenhungermedium (siehe Tab.6, serumfreies Medium) behandelt. Als Kontrolle wurde kein weiteres Serum hinzugegeben. Zu den übrigen Schalen wurde entweder 5% Dialyseserum oder 5% gesundes Serum beigefügt. Die Seren wurden zuvor hitzeinaktiviert, indem diese bei 56 Grad für 30 Minuten im Wasserbad erhitzt wurden. Die Inkubation erfolgte für 24h im Brutschrank und danach erfolgte die Zellenernte.

4.8.3 Behandlung der isolierten neonatalen Kardiomyozyten mit Dialyseseren und gesunden Seren

Nachdem die Kardiomyozyten isoliert wurden, wurde mikroskopisch die Dichte sowie die Kontraktilität kontrolliert. Nach 48h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt und 2ml neues Kardiomyozytenmedium (siehe Tab.6) pro Sixwell auf die Platte gegeben. Nach 2-3 Tagen konnten die Kardiomyozyten behandelt werden. Dazu wurde das Medium unter der Sterilbank abgesaugt, die Zellen mit sterilem 1xPBS gewaschen und 2ml Kardiomyozytenhungermedium (siehe Tab.6, serumfreies Medium) hinzugefügt. Kein zusätzliches Serum wurde bei den Kontrollpopulation beigefügt. Die übrigen Schalen wurden entweder mit 5% Dialyseserum oder mit 5% gesundem Serum behandelt. Die Seren wurden zuvor im Wasserbad hitzeinaktiviert. Die Inkubation erfolgte für 24h im Brutschrank bei 37 Grad.

4.8.4 Behandlung der kardialen Fibroblasten mit Indoxylsulfat

Nach dem zweiten Passagieren und nachdem die Schalen ausreichend dicht bewachsen waren, wurden die kardialen Fibroblasten unter der Sterilbank behandelt. Dazu wurde das Fibroblastenmedium abgesaugt und die Schalen mit 1xPBS gewaschen. Die kardialen Fibroblasten wurden mit 3ml Fibroblastenmedium, in welchem 10% gesundes menschliches Serum enthalten war, behandelt. Das gesunde Serum wurde immer von der gleichen Person, einem männlichen 1990 geborenen Probanden, ohne bekannte Erkrankungen, in regelmäßigen Abständen abgenommen. Nach der Zentrifugation wurde das Serum

abpipettiert und in Aliquots gesammelt. Das Serum wurde im Wasserbad bei 56 Grad Celsius für 30 Minuten hitzeinaktiviert und dann bei -80 Grad Celsius weggefroren und vor dem Verwenden aufgetaut. Je nach Schale wurde zu dem Hungermedium-Serum-Gemisch Indoxylsulfat unterschiedlicher Konzentration (0,5 µmol/L, 1 µmol/L, 10 µmol/L und 100 µmol/L) hinzugegeben. Das Indoxylsulfat wurde nach Herstellerinformation in Aqua dest. gelöst, aliquotiert und bei -60 Grad Celsius weggefroren. Zur Behandlung wurde die nötige Menge an Aliquots aufgetaut und danach die restliche Menge verworfen.

Nach der Behandlung wurden die kardialen Fibroblasten für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 Grad Celsius und 5%CO₂ inkubiert und dann geerntet.

4.8.5 Behandlung der Kardiomyozyten mit Indoxylsulfat

Nachdem die Schalen der Kardiomyozyten dicht bewachsen waren und gut spontan kontrahierten, wurde das Medium unter der Sterilbank abgesaugt und die Zellen mit sterilem 1xPBS gewaschen. Die Kardiomyozyten wurden jeweils mit 2ml Hungermedium, das 10% gesundes Serum enthielt behandelt. Auch hier wurde danach Indoxylsulfat in der Konzentration 0,5 µmol/L, 1 µmol/L, 10 µmol/L und 100 µmol/L hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 24h im Brutschrank.

4.8.6 Stimulation der Kardiomyozyten und Behandlung mit Dialyseseren

Zunächst wurden die Schalen auf ausreichende Dichtigkeit und gute spontane Kontraktion der Kardiomyozyten überprüft. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, wurden die Zellen mit sterilem 1xPBS gewaschen. Nachdem 2ml Hungermedium hinzugegeben wurde, wurden die Kardiomyozyten mit den Seren wie unter dem Punkt Patientencharakteristika beschrieben, behandelt. Hier wurde eine Serumkonzentration von 10% gewählt. Daraufhin erfolgte das sogenannte „Pacing“, hierzu wurden die Elektroden der Power Pac 200 Power Supply (Bio-Rad Laboratories) 30 Minuten zuvor in Ethanol eingelegt. Die Stimulation erfolgte rhythmisch und arrhythmisch mit 3Hz (siehe **Abb.4**). Die Stimulation wurde mikroskopisch kontrolliert. Die stimulierten Kardiomyozyten wurden für 24h im Brutschrank inkubiert und danach geerntet.

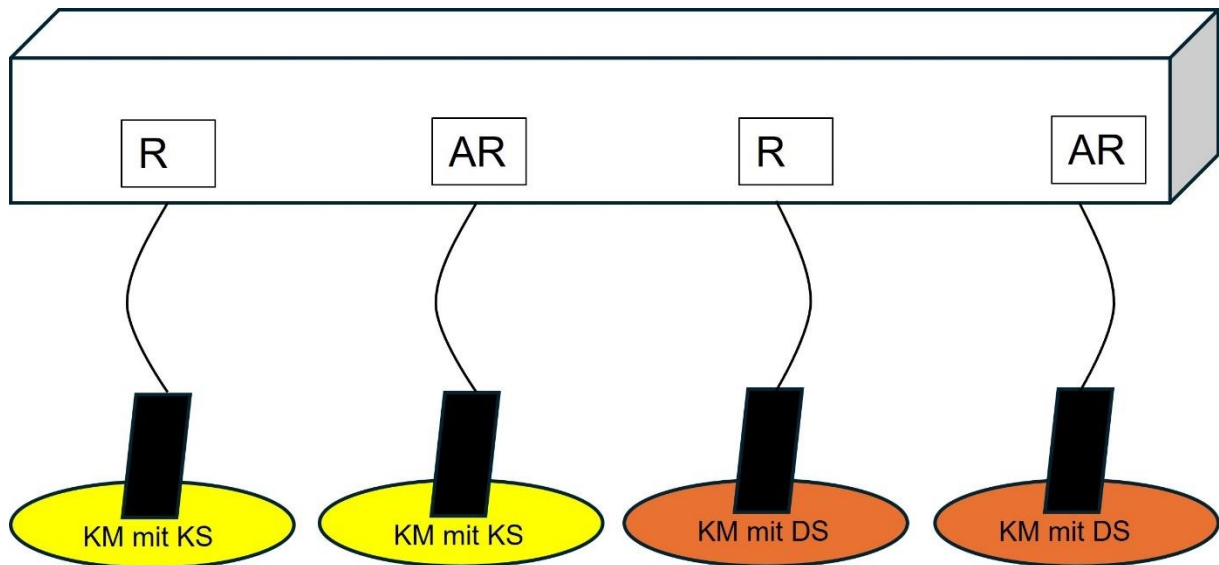


Abb. 4: Schematische Darstellung der Behandlung der Kardiomyozyten; neonatale Kardiomyozyten wurden für 24h mit 10% Kontroll-oder Dialyseserum behandelt und rhythmisch bzw. arrhythmisch mit 3Hz stimuliert. KM=Kardiomyozyten; KS=Kontrollserum; DS=Dialyseserum; R=rhythmisch; AR=arrhythmisch;

4.8.7 Behandlung der kardialen Fibroblasten mit Medium der stimulierten und mit Dialyseserum behandelten Kardiomyozyten

Nachdem die Kardiomyozyten wie in 4.8.6 beschrieben behandelt wurden, wurden die Kardiomyozyten geerntet und das Medium der Kardiomyozytenkultur genutzt, um kardiale Fibroblasten zu behandeln.

Bei ausreichender Dichtigkeit der Zellen wurde das Medium der kardialen Fibroblasten abgesaugt und mit 1xPBS gewaschen. Danach wurde eine Schale der kardialen Fibroblasten jeweils mit dem Medium einer Kardiomyozytenkultur behandelt. Hierbei wurden wie oben beschrieben die vier Bedingungen mit Dialyseserum behandelt, rhythmisch stimuliert, mit Dialyseserum behandelt, arrhythmisch stimuliert und mit gesundem Serum rhythmisch und arrhythmisch stimuliert voneinander unterschieden (siehe **Abb.5**).

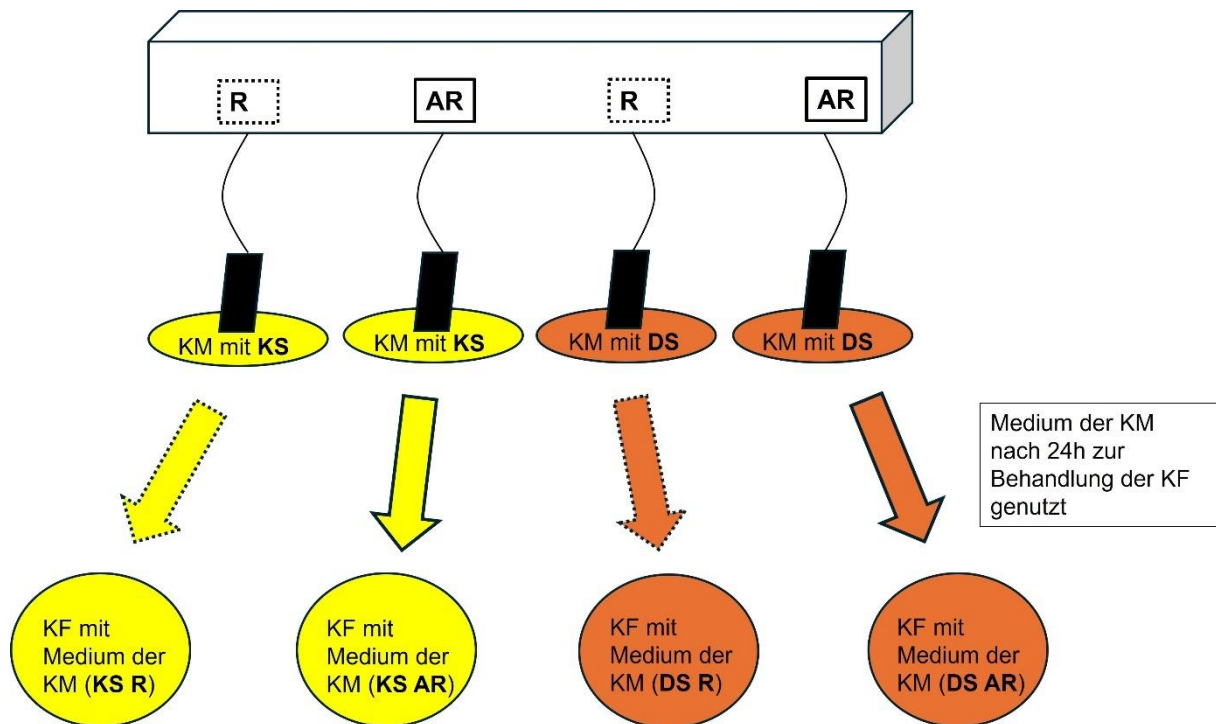


Abb. 5: Schematische Darstellung der Behandlung der kardialen Fibroblasten; Neonatale kardiale Fibroblasten wurden für 24 Stunden mit dem Medium der neonatalen Kardiomyozyten behandelt, die zuvor für 24 Stunden mit Kontroll-oder Dialyseserum behandelt wurden und rhythmisch-oder arrhythmisch stimuliert wurden. KM=Kardiomyozyten; KS=Kontrollserum; DS=Dialyseserum; R=rhythmisch; AR=arrhythmisch; KF= kardiale Fibroblasten;

4.9 Statistik:

Zur statistischen Auswertung und Diagrammerstellung wurden die Programme Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA) und Graph Pad Prism 4.0 (La Jolla, USA) verwendet. Bei den Auswertungen wurde das Signifikanzniveau $p < 0.001$ gewählt. Die Daten sind nach dem Schema Mittelwert $\pm$ SEM (standard error of the mean, Standardfehler) dargestellt. Berechnet wird der SEM aus der Standardabweichung (SD), die durch die Wurzel der Grundgesamtheit (n) geteilt wird ($SEM = SD / \sqrt{n}$). Als statistische Test zum Vergleich von zwei Gruppen wurden in dieser Arbeit der „Student’s t-test“ und der „Mann–Whitney-U-test“ genutzt. Als Test zum statistischen Vergleich mehrerer Gruppen wurde mit der „one-way ANOVA“-Analyse und dem „Tukey’s multiple comparison“ als Post-hoc-Test gearbeitet.

Tab. 14: Liste der genutzten statistischen Auswertung und statistischen Tests:

Anwendungsgebiet	Auswertprogramm

Statistische Auswertung und Diagrammerstellung	Microsoft Excel 2010 Graph Pad Prism 4.0
Statistische Tests	Student's t-test Mann–Whitney-U-test One-way ANOVA for multiple comparisons Post hoc comparisons: Bonferroni's Multiple Comparison Test

5. Ergebnisse

5.1 Behandlung von Kardiomyozyten mit Dialyseseren

5.1.1 Die Behandlung der Kardiomyozyten führt konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der Expression des Fibrosemarkers TGF- β .

Als Pilotexperiment, zur Konzentrationsfindung für kommende Experimente, wurden die Kardiomyozyten mit Dialyseseren aufsteigender Konzentrationen für 24h behandelt. Die Kontrolle erfolgte durch die Behandlung mit serumfreier Kontrolle (Hungerkontrolle). Die Analyse des Fibrosemarkers TGF- β erfolgte mittels Western Blot.

Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der TGF- β Expression, diese war für die Behandlung mit Dialyseserum 10% am stärksten ausgeprägt, es kam zu einer Zunahme um $2814 \pm 306\%$ ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrolle. Eine Zunahme um $2490 \pm 306\%$ ($p < 0,001$) konnte für die Behandlung mit 5% Dialyseserum verzeichnet werden. Keine Zunahme der TGF- β Expression konnte mehr beim Vergleich von 5% Dialyseserum und 10% Dialyseserum ausgemacht werden, sodass um Sättigungseffekte zu vermeiden die Konzentration für folgende Experimente auf 5% festgesetzt wurde.

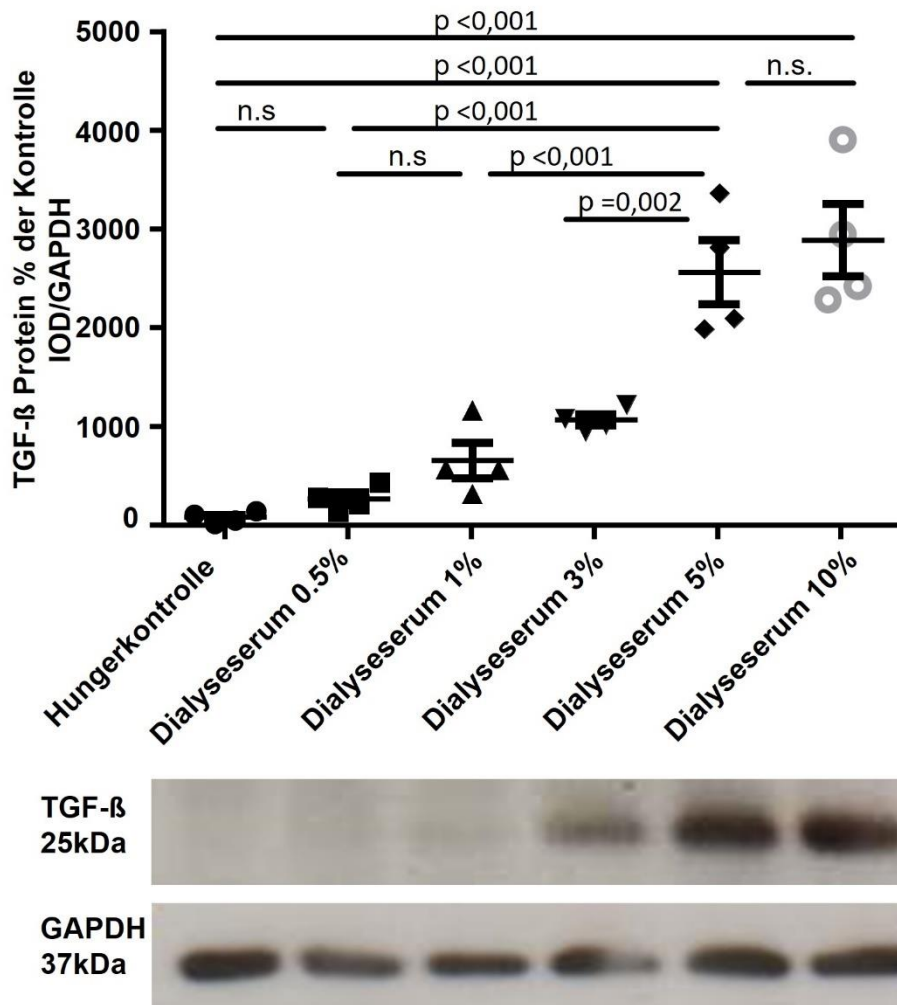


Abb. 6: Konzentrationsabhängiger Effekt des Dialysateserums auf die Expression der Fibrosemarker TGF-β in Kardiomyozyten. Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der Expression von TGF-β (Transforming Growth Factor beta) in Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit serumfreier Kontrolle (Hungerkontrolle) und 0.5%, 1%, 3%, 5% und 10% Dialysateserum. n = 4; n.s. =nicht signifikant;

5.1.2 Die Behandlung der Kardiomyozyten mit Dialysateseren und gesundem Serum führt nicht zu einer Zunahme der Apoptose und der Nekroserate.

Zu Beginn des Projekts stellte sich die Frage, wie sich die Behandlung der Kardiomyozyten mit Dialysateseren im Vergleich zur Behandlung mit gesunden Seren auf die Apoptose und Nekroserate auswirkt.

Um dieser Frage nachzugehen, wurden neonatale Kardiomyozyten für 24 Stunden mit 5% gesundem Serum (Kontrollserum) bzw. mit 5% Dialysateserum behandelt und im Anschluss eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Als positiv Kontrolle dienten hier Kardiomyozyten, die mit 1mmol/L H₂O₂ behandelt wurden. Kardiomyozyten, die in

serumfreien Hungermedium kultiviert wurden dienten als zusätzliche Kontrolle. Die Auswertung der Daten zeigte, dass die Behandlung mit Dialyseserum im Vergleich zum Kontrollserum zu keiner veränderten Apoptose- oder Nekroserate führte (siehe **Abbildung 7**). Die H₂O₂-positiv Kontrolle hingegen zeigte eine deutliche Erhöhung der Apoptose- und Nekroserate, was die Funktionalität des Assays bewies. Der Vergleich mit der serum-freien Hungerkontrolle zeigte eine Abnahme der Apoptoserate im 5% Kontrollserum um 63,5±41,2 % ($p<0,001$) und eine ebenfalls signifikante Abnahme bei Behandlung von 5% Dialyseserum um 71,2±41,2 % ($p<0,001$).

