

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg

microRNA-vermitteltes atriales Remodeling in einem  
Schweinemodell für paroxysmales Vorhofflimmern

**Dissertation**

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Philipp Tomsits**

aus Wien

2019



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Stefan Kääh
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Alexander Leber, FESC PD Dr. Nikolaus Sarafoff
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	28.03.2019



Die vorliegende Arbeit wurde von 2013 bis 2018 in der Medizinischen Klinik I des Klinikums Großhadern der Ludwig Maximilians Universität durchgeführt.

(Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Massberg)

Die Arbeit wurde betreut von Herrn Prof. Dr. med. Stefan Kääh

unter Mitarbeit von Herrn Prof. Dr. med. Reza Wakili und

Herrn Dr. med. Sebastian Clauß



## Danksagung

Danken möchte ich in erster Linie den Herren Prof. Dr. med. Stefan Kääh und Prof. Dr. med. Reza Wakili für das Öffnen der Türe in die Welt der Wissenschaft, die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, den steten Ansporn und die nötige Unterstützung und nicht zuletzt für die Überlassung dieser interessanten Themenstellung. Die Zeit seit Beginn dieser Arbeit war intensiv, fordernd und dennoch jeden Schritt wert. Bedanken möchte ich mich zudem für ihre Unterstützung meiner Bewerbung um ein DZHK-Promotionsstipendium, ohne diese wäre es nicht zu einer Förderung und damit nicht zu dieser Arbeit gekommen.

Danken möchte ich weiterhin Herrn Dr. med. Sebastian Clauß für die unermüdliche Unterstützung, die intensive Betreuung, die stete Ansprechbarkeit bei jeder noch so kleinen Fragestellung und die vielen guten Gespräche. Ohne diese Unterstützung wäre das Entstehen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ein besonderer Dank gilt ihm für die unglaublich produktive gemeinsame Zeit in Boston und die Begleitung in die Selbstständigkeit.

Ein besonderer Dank gilt zudem Bianca Hildebrand für die Einführung in die Laborarbeit. Dank der intensiven Schule, durch die ich gehen durfte, habe ich einen besonderen Blick auf Planung, Präzision und Ordnung gewonnen. Diese Fähigkeit ist es, die mir seitdem in jeder Planung und Durchführung eines Experiments viel Kummer erspart und die Erhebung von messfehlerfreien Daten ermöglicht.

Herrn Patrick T. Ellinor, MD, PhD möchte ich einen besonderen Dank aussprechen für die Möglichkeit einige Zeit in seinem Labor am Cardiovascular Research Center des MGH in Boston Massachusetts zu forschen und damit einen Einblick in die Forschung in Amerika zu erlangen.

Danken möchte ich zu guter Letzt insbesondere meinen Eltern, die mir das Tor zur Welt geöffnet haben, mir immer mit Rat und Tat zur Seite stehen, mich ermutigen und unterstützen und ohne die nichts von all dem je möglich gewesen wäre.



Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Teilen präsentiert:

**Tomsits P.**, Clauss S., Sattler S., Baloch E., Hinkel R., Kupatt C., Klier I., Lugenbiel P., Thomas D., Käab S., Wakili R. MiRNA-26a mediated arrhythmogenic atrial remodeling in ischemic heart failure over time. Heart Rhythm, Volume 13, Issue 5, Supplement, S1-S688, May 2016

Postervortrag im Rahmen der Jahrestagung der Amerikanischen Gesellschaft für Rhythmologie (Heart Rhythm Society (HRS), Scientific Sessions), San Francisco, USA, 2016.

**Tomsits P.**, Clauss S., Baloch E., Hinkel R., Lugenbiel P., Klier I., Sattler S., Schüßler-Hahn F., Kupatt C., Käab S., Thomas D., Wakili R. MiRNA-26a mediated arrhythmogenic atrial remodeling in ischemic heart failure over time. Clin Res Cardiol 105, Suppl 1, April 2016. P394.

Postervortrag im Rahmen der Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Mannheim, 2016.



# 1 Inhaltsverzeichnis

<b>Danksagung .....</b>	<b>7</b>
<b>1 Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>11</b>
<b>2 Zusammenfassung.....</b>	<b>15</b>
<b>3 Einleitung.....</b>	<b>17</b>
3.1 <i>Epidemiologie von Vorhofflimmern.....</i>	17
3.2 <i>Risikofaktoren von Vorhofflimmern .....</i>	17
3.3 <i>Klinik von Vorhofflimmern.....</i>	18
3.4 <i>Diagnostik von Vorhofflimmern .....</i>	19
3.5 <i>Therapie von Vorhofflimmern .....</i>	19
3.6 <i>Pathophysiologie von Vorhofflimmern.....</i>	21
3.6.1 <i>Das atriale Aktionspotential .....</i>	22
3.6.2 <i>Ektopie.....</i>	22
3.6.3 <i>Reentry .....</i>	24
3.7 <i>MicroRNA (miRNA) .....</i>	25
3.8 <i>In die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern involvierte miRNAs.....</i>	26
3.8.1 <i>miRNAs im elektrischen Remodeling.....</i>	26
3.8.1.1 <i>miR-1 .....</i>	27
3.8.1.2 <i>miR-26 .....</i>	27
3.8.1.3 <i>miR-106b-25 Cluster.....</i>	28
3.8.1.4 <i>miR-133 .....</i>	28
3.8.1.5 <i>miR-208 .....</i>	29
3.8.1.6 <i>miR-328 .....</i>	30
3.8.1.7 <i>miR-499 .....</i>	30
3.8.2 <i>miRNAs im strukturellen Remodeling.....</i>	30
3.8.2.1 <i>miR-21 .....</i>	31
3.8.2.2 <i>miR-26 .....</i>	32
3.8.2.3 <i>miR-29b .....</i>	32
3.8.2.4 <i>miR-30 .....</i>	33
3.8.2.5 <i>miR-133 .....</i>	33
3.8.2.6 <i>miR-499 .....</i>	33
3.8.2.7 <i>miR-590 .....</i>	33
3.8.3 <i>Fazit und Ausblick .....</i>	34
3.9 <i>Überblick über etablierte Tiermodelle des Vorhofflimmerns.....</i>	34
3.9.1 <i>Großtiermodelle des Vorhofflimmerns.....</i>	35

3.9.1.1	Tachypacing .....	35
3.9.1.2	Modelle des strukturellen Remodelings.....	36
3.9.1.2.1	Herzinsuffizienzmodelle .....	36
3.9.1.2.2	Mitralklappeninsuffizienz .....	36
3.9.1.2.3	AV-Block-Modell .....	37
3.9.1.2.4	Modell der sterilen Perikarditis .....	37
3.9.1.2.5	Modelle der Volumenbelastung .....	37
3.9.1.2.6	Arterielle Hypertonie .....	38
3.9.1.2.7	Weitere Modelle .....	38
3.9.2	Kleintiermodelle des Vorhofflimmerns.....	39
3.9.2.1	Vorhofflimmermodelle der Ratte .....	39
3.9.2.2	Mausmodelle des Vorhofflimmerns .....	39
3.9.3	Zusammenfassung Tiermodelle .....	40
3.10	<i>Hypothesen und Ziele</i> .....	41
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>43</b>
4.1	<i>In vivo</i> .....	43
4.1.1	Versuchstiere .....	43
4.1.2	Das Tiermodell – Studiendesign .....	43
4.1.3	Material .....	44
4.1.3.1	Geräte .....	44
4.1.3.2	Medikamente .....	45
4.1.3.3	Sonstiges.....	47
4.1.4	Methoden .....	47
4.1.4.1	Versuchstierhaltung.....	47
4.1.4.2	Induktion und Charakterisierung des Modells.....	47
4.1.4.2.1	Narkoseeinleitung.....	47
4.1.4.2.2	Vorbereitung der Messungen .....	48
4.1.4.2.3	Arterielle Blutdruckmessung .....	48
4.1.4.2.4	Bestimmung der Auswurffraktion (EF) .....	49
4.1.4.2.5	Messung des linksventrikulären Drucks (LVP).....	49
4.1.4.2.6	Messung der Hämodynamik des rechten Herzens sowie des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP).....	50
4.1.4.2.7	Infarzierung.....	50
4.1.4.2.8	Elektrophysiologische Untersuchung.....	52
4.1.4.2.9	Asservation der Gewebeproben, Vorbereitung der Histologie.....	53
4.1.4.2.10	Kontrolltiere.....	54
4.2	<i>In vitro</i> .....	54

4.2.1	Material .....	54
4.2.1.1	Geräte .....	54
4.2.1.2	Kits und Mastermixe .....	56
4.2.1.3	Chemikalien .....	57
4.2.1.4	Oligonukleotidprimer und –Proben für die RT-PCR.....	58
4.2.1.5	Antikörper.....	60
4.2.1.6	Software .....	61
4.2.2	Methoden .....	61
4.2.2.1	RNA Analyse .....	61
4.2.2.1.1	Isolation der RNA aus Gewebe .....	61
4.2.2.1.2	Synthese der cDNA .....	62
4.2.2.1.3	Realtime-PCR mittels TaqMan-Sonden .....	63
4.2.2.1.4	Primertest .....	64
4.2.2.1.5	Realtime-PCR mittels SYBR® Green .....	66
4.2.2.2	Proteinisolation .....	67
4.2.2.3	Westernblot.....	69
4.2.2.3.1	Puffer .....	69
4.2.2.3.2	Gele.....	70
4.2.2.3.3	Ablauf .....	71
4.2.2.3.4	Entwickeln.....	72
4.2.2.3.5	Westernblot Auswertung.....	73
4.2.2.4	Histologie.....	73
4.2.2.5	Statistik .....	74
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>75</b>
5.1	<i>Etablierung des Modells.....</i>	75
5.1.1	Anatomie und Histologie .....	75
5.1.2	Hämodynamik.....	76
5.1.3	Elektrophysiologische Untersuchung.....	79
5.2	<i>microRNA-Profil des Modells .....</i>	82
5.3	<i>Veränderung potentieller Zielgene der miR-26a .....</i>	84
5.3.1	Targetscan <i>in silico</i> Analyse.....	84
5.3.2	qPCR.....	85
5.3.3	Westernblot.....	89
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>91</b>
6.1	<i>Die ischämische Kardiomyopathie als Modell für paroxysmales Vorhofflimmern.....</i>	91
6.1.1	Das Schwein als Modelltier für Vorhofflimmern.....	91

6.1.2	Anatomie und Histologie .....	91
6.1.3	Hämodynamik.....	92
6.1.4	Elektrophysiologie .....	93
6.2	<i>microRNA-Profil des Modells</i> .....	94
6.2.1	Allgemeine Überlegungen .....	94
6.2.2	qPCR.....	95
6.2.3	Westernblot.....	100
6.3	<i>Ausblick und Relevanz</i> .....	101
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>8</b>	<b>Quellenverzeichnis.....</b>	<b>105</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>

## 2 Zusammenfassung

Vorhofflimmern (VHF) stellt die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung des Menschen dar. Die Jahresprävalenz in Deutschland liegt über zwei Prozent, besonders betroffen sind ältere Menschen. Die ökonomische Bedeutung für das Gesundheitswesen ist immens, die Therapien limitiert und unser pathophysiologisches Verständnis der komplexen Erkrankung noch in den Kinderschuhen. Grundlagenforschung zur Pathogenese der Erkrankung ist daher zwingend notwendig, um die Diagnose, Risikostratifizierung, Behandlung und Prognose von Vorhofflimmern zu verbessern.

MicroRNAs (miRNAs) haben in der Grundlagenforschung in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen – so auch in der Pathogenese des elektrischen und strukturellen Remodelings bei Vorhofflimmern. MicroRNAs sind kurze RNA-Moleküle die durch Bindung an die untranslatierte Region einer messengerRNA (mRNA) die Translation entscheidend beeinflussen können. Man kann sie als Finetuner der Genexpression betrachten.

In der vorliegenden Arbeit etablierten wir ein Schweinmodell für paroxysmales Vorhofflimmern durch 90-minütige Ischämie und anschließende Reperfusion der linken Koronararterie distal des ersten Diagonalasts. Es erfolgte der Vergleich von Kontrolltieren mit einer Kurzzeitschämiegruppe ( $I/R_3$ ) sowie einer Langzeitschämiegruppe ( $I/R_{30}$ ). Der Versuchsaufbau sah einen Ersteingriff an Tag 1, sowie in Abhängigkeit der Studiengruppe einen Zweiteingriff nach 3 ( $I/R_3$ ) oder 30 ( $I/R_{30}$ ) Tagen vor. Im Zuge des Ersteingriffes erfolgte der Verschluss der linken Koronararterie mittels eines Ballonkatheters. Der Zweiteingriff erfolgte je nach Studienast nach 3 oder 30 Tagen und beinhaltete eine elektrophysiologische Untersuchung (EPU) sowie die Induktion von Vorhofflimmern mittels Burststimulation. Die Kontrolltiere wurden jeweils nur dem Zweiteingriff unterzogen. In der Folge des Infarkts kam es zu proarrhythmogenem atrialem Remodeling, wodurch die Versuchstiere eine signifikant erhöhte Anfälligkeit für Vorhofflimmern entwickelten und eine signifikant verlängerte Dauer einzelner Vorhofflimmerepisoden zeigten. Dieser Phänotyp ging jedoch nicht mit einer Veränderung der atrialen Refraktärzeiten einher, vielmehr konnte im linken Vorhof der Ischämie/Reperfusionstiere eine signifikante Fibrose nachgewiesen werden.

Im Anschluss an die Etablierung des Modells erfolgte eine Charakterisierung des miRNA-Profiles mit Fokus auf die kardial abundanten und bereits im Zusammenhang mit Vorhofflimmern beschriebenen miRNAs. In dieser Arbeit legen wir den Fokus auf die miR-26a, welche bereits im Zusammenhang mit sowohl elektrischem als auch strukturellem Remodeling beschrieben wurde. Es zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen eine verminderte Expression der miR-26a in den I/R<sub>3</sub> Tieren, sowie eine erhöhte Expression in den I/R<sub>30</sub> Tieren. Es erfolgte eine *in silico* Targetanalyse der miR-26a und anschließend eine quantitative Analyse ausgewählter Zielgene in Gewebe des linken Atriums unserer Versuchstiere. Es konnte gezeigt werden, dass passend zur Erhöhung der miR-26a in unseren Langzeitschämietieren die validierten Zielgene KCNJ2 und PTEN vermindert exprimiert sind. Selbiges gilt für die noch nicht validierten Zielgene der miR-26a SCN5A und CACNA1C.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die deutlichen Regulationsunterschiede der miR-26a im Vergleich zu den Kontrolltieren mit ihren Zielgenen KCNJ2, PTEN, SCN5A und CACNA1C möglicherweise zur Pathogenese des paroxysmalen Vorhofflimmerns in unserem Modell beitragen. Weitere Versuche sind zum Nachweis des direkten Zusammenhangs nötig. Potentiell eröffnen sich durch diese Daten neue Wege der Therapie von Vorhofflimmern durch die Beeinflussung verschiedener miRNAs des Herzens.