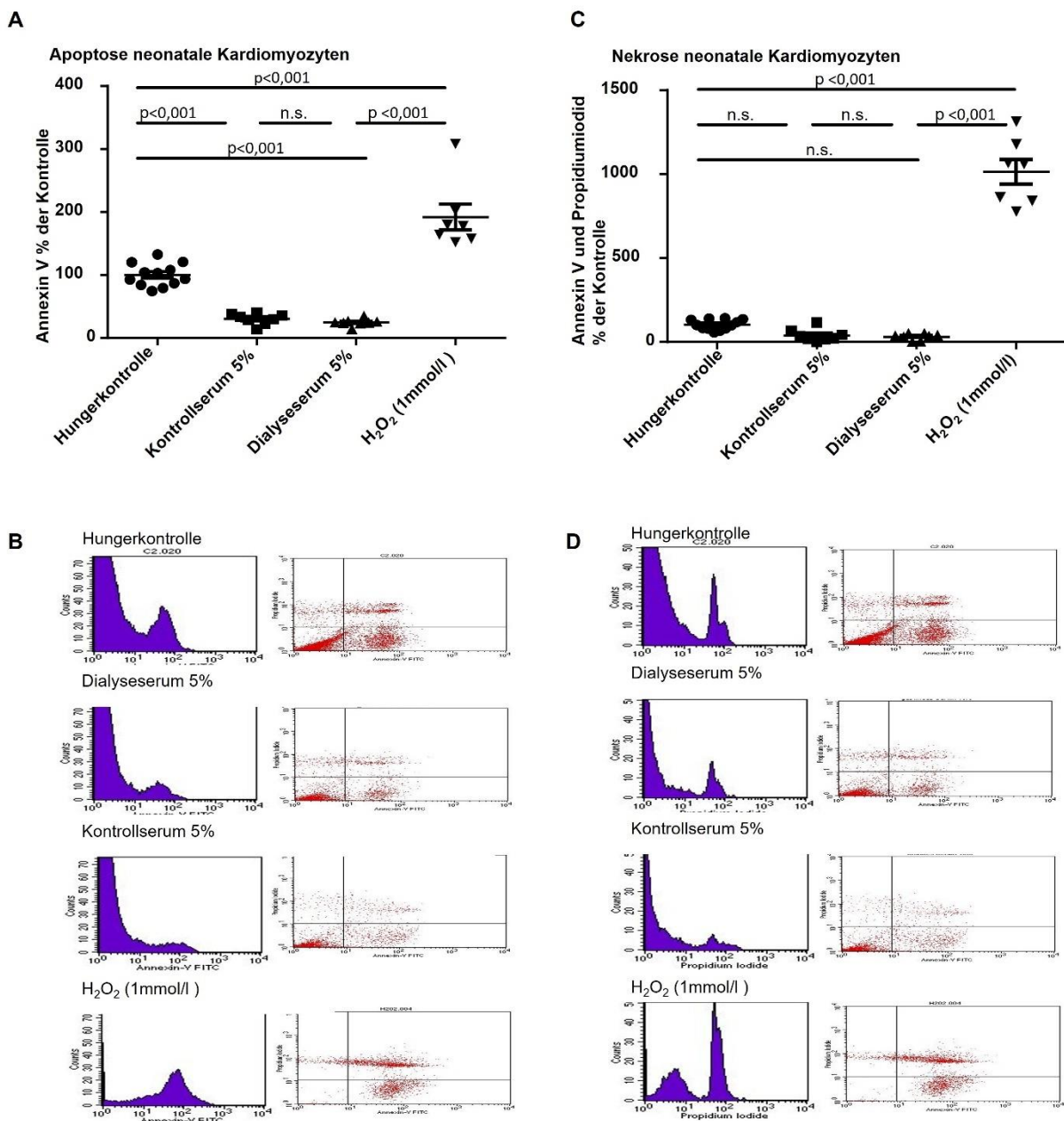


Abb. 7: Kein Effekt von Dialyseserum auf kardiomyozytäre Apoptose und Nekrose. Durchflusszytometrische Analyse der **(A)** Apoptose in Kardiomyozyten mittels Annexin V nach 24-stündiger Inkubation mit serumfreier Hungerkontrolle, 5% gesundem Serum

(Kontrollserum) oder 5% Dialyserverum. **(B)** Dot-Plot-Darstellung der durchflusszytometrischen Apoptoseanalyse in Kardiomyozyten nach 24-stündiger Serumbehandlung. **(C)** Nekrose in Kardiomyozyten mittels Annexin V und Propidiumiodidmarkierung nach 24-stündiger Inkubation mit serumfreier Hungerkontrolle, 5% gesundem Serum (Kontrollserum) und Dialyserverum. **(D)** Dot-Plot-Darstellung der durchflusszytometrischen Nekroseanalyse in Kardiomyozyten nach 24-stündiger Serumbehandlung. n=7-12; H₂O₂= Wasserstoffperoxid ohne Serum; n.s.= nicht signifikant;

5.1.3 Die Behandlung der Kardiomyozyten mit Dialyserverum führt zu einer Zunahme der Expression der Fibrosemarker TGF- β und CTGF.

Wie in Abb. 6 gezeigt kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der TGF- β Expression bei Behandlung mit Dialyserverum.

Um die Auswirkung der Behandlung mit Dialyserverum auf die Expression der Fibrosemarker TGF- β und CTGF in Kardiomyozyten zu untersuchen, wurden die Kardiomyozyten für 24h mit Serum-freien Medium (Hungerkontrolle), mit 5% gesundem Serum (Kontrollserum) oder mit 5% Dialyserverum behandelt. Die Analyse der Fibrosemarker erfolgte mittels Western Blot. Es zeigte sich für TGF- β eine signifikante Zunahme der Expression bei Behandlung mit Dialyserverum um $878,6 \pm 321,1\%$ ($p=0,03$) im Vergleich zum Kontrollserum. Für CTGF zeigte sich eine Zunahme der Expression bei Behandlung mit Dialyserverum um $526,6 \pm 194\%$ ($p=0,05$) im Vergleich zum gesunden Kontrollserum. Es konnte außerdem ein alleiniger Serumeffekt auf die CTGF-Expression festgestellt werden, bei Behandlung mit Kontrollserum (gesundem Serum) zeigte sich eine Erhöhung der Expression um $555 \pm 153,4\%$ ($p=0,008$) im Vergleich zur serumfreien Kontrolle.

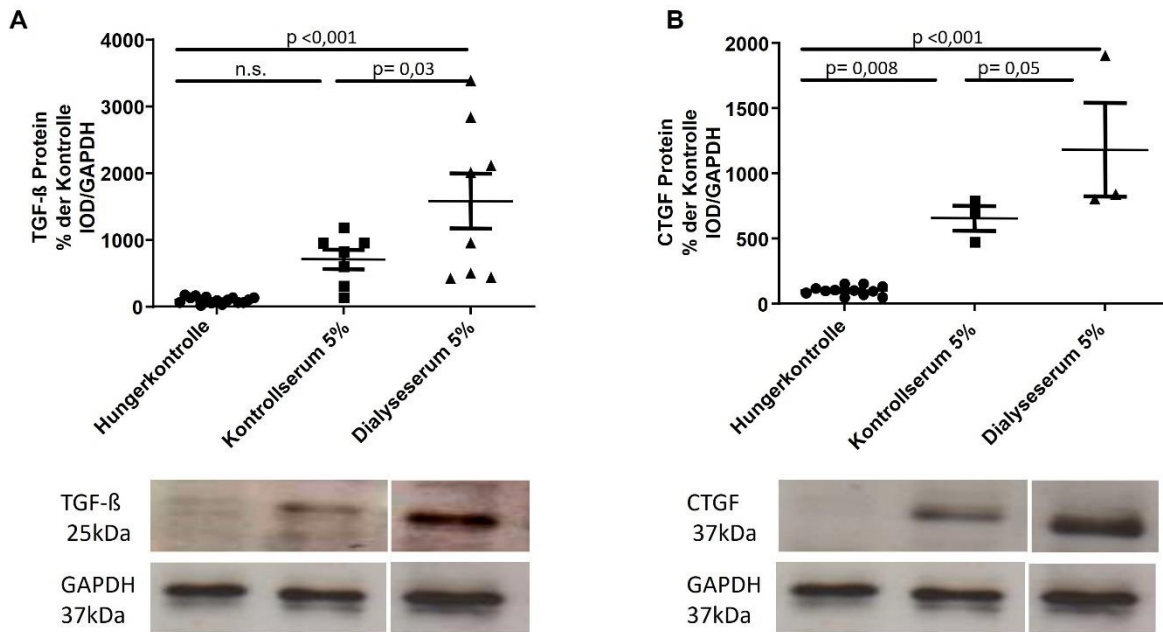


Abb. 8: Effekt des Dialyseserums auf die Expression der Fibrosemarker TGF-β und CTGF in Kardiomyozyten. Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der Expression von **(A)** TGF-β (Transforming Growth Factor beta) und **(B)** CTGF (Connective Tissue Growth Factor) in Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit serumfreier Kontrolle (Hungerkontrolle), 5% gesundem Serum (Kontrollserum) und Dialyseserum. n=3-12; n.s.=nicht signifikant;

5.2 Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Dialyseseren

5.2.1 Die Behandlung der kardialen Fibroblasten mit Dialyseserum führt zu einer Zunahme der Fibrosemarker TGF- β und CTGF.

Um die Auswirkung von Dialyseserum auf die Expression pro-fibrotischer Marker zu untersuchen, wurden kardialen Fibroblasten für 24h in der Zellkultur entweder mit serum-freiem Medium (Hungerkontrolle), mit 5% gesundem Serum (Kontrollserum) oder mit 5% Dialyseserum behandelt. Die Analyse der Fibrosemarker CTGF und TGF-β erfolgte mittels Western Blot. Die Behandlung der kardialen Fibroblasten mit Dialyseserum zeigte im Vergleich zum gesunden Kontrollserum eine deutliche Zunahme der TGF-β Proteinexpression um $164,4 \pm 64,5\%$ ($p=0,10$), die jedoch nicht signifikant war (siehe **Abbildung 9**). Für den Fibrosemarker CTGF zeigte sich eine signifikante Zunahme der Expression bei Behandlung mit 5% Dialyseserum um $39,8 \pm 11,3\%$ ($p=0,008$) im Vergleich zum Kontrollserum. Insgesamt konnte also eine zunehmende Proteinexpression der pro-fibrotischen Marker TGF-β und CTGF durch die Behandlung mit Dialyseserum nachgewiesen werden.

Der Vergleich mit der serum-freien Hungerkontrolle wies für den Fibrosemarker TGF- β eine um $258,3 \pm 64,5\%$ ($p=0,01$) gesteigerte Expression bei Behandlung mit Kontrollserum und eine Zunahme um $422,8 \pm 59,7\%$ ($p<0,001$) bei der Behandlung mit Dialyseserum auf, während CTGF unverändert blieb.

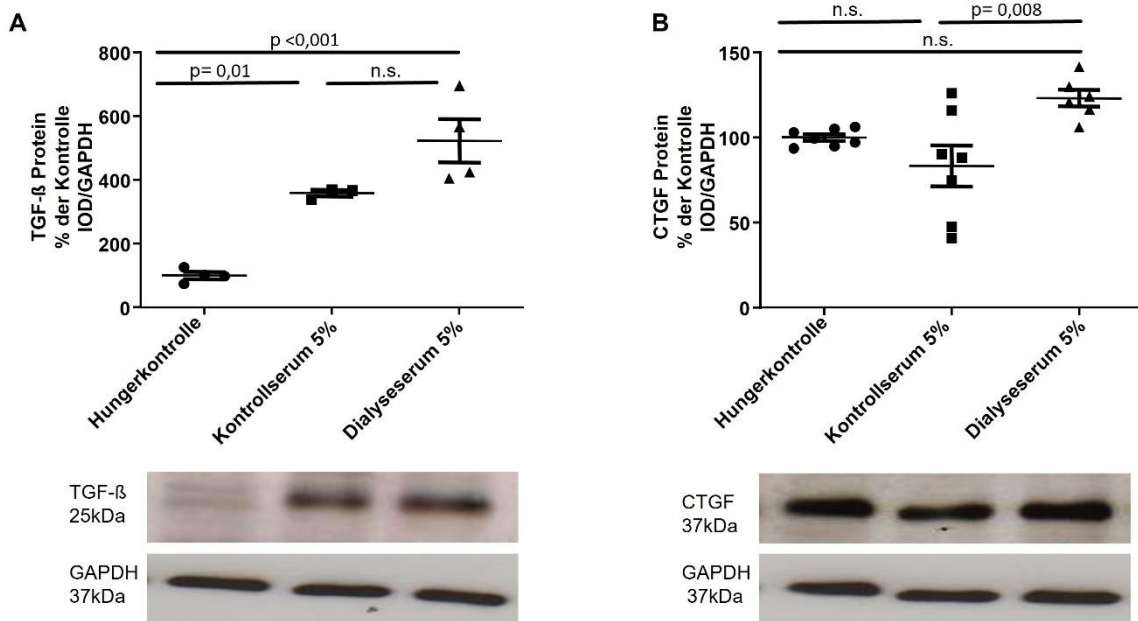


Abb. 9: Effekt des Dialyseserum auf die Expression der Fibrosemarker TGF- β und CTGF in neonatalen kardialen Fibroblasten. Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der Expression von **(A)** TGF- β (Transforming Growth Factor beta) und **(B)** CTGF (Connective Tissue Growth Factor) in kardialen Fibroblasten nach 24-stündiger Behandlung mit serumfreier Hungerkontrolle, 5% gesundem Kontrollserum und 5% Dialyseserum. $n=3-7$; n.s.=nicht signifikant;

5.2.2 Die Behandlung der kardialen Fibroblasten mit Dialyseserum führt zu einer Zunahme der Kollagenexpression.

Wie in Abbildung 9 gezeigt, führt die Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Dialyseserum zu einer Zunahme der Fibrosemarker TGF- β und CTGF. Um nun die Auswirkungen von Dialyseserum auf die Kollagenbildung zu untersuchen, wurden in den oben gewonnenen Protein-Lysaten die Expression von Col1A1 und Col3A1 mittels Western Blot analysiert und quantifiziert (siehe **Abbildung 10**). Bei Behandlung mit Dialyseserum kam es zu einer signifikanten Zunahme der Col1A1 Expression um $112,9 \pm 22,6\%$ ($p<0,001$) im Vergleich zum gesunden Kontrollserum. Für die Col3A1 Expression zeigte sich eine Zunahme um $105,2 \pm 22\%$ ($p<0,001$) bei Behandlung mit Dialyseserum im Vergleich zur Behandlung mit Kontrollserum. Beim Vergleich von serumfreier Hungerkontrolle und gesundem Serum konnte eine Abnahme der Col1A1 Expression um $76,2 \pm 22,6\%$ ($p=0,01$) nachgewiesen werden. Für Col3A1 konnte

eine Abnahme um $78,1 \pm 22\%$ ($p=0,007$) detektiert werden. Zwischen Dialyseserum und serumfreiem Hungermedium zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Col1A1 und Col3A1 Expression.

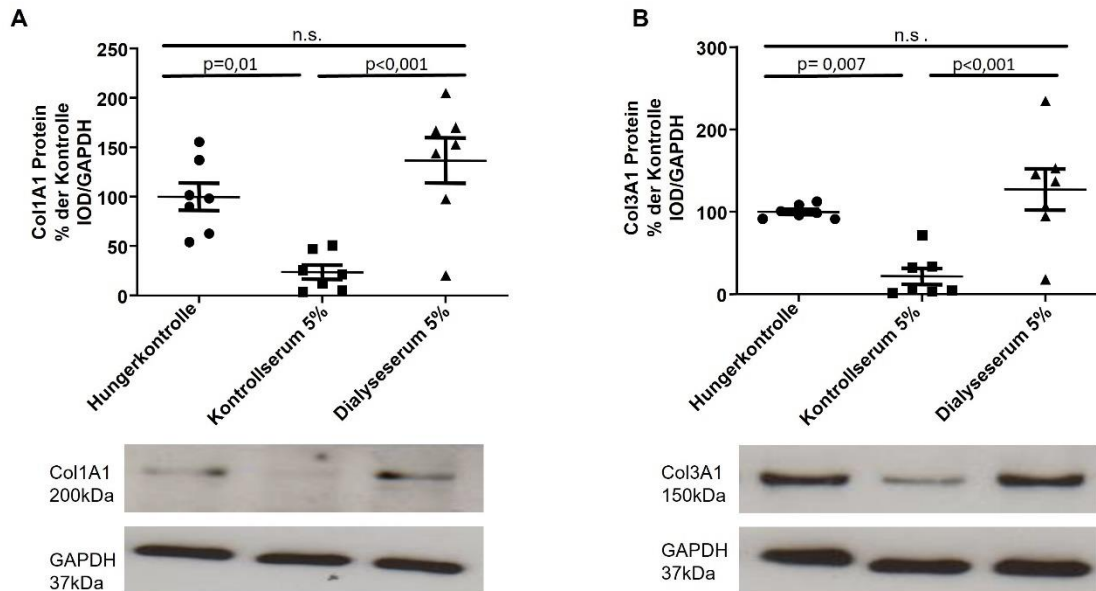


Abb. 10: Zunahme der Kollagensynthese durch Dialyseserum in kardialen Fibroblasten. Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der Expression von **(A)** Kollagen 1A1 (Col1A1) und **(B)** Kollagen 3A1 (Col3A1) in kardialen Fibroblasten nach 24- stündiger Behandlung mit serumfreier Kontrolle (Hungerkontrolle), 5% gesundem Serum (Kontrollserum) und Dialyseserum. $n = 7$; n.s.=nicht signifikant;

5.3 Dialyseserum und gesundes Kontrollserum haben vergleichbare TGF- β Konzentrationen. Ausschluss einer Kontamination durch das verwendete Serum.

Nachdem eine vermehrte TGF- β Expression in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten nach Behandlung mit Dialyseserum beobachtet wurde, wurde zum Ausschluss einer Kontamination der TGF- β Gehalt von unverdünntem Dialyseserum im Vergleich zu unverdünntem gesundem Serum (Kontrollserum) bestimmt. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Dabei konnte keine Veränderung im TGF- β Gehalt zwischen gesundem- und Dialyseserum detektiert werden (siehe **Abbildung 11**).