### **3 Einleitung**

#### **3.1 Epidemiologie von Vorhofflimmern**

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste anhaltende Herzrhythmusstörung des Menschen<sup>1</sup>. Die Inzidenz und Prävalenz von Vorhofflimmern sind weltweit hoch<sup>2</sup>. Für Deutschland konnten Wilke et al.<sup>3</sup> zeigen, dass im Jahre 2009 etwa 1,8 Millionen Menschen an Vorhofflimmern erkrankt waren. Das entspricht einer Jahresprävalenz von über zwei Prozent. An Vorhofflimmern erkrankten Menschen jeder Altersstufe, wobei die Prävalenz mit steigendem Alter zunimmt<sup>4</sup>. So beträgt die Prävalenz bei unter sechzig-jährigen noch weniger als 1% und nähert sich 20% bei Patienten >85 Jahren an<sup>5, 6</sup>. Daten aus der Framingham Heart Studie zeigen zudem, dass Männer häufiger von Vorhofflimmern betroffen sind als Frauen<sup>7</sup>. Das Lebenszeitrisko an Vorhofflimmern zu erkranken betrug für Männer mit einem Alter über 40 Jahren in dieser Arbeit 25%<sup>7</sup>.

In letzter Zeit ist die Erkrankung aufgrund dieser steigenden Prävalenz in Kombination mit dem demographischen Wandel zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Die sozioökonomische Last durch Vorhofflimmern im deutschen Gesundheitswesen ist enorm<sup>8, 9</sup> und die Therapien sind limitiert<sup>10</sup>. Nicht nur in Deutschland sondern auch weltweit stellt Vorhofflimmern einen der häufigsten Mortalitätsgründe alternder Individuen dar<sup>11</sup>.

#### **3.2 Risikofaktoren von Vorhofflimmern**

Die unterschiedlichsten kardiovaskulären Risikofaktoren und Erkrankungen sind über viele Jahre hinweg in der gängigen Fachliteratur konsistent im Zusammenhang mit Vorhofflimmern beschrieben worden<sup>12</sup>. Daten aus der Framingham Heart Studie legen nahe, dass folgende Faktoren unter anderem das Risiko an Vorhofflimmern zu erkranken signifikant erhöhen: zunehmendes Alter, männliches Geschlecht, Adipositas, Diabetes Mellitus, Schlafapnoe, Störungen des Schilddrüsenstoffwechsels sowie über viele Jahre bestehende arterielle Hypertonie. Außerdem sind vor allem kardiovaskuläre Erkrankungen wie insbesondere die (ischämische) Herzinsuffizienz, Klappenvitien oder ein abgelaufener Myokardinfarkt und viele Weitere mit einem signifikant erhöhten Risiko für das Auftreten von Vorhofflimmern verbunden<sup>13</sup>.

### 3.3 Klinik von Vorhofflimmern

Klinisch bleibt Vorhofflimmern oft inapparent, kann jedoch bei den Betroffenen zu Unwohlsein, Herzrasen oder Palpitationen führen, bei Brady- oder Tachyarrhythmien können Synkopen auftreten und eine verminderte Auswurfleistung des Herzens kann im Extremfall auch zu einer Minderperfusion des Herzens selbst sowie einer konsekutiven Herzinsuffizienz führen. Durch das Entstehen von Turbulenzen bei asynchroner Kontraktilität des Vorhofs steigt das Risiko des Auftretens thromboembolischer Komplikationen stark an<sup>14</sup>. Es lässt sich festhalten, dass Vorhofflimmern mit einer starken Morbidität einhergeht und vor allem das Lebenszeitrisiko für Schlaganfälle und andere thromboembolische Ereignisse, Herzinsuffizienz oder Demenz erhöht. Daneben stellt Vorhofflimmern eine häufige Ursache für Krankenhauseinweisungen dar<sup>15</sup>.

Vorhofflimmern ist entsprechend der Leitlinie der European Society for Cardiology (ESC) definiert als Arrhythmie des Herzens mit folgenden Eigenschaften<sup>15</sup>:

- Die im Oberflächen-EKG sichtbare Arrhythmie ist absolut (daher auch die gängige Bezeichnung als „Arrhythmia absoluta“). Das bedeutet, die RR-Intervalle folgen keinem sich wiederholenden Schema
- Im Oberflächen-EKG sind keine P-Wellen zu sehen
- Die Frequenz des Vorhofs – sofern sichtbar – ist stark erhöht auf >300/min.

Klinisch hat sich eine Einteilung des Vorhofflimmerns nach Art und Häufigkeit des Auftretens gegenüber einer streng ätiologischen Einteilung durchgesetzt. So unterscheidet man gemäß der Leitlinie der European Society for Cardiology (ESC) zwischen<sup>15</sup>:

- Paroxysmalem VHF, bei dem eine Spontankonversion in den Sinusrhythmus innerhalb von 48 h bis spätestens 7 Tagen erfolgt
- Persistierendem VHF, bei dem die Arrhythmie länger als 7 Tage andauert, und nur durch Kardioversion beendet werden kann
- Lang anhaltendem persistierendem VHF, das länger als ein Jahr andauert
- Permanentem Vorhofflimmern ohne Möglichkeit der Rhythmuskontrolle, somit akzeptiertes Vorhofflimmern

- Silentem (asymptomatischem) Vorhofflimmern als Erstmanifestation in Form von Komplikationen wie Schlaganfall oder einer Tachymyopathie. Möglich ist auch eine zufällige Diagnose mittels EKG. Diese Form des VHF kann sich als jede obige Form des VHF zeigen.

Besonders erwähnenswert ist, dass sich das Risiko für Komplikationen des Vorhofflimmerns nicht proportional zur Häufigkeit, Dauer oder Konvertierbarkeit der Episoden verhält<sup>16</sup>. Daher ist es klinisch entscheidend, auch paroxysmales Vorhofflimmern mit wenigen kurzen Episoden zu erfassen und auch diese betroffenen Patienten einer Therapie zukommen zu lassen. Das Wesen der Erkrankung – im Speziellen das episodenhafte Auftreten und die oft fehlende Symptomatik – machen es jedoch im Alltag schwer, diese Patienten zu entdecken. Oft ist das Erstereignis bereits eine Folgeerkrankung wie beispielsweise ein Schlaganfall. Es ist daher anzunehmen, dass die meisten Patienten vor Diagnosestellung bereits einige asymptomatische selbstterminierende Vorhofflimmer-Episoden durchlaufen haben<sup>15</sup>.

### **3.4 Diagnostik von Vorhofflimmern**

Im klinischen Alltag erfolgt die Diagnose mittels eines Oberflächenelektrokardiogramms. Bei bestehendem Verdacht auf VHF wird nach aktuellen Empfehlungen der ESC zuerst ein konventionelles 12-Kanal-EKG geschrieben. Im Idealfall erfolgt das Aufzeichnen des EKGs während der klinischen Symptomatik, die zum Initialverdacht geführt hat. Sollte sich so keine Diagnose finden lassen, der Verdacht jedoch weiterbestehen, empfiehlt sich eine längere Aufzeichnung des Herzrhythmus mittels eines bzw. mehrerer Langzeit-EKGs. Lediglich in Ausnahmefällen ist es nötig, die Diagnostik weiter zu eskalieren und beispielsweise einen Eventrecorder zu implantieren<sup>17</sup>.

### **3.5 Therapie von Vorhofflimmern**

Grundsätzlich bestehen zwei Therapieansätze zur Behandlung von Vorhofflimmern, zum einen die Frequenzkontrolle, zum anderen die Rhythmuskontrolle. Diese stehen neben der Prävention des Schlaganfalls im Zentrum der Therapie.

Wie dahingehend therapiert werden kann hängt von den Begleiterkrankungen ab. So sieht die Rhythmuskontrolle im Falle einer bestehenden Herzinsuffizienz anders aus, als wenn beispielsweise ein Präexzitationssyndrom vorliegt. Entgegen der lange Zeit vorherrschenden Meinung, dass die Rhythmuskontrolle der Frequenzkontrolle vorzuziehen ist, konnten Studien (vor allem die drei großen Studien hierzu AFFIRM, RACE, und AF-CHF) diese Annahme nicht bestätigen<sup>18</sup>. Die Entscheidung ist also individuell zu treffen und alle Konzepte haben erhebliche Vor- und Nachteile.

Wird die Rhythmuskontrolle angestrebt, so ist es im Akutmanagement entscheidend, wie lange die beobachtete Episode besteht. Patienten mit einer Episode unter 48 Stunden können ohne signifikant erhöhtes Schlaganfallsrisiko unter Heparinisierung elektrisch kardiovertiert werden, da nicht von einem intrakardialen Thrombus ausgegangen werden muss. Sollte der Beginn unklar sein oder die Episode länger als 48 Stunden bestehen kann mittels transösophagealer Echokardiographie ein Thrombus ausgeschlossen werden und anschließend unter Antikoagulation eine elektrische Kardioversion erfolgen<sup>15, 19</sup>.

Wie bereits zuvor erörtert resultiert das größte Komplikationsrisiko für Patienten mit VHF aus der Bildung von Thromben im Herzen. Nach Virchow haben drei Faktoren Einfluss auf die Entstehung von Thromben in der Gefäßbahn: Die Veränderung der Gefäßwand mit begleitender Intimaschädigung, Veränderung der Fließgeschwindigkeit des Blutes sowie die Veränderung der Zusammensetzung des Blutes<sup>20</sup>. Bei Patienten mit VHF kommt es zur Veränderung von zumindest zwei Faktoren: so kommt es aufgrund der fehlenden Vorhofkontraktion zu einer Verlangsamung des atrialen Blutflusses mit teils regionaler Stase (vor allem im linken Vorhof) und durch die Turbulenzen entstehen Schäden an der Intima des Herzens<sup>15</sup>. Daher ist es in der Behandlung von entscheidender Wichtigkeit das Risiko für Thrombembolien zu bestimmen und bei Notwendigkeit durch beispielsweise orale Antikoagulation zu senken<sup>21</sup>.

Zur Beurteilung des Risikos für Schlaganfälle bei VHF gibt es eine Reihe von Scores und Bewertungssystemen. Am häufigsten verwendet wird der CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc-Score (Congestive heart failure, deutsch „Herzinsuffizienz“ (1 Punkt), Hypertension (1 Punkt), Age (> 75 = 2 Punkte), Diabetes mellitus (1 Punkt), Stroke/TIA (2 Punkte), Vascular disease – z.B. pAVK, vorangegangener Herzinfarkt, schwere Verkalkung der Aorta (1 Punkt), Age: 65-74 (1 Punkt), Sex category: Frauen (1 Punkt))<sup>22</sup>. Bei

einem Punktwert von mindestens 1 bei Männern bzw. mindestens 2 bei Frauen (sofern 1 Punkt aufgrund des weiblichen Geschlechts vergeben wird) ist eine orale Antikoagulation indiziert. Zur Verfügung stehen hier neben Vitamin K Antagonisten und Heparinen auch direkte Faktor Xa bzw. Faktor II Inhibitoren.

Dem thrombembolischen Risiko steht klinisch immer das durch die Therapie induzierte Risiko der Blutung entgegen. Zur Beurteilung desselben hat sich der HAS-BLED Score<sup>23</sup> (uncontrolled Hypertension, Abnormal renal/liver function, Stroke, Bleeding history or predisposition, Labile INR, Elderly >65 years, Drugs/alcohol concomitantly) etabliert. Er erlaubt es dem Behandler eine informierte Entscheidung für und mit dem einzelnen Patienten in Zusammenschau des Risikos für einen ischämischen Schlaganfall und eine durch die Therapie verursachte Blutung zu treffen<sup>24</sup>. Des Weiteren kann es bei bestimmten Nebenerkrankungen, die eine Antikoagulation unmöglich machen, eine Option sein, operativ oder interventionell das linke Vorhofohr zu verschließen, da sich an dieser Stelle bevorzugt Thromben bilden<sup>15</sup>. Das Akutmanagement von VHF hat sich vor allem auf die Symptomatik des Patienten zu richten, nebenher darf aber natürlich nicht vergessen werden nach möglichen Ursachen Ausschau zu halten. So sollten mögliche Komplikationen abgeklärt und das EKG genau betrachtet werden<sup>15</sup>.

Die Vorhofflimmertherapie stützt sich demnach auf drei Säulen: Rhythmuskontrolle, Frequenzkontrolle und die Prävention von Folgeerscheinungen. Des Weiteren kann man invasive (vor allem kathetergestützte Ablationen bzw. Kardioversionen) von nicht invasiven (antiarrhythmische Medikation) Methoden unterscheiden<sup>25</sup>. Keine dieser etablierten Methoden stellt eine kausale Behandlung dar. Daher ist es unabdingbar, an neuen Therapiekonzepten zu forschen. Zur Entwicklung eben solcher neuen Konzepte ist ein umfassendes Verständnis der Pathophysiologie unverzichtbar, weshalb Grundlagenforschung nötig ist.

### **3.6 Pathophysiologie von Vorhofflimmern**

Die Pathophysiologie des Vorhofflimmerns ist komplex und multifaktoriell<sup>26, 27</sup>. Elektrophysiologisch sind die beiden zugrundeliegenden Mechanismen, die zur unkontrollierten Aktion des Vorhofs führen, Ektopie (ein nicht dem Sinusknoten entspringender Impuls, der zur Erregung des Vorhofs führt) und Reentry (kreisende Erregungen)<sup>28</sup>. Diese elektrischen Phänomene können viele molekularbiologische

Ursachen aufweisen und sind aktuell Gegenstand intensiver Forschung. Zu den bekannten Ursachen gehören Veränderungen in der Expression sowie der Funktion von Ionenkanälen<sup>27</sup>, gesteigerte atriale Automatizität, Störungen der Kalziumhomöostase, Veränderungen der Verteilung von gap junctions aber auch Einflüsse auf die strukturelle Integrität des Vorhofs wie beispielsweise Fibrose, Entzündung oder Dilatation. Interessanterweise sind es häufig initial protektive Gegenregulationen des Körpers die jedoch bei Fortbestehen zu einer Verstärkung der Flimmerneigung eines Patienten führen<sup>27, 29</sup>. Die beiden Begriffe unter denen sich diese Phänomene heute subsumieren sind elektrisches und strukturelles Remodeling<sup>5, 27, 30</sup>, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

### 3.6.1 Das atriale Aktionspotential

Im gesunden Herzen zeigen die reizleitenden Zellen typische elektrische Eigenschaften und Veränderungen der Spannung über die Zeit. So liegt das Ruhemembranpotential im negativen Bereich bei etwa -80 mV. Bei Erregung durch einen elektrischen Impuls folgt die Depolarisation sobald ein Schwellenpotential überstiegen wird. Dies geht einher mit ansteigender Spannung verursacht durch den Einstrom von Natrium-Ionen durch schnelle spannungsabhängige Natriumkanäle gefolgt von einigen Repolarisationsschritten bis das Ruhemembranpotential wieder erreicht ist. Dort verharrt die Zelle bis sie wieder erregt wird. Während der Depolarisation strömen zudem Kalzium-Ionen in die Zelle, sorgen für die Kontraktion der Herzmuskelzellen und verzögern die Repolarisation. Diese wird vor allem durch den Ausstrom von Kalium-Ionen durch verschiedene Kanäle erreicht<sup>27, 30</sup>.