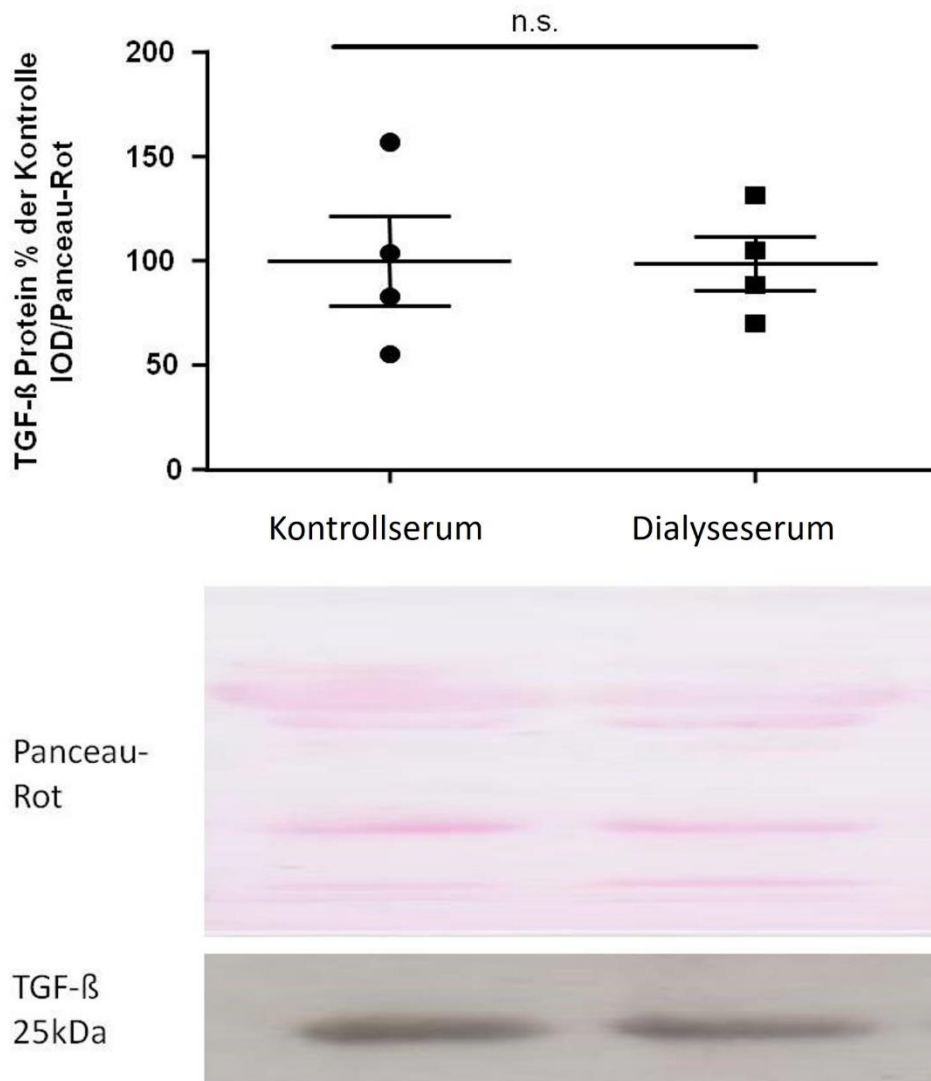


Abb. 11: Dialyseserum und gesundes Kontrollserum haben vergleichbare TGF-β Konzentrationen. Ausschluss einer Kontamination durch das verwendete Serum. Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der Expression von TGF-β (Transforming Growth Factor beta) in unverdünntem Kontroll- und Dialyseserum; n = 4; n.s.=nicht signifikant;

5.4 Behandlung von Kardiomyozyten mit Indoxylsulfat

5.4.1 Die Behandlung von Kardiomyozyten mit Indoxylsulfat führt zu keiner Zunahme der Apoptose und Nekroserate.

In den vorangehend beschriebenen Experimenten wurden die Effekte von Dialyseserum auf die Fibrosemarker CTGF und TGF-β in Kardiomyozyten gezeigt. Nun wurde der Frage nachgegangen, ob das Urämietoxin Indoxylsulfat für die eben gezeigten Effekte des Dialyseserums verantwortlich ist.

Dazu wurde zunächst die Apoptose und Nekroserate der Kardiomyozyten bei Behandlung mit Indoxylsulfat aufsteigender Konzentrationen und 10% gesundem Serum bestimmt. Die durchflusszytometrische Analyse der Apoptoserate erfolgte mittels Markierung mit Annexin V. Die durchflusszytometrische Analyse der Nekroserate erfolgte mittels Markierung mit Propidiumiodid und Annexin V. Die Behandlung von Indoxylsulfat aufsteigender Konzentrationen führte zu keiner Zunahme der Apoptose und Nekroserate im Vergleich zum Kontrollserum, welches 10% gesundes Serum ohne Indoxylsulfat enthielt. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen, dass Dialyseserum ebenfalls keinen Einfluss auf die Apoptose- und Nekroserate der neonatalen Kardiomyozyten hatte.

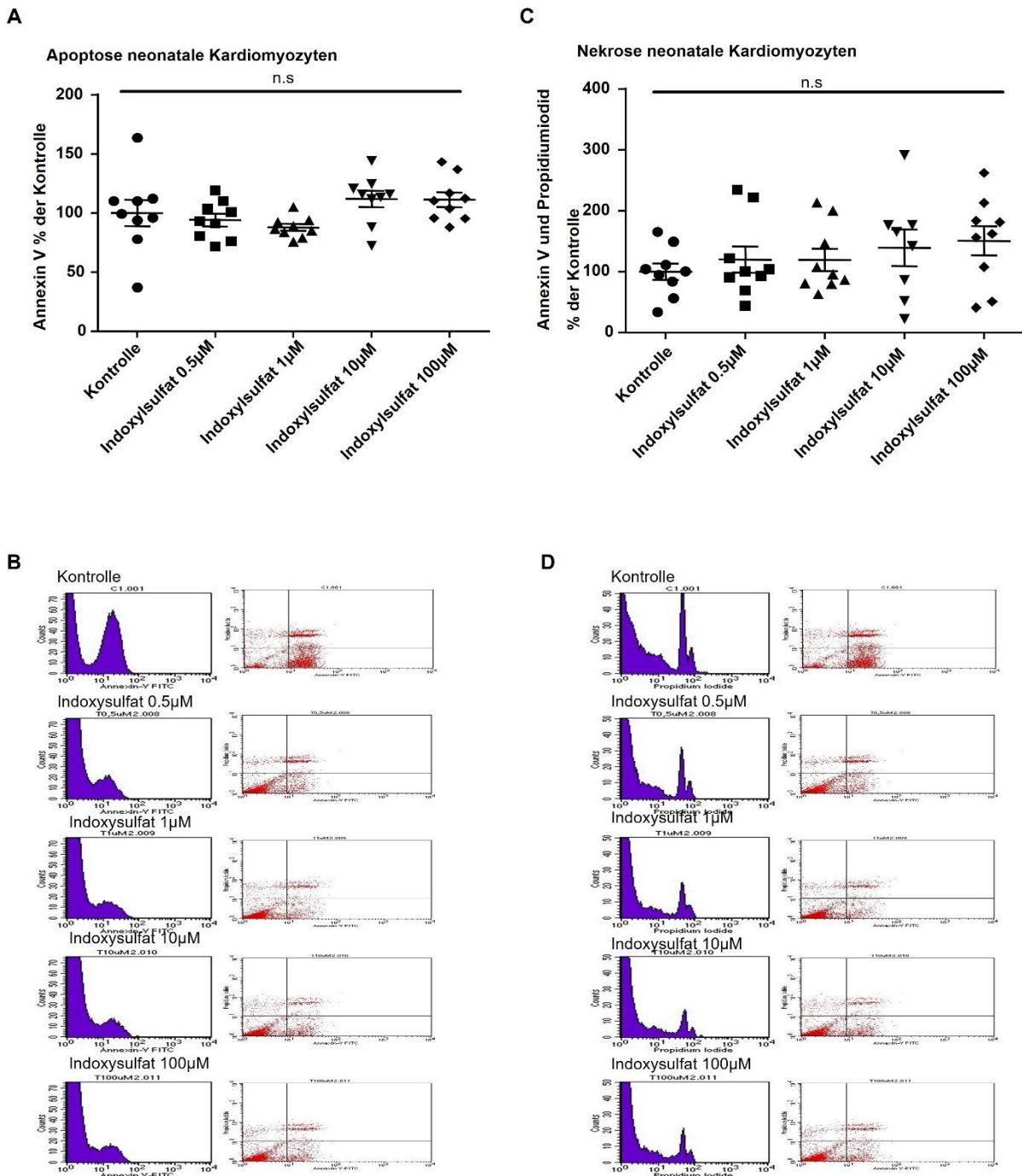


Abb. 12: Kein Effekt von Indoxylsulfat auf die kardiomyozytäre Apoptose und Nekrose. Durchflusszytometrische Analyse der **(A)** Apoptose in Kardiomyozyten mittels Annexin V nach 24-stündiger Inkubation mit 0.5 µmol/L, 1 µmol/L, 10 µmol/L und 100 µmol/L Indoxylsulfat. **(B)** Dot-Plot-Darstellung der durchflusszytometrischen Apoptoseanalyse in Kardiomyozyten nach 24-stündiger Indoxylsulfat Behandlung. **(C)** Nekrose in Kardiomyozyten mittels Annexin V und Propidiumiodid nach 24-stündiger Inkubation mit 0.5µmol/L, 1 µmol/L, 10 µmol/L und 100 µmol/L Indoxylsulfat. **(D)** Repräsentative Dot-Plot-Darstellung der durchflusszytometrischen Nekroseanalyse in Kardiomyozyten nach 24-stündiger Indoxysulfat Behandlung. n=8-9; n.s. =nicht signifikant;

5.4.2 Die Behandlung von Kardiomyozyten mit Indoxylsulfat führt zu einer Zunahme der Protein Expression des Fibrosemarkers TGF-β, aber nicht von CTGF.

In Abb. 8 wurde eine Zunahme der Proteinexpression von TGF-β und CTGF bei der Behandlung von Kardiomyozyten mit Dialyseseren gezeigt. Um der Hypothese nachzugehen, dass Indoxylsulfat für diese Effekte mitverantwortlich ist, wurden Kardiomyozyten in der Zellkultur für 24 Stunden mit 10% gesundem Serum und Indoxylsulfat aufsteigender Konzentration behandelt. Als Kontrolle diente Medium mit 10% gesundem Serum. Zur Überprüfung der vorherigen Ergebnisse wurden zudem die Kardiomyozyten mit 10% Dialyseserum behandelt (Positiv-Kontrolle). Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot und die Analyse der mRNA-Expression wurde mittels Real Time PCR durchgeführt. Für die Proteinexpression von TGF-β (siehe **Abbildung 13A**) konnte eine Zunahme bei Behandlung mit Indoxylsulfat 100µmol/L um 65,9±19,6% (p=0,03) im Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden. Es konnte keine Zunahme der Proteinexpression von CTGF im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (siehe **Abbildung 13B**). Die Analyse der mRNA-Expression mittels Real Time PCR zeigte, dass sowohl die Expression von TGF-β als auch die von CTGF durch die Behandlung mit Indoxylsulfat aufsteigender Konzentration im Vergleich zur Kontrolle unverändert blieb (siehe **Abbildung 13C** und **13D**). Wie schon in den vorherigen Experimenten gezeigt, kam es zu einer Zunahme der Proteinexpression von TGF-β bei der Behandlung mit Dialyseserum um 234,9±31,5% (p<0,001) im Vergleich zur Kontrolle (siehe **Abbildung 13A**).

Für CTGF konnte eine Zunahme der Proteinexpression um 162,2±47,2% (p=0,02) bei Behandlung mit Dialyseserum im Vergleich zur Behandlung mit Indoxylsulfat 0.5 µmol/L nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 13B**).

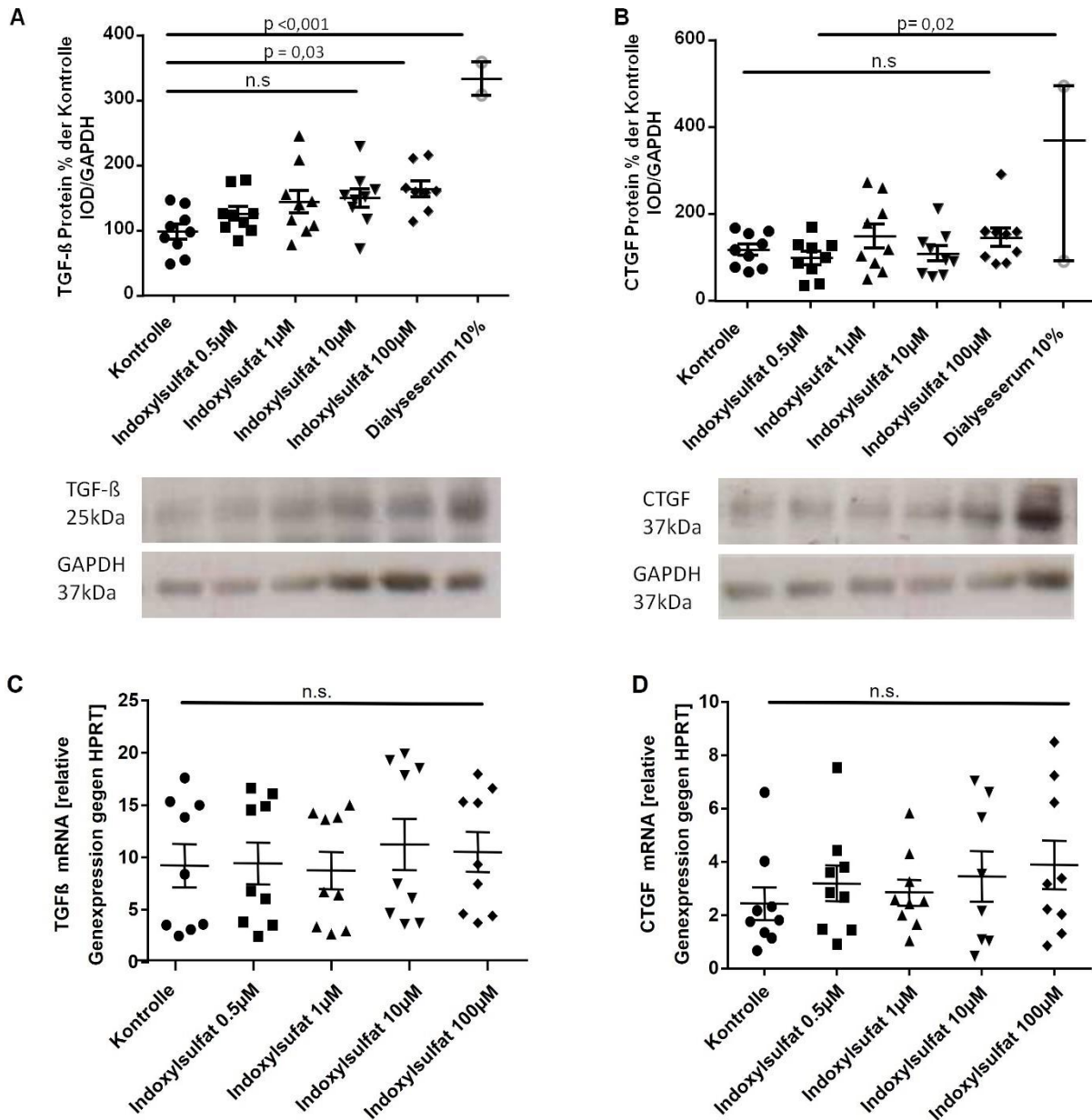


Abb. 13: Effekt von Indoxylsulfat auf die Expression der Fibrosemarker TGF-β und CTGF in neonatalen Kardiomyozyten. Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der **(A)** Proteinexpression von TGF-β (Transforming Growth Factor beta), **(B)** Proteinexpression von CTGF (Connective Tissue Growth Factor) und PCR-Analyse der **(C)** mRNA-Expression von TGF-β (Transforming Growth Factor beta), **(D)** mRNA-Expression von CTGF (Connective Tissue Growth Factor) in Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit 0.5μmol/L, 1μmol/L, 10μmol/L und 100μmol/L Indoxylsulfat. n=2-9; n.s. =nicht signifikant;

5.5 Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Indoxylsulfat

5.5.1 Die Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Indoxylsulfat führt zu keiner Zunahme der Proteinexpression und der mRNA-Expression der Fibrosemarker CTGF und TGF- β .

In den vorherigen Experimenten wurde insbesondere die Zunahme des Fibrosemarkers CTGF in kardialen Fibroblasten durch die Behandlung mit Dialyseserum gezeigt. Im Folgenden wurde untersucht, ob das Urämietoxin Indoxylsulfat, das für eine pro-fibrotische Wirkung bekannt ist [75], für diese Effekte mitverantwortlich ist. Dazu wurden kardiale Fibroblasten mit aufsteigender Indoxylsulfat Konzentration für 24h in der Zellkultur behandelt. Die Kontrolle stellen kardiale Fibroblasten dar, die 24h mit Hungermedium und 10% gesundem Kontrollserum behandelt wurden. Um physiologische Bedingungen zu schaffen, wurde zu Indoxylsulfat, 10% gesundes Kontrollserum hinzugegeben.

Die Analyse der Proteinexpression der Fibrosemarker TGF- β und CTGF erfolgte mittels Western Blot Analyse. Um eine mögliche Erhöhung der mRNA-Expression beurteilen zu können, erfolgte zusätzlich eine Real Time PCR Analyse.

Dabei zeigte sich, dass die Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Indoxylsulfat in aufsteigender Konzentration zu einer Zunahme der Proteinexpression von CTGF führte, was aufgrund der Streuung das Signifikanzniveau verfehlte. Dieser Effekt ließ sich auf mRNA-Ebene nicht nachweisen (siehe **Abbildung 14B, D**). Bei Behandlung von neonatalen kardialen Fibroblasten mit Indoxylsulfat aufsteigender Konzentration konnte keine Zunahme der Proteinexpression und der mRNA-Expression des Fibrosemarkers TGF- β nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 14A, C**).

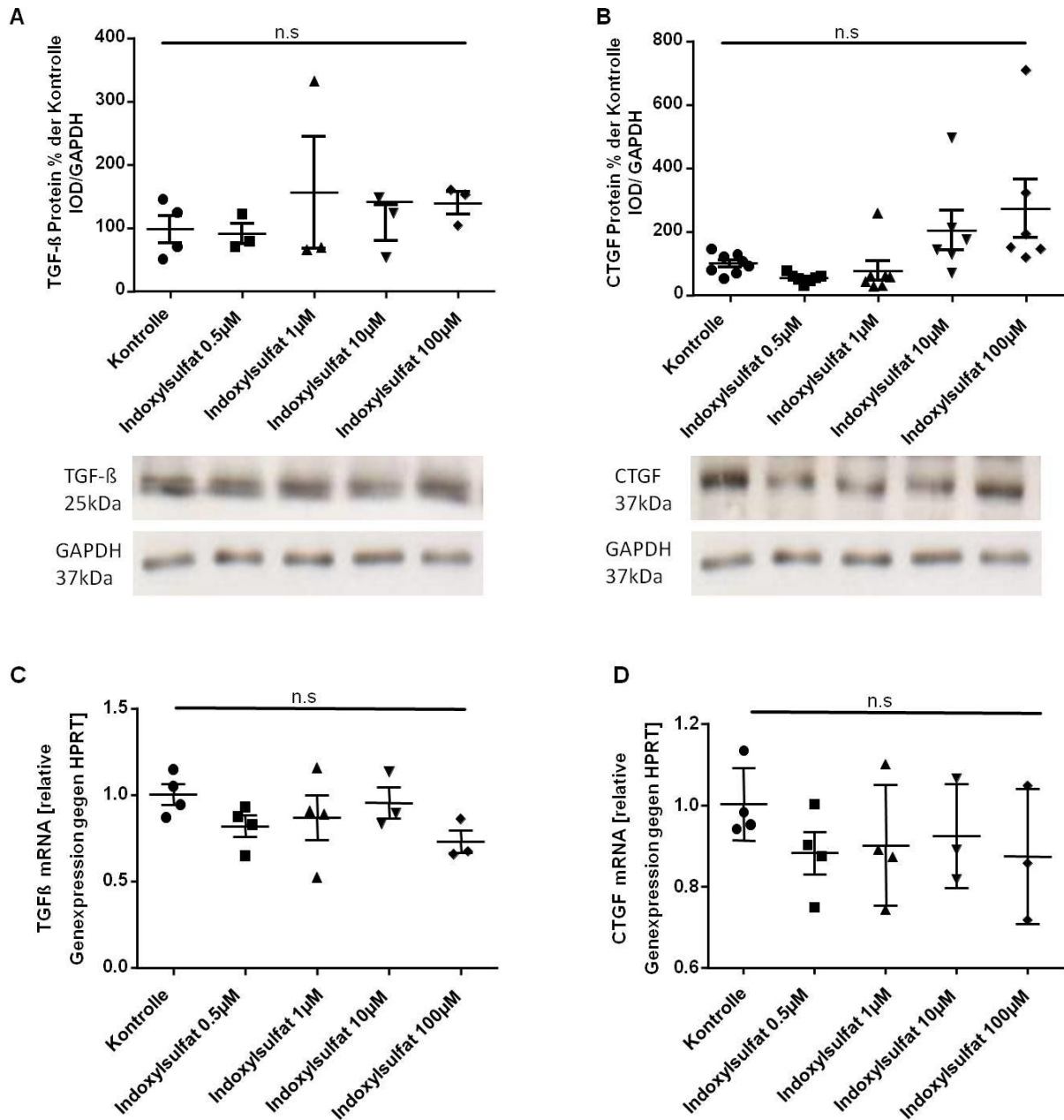


Abb. 14: Indoxylsulfat induziert nicht die Expression der Fibrosemarker TGF-β und CTGF in neonatalen kardialen Fibroblasten. Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der **(A)** Proteinexpression von TGF-β (Transforming Growth Factor beta), **(B)** Proteinexpression von CTGF (Connective Tissue Growth Factor) und Repräsentative Analyse und Quantifizierung der **(C)** mRNA-Expression von TGF-β (Transforming Growth Factor beta), **(D)** mRNA-Expression von CTGF (Connective Tissue Growth Factor) in kardialen Fibroblasten nach 24-stündiger Behandlung mit 0.5μmol/L, 1μmol/L, 10μmol/L und 100 μmol/L Indoxylsulfat. n = 6-8; n.s.=nicht signifikant;

5.5.2 Die Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Indoxylsulfat führt zu keiner Zunahme der Protein- und mRNA-Expression von Kollagen 1A1 und Kollagen 3A1.

Um zu untersuchen, ob die durch das Dialyseserum induzierte Expressionszunahme von Col1A1 und Col3A1 (siehe **Abb. 10**) durch das Urämietoxin Indoxylsulfat bedingt sind, wurden die oben gewonnenen Protein Lysate genutzt und wie oben beschrieben mit Indoxylsulfat aufsteigender Konzentration behandelt. Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot und die der mRNA-Expression mittels Real Time PCR. Es zeigte sich, dass die Behandlung der kardialen Fibroblasten mit Indoxylsulfat unterschiedlicher Konzentration zu keiner Zunahme der Protein- und mRNA- Expression von Col1A1 (siehe **Abbildung 15A, C**) und Col3A1(siehe **Abbildung 15B, D**) führt.

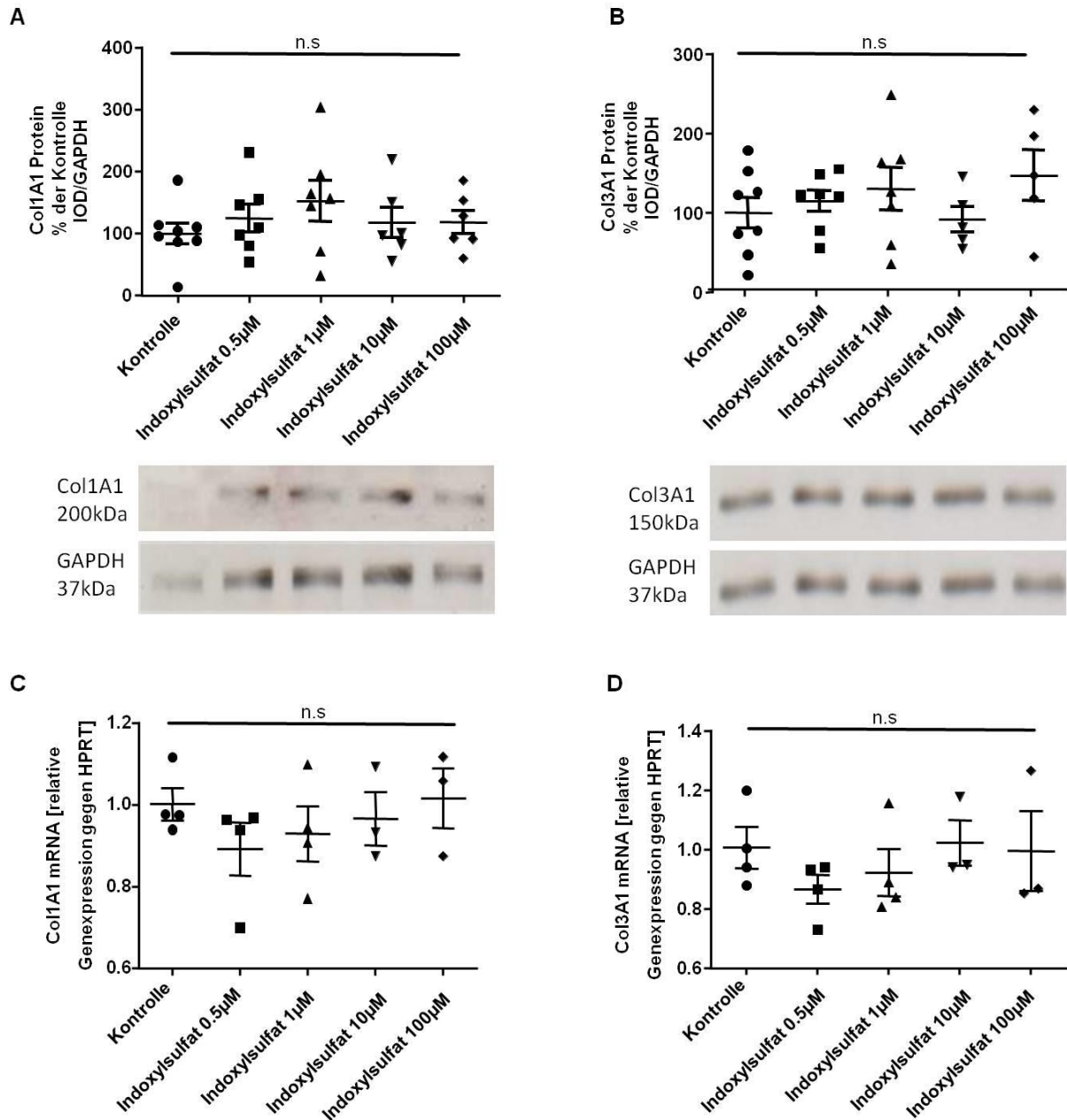


Abb. 15: Kein Effekt von Indoxylsulfat auf die Kollagen Expression in kardialen Fibroblasten. Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der **(A)** Proteinexpression von Kollagen 1A1 (Col1A1), **(B)** Proteinexpression von Kollagen 3A1 (Col3A1) und PCR-Analyse der **(C)** mRNA-Expression von Kollagen 1A1 (Col1A1), **(D)** mRNA-Expression von Kollagen 3A1 (Col3A1) in kardialen Fibroblasten nach 24-stündiger Behandlung mit 0.5µmol/L, 1µmol/L, 10µmol/L und 100 µmol/L Indoxylsulfat. n = 6-8; n.s.=nicht signifikant;

5.6 Kombination von Vorhofflimmern und chronischer Niereninsuffizienz zur Untersuchung des Einflusses der beiden Komorbiditäten auf die pro-fibrotische Genexpression in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

5.6.1 Additiver Effekt einer arrhythmischen Stimulation in Gegenwart von Dialyseserum auf die Proteinexpression von TGF- β in neonatalen Kardiomyozyten.

Nachdem in den vorherigen Versuchen gezeigt wurde, dass die Behandlung von Kardiomyozyten mit Dialyseserum zu einer Zunahme der Proteinexpression von TGF- β und CTGF führen und es außerdem bekannt ist, dass arrhythmisches Pacing Fibrose in Kardiomyozyten induziert [140], wurde in den folgenden Versuchen arrhythmisches Pacing und die Behandlung mit Dialyseserum kombiniert. Im Modell soll damit die myokardiale Fibrosierung bei Niereninsuffizienten Patienten mit Vorhofflimmern nachempfunden werden.

Der Versuchsaufbau wurde so gestaltet, dass zwei Variablen (rhythmisches vs. arrhythmisches Pacing und gesundes Serum vs. Dialyseserum) kombiniert untersucht wurden. Dazu wurden Kardiomyozyten für 24h mit 10%igem gesundem Kontrollserum oder Dialyseserum behandelt und 3Hz rhythmisch bzw. arrhythmisch stimuliert. Die Kontrolle stellten dabei Kardiomyozyten dar, die mit gesundem Kontrollserum behandelt und rhythmisch stimuliert wurden. Die Analyse der Proteinexpression von TGF- β erfolgte mittels Western Blot Analyse, die Analyse der mRNA-Expression von TGF- β wurde mittels Real Time PCR durchgeführt.

Für die Proteinexpression von TGF- β konnte bei Kombination von zwei Variablen eine signifikante Zunahme verzeichnet werden. Bei Behandlung von arrhythmisch stimulierten Kardiomyozyten mit Dialyseserum kam es zu einer Zunahme der TGF- β Expression um $185,1 \pm 43,2 \%$ ($p=0,002$) im Vergleich zur rhythmisch stimulierten Kontrollserum (siehe **Abbildung 16**). Bei Veränderung von nur einer Komorbidität konnte keine signifikante Zunahme der TGF- β Proteinexpression, bzw. keine signifikante Veränderung der TGF- β mRNA-Expression nachgewiesen werden. Für die TGF- β mRNA-Expression wurde bei arrhythmischer Stimulation mit Dialyseserum eine Abnahme um $0,27 \pm 0,088\%$ ($p=0,03$) im Vergleich zum rhythmischen stimulierten Kontrollserum beobachtet.

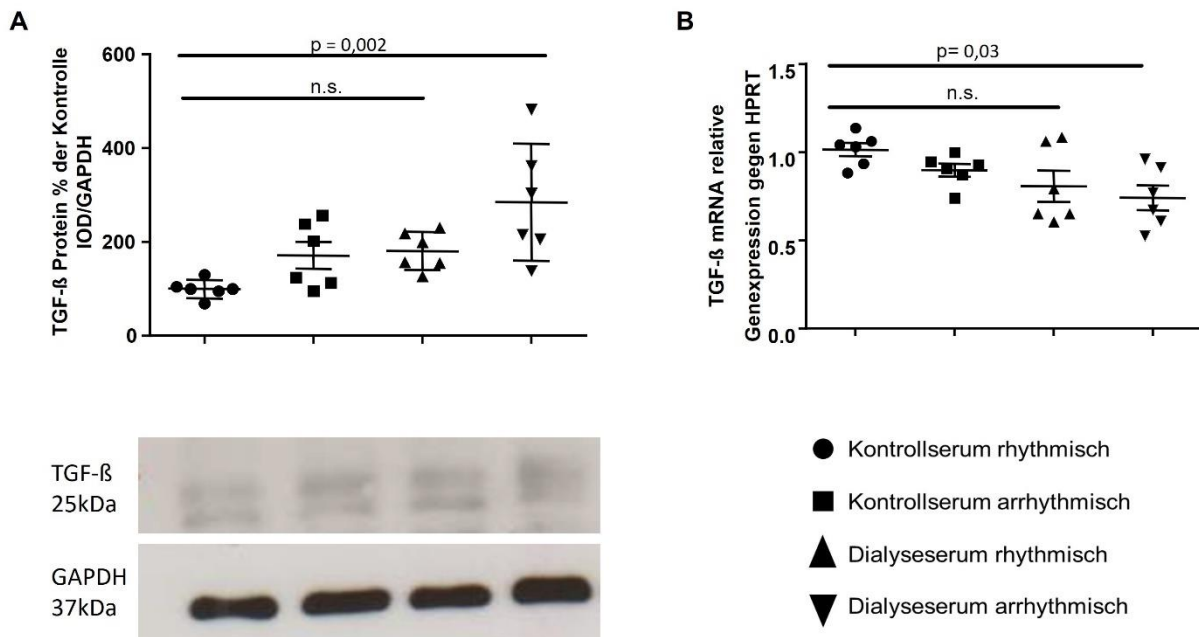


Abb. 16: Effekt des Pacings mit Dialyseserum und gesundem Serum auf Fibrosemarker TGF-β in Kardiomyozyten. Repräsentativer Western Blot und Quantifizierung der **(A)** Proteinexpression von TGF-β (Transforming Growth Factor beta) und PCR-Analyse der **(B)** mRNA-Expression von TGF-β (Transforming Growth Factor beta) in Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit 10% gesundem Serum und Dialyseserum mit rhythmischer und arrhythmischer Stimulation mit 3Hz für 24h. n=6; n.s.= nicht signifikant;

5.6.2 Effekt einer arrhythmischen Stimulation in Gegenwart von Dialyseserum auf die Proteinexpression von TGF-β in neonatalen Kardiomyozyten bei Vergleich der Probenpaare untereinander.

Wie in Abbildung 16 dargestellt, konnte bei Behandlung von arrhythmisch stimulierten Kardiomyozyten mit Dialyseserum im Vergleich zur rhythmisch stimulierten Kontrollserum für die Proteinexpression von TGF-β eine signifikante Zunahme verzeichnet werden.

Bei Vergleich der alters-und geschlechtsangepassten Probenpaare untereinander zeigt sich bei jedem Probenpaar dieselbe Tendenz hinsichtlich der TGF-β Expression. Innerhalb jedes Probenpaars konnte eine Zunahme der TGF-β Expression bei arrhythmischer Stimulation der Kardiomyozyten im Vergleich zu der rhythmischen Stimulation der Kardiomyozyten beobachtet werden. Dieser Effekt ist sowohl für die Behandlung mit Kontrollserum als auch für die mit Dialyseserum nachweisbar. Außerdem kam es zu einer Zunahme der TGF-β Expression innerhalb eines Probenpaares bei Behandlung mit Dialyseserum im Vergleich zum

Kontrollserum. Dies gilt sowohl für den Vergleich von rhythmischer, aber auch von arrhythmischer Stimulation.

Die stärkste Zunahme der TGF- β Expression ist innerhalb der Probenpaar durch Veränderung von zwei Variablen nachzuweisen. Dabei kam es zur stärksten Zunahme der TGF- β Expression bei arrhythmischer Stimulation und Behandlung mit Dialyseserum im Vergleich zum rhythmisch stimulierten Kontrollserum.

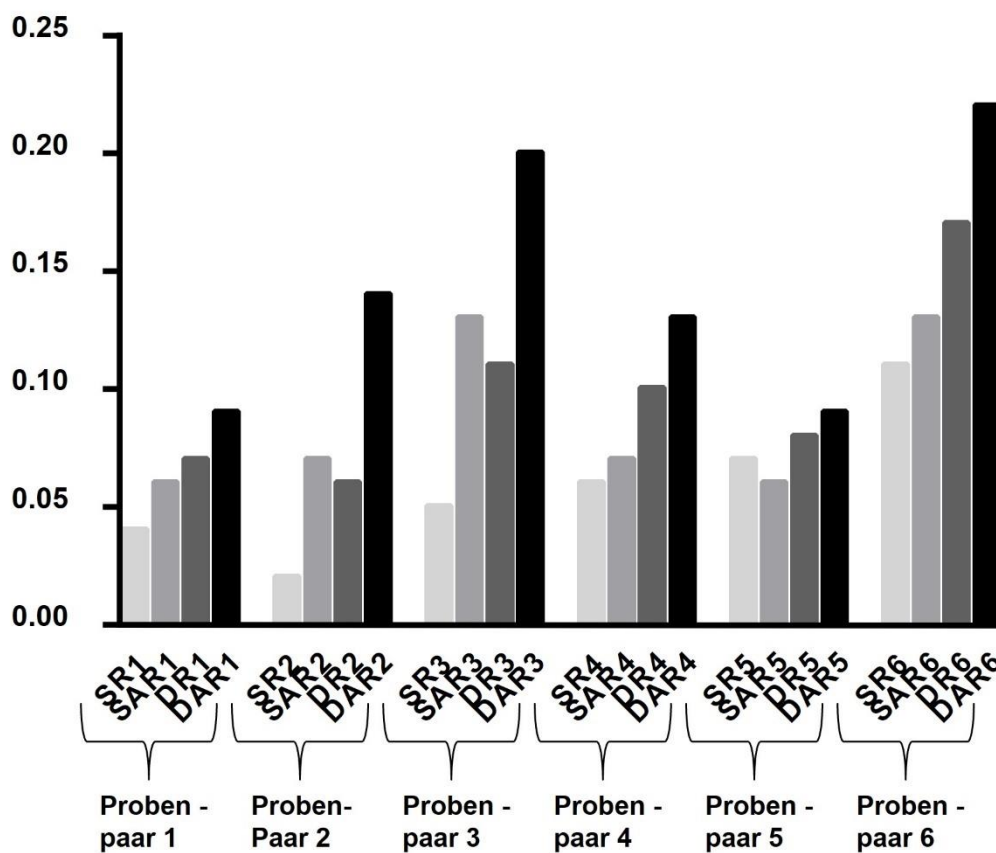


Abb. 17: Effekt der Stimulation mit Dialyseserum und gesundem Serum auf den Fibrosemarker TGF- β in Kardiomyozyten. Quantifizierung der Expression von TGF- β (Transforming Growth Factor beta) in Kardiomyozyten nach 24 stündiger Behandlung mit 10% gesundem Serum und alters-und geschlechtsangepasstem Dialyseserum mit rhythmischem und arrhythmischem Pacing mit 3Hz für 24h. n=6. Probenpaar 1: männlich, Geburtsjahr: 1952-1955; Probenpaar 2: männlich, Geburtsjahr: 1950-1964; Probenpaar 3: männlich, Geburtsjahr 1937-1940; Probenpaar 4: männlich, Geburtsjahr: 1978-1982; Probenpaar 5: männlich, Geburtsjahr 1955-1956 Probenpaar 6: männlich; Geburtsjahr 1947-1949; SR= Kontrollserum

rhythmisch; SAR= Kontrollserum arrhythmisch; DR= Dialyserverum rhythmisch; D AR= Dialyserverum arrhythmisch;

5.6.3 Die Behandlung von Kardiomyozyten mit Dialyserverum führt zu einer Zunahme der mRNA-Expression des Ryanidin-Rezeptor 2 (Ryr2).