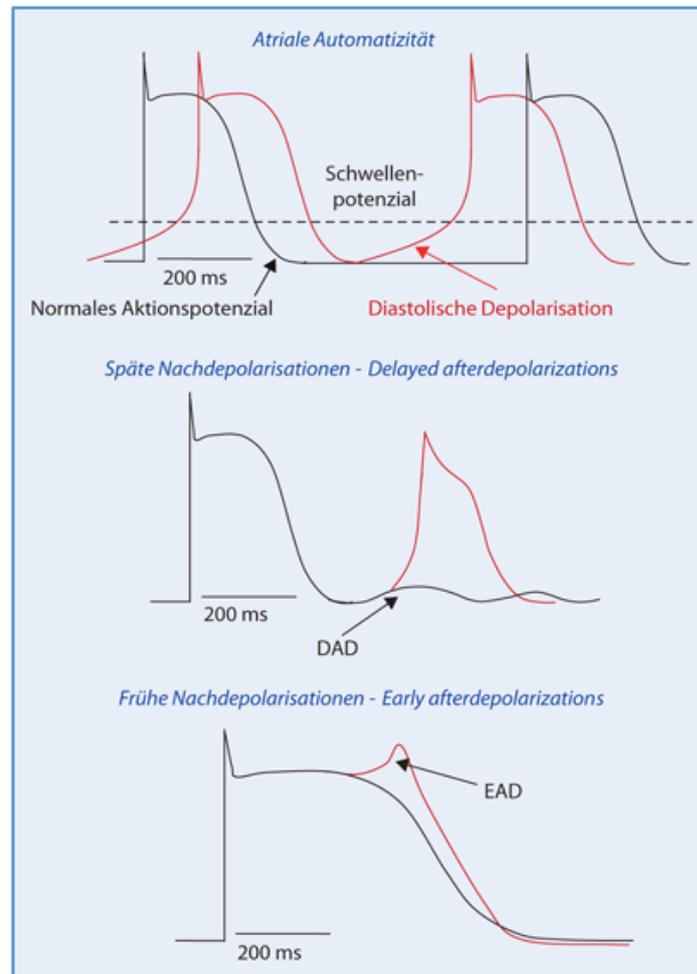
### 3.6.2 Ektopie

Physiologisch erfolgt die Erregung des Herzens über den Sinusknoten. Jedoch kann potentiell jede Zelle bei Überschreitung des Schwellenpotentials einen Impuls abgeben und damit zu einer ektopen Erregung führen, die wiederum eine atriale Tachykardie auslösen kann.

Drei Hauptmechanismen führen zu ektopen Erregungen innerhalb des Vorhofs: frühe und späte Nachdepolarisationen sowie atriale Automatizität<sup>31</sup> (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

Frühe Nachdepolarisationen treten bei extremer Aktionspotentialverlängerung auf.

Frühe Nachdepolarisationen treten bei extremer Aktionspotentialverlängerung auf. Dies ist beispielsweise bei genetischen Ionenkanalerkrankungen wie dem Long-QT-Syndrom der Fall<sup>30, 32</sup>. Die lange Dauer des Aktionspotentials führt zu einer möglichen Reaktivierung von Kalziumkanälen in der Zellmembran und zum Einstrom von Kalzium<sup>31</sup>.



**Abbildung 1.** Mechanismen ektopter Erregungsbildung<sup>30</sup>.

Späte Nachdepolarisationen werden durch diastolisches Austreten von Kalzium-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum verursacht<sup>5</sup>. In einer gesunden Zelle würden die Kalzium-Ionen während der Diastole von der Sarkoplasmatischen-Kalzium-ATPase (SERCA) sowie dem Natrium-Kalzium-Austauscher (NCX) aus dem Zytoplasma entfernt werden. Liegt nun eine atriale Tachykardie vor, so kann diese Kalziumhomöostase dahingehend gestört werden, dass Kalzium im Zytoplasma akkumuliert. Diese Überladung der Zelle kann nun in der Folge zum Beispiel auch zu einer Überladung des sarkoplasmatischen Retikulums und konsekutiver Undichtigkeit

des Ryanodinrezeptors führen<sup>27, 33</sup>. Das in die Zelle strömende Kalzium führt nun zu einer Positivierung des Membranpotentials während der Diastole, noch verstärkt durch die Aktivierung des NCX. Übersteigt diese Depolarisation nun den Schwellenwert führt sie zu einem ektopen Impuls – der späten Nachdepolarisation<sup>5, 32</sup>.

Atriale Automatizität entsteht beispielsweise durch Überexpression oder Hochregulation der sogenannten „funny channels“, den Natriumionenkanälen, welche für die spontane diastolische Depolarisation in Schrittmacherzellen verantwortlich sind<sup>27</sup>. Diese Hochregulation wurde zum Beispiel bei der Herzinsuffizienz beschrieben<sup>34</sup>.

### 3.6.3 Reentry

Unter Reentry versteht man kreisende Erregungen im Sinne einer „Kurzschlussverbindung“ und es bedarf zu seiner Ausprägung eines vulnerablen zellulären Substrats<sup>31</sup>. So muss die Refraktärzeit innerhalb des Gewebes durch Umbauprozesse verändert sein. Auch die Leitungsgeschwindigkeit muss zur Entstehung von kreisenden Erregungen verändert sein. Letztlich muss es zur Entstehung von Reentry möglich sein, dass eine elektrische Erregung auf eine Zelle trifft, die eigentlich noch refraktär sein sollte, aufgrund der Veränderungen der Refraktärzeit und der verzögerten Leitung aber bereits wieder erregt werden kann. Gibt es nun die Möglichkeit zur Weiterleitung des Impulses an ebenfalls nicht mehr refraktäre Zellen kommt es zu kreisenden Erregungen. Meist geht der Entstehung einer solchen kreisenden Erregung neben dem Vorhandensein des strukturellen Substrats eine ektope Erregung voraus<sup>31</sup>. Eine Vielzahl an Ursachen kann der veränderten Refraktärzeit bzw. der verlangsamten Weiterleitung zugrunde liegen. So kann zum einen elektrisches Remodeling zur Veränderung der Refraktärzeit führen oder die Weiterleitung verlangsamen, genauso kann aber auch strukturelles Remodeling wie beispielsweise die Entstehung einer Fibrose oder die schlichte Verlängerung der zurückzulegenden Strecke bei Vorliegen einer Dilatation zu Veränderungen der elektrischen Leitung führen<sup>27</sup>. Eine wichtige Ursache stellt die Fibrosierung des Atriums zum Beispiel im Rahmen einer ischämischen Kardiomyopathie dar<sup>31</sup>.

### 3.7 MicroRNA (miRNA)

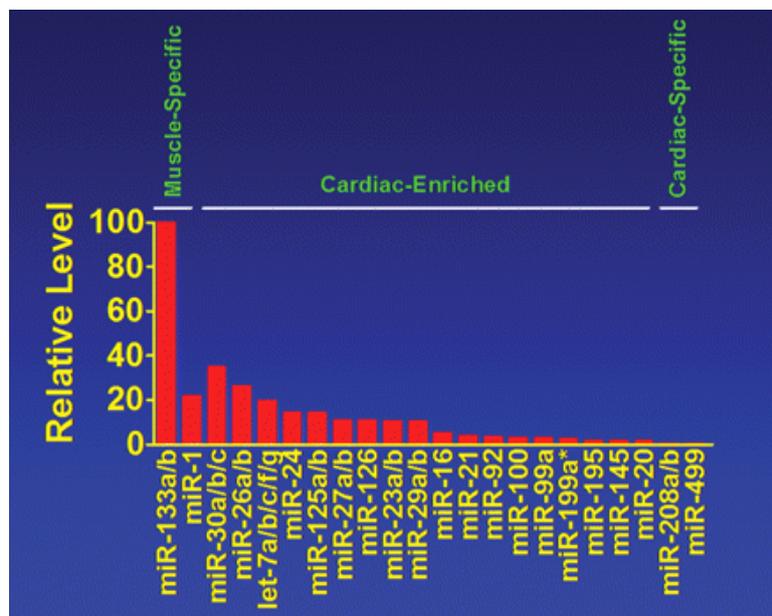
In den Neunziger Jahren gelang es einer Arbeitsgruppe der Harvard University etwas Licht in unser Verständnis der Translation zu bringen. Sie entdeckten einen neuen Mechanismus der Translationsregulation durch kurze RNA-Sequenzen, die an komplementäre Sequenzen innerhalb der 3'-UTR einer MessengerRNA (mRNA) binden und ihre Translation beeinflussen können<sup>35, 36</sup>. Die Bedeutung dieser kurzen RNA-Sequenzen (microRNAs, miRNAs) verdeutlichte sich in der Forschung der folgenden Jahre welche miRNAs als wichtigen Faktor in einer Vielzahl zellulärer Regulationsprozesse entdeckten<sup>37</sup>. Viele dieser Prozesse sind essentiell in der Regulation der Proteinbiosynthese und können bei Störungen zu Erkrankungen führen.

Kurz zusammengefasst sind miRNAs nicht kodierende, kurze RNA Einzelstränge von etwa 22 Basenpaaren (bp) Länge. Diese RNA Einzelstränge können nun durch Bindung an die untranslatierte Region (UTR) von mRNAs zur Herunterregulation ihrer Ziel-Gene führen. Binden sie an eine RNA, die direkt in ein Protein translatiert wird, so resultiert weniger Protein. Über die Inhibition eines endogenen Antagonisten ist jedoch auch die Hochregulation von Zielproteinen möglich. Verschiedene miRNAs sind spezieübergreifend hoch konserviert. Jede miRNA kann mehrere Zielgene haben und ein Zielgen kann von vielen miRNAs beeinflusst werden<sup>37, 38</sup>. Die Zusammenschau dieser Tatsachen macht deutlich, dass es sich hierbei um ein großes und enorm verzweigtes Netzwerk an Regulatoren handelt<sup>39</sup>. Für den humanen Organismus wurden nach aktuellem Stand der miRBase Online-Datenbank bis heute 2588 verschiedene miRNAs beschrieben<sup>40</sup>.

Das Verständnis der zugrundeliegenden Pathophysiologie des VHF hat sich seit der Entdeckung der miRNAs als Schlüsselfaktoren in der kardialen Pathogenese signifikant verbessert<sup>30</sup>. So sind mittlerweile viele miRNAs bekannt, die in die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern involviert sind<sup>27</sup>.

### 3.8 In die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern involvierte miRNAs

Die Erforschung von Einflüssen verschiedener miRNAs auf komplexe Erkrankungen wie VHF ist nicht einfach, da das Netzwerk der miRNAs verzweigt ist und es deshalb schwer ist, spezifische Effekte einer einzelnen miRNA kausal zu attribuieren. Nichtsdestotrotz ist genau das Gegenstand der aktuellen Forschung. Insbesondere sind die miRNAs von Interesse, die im Herzen exprimiert werden, in Tiermodellen und Patienten als verändert festgestellt wurden und/oder Gene zum Ziel haben, die in Remodeling-Prozesse involviert sind. Die wichtigsten im Herzen exprimierten miRNAs wurden von Wang et al. zusammengefasst<sup>41</sup> (**Abbildung 2**)



**Abbildung 2.** Die 20 abundantesten miRNAs des Herzens<sup>41</sup>.

Einen Überblick über die miRNAs mit gegenwärtig bekannter Rolle im kardialen Remodeling liefert das Review von Clauss et al.<sup>27</sup> an welchem sich im Folgenden orientiert wurde.

#### 3.8.1 miRNAs im elektrischen Remodeling

Bisher im Zusammenhang mit elektrischem Remodeling beschriebene miRNAs sind: miR-1<sup>42-47</sup>, miR-26<sup>48</sup>, miR-106b-25 Cluster<sup>49</sup>, miR-133<sup>46, 47</sup>, miR-208<sup>50</sup>, miR-328<sup>51</sup> und

miR-499<sup>52</sup>. Konsequenterweise regulieren diese miRNAs unter anderem Ionenkanäle, Connexine oder Proteine des Kalziumhandlings, d.h. Schlüsselfaktoren der Vorhofflimmerentstehung.

### 3.8.1.1 miR-1

Die miR-1 gehört wie auch die miR-133 zu den muskelspezifischen miRNAs. Beide gehören daher auch zu den kardial abundantesten miRNAs (**Abbildung 2**)<sup>27, 41, 53</sup>. Die Wichtigkeit von miR-1 für VHF wird deutlich aus der Forschung von Girmatsion et al., die zeigen konnten, dass in Herzen von Patienten mit permanentem Vorhofflimmern die Konzentration von miR-1 signifikant vermindert ist<sup>42</sup>. Weiter gelang es ihnen zu zeigen, dass diese Herunterregulation der miR-1 mit einer verstärkten Expression von KCNJ2 einhergeht. Dieses Gen kodiert für die Untereinheit  $K_{ir}2.1$  des einwärts gleichrichtenden Kaliumkanals. Diese verstärkte Expression des Zielgens (validiert von Yang et al.<sup>43</sup>) geht einher mit einer verkürzten Aktionspotentialdauer, was beispielsweise zur Aufrechterhaltung eines profibrillatorischen Substrats beitragen könnte<sup>27</sup>. Neben anderen bisher validierten und potentiell in die Entwicklung von Vorhofflimmern involvierten Zielgenen der miR-1 ist darüber hinaus vor allem der in einer Arbeit von Terentyev et al. hergestellte Zusammenhang zur Kalziumhomöostase – einem weiteren Eckpfeiler der Pathogenese – interessant. So konnten die Autoren zeigen, dass in Herzmuskelzellen der Ratte bei Überexpression von miR-1 das Gen  $B56\alpha$  stark herunterreguliert wird<sup>45</sup>. Dieses Gen kodiert eine Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (PP2A). Diese Veränderung führt über eine Dissoziation der PP2A vom Ryanodinrezeptor zu dessen Hyperphosphorylierung, was wiederum zu einer Kalziumleckage und zum spontanen und proarrhythmischen Entweichen von Kalziumionen führt<sup>27, 41, 46</sup>.

### 3.8.1.2 miR-26

Es konnte gezeigt werden, dass KCNJ2 und damit der einwärts gleichrichtende Kaliumstrom durch die miR-26 beeinflusst wird<sup>41, 48, 54</sup>. Dieser Effekt bestätigte sich in einem Mausmodell, in dem durch virusinduzierte Überexpression von miR-26 sowie durch miR-26 Knockout eine erhöhte Empfänglichkeit der Mäuse für

Flimmerepisoden gezeigt werden konnte<sup>48</sup>. In humanem Herzgewebe des rechten Vorhofs konnte für VHF Patienten eine verminderte Konzentration von miR-26 sowie ein konsekutiv erhöhter  $I_{K1}$  gezeigt werden<sup>48</sup>, was elektrophysiologisch zu einem verkürzten Aktionspotential führt.

Luo et al. konnten weiter zeigen, dass die Applikation eines *in vivo* knockdown-Oligos gegen miR-26 in ihrem Mausmodell zu einer verminderten Vulnerabilität für VHF führt. In so behandelten Tieren konnten insgesamt weniger und zudem nur kürzere Episoden induziert werden<sup>55</sup>. Ihrer Hypothese nach basierte dieser Effekt auf einer erhöhten Aktivität von NFAT. Diese soll zur Herabregelung von mir-26 und darüber zur Aufhebung der tonischen Unterdrückung von miR-26 auf KCNJ2/Kir2.1 führen. Das Endergebnis dieser Signalkaskade ist erneut eine profibrillatorische Aktionspotentialverkürzung<sup>55</sup>.

#### 3.8.1.3 miR-106b-25 Cluster

Im Jahr 2014 gelang es Chiang et al. einen weiteren Zusammenhang zwischen Vorhofflimmern, Kalziumhandling und miRNAs herzustellen. So identifizierten sie ein ganzes Cluster aus miRNAs als Mediatoren des elektrischen Remodelings<sup>49</sup>. In einer kleinen Patientenkohorte von Individuen mit paroxysmalem Vorhofflimmern konnten sie im Vorhofgewebe die Herunterregulation des miR-106b-25 Clusters, bestehend aus den miR-93 miR-106a/b und miR-25 im Vergleich zu Patienten mit Sinusrhythmus zeigen<sup>49</sup>. Bioinformatische Analysen ergaben den Verdacht, dass insbesondere die im Cluster höchst exprimierte miR-93<sup>56</sup> den Ryanodinrezeptor zum Ziel haben könnte. Mittels Luziferaseassay konnte RYR2 schließlich als Zielgen der miR-93 bestätigt werden. Zudem gelang es ihnen, in einem Knockoutmodell des miR-106b-25 Clusters der Maus erhöhte Empfänglichkeit für VHF sowie eine diastolische Kalziumleckage aufgrund vermehrter Ryanodinrezeptoren zu finden<sup>49</sup>.

#### 3.8.1.4 miR-133

Die muskelspezifische miR-133 wurde ebenfalls als in die Regulation von verschiedenen Ionenkanälen involviert beschrieben<sup>41</sup>. In einem Schweinemodell gelang es Shan et al. zu zeigen, dass eine Überexpression von miR-133 zu einer signifikant verminderten Menge an ERG führt<sup>47</sup>. ERG kodiert für eine Untereinheit

des Kaliumkanals, der für den späten gleichrichtenden Strom  $I_{Kr}$  verantwortlich ist. Dieser Effekt konnte durch Repression von miR-133 aufgehoben werden. Elektrophysiologisch führte dies zu einem verlängerten  $QT_c$ -Intervall verbunden mit erhöhten Sterblichkeitsraten der Versuchstiere<sup>27</sup>. Der gleiche Effekt konnte von Xiao et al. in einem Diabetesmodell des Kaninchens gezeigt werden<sup>57</sup>.

Interessanterweise veröffentlichten Belevych et al. Daten, die zeigen, dass miR-133 auch in das Kalziumhandling involviert ist<sup>46</sup>. So gelang es ihnen zu demonstrieren, dass in einem Hundemodell der Herzinsuffizienz die Expression von miR-133 erhöht ist. Dies führt zu einer Repression des Zielgens  $B56\delta$ , welches wie das oben beschriebene  $B56\alpha$  (Zielgen der miR-1) eine Untereinheit der PP2A darstellt. Der beobachtete Effekt ist ebenso ähnlich wie oben beschrieben<sup>46</sup>.

In einem miR-133 Überexpressionsmodell der Maus von Matkovich et al. zeigte sich wie in dem Schweinemodell von Shan et al. eine Verlängerung des QT-Intervalls sowie der Aktionspotentialdauer sowie eine Verminderung des auswärts gerichteten Kaliumstroms  $I_{to,f}$ <sup>58</sup>. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass auch miR-133 auf verschiedenen Wegen in die Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF durch elektrisches Remodeling involviert ist<sup>41</sup>.

#### 3.8.1.5 miR-208

Eine besondere Rolle nimmt die miR-208 mit ihren zwei Isoformen miR-208a und miR-208b ein. Die beiden Isoformen werden während der Kardiogenese unterschiedlich exprimiert. MiR-208a ist die Isoform des adulten Herzens, während miR-208b im gesunden Herzen lediglich während der Kardiogenese exprimiert wird. Interessanterweise kommt es jedoch im kranken Herzen zu Veränderungen die zu einer Reexpression von miR-208b mit ihrem Zielgen MYH7 führen<sup>50, 59, 60</sup>. Callis et al. untersuchten miR-208 in einem Mausmodell näher und konnten zeigen, dass es bei Überexpression zu erhöhter Vulnerabilität für Arrhythmien kommt<sup>50</sup>. Eine mögliche Ursache hierfür stellt Connexin-40 dar, welches vom Gen GJA5 kodiert und von miR-208 beeinflusst wird und dessen Alteration zu einem proarrhythmischen Substrat führen könnte<sup>27, 50</sup>.

### 3.8.1.6 miR-328

Die zentrale Rolle des Kalziumhandlings wird nicht zuletzt auch dadurch deutlich, dass mit miR-328 eine weitere miRNA involviert ist<sup>27, 41</sup>. miR-328 ist signifikant erhöht in Gewebe von Patienten mit VHF sowie einem Tachypacing-Hundemodell, gezeigt von Lu et al.<sup>51</sup>. Dies geht einher mit einer Veränderung der beiden validierten Zielgene CACNA1C und CACNB1, beides Untereinheiten des L-Typ-Kalziumkanals<sup>27</sup>. Phänotypisch zeigte das Modell eine erhöhte Empfindlichkeit für Arrhythmien und VHF im Speziellen, eine verkürzte Aktionspotentialdauer sowie verminderten Kalziumstrom  $I_{CaL}$ <sup>51</sup>. All dies sind Eckpfeiler der Pathogenese von VHF und legen eine Rolle der miR-328 in eben dieser nahe.

### 3.8.1.7 miR-499

Die Rolle der miR-499 in der Pathogenese des VHF ist bislang unklar<sup>27</sup>. Initial war aus genetischen Studien eine Assoziation von KCNN3 (dem kalziumgesteuerten Kaliumkanal 3 (SK3)) mit einer Sonderform des VHF, des sogenannten „lone atrial fibrillation“ bekannt<sup>61</sup>. Die Verbindung zu miR-499 konnten Ling et al. kürzlich feststellen, indem sie zeigten, dass miR-499 zum einen in humanem Gewebe erhöht, SK3 zeitgleich erniedrigt und KCNN3 ein Zielgen von miR-499 ist<sup>52</sup>. Es gelang ihnen jedoch nicht, vermehrte Suszeptibilität für Arrhythmien zu zeigen – weder *in vivo* noch *in vitro*. Somit bleibt die genaue Rolle der miR-499 weiterhin Gegenstand der Forschung und ihre Relevanz unklar<sup>27</sup>.

## 3.8.2 miRNAs im strukturellen Remodeling

Um Effekte im strukturellen Remodeling haben zu können, müssen die involvierten miRNAs Gene steuern, deren Einfluss in der Regulation der extrazellulären Matrix, Signalwegen der Fibrosesteuerung oder Gewebeintegrität liegen. Veränderungen in diesen Wegen führen zu einem anatomischen Substrat für Reentry und damit zu erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Rhythmusstörungen. Gezeigt werden konnte dies bisher für die miR-21, miR-26, miR-29b, miR-30, miR-133, miR-499 und miR-590<sup>27</sup>.

### 3.8.2.1 miR-21

Erste Hinweise auf eine Bedeutung der miR-21 für das strukturelle Remodeling lieferte eine Arbeit von Thum et al. aus dem Jahr 2008. In einem murinen Herzinsuffizienzmodell gelang es ihnen zu zeigen, dass miR-21 hochreguliert ist. Des Weiteren zeigten sie, dass dadurch via Sprouty homologue 1 (Spry1) der ERK-MAP-Kinase Signalweg verändert wurde, welcher als profibrotisch bekannt ist<sup>27, 62</sup>. Ein *in vivo* Knockout von miR-21 führte zu verminderter Fibrose und verbesserter Herzfunktion<sup>27</sup>.

Ein Jahr später konnten Roy et al. in einem murinen Herzinfarktmodell zeigen, dass die Hochregulation von miR-21 mit einer Supprimierung von PTEN (transcription factor phosphatase and tensin homologue) einherging<sup>63</sup>. In der Endstrecke führt diese Veränderung zu einem verstärkten Umbau der Extrazellulärmatrix<sup>27</sup>.

2012 gelang es Adam et al. schließlich, in humanem linksatrialem Gewebe von VHF Patienten nachzuweisen, dass miR-21 erhöht vorliegt<sup>64</sup>. Vereinbar mit den weiter oben beschriebenen Ergebnissen von Thum et al. ging dies einher mit einer verminderten Expression von Spry1 und erhöhtem extrazellulärem Kollagen. Zudem zeigte sich eine erhöhte Expression des profibrotischen connective tissue growth factor (CTGF), der Lysyloxidase und der Rac1-GTPase<sup>27</sup>.

Nach wie vor fehlte jedoch der direkte Nachweis, dass die beschriebenen profibrotischen Veränderungen zu einer erhöhten Anfälligkeit für VHF führen. Erste Hinweise in diese Richtung konnten Cardin et al. in einem Rattenmodell der ischämischen Kardiomyopathie liefern<sup>65</sup>. Konsistent mit den bisherigen Entdeckungen konnten sie in ihrem Modell miR-21 als erhöht feststellen und Spry1 als Ziel der miR-21 bestätigen. In einem weiteren Schritt injizierten sie einen miR-21-Antagonisten, was zu verminderter Fibrose und erstmals auch zu verminderter VHF-Dauer in der elektrophysiologischen Untersuchung führte<sup>65</sup>.

In einem Tachymyopathiemodell des Hundes, welches über atriales Remodeling zu einer erhöhten Suszeptibilität für VHF führt<sup>66</sup>, untersuchten Yeh et al. miRNAs und ihren Einfluss auf atriales Remodeling. In diesem Modell zeigte sich eine ausgeprägte Fibrose gepaart mit einer Überexpression von miR-21<sup>27</sup>. Es konnte für dieses Modell eine Herunterregulation von MMP2 im Gewebe des linken Atriums sowie eine Hochregulation von Matrixproteinen gezeigt werden<sup>67</sup>.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es multiple Hinweise auf eine Rolle der miR-21 im strukturellen Remodeling gibt und eine Rolle in der Pathogenese von VHF nahe liegt<sup>27, 41</sup>.

### 3.8.2.2 miR-26

Die mir-26 ist eine vielseitige miRNA und neben ihrer oben beschriebenen potentiellen Rolle im elektrischen Remodeling gibt es auch Hinweise für eine potentielle Rolle im strukturellen Remodeling<sup>27</sup>. So ist in dem von Harada et al. beschriebenen ventrikulären Tachypacingmodell des Hundes miR-26 atrial vermindert exprimiert<sup>54</sup>. In diesem Modell führte dies zu einer Hochregulation von TRPC3. Die Blockade von TRPC3 verhinderte in diesem Modell die Entwicklung von Vorhofflimmern<sup>27</sup>. In der Literatur wurde TRPC3 als in verschiedene Prozesse involviert beschrieben. Dazu gehört das Kalziumhandling genauso wie die generelle Zellproliferation<sup>27</sup>. Zhang et al. konnten miR-26 zudem in einem Rattenmodell mit der Entstehung von Hypertrophie in Verbindung bringen und Glykogen Synthase Kinase 3beta (GSK3B) als Zielgen identifizieren<sup>68</sup>. Dies legt eine Rolle der miR-26 im strukturellen wie auch im elektrischen Remodeling nahe.

### 3.8.2.3 miR-29b

Die Erstbeschreibung der miR-29b im Zusammenhang mit Herzerkrankungen geht auf eine Arbeit von van Rooij et al. aus dem Jahre 2008 zurück. In einem murinen Herzinfarktmodell, welches zu Fibrose und Hochregulation von einigen ECM Proteinen wie Elastin, Fibrillin und Kollagen führte, zeigte sich eine ausgeprägte Herabregulation von miR-29b<sup>69</sup>. Dieser Zusammenhang zwischen miR-29b und Matrixproteinen ließ sich *in vitro* durch Überexpression und Knockout bestätigen und legt einen Einfluss von miR-29b auf Matrixproteine nahe<sup>27</sup>.

In der Arbeit von Dawson et al. zeigte sich in deren Hundemodell ein vergleichbarer Effekt: miR-29b ist im atrialen Gewebe der Tiere bereits nach 24 Stunden Tachypacing signifikant herabgesetzt. Zudem zeigten sich Matrixproteine wie Kollagen und Fibrillin hochreguliert. Die Induzierbarkeit von VHF war ebenso erhöht wie die atriale Fibrose<sup>66, 70</sup>. Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen ebenfalls eine erniedrigte miR-29b im rechtsatrialen Gewebe von VHF Patienten.

#### 3.8.2.4 miR-30

Die miR-30 entfaltet vermutlich ihren Effekt im strukturellen Remodelling über ihr validiertes Zielgen CTGF. Duisters et al. haben in verschiedenen Tiermodellen (Ratte, Maus) aber auch in humanem Gewebe konsistent eine Herabregulation von miR-30 und eine konsekutive Hochregulation von CTGF zeigen können<sup>71</sup>. Diesen Effekt konnten sie *in vitro* nachstellen und durch Überexpression und Knockout von miR-30 verstärken bzw. aufheben<sup>27, 71</sup>.

#### 3.8.2.5 miR-133

Li et al. zeigten eine atriale Herabregulation von miR-30 und miR-133 in einem Tachypacingmodell des Hundes mit konsekutiv erhöhter Fibrose<sup>72</sup>. Diese Daten konnten von Chen et al. bestätigt werden<sup>67</sup>. Zudem gibt es eine Arbeit von Castoldi et al. die eine verminderte miR-133 und miR-29 in Ratten mit einer vermehrten Fibrose und Hochregulation von Kollagen in Verbindung bringt<sup>73</sup>. Dieser Effekt konnte durch die Applikation von Angiotensin II erzeugt sowie durch die Applikation von Irbesartan verhindert werden. Diese drei Arbeiten legen eine Rolle der miR-133 beim strukturellen Remodeling nahe. Zudem konnten Xu et al. zeigen, dass miR-133 dem Zelltod – der sogenannten Apoptose - im oxidativen Stress entgegenwirkt<sup>74</sup>. Eine direkte Assoziation zum Vorhofflimmern blieb diese Arbeit jedoch schuldig<sup>41</sup>.

#### 3.8.2.6 miR-499

Wang et al. gelang es, in einer Arbeit miR-499 mit verminderter Fibrose und verbesserter Herzfunktion nach Myokardinfarkt in Verbindung zu bringen. In einem murinen Myokardinfarktmodell beobachteten sie eine Herabsetzung von miR-499 in der „area at risk“ nach vorangegangener Durchblutungsstörung<sup>27, 75</sup>. Eine direkte Verbindung zu Vorhofflimmern konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden.