Um den Effekt von Dialyserverum und eine arrhythmische Stimulation auf den Calciumstoffwechselmarker Ryr2 zu überprüfen, wurden Kardiomyozyten für 24h mit alters- und geschlechtsangepasstem Kontroll- und Dialyserverum einer Konzentration von 10% behandelt und rhythmisch bzw. arrhythmisch stimuliert. Die Analyse der Ryr2 mRNA-Expression erfolgte mittels Real Time PCR. Es zeigte sich eine Zunahme der mRNA-Expression von Ryr2 bei Behandlung mit Dialyserverum und rhythmischer Stimulation um $1,7 \pm 0,3$ % ($p < 0,001$) im Vergleich zur Behandlung mit Kontrollserum mit rhythmischer Stimulation. Ebenso konnte eine Zunahme der mRNA-Expression von Ryr2 bei Behandlung mit Dialyserverum und arrhythmischer Stimulation um $1,6 \pm 0,2$ % ($p < 0,001$) im Vergleich zur Behandlung mit Kontrollserum mit arrhythmischen Pacing verzeichnet werden. Kein Unterschied konnte bei Vergleich von rhythmischer und arrhythmischer Stimulation für die Ryr2 mRNA-Expression beobachtet werden.

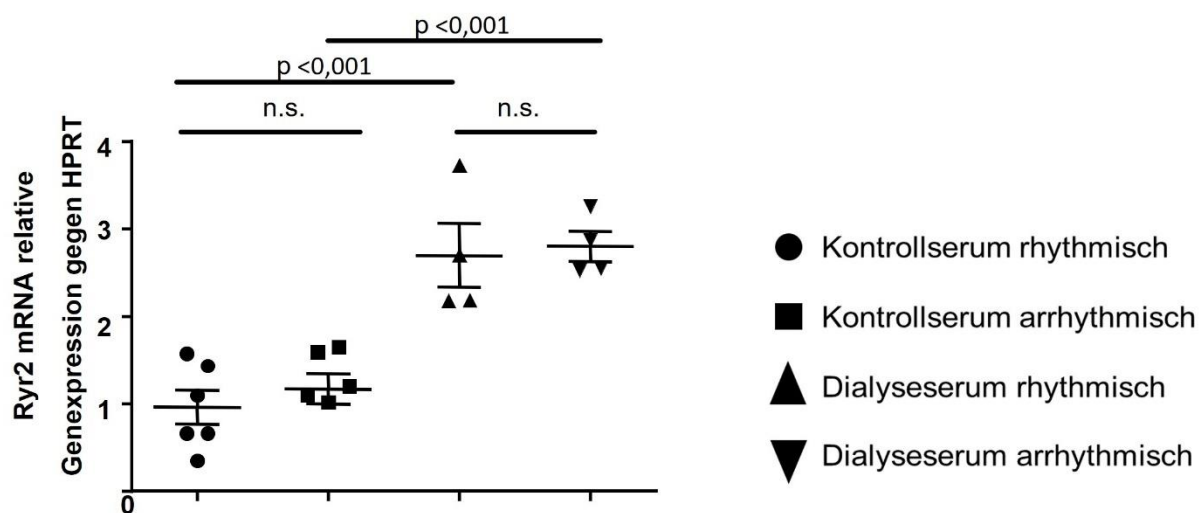


Abb. 18: Effekt des Dialyserverums und gesunden Serums mit rhythmischer und arrhythmischer Stimulation auf die Genexpression von Ryr2 in Kardiomyozyten. PCR-Analyse der mRNA-Expression des Ryanodin-Rezeptor 2 (Ryr2) in Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit 10% gesundem Serum und Dialyserverum mit rhythmischer und arrhythmischer Stimulation 3Hz. n=6; n.s.= nicht signifikant;

5.6.4 Die Behandlung von Kardiomyozyten mit Dialyseseren führt zu einer Zunahme der mRNA-Expression von ANP und BNP unabhängig von einer arrhythmischen Stimulation.

Um den Effekt von Dialyseserum und arrhythmischer Stimulation auf ANP und BNP zu überprüfen, wurden neonatale Kardiomyozyten für 24h mit alters- und geschlechtsangepasstem Kontroll- und Dialyseserum behandelt und rhythmisch bzw. arrhythmisch stimuliert. Die Analyse der ANP und BNP mRNA erfolgte mittels Real Time PCR. Für die ANP mRNA-Expression konnte eine Zunahme bei Behandlung mit Dialyseserum und rhythmischer Stimulation im Vergleich zum Kontrollserum mit rhythmischer Stimulation festgestellt werden, welche nicht das Signifikanzniveau erreichte (siehe **Abbildung 19A**). Ebenso konnte eine nicht das Signifikanzniveau erreichende Zunahme der ANP mRNA-Expression unter arrhythmischer Stimulation verglichen mit der entsprechenden Kontrolle verzeichnet werden. Für die BNP mRNA-Expression konnte eine signifikante Zunahme bei Behandlung mit Dialyseserum und rhythmischer Stimulation um $1,8 \pm 0,4\%$ ($p = 0,001$) im Vergleich zum Kontrollserum mit rhythmischer Stimulation festgestellt werden (siehe **Abbildung 19B**). Auch zeigten sich eine gesteigerte BNP-Expression in Dialyseserum-behandelten Kardiomyozyten unter arrhythmischer Stimulation verglichen gegen die entsprechende Kontrolle, diese erreichte aber nicht das Signifikanzniveau. Kein Unterschied zeigte sich beim Vergleich von rhythmischer und arrhythmischer Stimulation für die BNP mRNA-Expression.

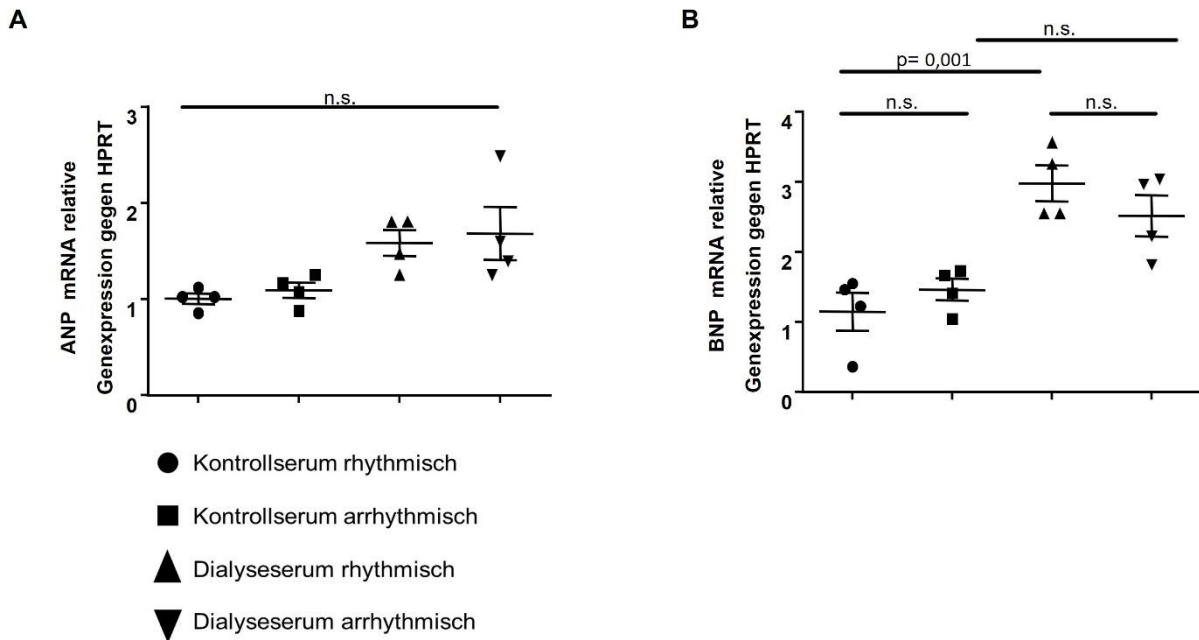


Abb. 19: Effekt des Dialyseserums und gesunden Serums mit rhythmischer und arrhythmischer Stimulation auf die Genexpression von ANP und BNP in Kardiomyozyten. PCR-Analyse der mRNA-Expression von **(A)** atrialem natriuretischen Peptid (ANP) und **(B)** brain natriuretischem Peptid (BNP) in Kardiomyozyten nach 24-stündiger Behandlung mit 10% gesundem Serum und Dialyseserum mit rhythmischer und arrhythmischer Stimulation mit 3Hz. n=6; n.s.= nicht signifikant;

5.7 Die Stimulation von kardialen Fibroblasten mit Medium aus einer Kardiomyozytenkultur mit Dialyseserum und arrhythmischer Stimulation induziert die Proteinexpression des Fibrosemarkers TGF- β und Col1A1.

Nachdem bei Behandlung mit Dialyseserum und arrhythmischer Stimulation eine Zunahme der Proteinexpression des Fibrosemarkers TGF- β in Kardiomyozyten gezeigt wurde, wurde nun die Auswirkung von arrhythmischer Stimulation in Kombination mit Dialyseserum auf die Fibroseinduktion in kardialen Fibroblasten untersucht. Ziel des Versuchsaufbaus war es nachzuweisen ob Kardiomyozyten durch Sekretion, kardiale Fibroblasten parakrin zur Expression von Col1A1 und TGF- β induzieren.

Wie in dem vorherigen Versuch wurden Kardiomyozyten für 24h mit Dialyseserum bzw. Kontrollserum behandelt und arrhythmisch bzw. rhythmisch stimuliert. Das daraus resultierende Medium der Kardiomyozytenkultur wurde weitergenutzt, um für 24 Stunden kardiale Fibroblasten zu behandeln. Hierbei wurden wie oben beschrieben die vier Bedingungen mit Dialyseserum behandelt, rhythmisch stimuliert, mit Dialyseserum behandelt,

arrhythmisch stimuliert und mit Kontrollserum rhythmisch und arrhythmisch stimuliert voneinander unterschieden. Die Analyse erfolgte mittels Western Blot. Eine signifikante Zunahme der TGF- β Expression in kardialen Fibroblasten konnte durch die Behandlung mit Medium aus einer Kardiomyozytenkultur verzeichnet werden, die vorher mit Dialyseserum und einer arrhythmischen Stimulation behandelt wurde. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme um $280,7 \pm 82,8\%$ ($p=0,02$) im Vergleich zu kardialen Fibroblasten, die mit Medium einer Kardiomyozytenkultur behandelt wurden, die vorher mit Kontrollserum und unter arrhythmischer Stimulation kultiviert wurde. Besonders ausgeprägt war die Zunahme bei Kombination von zwei Komorbiditäten. Es konnte eine besonders ausgeprägte Zunahme der TGF- β Expression in kardialen Fibroblasten durch Behandlung mit Medium aus einer Kardiomyozytenkultur, die zuvor mit Dialyseserum und einer arrhythmischen Stimulation behandelt wurde, nachgewiesen werden. Hier ergab sich eine Zunahme um $436,4 \pm 82,8\%$ ($p<0,001$) im Vergleich zur Behandlung mit Medium einer Kardiomyozytenkultur, die vorher mit Kontrollserum und rhythmischer Stimulation kultiviert wurde. Für die Col1A1 Expression der kardialen Fibroblasten konnte eine signifikante Zunahme durch die Behandlung mit Medium aus einer Kardiomyozytenkultur, die vorher mit Kontrollserum und einer arrhythmischen Stimulation behandelt wurde, nachgewiesen werden. Hier zeigte sich eine Zunahme um $126,7 \pm 32,1\%$ ($p=0,004$) im Vergleich zur Behandlung mit Medium einer Kardiomyozytenkultur, die vorher mit Kontrollserum und rhythmischer Stimulation kultiviert wurde. Ebenso konnte eine Zunahme der Col1A1 Expression der kardialen Fibroblasten bei Behandlung mit Medium der Kardiomyozytenkultur, die vorher mit Dialyseserum und einer rhythmischen Stimulation behandelt wurden, nachgewiesen werden. Hier konnte eine Zunahme um $131,5 \pm 33,4\%$ ($p=0,004$) im Vergleich zur Behandlung mit Medium einer Kardiomyozytenkultur, die vorher mit Kontrollserum und rhythmischer Stimulation kultiviert wurde, gezeigt werden. Die stärkste Zunahme der Col1A1 Expression der kardialen Fibroblasten konnte bei Behandlung mit Medium einer Kardiomyozytenkultur gezeigt werden, bei der die Kultivierung mit Dialyseserum und arrhythmischer Stimulation kombiniert wurde. Hierbei konnte eine Zunahme um $164,1 \pm 33,4\%$ ($p<0,001$) im Vergleich zur Behandlung mit Medium einer Kardiomyozytenkultur, die vorher mit Kontrollserum und rhythmischer Stimulation kultiviert wurde, gezeigt werden.

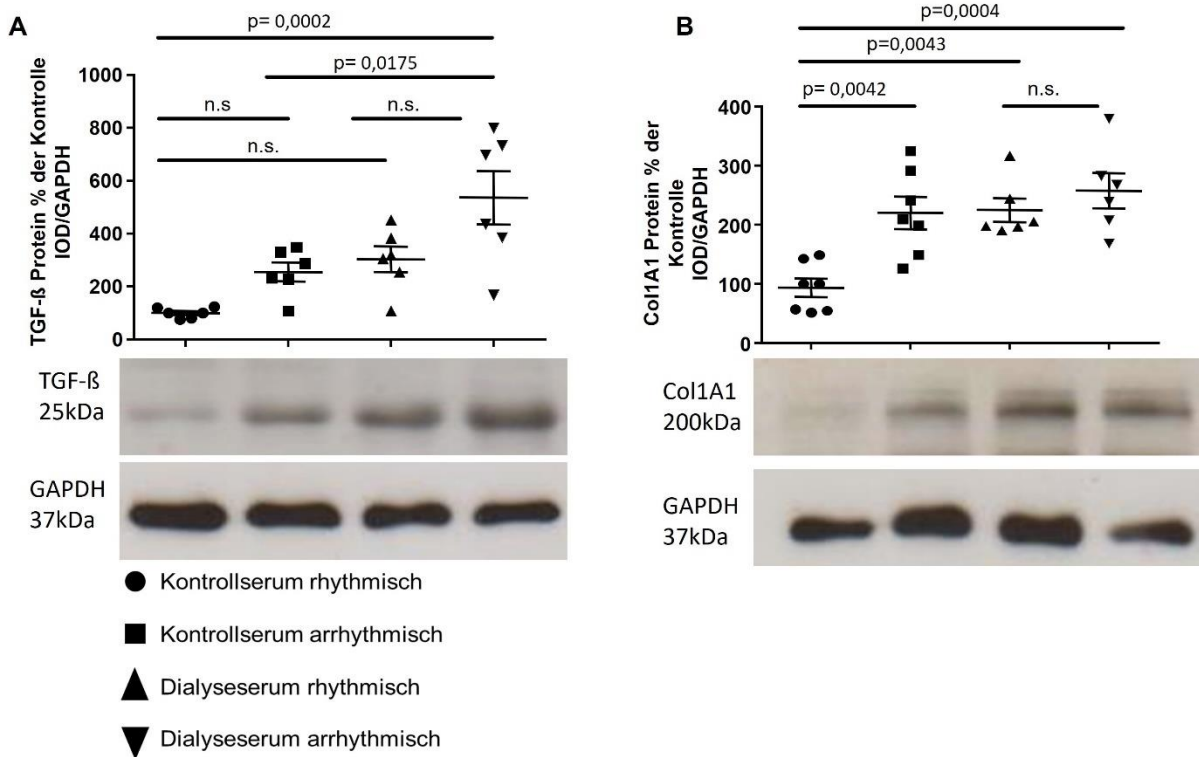


Abb. 20: Effekt des Mediums der Kardiomyozytenkulturen, die stimuliert und mit Dialyseserum behandelt wurden, auf den Fibrosemarker TGF-β und die Col1A1 Expression in kardialen Fibroblasten. Repräsentative Western Blot Analyse und Quantifizierung von **(A)** TGF-β (Transforming Growth Factor beta) und **(B)** Kollagen1A1 (Col1A1) in kardialen Fibroblasten nach 24-stündiger Behandlung mit Kardiomyozyten Medium nach Behandlung mit 10% Kontrollserum und Dialyseserum mit rhythmischer und arrhythmischer Stimulation bei 3Hz für 24h. n=6; n.s. = nicht signifikant;

5.8 Ergebnisschemen

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung von Kardiomyozyten mit Dialyseserum zu einer Zunahme der Expression der Fibrosemarker TGF- β und CTGF führt. Die Behandlung von kardialen Fibroblasten führt zu keiner Ausschüttung von TGF- β , aber zu einer erhöhten Expression der Kollagene Col1A1 und Col3A1. Somit wirken die von den Kardiomyozyten exprimierten pro-fibrotischen Mediatoren TGF- β und CTGF parakrin auf die kardialen Fibroblasten und induzieren eine Myokardiale Fibrose.