#### 3.8.2.7 miR-590

Die miR-590 nimmt noch einmal eine besondere Stellung ein, beleuchtet ihre Entdeckung doch das erhöhte Risiko für VHF für Raucher näher<sup>27</sup>. In dem bereits

weiter oben beschriebenen Hundemodell zeigte die Arbeitsgruppe von Shan et al. eine signifikant erhöhte atriale Fibrose und verstärktes VHF nach 30-tägiger Applikation von Nikotin<sup>47</sup>. Dieser Effekt ging einher mit einer verminderten Expression von miR-590. Im Folgenden konnte TGF-bRII (der TGF- $\beta$  Rezeptor II) als Zielgen der miR-590 validiert werden. Zudem konnten sie diese Beobachtung im rechtsatrialen Gewebe von rauchenden VHF Patienten bestätigen, in dem miR-590 ebenfalls vermindert war. Diese Funde legen eine Rolle der miR-590 in der Entstehung von Vorhofflimmern über die Induktion von Fibrose bei Rauchern nahe<sup>27</sup>.

### 3.8.3 Fazit und Ausblick

Schätzungen zur Folge werden über 60% der Proteine des menschlichen Organismus von miRNAs reguliert<sup>76</sup>. Es liegen viele Hinweise auf einen direkten und umfassenden Einfluss verschiedenster miRNAs auf die Entstehung von VHF vor<sup>76</sup>. An vielen Stellen ist es jedoch noch nicht gelungen den kausalen Beweis im Modellorganismus anzutreten, so dass unser Verständnis anhand der aktuellen Forschung noch sehr eingeschränkt ist. Vorhofflimmern ist eine so komplexe und inhomogene Erkrankung, dass davon auszugehen ist, dass auch nicht alle Subtypen der Erkrankung den gleichen Mechanismen unterliegen. Daher ist anzunehmen, dass auch verschiedene miRNAs bei der Entstehung der verschiedenen Arten von VHF beteiligt sind<sup>41</sup>. Die aktuelle Datenlage erlaubt es noch nicht, ein Gesamtbild zu sehen, daher ist jeder weitere Versuch Licht ins Dunkel zu bringen von potentiell enormem Wert für die Entwicklung neuer Therapien des Vorhofflimmerns.

## 3.9 Überblick über etablierte Tiermodelle des Vorhofflimmerns

Vermutlich aufgrund der vielen Einflüsse auf die Pathogenese von VHF haben Arbeitsgruppen die unterschiedlichsten Ansätze verfolgt um Tiermodelle des Vorhofflimmerns zu erzeugen. Es ist deutlich, dass die Verwendung von Tiermodellen im Vergleich zur Erforschung im Patienten viele Vorteile bietet. So bietet sich dem Forscher die Möglichkeit zur umfassenden Manipulation aller erdenklichen Faktoren, aber auch beispielsweise die Option, jedes Gewebe der Tiere zu asservieren und molekularbiologisch zu untersuchen<sup>77</sup>. Verständlicherweise ist dies in Patienten nur in den seltensten Fällen möglich, etwa im Rahmen von kardiochirurgischen Eingriffen.

Im Groben lassen sich die etablierten Modelle in Großtier- und Kleintiermodelle unterteilen.

### 3.9.1 Großtiermodelle des Vorhofflimmerns

Zwei große Ansätze lassen sich hier voneinander abgrenzen. In den Großtiermodellen wurde das Substrat für VHF entweder durch forcierte Erhöhung der Herzfrequenz (Tachypacingmodelle) oder durch induziertes strukturelles Remodeling (zum Beispiel durch Ischämie oder verstärkten autonomen Stress) herbeigeführt<sup>77</sup>. Spezies, in denen dies versucht wurde sind unter anderem: Hund, Ziege, Schaf, Schwein, Kaninchen. Den verschiedenen Ansätzen lag stets das Ziel zugrunde, verschiedene pathogenetische Faktoren des Vorhofflimmerns zu imitieren.

Einige dieser Modelle sollen hier nun vorgestellt werden.

#### 3.9.1.1 Tachypacing

Die Erkenntnis, dass durch Vorhofflimmern selbst die Elektrophysiologie des Herzens verändert und das profibrillatorische Substrat aufrechterhalten bzw. sogar gefördert wird<sup>78</sup> geht auf eine Arbeit von Wijffels et al. aus dem Jahre 1995 zurück. In ihrem Ziegenmodell konnten sie erste Hinweise auf den Einfluss von „burst pacing“ auf die Elektrophysiologie des Herzens finden und prägten den neuen Begriff des atrialen Remodelings. Genauer beobachteten sie eine verkürzte Refraktärperiode der Ziegenherzen mit Verlust der Frequenzadaptivität selbiger sowie eine verstärkte Aufrechterhaltung von VHF<sup>78</sup>. Das durch Vorhofflimmern induzierte Remodeling ist nicht von dem durch jede andere schnelle atriale Tachykardie induzierten Remodeling zu unterscheiden<sup>77</sup>. Diesen Umstand machte man sich nun zu Nutze, um durch sogenanntes Tachypacing in verschiedenen Spezies Modelle des Vorhofflimmerns zu etablieren. Dies wurde vorgenommen in Schweinen<sup>79, 80</sup>, Hunden<sup>81, 82</sup> und Schafen<sup>83</sup>, sowie wie oben beschrieben in der Ziege<sup>77, 78</sup>. Da durch den Einfluss von Tachypacing vorwiegend elektrische Vorgänge beeinflusst werden, bietet sich diese Form der Modelle an, Mechanismen und eventuell Medikamente zu erforschen, die elektrisches Remodeling beeinflussen<sup>77</sup>.

### 3.9.1.2 Modelle des strukturellen Remodelings

Neben den Tachypacingmodellen haben sich Modelle des strukturellen Remodelings bewährt. Dass dies funktioniert wurde erstmals von Li et. al 1999 in einem Herzinsuffizienzmodell des Hundes gezeigt<sup>84</sup>. Klinisch zeigen – wie weiter oben demonstriert – viele der für VHF präkonditionierenden Umstände strukturelles Remodeling. Gezeigt werden konnte dies unter anderem für valvuläres VHF, Bluthochdruck, Altern und vielleicht am wichtigsten für Kardiomyopathien und im speziellen die ischämische Kardiomyopathie<sup>77</sup>. So haben sich Modelle aus den meisten dieser Pathologien entwickelt. Nachfolgend sollen einige dazu vorgestellt werden. Diese enthalten Modelle der Herzinsuffizienz, der Mitralinsuffizienz, des AV-Blocks dritten Grades, Volumenbelastung der Vorhöfe, Bluthochdruck oder auch Herzinfarkten<sup>77</sup>.

#### 3.9.1.2.1 Herzinsuffizienzmodelle

Das Spektrum an Möglichkeiten zur Induktion einer Herzinsuffizienz in Modellorganismen ist breit. Dennoch wurden hierzu, um VHF zu untersuchen vorwiegend Modelle entwickelt, die auf einem Tachypacing – zum Beispiel in Hunden und Schafen – basieren<sup>84-86</sup>. Den in der Literatur bereits beschriebenen Modellen ist gemein, dass Zellen, die aus den Herzen der Modelle isoliert wurden, verlängerte Aktionspotentialdauer, späte Nachdepolarisationen und eine Positivierung des Ruhemembranpotentials zeigen<sup>66, 87</sup>. Wird in diesen Modellen die schnelle Schrittmacherstimulation der Tiere eingestellt, so bildet sich die klinische Herzinsuffizienz sowie die Veränderungen des elektrischen Remodelings weitgehend zurück, während die Fibrose<sup>5</sup>, sowie der arrhythmogene Phänotyp bestehen bleiben<sup>88-91</sup>. Dieser Umstand legt nahe, dass zumindest im experimentellen Setting der Herzinsuffizienz strukturelles Remodeling eine wichtigere Rolle einnimmt, als elektrisches Remodeling<sup>77</sup>. Dies kann eine Entscheidungshilfe zur Wahl des adäquaten Modells darstellen.

#### 3.9.1.2.2 Mitralklappeninsuffizienz

Ein wesentlicher Faktor, der das Auftreten von VHF begünstigt ist die Mitralklappeninsuffizienz. So etablierten Verheule et al. ein Hundemodell, in dem sie

den Rückfluss durch die Mitralklappe durch interventionelle Schädigung derselben herbeiführten<sup>92</sup>. Es zeigte sich eine Verlangsamung der Erregungsfortleitung, vermutlich bedingt durch die entstandene Fibrose. Dies führte in dem Modell zu einem Nährboden für VHF<sup>93</sup>.

#### 3.9.1.2.3 AV-Block-Modell

Neuberger et al. etablierten ein VHF Modell in Ziegen, bei denen sie einen AV-Block dritten Grades herbeiführten. Nach vier Wochen stellte sich bei den Ziegen eine Vergrößerung der Vorhöfe sowie vermehrt VHF ein<sup>94, 95</sup>. Dieses Modell eignet sich demnach vermutlich, um Mechanismen hinter dem Zusammenhang zwischen atrialer Dilatation und VHF näher zu beleuchten.

#### 3.9.1.2.4 Modell der sterilen Perikarditis

Aus der Geschichte der offenen Chirurgie des Thorax ist bekannt, dass Vorhofflimmern eine der möglichen postoperativen Komplikationen darstellt<sup>77</sup>. Dies wird mit der Entstehung einer sterilen Perikarditis in Verbindung gebracht und hat schon im Jahre 1986 Pagé et al. dazu inspiriert, ein Hundemodell der sterilen Perikarditis durch offene Bestäubung der Vorhöfe mit Talkumpuder zu generieren, in dem sie eine vermehrte Induzierbarkeit von VHF (und Vorhofflattern) feststellten<sup>96, 97</sup>.

#### 3.9.1.2.5 Modelle der Volumenbelastung

Eine Volumenbelastung des Herzens führt zur Dilatation von Vorhöfen und Ventrikeln. Diesen Umstand machen sich Modelle zu Nutze, die durch akute oder chronische Volumenüberladung des Organismus ein Flimmersubstrat entstehen lassen. Bisher wurde dies in Hunden, Ziegen, Schafen und Kaninchen etabliert<sup>98-101</sup>. Um eine experimentelle Volumenbelastung herbeizuführen, wurden verschiedene Modelle etabliert, darunter zum Beispiel um eine chronische Belastung herbeizuführen aorto-linksatriale Shunts oder aorto-pulmonale Shunts<sup>77</sup>. In diesen Modellen trat vermehrt VHF auf<sup>77</sup>. Auch zur Etablierung von akuten Belastungen wurden verschiedene Wege beschritten, Ravelli et al. erzeugten beispielsweise eine Vorhofdehnung an Kaninchenherzen in Langendorffperfusion<sup>102</sup>. Andere Strategien *in*

*vivo* erzeugten Volumenbelastung durch Infusion von Salzlösungen oder atriale Dehnung durch Ballonkatheter in Hunden<sup>101, 103</sup>.

#### 3.9.1.2.6 Arterielle Hypertonie

Durch das pränatale Verabreichen von Steroiden an Schafe gelang es Kistler et al. ein VHF Modell zu generieren<sup>104</sup>. In diesem Modell zeigte sich eine atriale Dilatation begleitet von verlängerten VHF Episoden sowie signifikantes strukturelles Remodeling<sup>104</sup>.

#### 3.9.1.2.7 Weitere Modelle

Durch die Applikation des Neurotoxins Aconitine konnten Hashimoto et al. ein weiteres Modell des VHF im Hund erzeugen. Der Wirkstoff öffnet tetrodotoxinsensitive Natriumkanäle im Herzen und führt so zur Entstehung von Vorhofflimmern<sup>105, 106</sup>. Dieses Modell wurde verwendet um neue Medikamente zu testen, die Einfluss auf Ionenkanäle nehmen<sup>77</sup>.

Besonders interessant ist das Modell von Sinno et al. Sie erzeugten einen akuten Infarkt in einem Seitenast einer ausschließlich das Atrium versorgenden Arterie eines Hundes und konnten dadurch verlängertes VHF hervorrufen<sup>107</sup>. Dieses Modell ist insofern interessant, als dass die koronare Herzkrankheit (KHK) ein besonderer – weil häufiger – Risikofaktor für VHF ist<sup>77</sup> und eine Erforschung der Pathologie dieses Phänomens wichtig ist. Unter Umständen ist ein besonderer Therapieansatz für VHF auf Basis von KHK bei spezifischem Krankheitsprofil möglich<sup>77</sup>.

Ein praktischer – weil nicht so kostenintensiver – Ansatz ist die Erzeugung von VHF Modellen durch Vagusstimulation, so unter anderem etabliert in Schaf und Hund<sup>108-110</sup>. Diese Modelle bieten sich besonders zum *in vivo* Screening bei potentiellen neuen Antiarrhythmika an<sup>77</sup>. Neben der vagalen Stimulation ist es auch möglich durch sympathomimetische Wirkung ein Modell des VHF zu generieren, so geschehen in einem Hundemodell<sup>111</sup>.

### 3.9.2 Kleintiermodelle des Vorhofflimmerns

Von besonderer Bedeutung unter den Kleintiermodellen sind neben den vielfältigen Knockoutmodellen der Maus noch einige Modelle in der Ratte zu nennen. Es folgt ein kurzer Überblick über bestehende Modelle. Modelle des Zebrafisches sind vor allem in der Genetik relevant, einzelne Modelle zu rhythmologischen Fragestellungen wurden erzeugt – jedoch erlaubt der Modellorganismus lediglich das Untersuchen von basalen elektrophysiologischen Parametern wie das Ableiten eines Einkanal-EKGs<sup>61, 112, 113</sup> und eignet sich daher nicht für komplexere pathogenetische Fragestellungen.

#### 3.9.2.1 Vorhofflimmermodelle der Ratte

Wichtige Ansätze zur Generierung von Modellen in der Ratte sind vor allem Infarktmodelle, Hypertoniemodelle, und Modelle durch Inhibition der Glykolyse<sup>77</sup>.

Erste Schritte in der Etablierung von nicht pharmakologisch generierten VHF Modellen in Kleintieren gingen Boixel et al. in der Ratte<sup>114</sup>. Durch Ligatur der linken Koronararterie erzeugten sie in Ratten eine linksatriale Fibrose und eine Dilatation des linken Atriums neben einer Herzinsuffizienz<sup>114</sup>. Trotz dieses profibrillatorischen Substrats konnten sie in EKG-Aufnahmen der Ratten kein spontanes VHF nachweisen<sup>77, 114</sup>.

In genetisch hypertensiven Ratten zeigte sich ebenfalls die Entstehung eines profibrillatorischen Substrats überwiegend bestehend aus Fibrose<sup>115, 116</sup>.

Den Umstand der ATP-abhängigen Aufnahme von Kalzium in das sarkoplasmatische Retikulum machten sich Ono et al. zu Nutze. Sie inhibierten die Glykolyse in isolierten Rattenherzen und konnten dadurch in alten Ratten spontanes VHF generieren<sup>117</sup>.