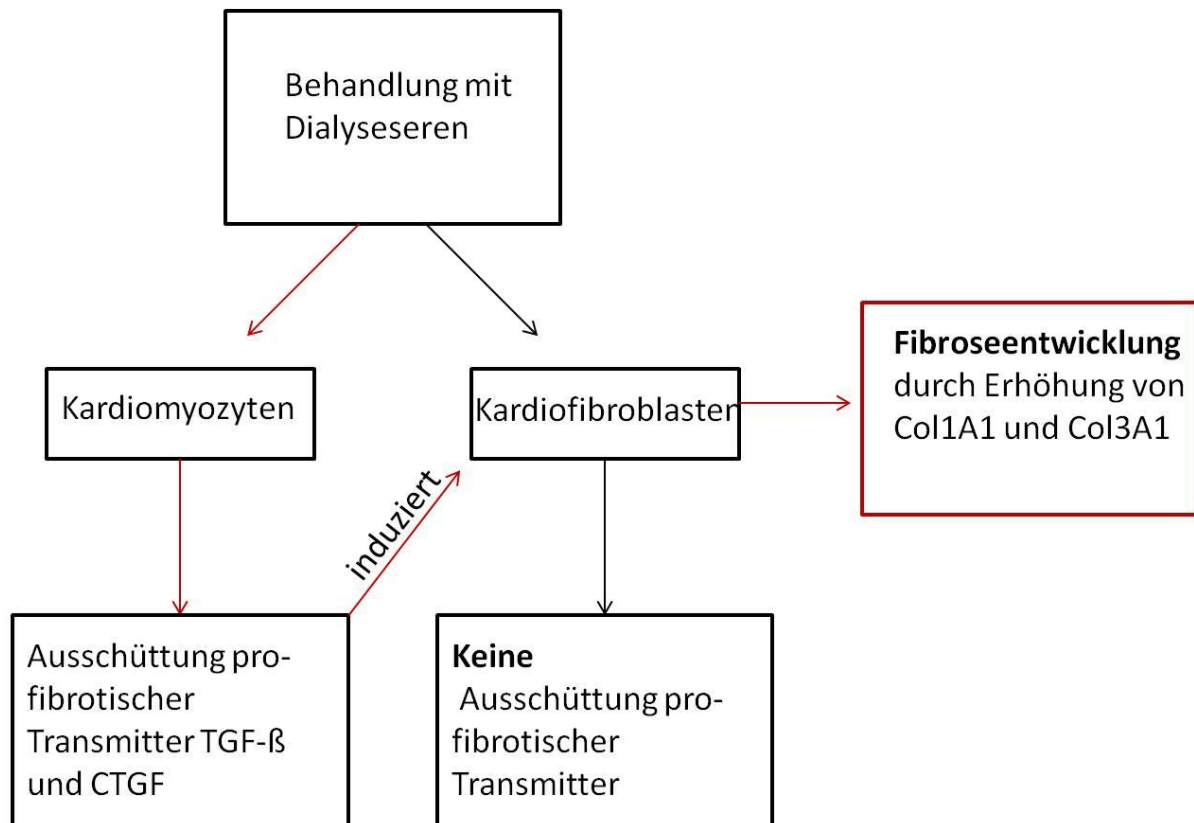


Abb. 21: Ergebnisschema. Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Arbeit. TGF- β =Transforming Growth Factor beta; CTGF=Connective Tissue Growth Factor; Col1A1= Kollagen1A1; Col3A1=Kollagen3A1;

6. Diskussion

Es ist bekannt, dass dialysepflichtige CNi aufgrund eines erhöhten kardiovaskulären Risikos[131] mit einer erhöhten Mortalität einhergeht. Einige *in vivo* Studien beschreiben zudem die Wirkung von CNi auf die kardiale Fibrosierung [85,92]. Studien, die die Auswirkungen von dialysepflichtiger CNi auf die kardiale Fibrose beschreiben, fehlen jedoch. Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, wurde ein Zellkulturmodell entwickelt, indem Kardiomyozyten und kardiale Fibroblasten für 24h mit Dialyseseren und als Kontrolle mit gesunden Seren behandelt wurden. Mittels Western Blot Analyse wurde die Expression der Fibrosemarker TGF- β , CTGF und von Kollagen1A1 und Kollagen3A1 gemessen. Bei bekannter Wirkung von Indoxylsulfat auf die kardioresnale Fibrogenese [75,118], wurde zudem untersucht, ob IS in unserem Versuchsaufbau ebenfalls pro-fibrotische Wirkungen zeigt.

Zudem wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen ob Dialyseserum in Kombination mit VHF, was die häufigste Arrhythmie bei Dialysepatienten darstellt [28], die kardiale Fibrogenese mehr erhöht, als nur die Behandlung mit Dialyseserum, oder nur die Behandlung mit arrhythmischer Stimulation alleine. Dazu wurden Kardiomyozyten mit Dialyseserum und als Kontrolle mit gesundem Serum behandelt und für 24h arrhythmisch bzw. als Kontrolle rhythmisch stimuliert. Es wurde insbesondere die Auswirkungen auf den Fibrosemarker TGF- β gemessen.

6.1 Zusammenhänge zwischen Dialyseseren und kardialer Fibrose

In dieser Arbeit konnte eine vermehrte Kollagen- und CTGF-Expression bei der Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Dialyseserum beobachtet werden. Außerdem konnte eine erhöhte TGF- β und CTGF-Expression bei Behandlung von Kardiomyozyten mit Dialyseseren gezeigt werden.

Auch *in vivo* Studien bestätigen die pro-fibrotische Wirkung von Nierenfunktionsverlust auf das Herz [92]. In einem Tiermodell konnte festgestellt werden, dass 5/6 nephrektomierte Ratten, bei denen ein Myokardinfarkt ausgelöst wurde, eine erhöhte Herzfibrose und Kollagen I Expression in der nicht-Infarktzone zeigten [85]. Martin et. al konnten bei Ratten mit einseitiger Nephrektomie nach 4 Wochen eine Herzfibrose beobachten, welche diese über Veränderungen im TGF- β und Apoptose Signalweg erklärten [61,92,128]. Zudem beschrieb die Arbeitsgruppe eine zunehmende Fibrosierung der verbleibenden Niere und stellten die Vermutung auf, dass diese Faktoren freisetzen, die über den TGF- β und Apoptose Signalweg pro-fibrotische Wirkungen vermitteln [92].

Der TGF- β Gehalt zwischen gesundem und Dialyseserum war vergleichbar, dies lässt die Vermutung zu, dass die Kardiomyozyten durch die Behandlung mit Dialyseseren über eine TGF- β und CTGF-Freisetzung, die vermehrte Kollagenexpression in kardialen Fibroblasten induzieren.

Der Versuchsaufbau unserer Experimente wurde so gewählt, dass jedes Dialyseserum einer alters- und geschlechtsangepassten gesunden Kontrolle zugeordnet wurde. Es ist bekannt, dass der Metabolismus bestimmter Stoffe wie z.B. Phosphat alters- und geschlechtsabhängig ist und damit auch die Serumkonzentration beeinflusst wird [37]. Um diese Einflussfaktoren auszuschalten, entschieden wir uns für alters- und geschlechtsangepasste gesunde Kontrollen.

6.2 Die Rolle der serumfreien Kontrolle

In verschiedenen Arbeiten wurde beschrieben, dass Serum komplementhaltig ist und damit in bestimmten Fibroblasten die Expression pro-fibrotischer Faktoren induzieren kann [99]. So zeigte Monteiro et. al, dass eine Fibroseinduktion durch nicht-komplementinaktiviertes Serum in Leberzirrhose Zellen stattfindet [99,123]. Die Kontrolle stellte dabei komplementinaktiviertes Serum dar. Die Komplementinaktivierung wurde durch eine Erhitzung des Serums (Hitzeinaktivierung) erreicht [99]. Um den Serumeffekt auf die Fibroseinduktion in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten zu untersuchen, wurde zusätzlich in dieser Arbeit eine serumfreie Kontrolle etabliert. Um die von Monteiro et. al beobachteten pro-fibrotischen Effekte des Serums durch das Komplementsystem auszuschließen [99], wurde das von uns genutzte Serum bei 56 Grad über 30 Minuten erhitzt. Dabei konnten wir tatsächlich eine vermehrte TGF- β Expression in kardialen Fibroblasten und eine vermehrte CTGF- Expression in Kardiomyozyten bei Behandlung mit gesundem Serum, im Vergleich zur serumfreien Kontrolle ermitteln. Also scheint das Serum per se die Expression von pro-fibrotischen Mediatoren zu erhöhen. Allerdings zeigte der Vergleich von gesundem und Dialyseserum eine verstärkte Expression der Fibrosemarker unter Dialyseserum, sodass die Expressionszunahme insgesamt nicht nur durch den Serumeffekt erklärt werden kann.

Bei Behandlung von kardialen Fibroblasten mit gesundem Serum konnte eine Abnahme der Kollagenexpression im Vergleich zur serumfreien Kontrolle detektiert werden. Dies lässt sich mutmaßlich dadurch erklären, dass Substratmangel Stress generiert [126], was wiederum die Expression von pro-fibrotischen Signalkaskaden fördern könnte. Auch Takemura et al. nutzen schon Hungerbedingungen in Kardiomyozyten aus, um Stress zu generieren. Die Wissenschaftler nutzen dieses Stressmodell, um Autophagie näher zu erforschen [126]. Autophagie stellt einen Prozess dar, der abhängig von der Situation und dem Auslöser den Zelltod oder das Zellüberleben fördern kann [82,126]. Sie konnten nach vier Tagen

Hungerbedingungen der Kardiomyozyten insbesondere strukturelle Veränderungen und eine Zunahme der Nekroserate der Zellen feststellen[126]. Auch wir konnten nach 24 Stunden Hungerbedingung eine Zunahme der Apoptoserate in Kardiomyozyten im Vergleich zur Behandlung mit Serum beobachten. Studien, die die direkte Auswirkung von Substratmangel auf die Myokardiale Fibrose thematisieren, fehlen. Wobei eine pro-fibrotische Wirkung von verschiedenen anderen myokardialen Stressreizen, wie z.B mechanische Dehnung bekannt ist [11]. Es lässt sich also nur spekulieren, dass der Stressreiz Substratmangel pro-fibrotische Signalkaskaden anstößt, die dann zu den von uns beobachteten Zunahmen der Kollagenexpression führen.

Kombinierend lässt sich mutmaßen, dass der Komplementeffekt des Serums, aber auch der Stressreiz durch Hungerbedingungen für die verschiedene Expressionsmuster von Fibrosemarkern und Kollagen eine Rolle spielen könnten. Da diesbezüglich erst wenige Daten existieren, sind noch weitere Forschungen nötig, um alle Faktoren zu identifizieren, die die Unterschiede zwischen Serumbehandlung und serumfreier Kontrolle erklären.

Diese Arbeit thematisiert hauptsächlich die Auswirkungen von Serum von Patienten unter Dialyse auf die Myokardiale Fibrose. Im Weiteren wird also, ungeachtet des Serumeffekts, auf den Unterschied zwischen dem Serum gesunder Probanden und dem Serum von Patienten unter Dialyse eingegangen.

6.3 Zusammenhänge zwischen BNP-Erhöhung in Kardiomyozyten und Dialyseseren

Es konnte eine Zunahme der Genexpression des Hypertrophiemarkers BNP bei Behandlung von Kardiomyozyten mit Dialyseseren erhoben werden. Dies passt zu den Beobachtungen von Goto et al., welche feststellten, dass die Behandlung von neonatalen Kardiomyozyten mit einem papillären Extrakt aus der Niere zu einer vermehrten BNP Sekretion führt [45]. Was also vermuten lässt, dass auch die Niere Mediatoren sezerniert, die an der Ausschüttung von BNP beteiligt sind. Ogawa et al. konnten in BNP knockout Mäusen eine vermehrte ventrikuläre Fibrose mit einer vermehrten Kollagen- und TGF- β Expression eruieren. Diese postulierten, dass BNP als von Kardiomyozyten abgeleiteter antifibrotischer Faktor wirkt [107]. Andere Arbeiten beschreiben hingegen eine pro-fibrotische Wirkung von BNP auf die Herzvorhöfe [130]. Weitere Experimente sind nötig, um die zu Grunde liegenden Mechanismen der BNP-Freisetzung in Kardiomyozyten bei Behandlung mit Dialyseserum zu untersuchen und den Stellenwert im kardierenalen Syndrom und bei der kardialen Fibrose zu beschreiben. So könnte die Behandlung von kardialen Fibroblasten mit Dialyseserum und BNP weiteren Aufschluss über die potenziell anti- oder pro-fibrotische Wirkung von BNP im kardierenalen Syndrom liefern.

6.4 Zusammenhänge zwischen RyR-2 und kardialer Fibrose

Der Ryanodinrezeptor Typ 2(RyR-2) ist der Hauptkanal der Calcium Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in Kardiomyozyten[1]. Der Calciumkanal spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der kontraktile Myokardfunktion, aber auch bei der Herzhyperthrophie [29]. RyR-2 wird nur in Kardiomyozyten, nicht jedoch in kardialen Fibroblasten exprimiert [29]. Ding et. al untersuchten die Wirkung von RyR-2 auf die kardiale Fibrose. Sie beobachteten, dass eine mechanische Dehnung zu einer vermehrten Expression von TGF- β in Kardiomyozyten führt. Durch einen RyR-2 knockdown konnte diese signifikant vermindert werden. Ebenso konnte durch den Knockdown die durch mechanische Dehnung ausgelöste Kollagenexpression in kardialen Fibroblasten vermindert werden [29]. Ding et al. schlossen daraus, dass RyR-2 eine wichtige Rolle bei der durch Dehnung ausgelösten Herzfibrose spielt und dabei TGF- β parakrin die Kollagenbildung in kardialen Fibroblasten wirkt [29].

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dialyseserum zu einer erhöhten Expression von RyR-2 führt. Gegebenenfalls könnte also RyR-2, auch ohne mechanische Dehnung, an der durch Dialyseserum gezeigten kardialen Fibrose beteiligt sein. Der Mechanismus der erhöhten RyR-2 Expression durch Dialyseseren bleibt jedoch unklar. Es sind weitere Forschungen nötig, um die Rolle von RyR-2 in CKD-Patienten und bei einer kardialen Fibroseentwicklung zu identifizieren. Aufschluss könnten Versuche liefern, die die Auswirkung von einem RyR-2 Knockdown, auf die durch Dialyseserum ausgelöste kardiale Fibrose untersuchen.

6.5 Zusammenhänge zwischen arrhythmischer Stimulation, Behandlung mit Dialyseserum und kardialer Fibrose

Die Behandlung mit Dialyseserum und arrhythmischer Stimulation führt in Kardiomyozyten zu einer Zunahme der TGF- β Protein Expression. Passend hierzu kam es zu einer Abnahme der TGF- β mRNA-Expression bei arrhythmischer Stimulation und Behandlung mit Dialyseserum, was einer Gegenregulation entsprechen könnte. In kardialen Fibroblasten konnte für die TGF- β und Kollagen Expression, sowohl eine Zunahme durch Dialyseserum als auch durch arrhythmische Stimulation gezeigt werden. Die stärkste Expressionszunahme konnte durch die Kombination von Dialyseserum und arrhythmischer Stimulation beobachtet werden. Auch Slawik et. al. konnten eine Zunahme der TGF- β und Kollagenexpression bei arrhythmischer Stimulation erfassen[121]. Unsere Ergebnisse zeigen, dass durch arrhythmische Stimulation und Dialyseserum die TGF- β Expression in Kardiomyozyten steigt, was wiederum parakrin auf Kardiofibroblasten wirkt und so erneut über den TGF- β Signalweg eine vermehrte Kollagenbildung und Fibrose entsteht. Im Ganzen kann also darauf geschlossen werden, dass

die kardiale Fibrogenese bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz und VHF, was die häufigste Arrhythmie bei diesen Patienten darstellt [144], noch höher ist, als bei einem dieser Erkrankungen alleine.

VHF ist neben der Arrhythmie auch durch eine Tachykardie gekennzeichnet [14,24,42,63]. In unserem Modell wurde jedoch VHF nur mittels Arrhythmie untersucht, inwieweit auch eine Tachykardie bzw. eine Frequenzabhängigkeit Einfluss auf die kardiale Fibrose hat, gilt es noch weiter zu untersuchen.

6.6 Zusammenhänge zwischen Indoxylsulfat und kardialer Fibrose

In vielen Studien konnten die Zusammenhänge von Indoxylsulfat und kardialer Fibrose belegt werden [75,118]. Lekawanvijit et. al beschrieben eine konzentrationsabhängige Expressionszunahme von Kollagen in kardialen Fibroblasten nach 48-stündiger Behandlung mit Indoxylsulfat einer Konzentration von 3µmol/L bis 200µmol/L [75]. Bei Nierengesunden scheint die pro-fibrotische Wirkung von IS keine Rolle zu spielen, da die IS Konzentration lediglich zwischen 0,1-2,39µmol/L [75] liegt. Savira et. al konnten bei einer Indoxylsulfat Konzentration von 10µmol/L eine erhöhte TGF-β und CTGF Expression in kardialen Fibroblasten feststellen [118]. Aufgrund dieser Arbeiten legten wir die von uns genutzte IS-Konzentrationen auf 0,1µmol/L -100µmol/L fest. Ein Effekt von Indoxylsulfat auf die Kollagen, CTGF und TGF-β Protein und mRNA-Expression in kardialen Fibroblasten konnte nach 24-stündiger Behandlung in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Dies ist konträr zu den Ergebnissen von Lekawanvijit et. al und von Savira et. al, wobei in diesen Studien der Effekt auf die Kollagenexpression erst nach 48h gezeigt wurde [75,118]. Ein weiterer Unterschied besteht in der Methodik, wobei die Messung der Kollagensynthese in den vorherigen Studien durch den Einbau von 3-H Prolin durchgeführt wurde und in dieser Arbeit mittels Western Blot Analyse [75,118].

Es fehlen bisher Studien, die die Wirkung einer Indoxylsulfat Behandlung von Kardiomyozyten auf die Fibrosemarker TGF-β und CTGF beschreiben. Lediglich für HK-2 Zellen ist eine erhöhte Expression von TGF-β nach 18-stündiger Behandlung mit Indoxylsulfat 10µmol/L nachgewiesen worden [118]. Im Zuge dieser Doktorarbeit konnte eine erhöhte TGF-β Expression bei Behandlung von Kardiomyozyten mit 100µmol/L Indoxylsulfat gezeigt werden. Dieser Effekt war aber im Vergleich zur Behandlung mit Dialyseseren nur gering ausgeprägt.

Zusammenfassend konnte in unseren Experimenten mit IS keine Effekte für die Behandlung von Kardiofibroblasten detektiert werden. In Kardiomyozyten konnte im Vergleich zum Dialyseserum nur ein geringer Effekt erhoben werden. Mutmaßlich ist Indoxylsulfat zumindest nicht allein, oder nur teilweise bei den in dieser Arbeit gezeigten Effekte von Dialyseserum auf

die Fibrosemarker und die Kollagenbildung beteiligt. Wobei zu beachten ist, dass in verschiedenen Studien die mediane Serum Konzentration von IS bei Patienten mit fortgeschrittener Niereninsuffizienz stark variierte, es wurden Konzentrationen von 40µmol/L - 500µmol/L beschrieben [95]. Die IS-Konzentration wurde in den von uns genutzten Dialyseseren nicht gemessen. Also könnte IS in den Dialyseseren, die hier genutzte maximale Konzentration von 100µmol/L überschritten haben. In dieser Arbeit wurde nicht gezeigt, ob IS von den Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten aufgenommen wurde, oder ob die Bindung an Rezeptoren an der Zellwand entscheidend ist. Auch *in vivo* sind Effekte von Indoxylsulfat auf kardiale Fibrose beschrieben. In einem 5/6 Nephrektomiemodell konnte eine kardiale Fibrosierung mit Indoxylsulfat über den TGF-β Signalweg in Verbindung gebracht werden [76].

Aktuell sind 160 Urämietoxine bekannt [32,95,134], neben IS, wurde für PCS, als einziges weiteres Protein gebundenes Urämie Toxin [75,84] eine kardiale pro-fibrotische Wirkung gezeigt [118]. Auch für die mittel großen Moleküle wie FDF 23 und PTH sind pro-fibrotische Wirkungen bekannt [3,49]. Ziele für weitere Arbeiten könnten sein, die Wirkungen weiterer Urämietoxine und auch die Kombination dieser auf die kardiale Fibrose zu untersuchen.

6.7 Einschränkungen:

Unser Zellmodell wurde aus neonatalen Ratten gewonnen. Es ist jedoch belegt, dass neonatale Herzzellen im Gegensatz zu erwachsenen Herzzellen einen unterschiedlichen Metabolismus [33] und unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften [139] besitzen. Wohingegen ein identischer TGF-Phänotyp besteht [50,129,134,141]. Zudem wurde dieses Zellkulturmodell schon in vielen vorherigen Studien [75,135] genutzt, um die Auswirkung des kardioresenalen Syndroms auf die kardiale Fibrose zu beschreiben. Ein *in vitro* Modell kann, wie auch schon in anderen Studien kritisiert, nicht die Komplexität des kardioresenales Syndroms darstellen [75]. Weiterhin ist bekannt, dass der Gehalt an Urämietoxinen in Dialysepatienten stark schwankt [95], wobei die IS Konzentration und die Konzentration anderer Urämietoxine, in den von uns verwendeten Dialyseseren nicht gemessen wurde. In dieser Arbeit konnte die pro-fibrotische Wirkung des Dialyseserums nicht allein durch IS erklärt werden, andere wurden hier nicht berücksichtigt.

Diskutiert werden muss, dass die Einflussfaktoren von kardialen Fibroblasten zahlreich sind. So reagieren kardiale Fibroblasten auf sehr verschiedene Stimuli, neben Zytokinen (TGF-alpha, IL-1, IL6, TGF-β etc.) auch auf Hormone (wie natriuretische Peptide, Ang II, Endothelin-1, Noradrenalin etc.), aber auch auf mechanische Dehnung und unterschiedlichen Sauerstoffgehalt [12,48,54,73,83,103,114,132,138]. Auch auf einige Faktoren, die schon in Zusammenhang mit einer pro-fibrotischen Wirkung im kardioresenalen Syndrom stehen, wurde

nicht eingegangen. So ist Angiotensin II (Ang II), ein Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems (RAAS) [104], für seine pro-fibrotische Wirkung bekannt und vermittelt diese unter anderem über TGF- β [101]. Ang II kann die Expression von Endothelin-1 in der Niere erhöhen [8], welches ebenfalls pro-fibrotische Wirkungen hat [101]. Dies ist ein wichtiger Ansatz, welcher in weiteren Arbeiten untersucht werden sollte. Entzündungsmediatoren wie TNF- α , IL-1 und IL-6 wurden nicht berücksichtigt. Es steht fest, dass entzündungsfördernde Biomarker in Patienten mit CKD erhöht sind, was vor allem über das RAAS und das sympathische Nervensystem vermittelt wird. Die proinflammatorischen Mediatoren können zu einer Gewebeschädigung der Niere und des Herzens beitragen und zu Fibrose führen [72]. Parameter, die die beschriebene Fibrose bei Behandlung mit Dialyseseren erklären sind zahlreich. Um diese zu relativieren wäre es für zukünftige Arbeiten sinnvoll diese Parameter zu messen.

6.8 Zusammenfassungen der Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Dialyseseren zu einer vermehrten Proteinexpression der Fibrosemarker TGF- β und CTGF in Kardiomyozyten und zu einer vermehrten Kollagenexpression in kardialen Fibroblasten führt. Weiterhin wurde eine Erhöhung der Genexpression von BNP und RyR 2 bei Behandlung mit Dialyseserum beobachtet. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die profibrotischen Wirkungen von Dialyseseren und arrhythmischer Stimulation noch stärker ausgeprägt ist als die Behandlung mit Dialyseserum und rhythmischer Stimulation. Auf Proteinebene wurde eine Vermehrte TGF- β Expression in Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten, sowie eine erhöhte Kollagenbildung in Kardiofibroblasten nachgewiesen. Auf mRNA-Ebene konnte eine Verminderung der TGF- β mRNA-Expression bei arrhythmischer Stimulation und Dialyseserumbehandlung im Vergleich zur rhythmisch stimulierten Kontrolle gezeigt werden. Das Urämietoxin Indoxylsulfat, welches für seine profibrotische Wirkung bekannt ist [75], zeigte nach 24h lediglich bei 100 μ mol/L geringe Auswirkungen auf die TGF- β Proteinexpression in Kardiomyozyten und keine Auswirkungen den Fibrosemarker CTGF, sowie auf die Kollagenexpression in Kardiofibroblasten. Alle der oben genannten Ergebnisse sind ohne signifikante Veränderung auf die Lebensfähigkeit der Kardiomyozyten aufgetreten, was durch ein Apoptose-, Nekrose-FACS gemessen wurde. Der Mechanismus, welcher der erhöhten Expression von Kollagen in Kardiofibroblasten zu Grunde liegt, kann über eine Induktion durch Kardiomyozyten begründet werden. Diese exprimieren pro-fibrotische Mediatoren, wie TGF- β und CTGF, welche parakrin auf die Kardiofibroblasten wirken und damit zu einer erhöhten Kollagenexpression führen.

7. Literaturverzeichnis

1. Adijiang A, Shimizu H, Higuchi Y, Nishijima F, Niwa T (2011) Indoxyl sulfate reduces klotho expression and promotes senescence in the kidneys of hypertensive rats. *J Ren Nutr Off J Counc Ren Nutr Natl Kidney Found* 21:105–109
2. Almeras C, Argilés A (2009) The general picture of uremia. *Semin Dial* 22:329–333
3. Amann K, Ritz E, Wiest G, Klaus G, Mall G (1994) A role of parathyroid hormone for the activation of cardiac fibroblasts in uremia. *J Am Soc Nephrol JASN* 4:1814–1819
4. Ando K, Ohtsu H, Arakawa Y, Kubota K, Yamaguchi T, Nagase M, Yamada A, Fujita T, Eplerenone combination Versus conventional Agents to Lower blood pressure on Urinary Antialbuminuric Treatment Effect Study Investigators (2010) Rationale and design of the Eplerenone combination Versus conventional Agents to Lower blood pressure on Urinary Antialbuminuric Treatment Effect (EVALUATE) trial: a double-blinded randomized placebo-controlled trial to evaluate the antialbuminuric effects of an aldosterone blocker in hypertensive patients with albuminuria. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens* 33:616–621
5. Aronov PA, Luo FJ-G, Plummer NS, Quan Z, Holmes S, Hostetter TH, Meyer TW (2011) Colonic contribution to uremic solutes. *J Am Soc Nephrol JASN* 22:1769–1776
6. Attisano L, Wrana JL (1996) Signal transduction by members of the transforming growth factor-beta superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 7:327–339
7. Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA (2006) Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Ann N Y Acad Sci* 1080:76–84
8. Barton M, Shaw S, d’Uscio LV, Moreau P, Lüscher TF (1997) Angiotensin II increases vascular and renal endothelin-1 and functional endothelin converting enzyme activity in vivo: role of ETA receptors for endothelin regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 238:861–865
9. Bianchi S, Bigazzi R, Campese VM (2006) Long-term effects of spironolactone on proteinuria and kidney function in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 70:2116–2123
10. Border WA, Ruoslahti E (1992) Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest* 90:1–7

11. Borer JS, Truter S, Herrold EM, Falcone DJ, Pena M, Carter JN, Dumlaio TF, Lee JA, Supino PG (2002) Myocardial fibrosis in chronic aortic regurgitation: molecular and cellular responses to volume overload. *Circulation* 105:1837–1842
12. Bouzeghrane F, Thibault G (2002) Is angiotensin II a proliferative factor of cardiac fibroblasts? *Cardiovasc Res* 53:304–312
13. Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR (1991) Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114:1285–1294
14. Calkins H, Kuck KH, Cappato R, Brugada J, Camm AJ, Chen S-A, Crijns HJG, Damiano RJ, Davies DW, DiMarco J, Edgerton J, Ellenbogen K, Ezekowitz MD, Haines DE, Haissaguerre M, Hindricks G, Iesaka Y, Jackman W, Jalife J, Jais P, Kalman J, Keane D, Kim Y-H, Kirchhof P, Klein G, Kottkamp H, Kumagai K, Lindsay BD, Mansour M, Marchlinski FE, McCarthy PM, Mont JL, Morady F, Nademanee K, Nakagawa H, Natale A, Nattel S, Packer DL, Pappone C, Prystowsky E, Raviele A, Reddy V, Ruskin JN, Shemin RJ, Tsao H-M, Wilber D (2012) 2012 HRS/EHRA/ECAS Expert Consensus Statement on Catheter and Surgical Ablation of Atrial Fibrillation: Recommendations for Patient Selection, Procedural Techniques, Patient Management and Follow-up, Definitions, Endpoints, and Research Trial Design. *Heart Rhythm* 9:632-696.e21
15. Capodanno D, Angiolillo DJ (2012) Antithrombotic therapy in patients with chronic kidney disease. *Circulation* 125:2649–2661
16. Chan CT, Levin NW, Chertow GM, Larive B, Schulman G, Kotanko P, Frequent Hemodialysis Network Daily Trial Group (2010) Determinants of cardiac autonomic dysfunction in ESRD. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 5:1821–1827
17. Chen W-T, Chen Y-C, Hsieh M-H, Huang S-Y, Kao Y-H, Chen Y-A, Lin Y-K, Chen S-A, Chen Y-J (2015) The uremic toxin indoxyl sulfate increases pulmonary vein and atrial arrhythmogenesis. *J Cardiovasc Electrophysiol* 26:203–210
18. Chilton L, Giles WR, Smith GL (2007) Evidence of intercellular coupling between co-cultured adult rabbit ventricular myocytes and myofibroblasts. *J Physiol* 583:225–236
19. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim Y-H, McAnulty JH, Zheng Z-J, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJL (2014) Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation* 129:837–847

20. Clark RA (1985) Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. I. *J Am Acad Dermatol* 13:701–725
21. Coelho NM, McCulloch CA (2016) Contribution of collagen adhesion receptors to tissue fibrosis. *Cell Tissue Res* 365:521–538
22. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Levey AS (2007) Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 298:2038–2047
23. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G (1993) Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 122:103–111
24. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association (EHRA), Endorsed by the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS), Authors/Task Force Members, Camm AJ, Kirchhof P, Lip GYH, Schotten U, Savelieva I, Ernst S, Van Gelder IC, Al-Attar N, Hindricks G, Prendergast B, Heidbuchel H, Alfieri O, Angelini A, Atar D, Colonna P, De Caterina R, De Sutter J, Goette A, Gorenek B, Heldal M, Hohloser SH, Kolh P, Le Heuzey J-Y, Ponikowski P, Rutten FH, ESC Committee for Practice Guidelines (CPG), Vahanian A, Auricchio A, Bax J, Ceconi C, Dean V, Filippatos G, Funck-Brentano C, Hobbs R, Kearney P, McDonagh T, Popescu BA, Reiner Z, Sechtem U, Sirnes PA, Tendera M, Vardas PE, Widimsky P, Document Reviewers, Vardas PE, Agladze V, Aliot E, Balabanski T, Blomstrom-Lundqvist C, Capucci A, Crijns H, Dahlof B, Folliguet T, Glikson M, Goethals M, Gulba DC, Ho SY, Klautz RJM, Kose S, McMurray J, Perrone Filardi P, Raatikainen P, Salvador MJ, Schalij MJ, Shpektor A, Sousa J, Stepinska J, Uuetoa H, Zamorano JL, Zupan I (2010) Guidelines for the management of atrial fibrillation: The Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 31:2369–2429
25. Dhondt A, Vanholder R, Van Biesen W, Lameire N (2000) The removal of uremic toxins. *Kidney Int Suppl* 76:S47-59
26. Di Lullo L, House A, Gorini A, Santoboni A, Russo D, Ronco C (2015) Chronic kidney disease and cardiovascular complications. *Heart Fail Rev* 20:259–272
27. Di Lullo L, Gorini A, Russo D, Santoboni A, Ronco C (2015) Left Ventricular Hypertrophy in Chronic Kidney Disease Patients: From Pathophysiology to Treatment. *Cardiorenal Med* 5:254–266

28. Di Lullo L, Ronco C, Cozzolino M, Russo D, Russo L, Di Iorio B, De Pascalis A, Barbera V, Galliani M, Vitaliano E, Campana C, Santoboni F, Bellasi A (2017) Nonvitamin K-dependent oral anticoagulants (NOACs) in chronic kidney disease patients with atrial fibrillation. *Thromb Res* 155:38–47
29. Ding Z, Yuan J, Liang Y, Wu J, Gong H, Ye Y, Jiang G, Yin P, Li Y, Zhang G, Yang C, Guo J, Chen Z, Wang X, Weng L, Zou Y (2017) Ryanodine Receptor Type 2 Plays a Role in the Development of Cardiac Fibrosis under Mechanical Stretch Through TGFβ-1. *Int Heart J* 58:957–961
30. Dobrev D, Nattel S (2010) New antiarrhythmic drugs for treatment of atrial fibrillation. *Lancet Lond Engl* 375:1212–1223
31. Drüeke T, Le Pailleur C (1986) Cardiomyopathy in patients on maintenance haemodialysis. *Contrib Nephrol* 52:27–33
32. Duranton F, Cohen G, De Smet R, Rodriguez M, Jankowski J, Vanholder R, Argiles A, European Uremic Toxin Work Group (2012) Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol JASN* 23:1258–1270
33. Ehler E, Moore-Morris T, Lange S (2013) Isolation and culture of neonatal mouse cardiomyocytes. *J Vis Exp JoVE*
34. Ellis RJ, Small DM, Vesey DA, Johnson DW, Francis R, Vitetta L, Gobe GC, Morais C (2016) Indoxyl sulphate and kidney disease: Causes, consequences and interventions. *Nephrol Carlton Vic* 21:170–177
35. Epstein M, Williams GH, Weinberger M, Lewin A, Krause S, Mukherjee R, Patni R, Beckerman B (2006) Selective aldosterone blockade with eplerenone reduces albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Clin J Am Soc Nephrol CJASN* 1:940–951
36. Ferrario CM, Strawn WB (2006) Role of the renin-angiotensin-aldosterone system and proinflammatory mediators in cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 98:121–128
37. Ferraro PM, Bonello M, Gambaro A, Sturniolo A, Gambaro G (2011) Age- and sex-tailored serum phosphate thresholds do not improve cardiovascular risk estimation in CKD. *J Nephrol* 24:446–452
38. Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR (1996) Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 107:404–411

39. Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S (2013) Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Sci Transl Med* 5:167sr1
40. Frieler RA, Mortensen RM (2015) Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation* 131:1019–1030
41. Fujii H, Nishijima F, Goto S, Sugano M, Yamato H, Kitazawa R, Kitazawa S, Fukagawa M (2009) Oral charcoal adsorbent (AST-120) prevents progression of cardiac damage in chronic kidney disease through suppression of oxidative stress. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 24:2089–2095
42. Fuster V, Rydén LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Kay GN, Le Huez J-Y, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann LS (2011) 2011 ACCF/AHA/HRS Focused Updates Incorporated Into the ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation. *J Am Coll Cardiol* 57:e101–e198
43. Gao H, Liu S (2017) Role of uremic toxin indoxyl sulfate in the progression of cardiovascular disease. *Life Sci* 185:23–29
44. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C (2004) Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351:1296–1305
45. Goto I, Okamoto R, Hashizume R, Suzuki N, Ito R, Yamanaka K, Saito H, Kiyonari H, Tawara I, Kageyama Y, Ogihara Y, Ali Y, Yamada N, Katayama N, Ito M (2018) Renal papillary tip extract stimulates BNP production and excretion from cardiomyocytes. *PLoS One* 13:e0197078
46. Gravning J, Ahmed MS, von Lueder TG, Edvardsen T, Attramadal H (2013) CCN2/CTGF attenuates myocardial hypertrophy and cardiac dysfunction upon chronic pressure-overload. *Int J Cardiol* 168:2049–2056
47. Grolhier G, Hurault de Ligny B, Bonnet H, Scanu P, Potier JC (1990) [So-called uremic heart diseases]. *Arch Mal Coeur Vaiss* 83:401–406
48. Gupta V, Grande-Allen KJ (2006) Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovasc Res* 72:375–383

49. Hao H, Li X, Li Q, Lin H, Chen Z, Xie J, Xuan W, Liao W, Bin J, Huang X, Kitakaze M, Liao Y (2016) FGF23 promotes myocardial fibrosis in mice through activation of β -catenin. *Oncotarget* 7:64649–64664
50. Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC (1997) Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 29:2873–2892
51. Heywood JT, Fonarow GC, Costanzo MR, Mathur VS, Wigneswaran JR, Wynne J, ADHERE Scientific Advisory Committee and Investigators (2007) High prevalence of renal dysfunction and its impact on outcome in 118,465 patients hospitalized with acute decompensated heart failure: a report from the ADHERE database. *J Card Fail* 13:422–430
52. Hsu C, Vittinghoff E, Lin F, Shlipak MG (2004) The incidence of end-stage renal disease is increasing faster than the prevalence of chronic renal insufficiency. *Ann Intern Med* 141:95–101
53. Hung S-C, Kuo K-L, Wu C-C, Tarng D-C (2017) Indoxyl Sulfate: A Novel Cardiovascular Risk Factor in Chronic Kidney Disease. *J Am Heart Assoc* 6:
54. Huntley BK, Sandberg SM, Noser JA, Cataliotti A, Redfield MM, Matsuda Y, Burnett JC (2006) BNP-induced activation of cGMP in human cardiac fibroblasts: interactions with fibronectin and natriuretic peptide receptors. *J Cell Physiol* 209:943–949
55. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR (1993) Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4:637–645
56. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR, Takehara K (1995) Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 105:280–284
57. Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, Grotendorst GR, Takehara K (1996) Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* 106:729–733
58. Ihn H (2002) Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* 14:681–685