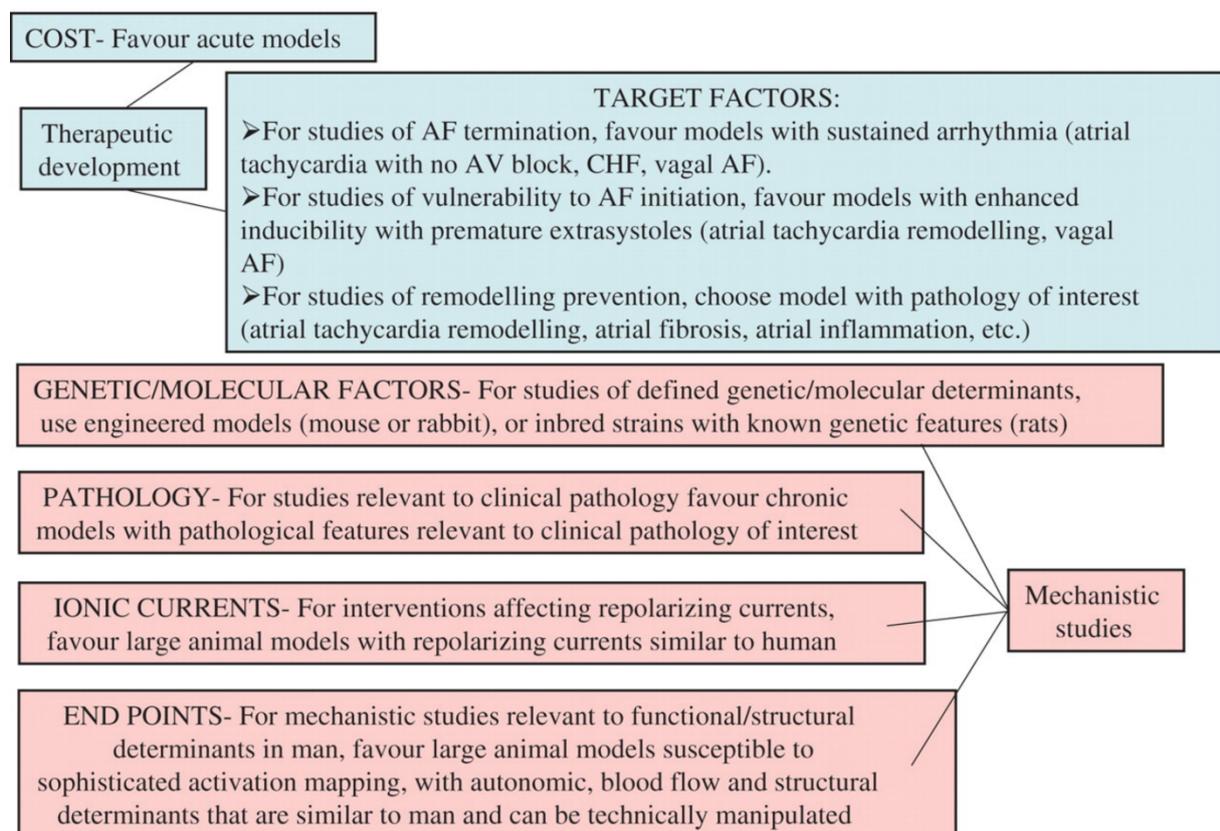
#### 3.9.2.2 Mausmodelle des Vorhofflimmerns

Der Modellorganismus Maus wird vor allem zur Generierung von Knockoutmodellen herangezogen<sup>77</sup>. Mausmodelle eignen sich vor allem dazu, eine Brücke zwischen der genetischen Forschung und der Grundlagenforschung zu schlagen. So gab es in den letzten Jahren einige Veröffentlichungen zu sogenannten genome wide association

studies (GWAS), die bestimmte genetische Loci mit VHF korrelieren konnten<sup>118, 119</sup>. In weiterer Folge entstanden viele Knockout Modelle der Maus zu den unterschiedlichsten Loci, um zu erforschen, ob ein Vorhofflimmer-Phänotyp mit der genetischen Variante assoziiert ist.

### 3.9.3 Zusammenfassung Tiermodelle

Die multifaktorielle Genese von VHF macht es unmöglich, ein ideales VHF Modell zu erzeugen<sup>77</sup>. Daher ist es von besonderer Bedeutung, das beste Modell für die zu untersuchende Fragestellung auszuwählen. Viele Aspekte müssen bei dieser Entscheidung berücksichtigt werden. Einen Überblick zu den Überlegungen lieferten Nishida et al. in ihrem Review aus dem Jahr 2010 (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3.** Überlegungen zur Wahl des geeigneten Tiermodells<sup>77</sup>.

Jedes erwählte Modell liefert im besten Fall kleine Aussagen bezüglich der Bedingungen von Teilaspekten der Genese der Erkrankung in diesem Modell

selbst<sup>120</sup>. Dennoch ist festzuhalten, dass die Forschung in Modellorganismen in den letzten Jahren wichtige Hinweise zu den zugrunde liegenden Mechanismen geliefert hat und eine weitere Verfolgung dieses Ansatzes wünschenswert ist<sup>77</sup>.

### 3.10 Hypothesen und Ziele

Der Fortschritt der modernen Medizin hat zu einer Situation geführt, in der unter dem Aspekt der zunehmend alternden Bevölkerungsstruktur kombiniert mit einem immer längeren Überleben trotz kardiovaskulärer Grunderkrankungen (zunehmendes Alter und Begleiterkrankungen beschleunigen die Grunderkrankung sowie die Häufigkeit auftretender Komplikationen signifikant<sup>121</sup>) die Wichtigkeit des grundlegenden Verständnisses der Volkskrankheit Vorhofflimmern stetig zunimmt.

Es ist von entscheidender Bedeutung bei dem Entwurf einer Studie einen möglichst geeigneten Modellorganismus zu wählen. Wie bereits oben ausgeführt sind dabei viele Faktoren von immenser Bedeutung. Allgemein sind Tiermodelle eine Möglichkeit, Pathogenese *in vivo* zu untersuchen<sup>122</sup>. Den Vorteilen von Kleintiermodellen, besonders der Maus – wie beispielsweise die geringeren Kosten/Tier, der kurzen Generationszeit, den großen Würfen und den inzwischen nahezu grenzenlosen mikrochirurgischen Möglichkeiten, aber auch des vielfältigen Wissens über die Genetik der Spezies – sind Nachteile entgegenzustellen wie die fragliche Übertragbarkeit auf den Menschen<sup>122</sup>. Besonders was die kardiovaskuläre Forschung angeht, macht es elektrophysiologisch einen Unterschied ob ein Herz 60 Mal oder 600 Mal in einer Minute schlägt<sup>112</sup> und ob Anatomien vergleichbar sind. Aus diesem Grund sind geeignete Großtiermodelle für bestimmte Fragestellungen unerlässlich. Hundemodelle haben Limitationen hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus, beispielsweise durch ihre grundlegend andere Koronaranatomie. Zudem sind sie in gesellschaftspolitischer Hinsicht schwer vermittelbar und werden daher von den zuständigen Genehmigungsbehörden nicht mehr unterstützt. Das Schwein bietet sich hier als alternatives Modelltier an, zumal die Anatomie des porcinen Herzens der des Menschen ähnelt. So ist etwa das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht in Hausschweinen mit 5g/kg identisch zu dem des Menschen<sup>123</sup>. Auch die Klappenanatomie ist sehr ähnlich<sup>124</sup>. Besonders vorteilhaft ist, dass gerade im Gegensatz zu Hunden die Koronaranatomie des Schweins mit der des Menschen absolut vergleichbar ist<sup>124</sup>. Das ist auch

dahingehend vorteilhaft, als dass die Blutversorgung des Reizleitungssystems der des Menschen ähnelt und ischämieinduzierte Veränderungen daher anatomisch korrelierbar sind. Auch die hämodynamischen Parameter des Schweins sind denen des Menschen sehr ähnlich<sup>124</sup>. Zudem ist es durch die ähnlichen Maße einwandfrei möglich, für den Menschen entwickeltes Equipment im Schwein einzusetzen – ein nicht zu vernachlässigender Faktor im praktischen Alltag. Die vorhandenen Schweinemodelle für Vorhofflimmern, etwa das atriale Tachypacingmodell oder das Modell der sterilen Perikarditis, haben jedoch einen entscheidenden Nachteil: sie imitieren eine im Menschen nur seltene Ursache für Vorhofflimmern (Tachykardiomyopathie bzw. Perikarditis), wodurch die anhand dieser Modelle gewonnenen Erkenntnisse unter Umständen nur auf eine kleine Anzahl Patienten zutrifft.

Im Menschen ist die ischämische Kardiomyopathie dagegen die häufigste zugrundeliegende Herzerkrankung, die zu Vorhofflimmern führt. Ein entsprechendes Ischämiemodell im Schwein existiert jedoch bislang nicht.

Darüber hinaus sind microRNA-vermittelte proarrhythmogene Mechanismen zwar in einer Reihe von Modellen beschrieben, die Bedeutung von miRNA-assoziiertem Remodeling bei ischämischer Kardiomyopathie und damit einhergehender Arrhythmieneigung ist jedoch weiter unklar. Die miR-26 ist zwar keine herzspezifische miRNA, jedoch im Herzen besonders stark exprimiert und wurde in anderen Modellen bereits mit elektrischem und strukturellem Remodeling assoziiert<sup>56,27</sup>.

Die vorgelegte Arbeit untersucht daher zwei Hypothesen, einerseits, dass die ischämische Kardiomyopathie im Schwein ein adäquates Modell für paroxysmales Vorhofflimmern darstellt, und andererseits, dass die miR-26 eine wichtige Rolle bei ischämie-bedingtem proarrhythmischem Remodeling spielt.

**Um diese Hypothesen zu überprüfen werden folgende Ziele verfolgt:**

- 1) die Charakterisierung eines präklinischen Schweinmodells der Myokardischämie und dessen Etablierung als Modell für paroxysmales Vorhofflimmern
- 2) die Untersuchung von microRNA-Veränderungen und deren Einfluss auf kardiales Remodeling in diesem Schweinmodell

## 4 Material und Methoden

### 4.1 *In vivo*

#### 4.1.1 Versuchstiere

Bezogen wurden als Versuchstiere Schweine der Rasse deutsches Landschwein im Alter von drei bis sechs Monaten. Durchschnittlich betrug das Gewicht der Schweine 20 – 25 kg. Die Tiere kamen aus dem Lehr- und Versuchstiergut der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim.

Die Schweine wurden sodann im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin in Großhadern untergebracht. Die Haltung der Tiere erfolgte bei kontrolliertem Tag-/Nachtzyklus, sowie bei Zugang zu Wasser und Futter ad libitum konform der Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes. Zur Akklimatisation der Tiere sowie zur Stressreduktion vor den Interventionen wurde eine Wartezeit vor Beginn der Studie von einigen Tagen eingehalten.

#### 4.1.2 Das Tiermodell – Studiendesign

Nach dem Zufallsprinzip wurden die Tiere den Versuchsgruppen zugeteilt: 1) Kontrolle, 2) Kurzzeitschämie (I/R<sub>3</sub>) oder 3) Langzeitschämie (I/R<sub>30</sub>). Insgesamt wurden 28 Schweine untersucht, 14 in der Kontrollgruppe, 4 in der I/R<sub>3</sub>-Gruppe und 10 in der I/R<sub>30</sub>-Gruppe.

Der Versuchsaufbau sah einen Ersteingriff an Tag 1, sowie abhängig der Studiengruppe einen Zweiteingriff nach 3 (Kurzzeitschämiemodell) oder 30 (Langzeitschämiemodell) Tagen vor. Im Zuge des Ersteingriffes erfolgte die invasive Bestimmung hämodynamischer Basisparameter, eine linksventrikuläre Angiografie sowie bei Tieren der beiden Interventionsgruppen eine Koronarangiographie verbunden mit einem Verschluss der linken Koronararterie mittels eines Ballons, der angiographisch distal des Abgangs des ersten Diagonalasts platziert wurde. Dieser Ballon wurde für 90 Minuten mit einem Druck 10 atm gefüllt und anschließend nach Ablassen des Drucks wieder entfernt. Die erfolgreiche Reperfusion wurde durch erneute koronarangiographische Darstellung nachgewiesen und der Eingriff beendet.

Der Zweiteingriff erfolgte je nach Studienast nach 3 oder 30 Tagen und umfasste die gleichen Messungen wie zum Zeitpunkt des Ersteingriffes. Im Anschluss an die

Laevokardiographie erfolgte jedoch zusätzliche eine Elektrophysiologische Untersuchung (EPU) sowie die Induktion von Vorhofflimmern mittels Burststimulation. Im Anschluss an den Zweiteingriff erfolgten die Tötung der Tiere sowie die Entnahme der Herzen zur weiteren molekularbiologischen und histologischen Untersuchung. Die Kontrolltiere wurden jeweils nur dem Zweiteingriff unterzogen.

#### 4.1.3 Material

##### 4.1.3.1 Geräte

Katheterschleusen	Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
Druckschlauchsystem	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Druckabnehmer Statham Transducer P23 ID	Statham Instruments, Inc., Oxnard, California, USA
Hellige Monitor	Hellige, Freiburg
Pulsoxymeter Ohmeda BIOX 3700e	Ohmeda Louisville, CO, USA
C-Bogen Exposcop 8000	Ziehm GmbH, Nürnberg
Pigtail Katheter PIG Super Torque® Plus	Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
Ethibond Excel Sutupak 6 x 45 cm	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Vicryl CTX Plus 70 cm	Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
0,014“ Führungsdraht	Road Runner Extra Support, Cook Denmark Holding ApS, Bjæverskov, DÄNEMARK
Judkins-Rechts-Katheter	Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
12/3.0 PTCA-Ballon Quantum™ Maverick® Monorail Ballon Katheter	Boston Scientific, Natick, MA, USA

In-/Deflator	Sedat, Irigny FRANKREICH
Universal Heart Stimulator UHS 20	Biotronik, Baar, SCHWEIZ
CardioLab EP Aufzeichnungssystem	GE Healthcare, Solingen

#### 4.1.3.2 Medikamente

Alle Medikamente wurden über die Apotheke des Klinikums Großhadern von den Vertragspartnern der Apotheke bezogen.

#### Narkotika

Propofol 2%	IFL	1000 mg / 50 ml (2%)
Ketamin-Hcl	IFL	500 mg / 10 ml
Midazolam	Amp.	15 mg / 3 ml

#### Analgetika

Piritramid	Amp.	15 mg / 2 ml
Fentanylidihydrogencitrat	Amp.	0,157 mg / 2 ml
Fentanylidihydrogencitrat	Amp.	0,785 mg / 10 ml

#### Infusionslösungen

Natriumchloridlösung 0,9%	Amp.	10 ml Miniplasco
Natriumchloridlösung 0,9%	IFL	50 ml
Natriumchloridlösung 0,9%	INF	500 ml

#### Antibiotika

Cefuroxim-Na	IFL	1500 mg
--------------	-----	---------

**Antikoagulation**

Heparin-Na	IFL	25.000 IE / 5 ml
DL-Lysinmonoacetylsalicylat	IFL	500 mg ASS / 5 ml
Clopidogrel	Tbl.	75 mg

**Kardiaka**

Lidocain-Hcl 2%	Amp.	5 ml
Metoprololtartrat	Amp.	5 mg / 5 ml
Amiodaron-Hcl	Amp.	150 mg
Glyceroltrinitrat	Amp.	5 mg / 5 ml

**Sonstiges**

Kaliumchloridlösung 7,45%	Amp.	20 ml
Atropinsulfat	Amp.	0,5 mg / 1 ml
Furosemid-Na	Amp.	20 mg / 2 ml
Magnesiumsulfat-7H <sub>2</sub> O	Amp.	5 g / 10 ml

**Veterinärmedizinische Medikamente**

Atipamezol	Antisedan©
Medetomidin	Domitor©
Xylazin	Rompun©
Azaperon	Stresnil©

**Kontrastmittel**

Kontrastmittel Imeron <sup>®</sup> 350, Iomeprol	Bracco Imaging, Konstanz
--	--------------------------

#### 4.1.3.3 Sonstiges

Gaze Nobagaze® Kompressen	Noba Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter
Klebeplaster Leucoplast® hospital	BSN medical GmbH, Hamburg

#### 4.1.4 Methoden

##### 4.1.4.1 Versuchstierhaltung

Die Haltung der Schweine erfolgte im Walter-Brendel-Zentrum in Stallungen entsprechend den Voraussetzungen S1 nach der Gentechnik-Sicherheitsverordnung von 1990. Die Innenboxen (1,5 x 2,0 m) sind zur Trinkwasserversorgung mit automatischen Nippeltränken versehen. Ihre Liegeflächen sind mit speziellen Fliesen ausgekleidet. Zusätzlich wurden die Boxen täglich gereinigt und frisches Stroh eingelegt. Zu überdachten Außenausläufen (4 x 4 m) herrschte ganztags freie Zugangsmöglichkeit. Deren Boden besteht aus Beton. Zum Enrichment der Tierhaltung im Walter-Brendel-Zentrum zählen Tierbälle in den Ausläufen sowie trockene Nudeln im Stroh in den Innenboxen. Die Tiere erhalten Wasser ad libitum sowie ein geeignetes Pelletfutter. Zusätzlich werden Luzerne, Vollkorn-, Obst- und Gemüseprodukte von den Betreuern angeboten. Alle Tiere unterlagen einer 12-stündigen präoperativen Nahrungskarenz.

Die Tiere waren mindestens eine Woche vor der ersten Intervention in der Tierhaltung, um sich an die neue Umgebung anpassen zu können und sich von dem transportbedingten Stress zu erholen. Postoperativ gibt es eine eigene Aufwachbox, in der sie bis zum vollständigen Aufwachen verblieben.

##### 4.1.4.2 Induktion und Charakterisierung des Modells

###### 4.1.4.2.1 Narkoseeinleitung

20-25 kg schwere Schweine erhielten nach intramuskulärer Narkoseeinleitung mittels Ketamin (20 mg/kg), Azaperon (10 mg/kg) und Atropinsulfat (0,05 mg/kg) einen peripheren venösen Zugang an der Ohrvene, über den die Narkose mittels Midazolam

(0,5 mg/kg i.v.) vertieft wurde. Anschließend wurden die Schweine endotracheal intubiert und druckkontrolliert beatmet (initialer Beatmungsdruck 20-25 mbar, PEEP 5 mbar, Atemfrequenz 16/min., um ein Atemzugvolumen von 8-12 ml/kg Körpergewicht zu erreichen; weitere Anpassung der Beatmungsparameter erfolgte entsprechend der wiederholten Blutgasanalysen im Verlauf). Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch Allgemeinanästhesie mit Propofol (0,5 mg/kg/min i.v.). Die Überprüfung der Narkosetiefe erfolgte durch Testung des Pedalreflexes sowie Überwachung der Herzfrequenz. Zur peri- und postoperativen Analgesie wurde Fentanyl (0,05 mg/kg i.v.) verwendet.

#### 4.1.4.2.2 Vorbereitung der Messungen

Im Ersteingriff wurden nach ca. 4 cm langer Inzision seitlich am Hals auf Höhe des M.sternocleidomastoideus die V. jugularis interna und die A. carotis externa unter sterilen Bedingungen freigelegt und jeweils eine Katheterschleuse (V.jugularis: 11 F, A.carotis: 9 F) eingebracht. Anschließend erfolgte die Messung hämodynamischer Parameter. Die Rechtsherzkatheteruntersuchung erfolgte durch Einschwenken eines Pulmonalkatheters. So konnten die Drücke im rechten Herzen sowie das Herzzeitvolumen mittels Thermodilutionsmethode gemessen werden. Im Anschluss daran wurde mittels Pigtail-Katheter eine linksventrikuläre Angiographie aufgenommen, sowie die linksventrikulären Drücke gemessen. Die Messungen erfolgten in Ruhe und unter gesteigerter Herzfrequenz von 130/min., die mittels passagerer Schrittmacherstimulation erreicht wurde.

Die Überwachung der Narkose erfolgte kontinuierlich über die abgeleiteten Vitalparameter des arteriellen Blutdrucks mittels invasiver Messung sowie des Pulses und der Sauerstoffsättigung über ein Pulsoxymeter welches am Ohr des Versuchstieres befestigt wurde. Zusätzlich erfolgte die kontinuierliche Ableitung eines EKGs.

#### 4.1.4.2.3 Arterielle Blutdruckmessung

Die Messung des arteriellen Blutdrucks erfolgte invasiv über ein Druckwandlersystem und nachfolgend optische Darstellung auf einem Monitor. Das Messsystem wurde zum Nullabgleich gegen den atmosphärischen Druck abgeglichen. Nun wurde

kontrolliert, ob auch das gesamte System luftblasenfrei mit 0,9 %iger NaCl-Lösung befüllt war. Danach konnte die eigentliche Messung vorgenommen werden.

#### 4.1.4.2.4 Bestimmung der Auswurfaktion (EF)

Es erfolgte die Einbringung eines Pigtail Katheters über die arterielle Schleuse. Über die Aorta wurde dieser unter Durchleuchtungskontrolle in den linken Ventrikel eingebracht. Es erfolgte die Applikation von 20 ml Kontrastmittel und damit eine Darstellung des Ausmaßes des linken Ventrikels über mindestens eine gesamte Herzaktion. Diese Darstellung erfolgte in einer 30° RAO Position, um unten beschriebene Berechnung zu ermöglichen. Zuerst erfolgte die Darstellung unter Ruhebedingungen. Anschließend wurde ein passagerer Schrittmacher über die venöse Schleuse in den rechten Vorhof eingebracht und die Darstellung unter Stimulation mit 130/min. in der gleichen Projektionsebene wiederholt.

Daraus folgend wurde am Computer planimetrisch mithilfe der Bildbearbeitungssoftware Image J die Fläche des linken Ventrikels zum Ende der Systole (ESF) sowie zum Ende der Diastole (EDF) sowie die Länge des Ventrikels zum Ende der Systole und der Diastole bestimmt und daraus die EF nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{End systolic volume (ESV)} = \frac{8}{3 \times \pi} \times \frac{\text{IV area}_{\text{systole}}^2}{\text{IV length}_{\text{systole}}} \times \text{body surface}^3$$

$$\text{End diastolic volume (EDV)} = \frac{8}{3 \times \pi} \times \frac{\text{IV area}_{\text{diastole}}^2}{\text{IV length}_{\text{diastole}}} \times \text{body surface}^3$$

$$\text{Ejection fraction (EF)} = \frac{(\text{EDV} - \text{ESV})}{\text{EDV}} \times 100$$

#### 4.1.4.2.5 Messung des linksventrikulären Drucks (LVP)

Die Messung des linksventrikulären Druckes erfolgte mittels eines Pigtailkatheters. Unter Durchleuchtungskontrolle wurde der Katheter nun in der linken Herzkammer im Bereich des Apex platziert. Die Entsprechenden Drücke konnten nun am Monitor über die Zeit abgelesen werden. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die

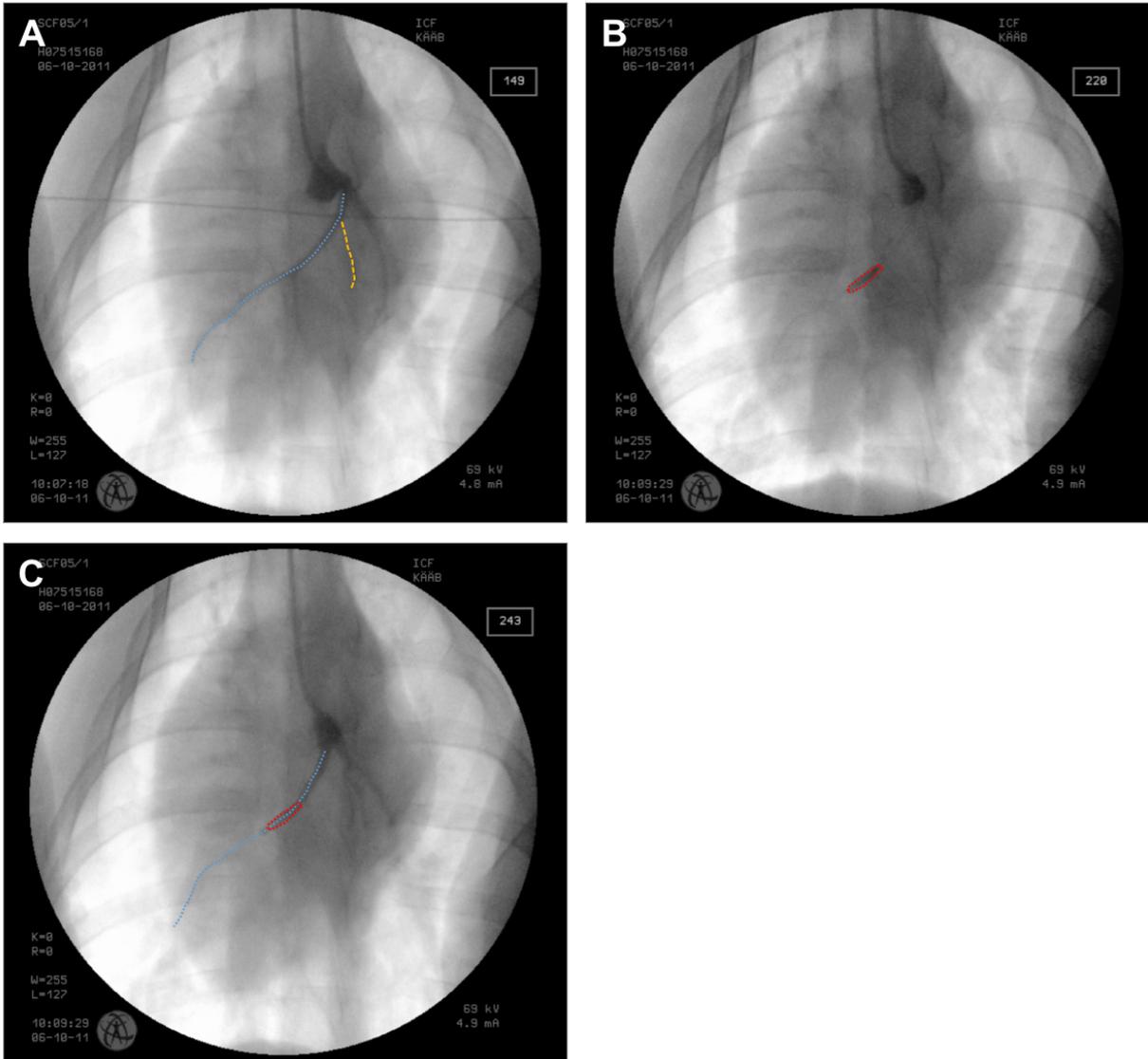
Messungen unter ventrikulärem Pacing (130/min.) mittels eines passageren Schrittmachers vorgenommen.

#### 4.1.4.2.6 Messung der Hämodynamik des rechten Herzens sowie des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP)

Die Messung der Drücke des rechten Herzens (Druck im rechten Atrium, rechten Ventrikel und in der Pulmonalarterie) sowie des linksventrikulären enddiastolischen Drucks erfolgte mittels Swan-Ganz Katheter. Dieser wurde über die venöse Schleuse zuerst im rechten Herzen und dann bis in einen Endast der Pulmonalarterie platziert. Nach erfolgter Messung der Hämodynamik des rechten Herzens wurde nun nach dem Prinzip des Katheters der Endast der Pulmonalarterie durch einen kleinen Ballon verschlossen. Da sich der Druckabnehmer nun vor dem Ballon befindet kann nach dem Prinzip der kommunizierenden Röhren der linksventrikuläre enddiastolische Druck bei offener Mitralklappe in diesem kleinen Gefäß gemessen werden.

#### 4.1.4.2.7 Infarzierung

Nach Durchführung der Messungen wurde ein Judkins Katheter 7F rechts über den arteriellen Zugang bis in das Ostium der linken Koronararterie vorgeschoben. Durch diesen Katheter wurde ein 0,014“-Führungsdraht in die linke Koronararterie vorgeschoben und darüber der Ballon in diese eingebracht. Nach angiographischer Kontrolle der Positionierung distal des 1. Diagonalasts wurde der 3,0 x 12 mm Ballon mit 10 atm dilatiert und eine 90-minütige Ischämie induziert. Nach 90 Minuten wurde der Ballon schließlich wieder entfernt und die Reperfusion ermöglicht. Die tatsächlich erfolgte Reperfusion wurde unter Durchleuchtung kontrolliert und bildlich festgehalten.



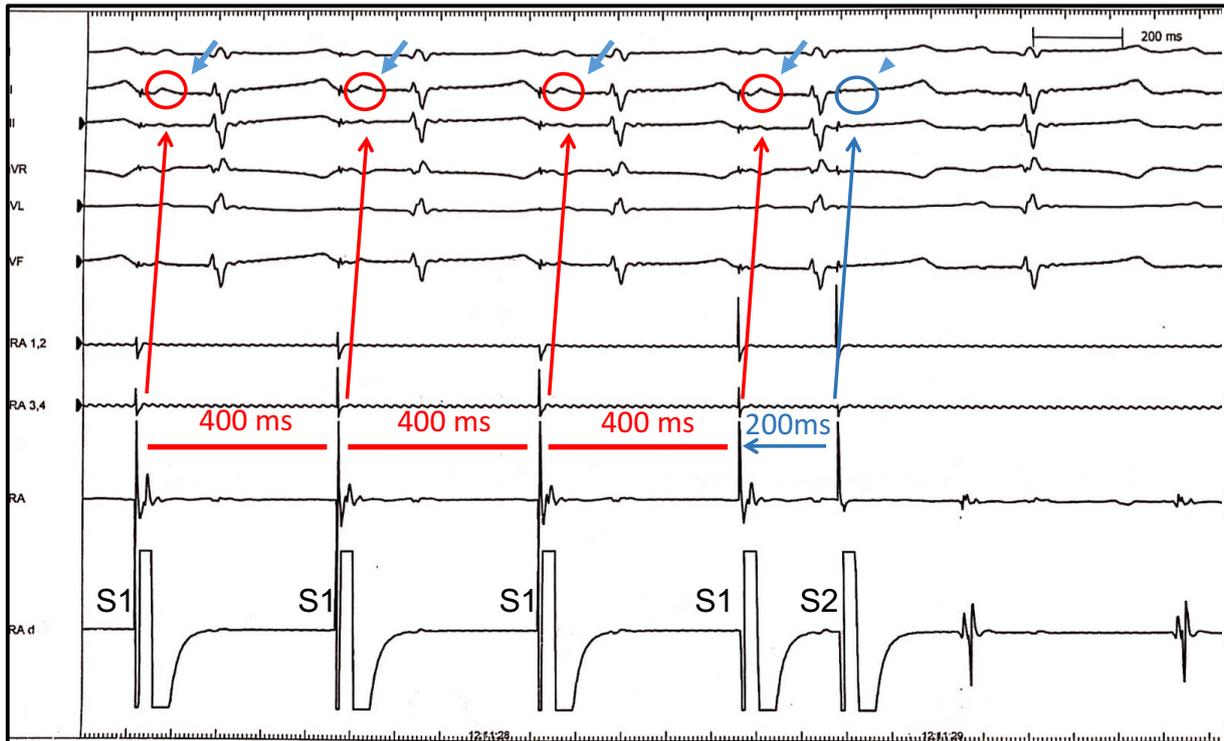
**Abbildung 4.** Koronarangiographie. **A.** Darstellung der linken Koronararterie: LAD blau gestrichelt, erster Diagonalast gelb gestrichelt. **B.** Darstellung des rot umrahmten Ballons in Position. **C.** Zustand bei insuffliertem Ballon, zu sehen der Perfusionsabbruch im Stromgebiet nach dem Ballon.