-
59. Inker LA, Grams ME, Levey AS, Coresh J, Cirillo M, Collins JF, Gansevoort RT, Gutierrez OM, Hamano T, Heine GH, Ishikawa S, Jee SH, Kronenberg F, Landray MJ, Miura K, Nadkarni GN, Peralta CA, Rothenbacher D, Schaeffner E, Sedaghat S, Shlipak MG, Zhang L, van Zuilen AD, Hallan SI, Kovesdy CP, Woodward M, Levin A, CKD Prognosis Consortium (2019) Relationship of Estimated GFR and Albuminuria to Concurrent Laboratory Abnormalities: An Individual Participant Data Meta-analysis in a Global Consortium. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 73:206–217
 60. Iwasaki Y, Nishida K, Kato T, Nattel S (2011) Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management. *Circulation* 124:2264–2274
 61. Jain M, Jakubowski A, Cui L, Shi J, Su L, Bauer M, Guan J, Lim CC, Naito Y, Thompson JS, Sam F, Ambrose C, Parr M, Crowell T, Lincecum JM, Wang MZ, Hsu Y-M, Zheng TS, Michaelson JS, Liao R, Burkly LC (2009) A novel role for tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK) in the development of cardiac dysfunction and failure. *Circulation* 119:2058–2068
 62. Jalife J, Kaur K (2015) Atrial remodeling, fibrosis, and atrial fibrillation. *Trends Cardiovasc Med* 25:475–484
 63. January CT, Wann LS, Alpert JS, Calkins H, Cigarroa JE, Cleveland JC, Conti JB, Ellinor PT, Ezekowitz MD, Field ME, Murray KT, Sacco RL, Stevenson WG, Tchou PJ, Tracy CM, Yancy CW, ACC/AHA Task Force Members (2014) 2014 AHA/ACC/HRS guideline for the management of patients with atrial fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 130:e199-267
 64. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, Saran R, Wang AY-M, Yang C-W (2013) Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet Lond Engl* 382:260–272
 65. Kajstura J, Cigola E, Malhotra A, Li P, Cheng W, Meggs LG, Anversa P (1997) Angiotensin II induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol* 29:859–870
 66. Kamo T, Akazawa H, Komuro I (2015) Cardiac nonmyocytes in the hub of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 117:89–98
 67. Kaur K, Jalife J (2017) Is TGF- β 1 (Transforming Growth Factor- β 1) an Enabler of Myofibroblast-Cardiomyocyte Cross Talk? *Circ Arrhythm Electrophysiol* 10:e005289

68. Kawano H, Do YS, Kawano Y, Starnes V, Barr M, Law RE, Hsueh WA (2000) Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation* 101:1130–1137
69. Kennedy DJ, Malhotra D, Shapiro JI (2006) Molecular insights into uremic cardiomyopathy: cardiotonic steroids and Na/K ATPase signaling. *Cell Mol Biol Noisy--Gd Fr* 52:3–14
70. Kong P, Christia P, Frangogiannis NG (2014) The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Life Sci CMLS* 71:549–574
71. Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, Lip GYH, Franco OH, Hofman A, Witteman JCM, Stricker BH, Heeringa J (2013) Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J* 34:2746–2751
72. Kumar U, Wettersten N, Garimella PS (2019) Cardiorenal Syndrome: Pathophysiology. *Cardiol Clin* 37:251–265
73. Kuruvilla L, Nair RR, Umashankar PR, Lal AV, Kartha CC (2007) Endocardial endothelial cells stimulate proliferation and collagen synthesis of cardiac fibroblasts. *Cell Biochem Biophys* 47:65–72
74. Kuwahara F, Kai H, Tokuda K, Kai M, Takeshita A, Egashira K, Imaizumi T (2002) Transforming growth factor-beta function blocking prevents myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in pressure-overloaded rats. *Circulation* 106:130–135
75. Lekawanvijit S, Adrahtas A, Kelly DJ, Kompa AR, Wang BH, Krum H (2010) Does indoxyl sulfate, a uraemic toxin, have direct effects on cardiac fibroblasts and myocytes? *Eur Heart J* 31:1771–1779
76. 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:e41281
77. Lekawanvijit S, Kompa AR, Wang BH, Kelly DJ, Krum H (2012) Cardiorenal syndrome: the emerging role of protein-bound uremic toxins. *Circ Res* 111:1470–1483
78. Lekawanvijit S, Krum H (2014) Cardiorenal syndrome: acute kidney injury secondary to cardiovascular disease and role of protein-bound uraemic toxins. *J Physiol* 592:3969–3983

79. Lekawanvijit S (2018) Cardiotoxicity of Uremic Toxins: A Driver of Cardiorenal Syndrome. *Toxins* 10:
80. Leong SC, Sirich TL (2016) Indoxyl Sulfate-Review of Toxicity and Therapeutic Strategies. *Toxins* 8:
81. Levin A, Singer J, Thompson CR, Ross H, Lewis M (1996) Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population: identifying opportunities for intervention. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 27:347–354
82. Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6:463–477
83. Li PF, Dietz R, von Harsdorf R (1999) Superoxide induces apoptosis in cardiomyocytes, but proliferation and expression of transforming growth factor-beta1 in cardiac fibroblasts. *FEBS Lett* 448:206–210
84. Lin C-J, Wu V, Wu P-C, Wu C-J (2015) Meta-Analysis of the Associations of p-Cresyl Sulfate (PCS) and Indoxyl Sulfate (IS) with Cardiovascular Events and All-Cause Mortality in Patients with Chronic Renal Failure. *PloS One* 10:e0132589
85. Liu S, Kompa AR, Kumfu S, Nishijima F, Kelly DJ, Krum H, Wang BH (2013) Subtotal nephrectomy accelerates pathological cardiac remodeling post-myocardial infarction: Implications for cardiorenal syndrome. *Int J Cardiol* 168:1866–1880
86. London GM, Fabiani F, Marchais SJ, de Vernejoul MC, Guerin AP, Safar ME, Metivier F, Llach F (1987) Uremic cardiomyopathy: an inadequate left ventricular hypertrophy. *Kidney Int* 31:973–980
87. Ma Z-G, Yuan Y-P, Wu H-M, Zhang X, Tang Q-Z (2018) Cardiac fibrosis: new insights into the pathogenesis. *Int J Biol Sci* 14:1645–1657
88. Maisel AS, Katz N, Hillege HL, Shaw A, Zanco P, Bellomo R, Anand I, Anker SD, Aspromonte N, Bagshaw SM, Berl T, Bobek I, Cruz DN, Daliento L, Davenport A, Haapio M, House AA, Mankad S, McCullough P, Mebazaa A, Palazzuoli A, Ponikowski P, Ronco F, Sheinfeld G, Soni S, Vescovo G, Zamperetti N, Ronco C, Acute Dialysis Quality Initiative consensus group (2011) Biomarkers in kidney and heart disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 26:62–74

89. Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, Friedman EA, Kaufman AM, Korbet SM, Barth RH, Winston JA, Fuh H, Manogue KR (1994) Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure. *Lancet Lond Engl* 343:1519–1522
90. Manabe I, Shindo T, Nagai R (2002) Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res* 91:1103–1113
91. Marshall RP, Simpson JK, Lukey PT (2013) Strategies for biomarker discovery in fibrotic disease. *Biochim Biophys Acta* 1832:1079–1087
92. Martin FL, McKie PM, Cataliotti A, Sangaralingham SJ, Korinek J, Huntley BK, Oehler EA, Harders GE, Ichiki T, Mangiafico S, Nath KA, Redfield MM, Chen HH, Burnett JC (2012) Experimental mild renal insufficiency mediates early cardiac apoptosis, fibrosis, and diastolic dysfunction: a kidney-heart connection. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302:R292-299
93. Massague J (1990) The Transforming Growth Factor-beta Family. *Annu Rev Cell Biol* 6:597–641
94. Meert N, Schepers E, De Smet R, Argiles A, Cohen G, Deppisch R, Drüeke T, Massy Z, Spasovski G, Stegmayr B, Zidek W, Jankowski J, Vanholder R (2007) Inconsistency of reported uremic toxin concentrations. *Artif Organs* 31:600–611
95. Meert N, Schepers E, De Smet R, Argiles A, Cohen G, Deppisch R, Drüeke T, Massy Z, Spasovski G, Stegmayr B, Zidek W, Jankowski J, Vanholder R (2007) Inconsistency of reported uremic toxin concentrations. *Artif Organs* 31:600–611
96. Meert N, Eloot S, Waterloos M-A, Van Landschoot M, Dhondt A, Glorieux G, Ledebou I, Vanholder R (2009) Effective removal of protein-bound uraemic solutes by different convective strategies: a prospective trial. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 24:562–570
97. Meyer TW, Hostetter TH (2014) Approaches to uremia. *J Am Soc Nephrol JASN* 25:2151–2158
98. Miyazaki T, Ise M, Seo H, Niwa T (1997) Indoxyl sulfate increases the gene expressions of TGF-beta 1, TIMP-1 and pro-alpha 1(I) collagen in uremic rat kidneys. *Kidney Int Suppl* 62:S15-22

99. Monteiro AN, Borojevic R (1995) Complement-dependent induction of DNA synthesis and cell proliferation in human liver connective tissue cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31:149–155
100. Nanthakumar CB, Hatley RJD, Lemma S, Gauldie J, Marshall RP, Macdonald SJF (2015) Dissecting fibrosis: therapeutic insights from the small-molecule toolbox. *Nat Rev Drug Discov* 14:693–720
101. Neuhofer W, Pittrow D (2006) Role of endothelin and endothelin receptor antagonists in renal disease. *Eur J Clin Invest* 36 Suppl 3:78–88
102. Nguyen TP, Qu Z, Weiss JN (2014) Cardiac fibrosis and arrhythmogenesis: the road to repair is paved with perils. *J Mol Cell Cardiol* 70:83–91
103. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P (2004) Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 94:1543–1553
104. Nik-Akhtar B, Khonsari H, Hesabi A, Khakpour M (1978) Uremic cardiomyopathy in hemodialysis patients. *Angiology* 29:758–763
105. Niwa T, Takeda N, Tatematsu A, Maeda K (1988) Accumulation of indoxyl sulfate, an inhibitor of drug-binding, in uremic serum as demonstrated by internal-surface reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem* 34:2264–2267
106. Niwa T, Ise M (1994) Indoxyl sulfate, a circulating uremic toxin, stimulates the progression of glomerular sclerosis. *J Lab Clin Med* 124:96–104
107. Ogawa Y, Tamura N, Chusho H, Nakao K (2001) Brain natriuretic peptide appears to act locally as an antifibrotic factor in the heart. *Can J Physiol Pharmacol* 79:723–729
108. Olesen JB, Lip GYH, Kamper A-L, Hommel K, Køber L, Lane DA, Lindhardsen J, Gislason GH, Torp-Pedersen C (2012) Stroke and Bleeding in Atrial Fibrillation with Chronic Kidney Disease. *N Engl J Med* 367:625–635
109. Parfrey PS, Harnett JD, Griffiths SM, Taylor R, Hand J, King A, Barre PE (1990) The clinical course of left ventricular hypertrophy in dialysis patients. *Nephron* 55:114–120
110. Parfrey PS, Foley RN, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, Barre PE (1996) Outcome and risk factors for left ventricular disorders in chronic uraemia. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 11:1277–1285

111. Patel PC, Ayers CR, Murphy SA, Peshock R, Khera A, de Lemos JA, Balko JA, Gupta S, Mammen PPA, Drazner MH, Markham DW (2009) Association of Cystatin C With Left Ventricular Structure and Function: The Dallas Heart Study. *Circ Heart Fail* 2:98–104
112. Peters J Body Water: the exchange of fluids in man.
113. Plantinga LC, Boulware LE, Coresh J, Stevens LA, Miller ER, Saran R, Messer KL, Levey AS, Powe NR (2008) Patient awareness of chronic kidney disease: trends and predictors. *Arch Intern Med* 168:2268–2275
114. Porter KE, Turner NA (2009) Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther* 123:255–278
115. Ronco C (2011) The Cardiorenal Syndrome: Basis and Common Ground for a Multidisciplinary Patient-Oriented Therapy. *Cardiorenal Med* 1:3–4
116. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S (1993) Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 75:977–984
117. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW, American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention (2003) Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 108:2154–2169
118. Savira F, Cao L, Wang I, Yang W, Huang K, Hua Y, Jucker BM, Willette RN, Huang L, Krum H, Li Z, Fu Q, Wang BH (2017) Apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibition attenuates cardiac hypertrophy and cardiorenal fibrosis induced by uremic toxins: Implications for cardiorenal syndrome. *PLoS One* 12:e0187459
119. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE (2007) Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 116:85–97
120. Schiller M, Javelaud D, Mauviel A (2004) TGF-beta-induced SMAD signaling and gene regulation: consequences for extracellular matrix remodeling and wound healing. *J Dermatol Sci* 35:83–92

121. Slawik J, Adrian L, Hohl M, Lothschütz S, Laufs U, Böhm M (2019) Irregular pacing of ventricular cardiomyocytes induces pro-fibrotic signalling involving paracrine effects of transforming growth factor beta and connective tissue growth factor. *Eur J Heart Fail* 21:482–491
122. Soliman EZ, Prineas RJ, Go AS, Xie D, Lash JP, Rahman M, Ojo A, Teal VL, Jensvold NG, Robinson NL, Dries DL, Bazzano L, Mohler ER, Wright JT, Feldman HI, Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC) Study Group (2010) Chronic kidney disease and prevalent atrial fibrillation: the Chronic Renal Insufficiency Cohort (CRIC). *Am Heart J* 159:1102–1107
123. Soltis RD, Hasz D, Morris MJ, Wilson ID (1979) The effect of heat inactivation of serum on aggregation of immunoglobulins. *Immunology* 36:37–45
124. Stanfel LA, Gulyassy PF, Jarrard EA (1986) Determination of indoxyl sulfate in plasma of patients with renal failure by use of ion-pairing liquid chromatography. *Clin Chem* 32:938–942
125. Sun C-Y, Chang S-C, Wu M-S (2012) Uremic toxins induce kidney fibrosis by activating intrarenal renin-angiotensin-aldosterone system associated epithelial-to-mesenchymal transition. *PloS One* 7:e34026
126. Takemura G, Maruyama R, Goto K, Kanamori H, Tsujimoto A, Minatoguchi S, Fujiwara H (2009) Fate of isolated adult cardiomyocytes undergoing starvation-induced autophagic degeneration. *Autophagy* 5:90–92
127. Tang W-H, Wang C-P, Chung F-M, Huang LLH, Yu T-H, Hung W-C, Lu L-F, Chen P-Y, Luo C-H, Lee K-T, Lee Y-J, Lai W-T (2015) Uremic retention solute indoxyl sulfate level is associated with prolonged QTc interval in early CKD patients. *PloS One* 10:e0119545
128. Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, Alcalai R, Wang L, Wakimoto H, Naylor M, Konno T, Gorham JM, Wolf CM, Kim JB, Schmitt JP, Molkentin JD, Norris RA, Tager AM, Hoffman SR, Markwald RR, Seidman CE, Seidman JG (2010) Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires Tgf- β . *J Clin Invest* 120:3520–3529
129. Thomas WG, Brandenburger Y, Autelitano DJ, Pham T, Qian H, Hannan RD (2002) Adenoviral-directed expression of the type 1A angiotensin receptor promotes cardiomyocyte hypertrophy via transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Circ Res* 90:135–142

130. Tsai Y-T, Lin F-Y, Lin C-S, Loh S-H, Li C-Y, Lin C-Y, Lin Y-W, Tsai C-S (2019) B-type natriuretic peptide enhances fibrotic effects via matrix metalloproteinase-2 expression in the mouse atrium in vivo and in human atrial myofibroblasts in vitro. *Transl Res J Lab Clin Med* 208:30–46
131. Tumlin JA, Costanzo MR, Chawla LS, Herzog CA, Kellum JA, McCullough PA, Ronco C (2013) Cardiorenal syndrome type 4: insights on clinical presentation and pathophysiology from the eleventh consensus conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI). *Contrib Nephrol* 182:158–173
132. Turner NA, Porter KE, Smith WHT, White HL, Ball SG, Balmforth AJ (2003) Chronic beta2-adrenergic receptor stimulation increases proliferation of human cardiac fibroblasts via an autocrine mechanism. *Cardiovasc Res* 57:784–792
133. Vanholder R, De Smet R, Lameire N (2001) Protein-bound uremic solutes: the forgotten toxins. *Kidney Int Suppl* 78:S266-270
134. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, De Deyn PP, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T, Jörres A, Lemke HD, Massy ZA, Passlick-Deetjen J, Rodriguez M, Stegmayr B, Stenvinkel P, Tetta C, Wanner C, Zidek W, European Uremic Toxin Work Group (EUTox) (2003) Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 63:1934–1943
135. Vanholder R, De Smet R, Glorieux G, Argilés A, Baurmeister U, Brunet P, Clark W, Cohen G, De Deyn PP, Deppisch R, Descamps-Latscha B, Henle T, Jörres A, Lemke HD, Massy ZA, Passlick-Deetjen J, Rodriguez M, Stegmayr B, Stenvinkel P, Tetta C, Wanner C, Zidek W, European Uremic Toxin Work Group (EUTox) (2003) Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int* 63:1934–1943
136. Vaziri ND, Zhao Y-Y, Pahl MV (2016) Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 31:737–746
137. Villarreal FJ, Dillmann WH (1992) Cardiac hypertrophy-induced changes in mRNA levels for TGF-beta 1, fibronectin, and collagen. *Am J Physiol* 262:H1861-1866

138. Wang Q, Oka T, Yamagami K, Lee J-K, Akazawa H, Naito AT, Yasui T, Ishizu T, Nakaoka Y, Sakata Y, Komuro I (2017) An EP4 Receptor Agonist Inhibits Cardiac Fibrosis Through Activation of PKA Signaling in Hypertrophied Heart. *Int Heart J* 58:107–114
139. Wang Y, Xu H, Kumar R, Tipparaju SM, Wagner MB, Joyner RW (2003) Differences in transient outward current properties between neonatal and adult human atrial myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 35:1083–1092
140. Wijesurendra RS, Casadei B (2019) Mechanisms of atrial fibrillation. *Heart Br Card Soc* 105:1860–1867
141. Woodcock EA, Wang BH, Arthur JF, Lennard A, Matkovich SJ, Du X-J, Brown JH, Hannan RD (2002) Inositol polyphosphate 1-phosphatase is a novel antihypertrophic factor. *J Biol Chem* 277:22734–22742
142. Wu I-W, Hsu K-H, Lee C-C, Sun C-Y, Hsu H-J, Tsai C-J, Tzen C-Y, Wang Y-C, Lin C-Y, Wu M-S (2011) p-Cresyl sulphate and indoxyl sulphate predict progression of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 26:938–947
143. Yang K, Wang C, Nie L, Zhao X, Gu J, Guan X, Wang S, Xiao T, Xu X, He T, Xia X, Wang J, Zhao J (2015) Klotho Protects Against Indoxyl Sulphate-Induced Myocardial Hypertrophy. *J Am Soc Nephrol JASN* 26:2434–2446
144. Zimmerman D, Sood MM, Rigatto C, Holden RM, Hiremath S, Clase CM (2012) Systematic review and meta-analysis of incidence, prevalence and outcomes of atrial fibrillation in patients on dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 27:3816–3822
145. (2013) Summary of Recommendation Statements. *Kidney Int Suppl* 3:5–14

8. Dank

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen Personen bedanken, die an der Anfertigung meiner Dissertation beteiligt waren.

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herr Prof. Dr. Böhm, der diese Dissertation möglich gemacht hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Hohl bedanken, der mich stets unterstützt hat und auch nach längerer Pause, die nötige Motivation und Ermutigung bereitstellte.

Für die gute Betreuung möchte ich mich bei Herr Dr. Adrian bedanken.

Ganz besonderer Dank geht an Ellen und Simone, welche mir allzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meinen Eltern danke ich für die Geduld während meines Studiums und meiner Dissertation.

9. Lebenslauf

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

Tag der Dissertation: 12.03.2026

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hanning

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Böhm

Prof. Dr. rer. Nat. Peter Lipp