Im Anschluss daran wurden die Schleusen am Hals entfernt, die Gefäße ligiert und die Muskelschichten schichtweise vernäht. Nach sorgfältiger Blutstillung wurde auch die Haut mit Einzelknopfnähten verschlossen. Nach erfolgter Hautnaht wurde die Narkose ausgeleitet. Sobald eine stabile Eigenatmung erreicht war, wurden die Tiere extubiert und unter fortlaufender Kontrolle der Vitalparameter in den Tierstall zurückgebracht.

Zwischen Erst- und Zweiteingriff wurden die Tiere engmaschig überwacht. Die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme unterlag auch hier keinen Restriktionen. Ergaben sich aus den Wundverhältnissen Anzeichen einer Infektion der Wunde, wurde ein Antibiotikum (Cefuroxim 50 mg/kg KG) verabreicht. Die Naht am Hals beeinträchtigte die Tiere in ihrem Bewegungsverhalten nicht. Um postoperative Schmerzen aufgrund der Halswunde bzw. der Myokardischämie von vornherein zu verhindern wurden zusätzlich Analgetika zweimal täglich für drei Tage verabreicht (Buprenorphin 6 µg/kg KG i.m.). Zeigten sich darüber hinaus Anzeichen für ein Schmerzleiden, wurden zusätzlich Analgetika verabreicht. Das gleiche galt bei Hinweisen auf eine bestehende postoperative Infektion, in diesem Fall erfolgte eine kalkulierte antibiotische Therapie mit Cefuroxim (50 mg/kg KG).

#### 4.1.4.2.8 Elektrophysiologische Untersuchung

Zum Zweiteingriff wurden die Tiere nach o.g. Protokoll anästhesiert. Unter Allgemeinnarkose wurden die Halsgefäße der kontralateralen Seite präpariert und die Gefäßschleusen platziert wie oben beschrieben. Es erfolgte die Messung hämodynamischer Parameter mittels Rechtsherz- und Pigtailkatheter sowie die elektrophysiologische Untersuchung. Hierzu wurden zwei multipolare Stimulationskatheter eingeführt und im rechten Vorhof platziert und die Reizschwelle bestimmt. Anschließend wurden verschiedene Stimulationsmanöver durchgeführt, um die absolute Refraktärzeit des Vorhofs zu bestimmen. Bei verschiedenen Basiszykluslängen wurde in einem klassischen Protokoll mit 8 Basisschlägen (S1) und einem vorzeitigen Extrastimulus (S2) stimuliert, welcher immer kürzer angekoppelt wird (in 10 ms Dekrementen) bis der Stimulus keine erkennbare Erregung mehr auslöst und damit die effektive Refraktärperiode bestimmt ist (**Abbildung 5**).



**Abbildung 5.** Bestimmung der AERP mittels Extrastimuli. S1, Stimulus mit Basiszykluslänge 400 ms, S2, Extrastimulus mit einer Zykluslänge von 200 ms. Pfeile markieren die durch den Stimulus induzierten P-Wellen. Pfeilspitze markiert die ausbleibende P-Welle nach dem Extrastimulus.

Im Anschluss an die Refraktärzeit-Bestimmung erfolgte die Induktion von Vorhofflimmern mittels 10 Hz Burst-Stimulation. Im Falle einer erfolgreichen VHF-Induktion wurde die Dauer des VHF gemessen und notiert, insgesamt wurden bis zu 40 Stimulationsversuche unternommen und anschließend die Dauer der einzelnen Episoden sowie mittlere Episodendauer pro erfolgreicher Induktion bestimmt.

#### 4.1.4.2.9 Asservation der Gewebeproben, Vorbereitung der Histologie

Im Anschluss daran wurden 0,05 mg/kg Fentanyl verabreicht und der Thorax nach 5-minütiger Wartezeit durch mediane Thorakotomie eröffnet. Das Herz wurde von Perikard befreit. Gesättigte Kaliumchloridlösung (40 mval) wurde in das Herz injiziert und die Tiere durch den so ausgelösten Herz-Kreislaufstillstand schmerzfrei getötet. Das Herz konnte so entnommen und Gewebeproben aus sechs verschiedenen Regionen (rechter und linker Ventrikel, rechter und linker Vorhof, jeweils freie Wand

und Herzohr) asserviert werden. Diese standen sodann für nachfolgende histologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Verfügung.

#### 4.1.4.2.10 Kontrolltiere

Als Kontrolle dienten gesunde gewichts- und altersadaptierte Schweine, die ebenfalls nach o.g. Protokoll anästhesiert wurden. Nach Platzierung der Gefäßschleusen wurden hämodynamische Parameter erhoben und eine elektrophysiologische Untersuchung durchgeführt wie oben beschrieben. Anschließend wurden die Tiere nach o.g. Protokoll schmerzfrei getötet, das Herz entnommen und Gewebeproben asserviert.

## 4.2 *In vitro*

### 4.2.1 Material

#### 4.2.1.1 Geräte

#### **Sterilbank**

Hera Safe	Heraeus Instruments, Hanau
-----------	----------------------------

#### **Wasserbäder**

Julabo 5	Julabo, Seelbach
C10-B3 Water Bath	Thermo Haake, Karlsruhe
Julabo SW20 Schüttelwasserbad	Julabo, Seelbach
Paraffin-Streckbad 1052	GFL, Burgwedel

#### **Zentrifugen**

MiniSpin plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge 5430R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
EBA20	Hettich, Tuttlingen

Biofuge Stratos	Heraeus Instruments, Hanau
Universal 16A	Heraeus Instruments, Hanau

### Cycler

C1000 Touch Thermal Cycler	Bio-Rad, München
DYAD DANN engine	MJ Research, St. Bruno, Canada

### Waagen

Sartorius BP 610	Sartorius, Göttingen
Pioneer PA114C	Ohaus, Pine Brook, USA

### Mikroskope

Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen
Wilovert S	Hund, Wetzlar
Kamera DFC450C	Leica, Wetzlar
DM2500	Leica, Wetzlar

### Sonstiges

NanoDrop™ 2000 Photometer	Thermo Fisher Scientific, München
Pipetten pipetman® 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Gilson, Villiers le bel, Frankreich
Pipetten PEQpette® 2µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Peqlab, Erlangen
AccuJet Pipette	Brand, Wertheim
Vortexgenie 2	Scientific industries, New York, USA
Inkubator Jouan EB115	Thermo Fisher, München
CO <sup>2</sup> Wärmeinkubator CB160	Binder, Tuttlingen
Kochplatte RCT Basic	IKA Labortechnik, Staufen

Thermomixer <sup>®</sup>	Eppendorf, Hamburg
Mechanischer Zellzähler	VWR international, Darmstadt
Magnetrührer IKAMAG-REO	IKA Labortechnik, Staufen
pH-Meter pH538	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kühlschrank KT1530	Liebherr, Biberach an der Riß
Gefrierschrank -20°C Comfort	Liebherr, Biberach an der Riß
Gefrierschrank -80°C KF-85-300S	Colora Messtechnik, Lorch
Gelrunner Power Pac 3000	Bio-Rad, München
Gelkammer	Bio-Rad, München
Westernrunner Power Pac HC	Bio-Rad, München
Gelviewer GelDoc 2000	Bio-Rad, München
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
CL-Xposure Film 5x7in.	Thermo-Fisher, München
Tissue Embedder EG1150H	Leica, Wetzlar
Mikrotom RM2245	Leica, Wetzlar
Menzel-Gläser	Thermo Scientific, Braunschweig

#### 4.2.1.2 Kits und Mastermixe

mirVANA <sup>™</sup> RNA aus Gewebe	Applied Biosystems, Darmstadt
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA aus Plasma	Macherey-Nagel, Düren
iScript <sup>®</sup> RT-PCR Kit	Bio-Rad, München
TaqMan <sup>®</sup> MicroRNA RT Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
SYBR Green	Bio-Rad, München

TaqMan <sup>®</sup> universal PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt
Pierce BCA Protein Assay	Thermo-Fisher, München
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo-Fisher, München
Precision Plus Dual Color Standards	Bio-Rad, München
MagicMark <sup>™</sup> XP Western Protein Standard	Life Technologies, Darmstadt
CL-Xposure Film, 5 x 7in. (12.5x17.5cm)	Thermo-Fisher, München
Nitrocellulose, 0,45 µm Pore Size	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
LMW-SDS Marker Kit	GE Healthcare, Freiburg
NucleoSpin <sup>®</sup> Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren

#### 4.2.1.3 Chemikalien

100bp Ladder TrackIt <sup>®</sup>	Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Nuclease-Free Water	Qiagen, Hilden
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Glycine	Serva, Heidelberg
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
cOmplete Mini Protease Inhibitor	Roche, Unterhaching
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor	Roche, Unterhaching
NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)	Life Technologies, Darmstadt
Ponceau S solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

TWEEN® 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumperoxidsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Carl Roth, Karlsruhe
SDS ultra pure	Carl Roth, Karlsruhe
Roti-Free Stripping Puffer	Carl Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V, (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphotungstic Acid Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphomolybdic Acid Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anilin Blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bouins Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Weigert Eisen Hämatoxylin Set	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

#### 4.2.1.4 Oligonukleotidprimer und –Proben für die RT-PCR

GSK3B	Forward Primer	CCCAGAACCACCTCCTTTGC
	Reward Primer	TGGCTTGATACACCACACCA
GAPDH	Forward Primer	TCGGAGTGAACGGATTTG
	Reward Primer	CCTGGAAGATGGTGATGG

ACTB	Forward Primer	TCTGGCACCACACCTTCT
	Reward Primer	TGATCTGGGTCATCTTCTCAC
HPRT	Forward Primer	CCGAGGATTTGGAAAAGGT
	Reward Primer	CTATTTCTGTTTCAGTGCTTTGATGT
PTEN	Forward Primer	GACTCCCAGACATGACAGCC
	Reward Primer	TGTTCCCTGTATACGCCTTCAAGT
KCNQ4	Forward Primer	GAAGCGGCGGAGGAGAAGAG
	Reward Primer	CTTCACGTCGTAGGGTCGCA
SCN5A	Forward Primer	GCTACACCAGCTTCGACTCC
	Reward Primer	GACCACAGCCAGGATCAAGT
GATA4	Forward Primer	TCAAACCAGAAAACGGAAGC
	Reward Primer	ACTGCTGGAGTTGCTGGAAG
SMAD1	Forward Primer	GATGGTTTCACCGATCCTTC
	Reward Primer	ATTCGGCATACACCTCACCT
CTGF	Forward Primer	GCAGACTGGAGAAGCAGAGC
	Reward Primer	GCCCGGTATGTCTTCACACT
TRPC3	Forward Primer	ACTTTTCCAATGCAGAAGGAG
	Reward Primer	AACGTGTTGGCTGATTGAGA
ZFHX3	Forward Primer	AAAACATCGGAGGAGACCAA
	Reward Primer	AGGTGCAGCTGGAGGTGTAT
CACNA1C	Forward Primer	GCGTGGCCTTAGCGATCTAT
	Reward Primer	GTAAGCGTTGGGGTGAAAGA
KCNJ2	Forward Primer	AAGAAGGACGGCCACTGTAA
	Reward Primer	AAGCTGTTGACCTCGGACAC

COL1A2	Forward Primer	AGACTCAGCCACCCAGAATG
	Reward Primer	AGCTCGAATGCAGGTTTCAC
COL5A1	Forward Primer	CCGGACAGCAGGGTAATCCA
	Reward Primer	CATTCCTGGGAGGCCTGGTT

#### 4.2.1.5 Antikörper

##### Primäre Antikörper

Anti-ATBF1 antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-COL1A2 antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-CACNA1C antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-GATA4 antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-TGF beta 1 antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-MMP2 antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-beta Actin antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-alpha smooth musce Actin antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-CTGF antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-Kir2.1 antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-PTEN antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-KCNQ4 antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-Nav1.5 antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-Smad2 antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-Vimentin antibody	ABCAM, Cambridge, UK
Anti-Collagen Type V antibody	ABCAM, Cambridge, UK

## Sekundäre Antikörper

Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP)	ABCAM, Cambridge, UK
Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)	ABCAM, Cambridge, UK
Rabbit anti-Mouse IgG H&L (HRP)	ABCAM, Cambridge, UK
Goat polyclonal secondary to Mouse IgG	ABCAM, Cambridge, UK

### 4.2.1.6 Software

ImageJ	National Institute of Health, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software Inc. La Jolla, USA
Microsoft Office Suite	Microsoft Corporation, Redmond, USA

## 4.2.2 Methoden

### 4.2.2.1 RNA Analyse

#### 4.2.2.1.1 Isolation der RNA aus Gewebe

Von den Schweinen wurden bei der Entnahme der Herzen Gewebe aus den Vorhöfen und Ventrikeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolation der RNA aus dem Gewebe erfolgte mittels mirVANA Kits (Applied Biosystems). Zum Homogenisieren des Gewebes wurde in unserem Labor folgende Methode etabliert:

Das gefrorene Gewebe wird in ein Schälchen aus Alufolie gebettet und dieses an allen Seiten gefaltet, so dass es dicht ist. Unter beständigem erneutem Eintauchen in flüssigen Stickstoff erfolgt nun eine Zerkleinerung des Gewebes mit einem Hammer. Dadurch entsteht ein kleines Gewebeplättchen, das in ein Tube mit Lysis/Binding-Buffer gegeben wird, ehe es durch repetitive Aspirationen mittels einer Spritze weiter zerkleinert wird bis eine homogene Lösung vorliegt. Zu dieser Lösung folgt die Zugabe von 100 µl Homogenate additive und gutes Mischen durch Vortexen. Es folgen eine Kühlung auf Eis von 10 Minuten und dann die Zugabe von 1 ml Acid-Phenol:Chloroform und erneutes Mischen durch Vortexen. Im Folgenden wird die nun gefällte organische Phase bei 10.000 x g für fünf Minuten abzentrifugiert. Die

wässrige obere Phase wird in ein neues Tube übertragen. Zu dieser Phase erfolgt die Zugabe von 1,25 x des Ausgangsvolumens an 100% Ethanol, sowie erneutes Mischen. Anschließend erfolgt die Ladung der Trennsäulen des Kits mit der im Schritt zuvor entstandenen Lösung. Bei etwa 10.000 rpm wird die Flüssigkeit in etwa 15 Sekunden durch den Filter gepresst. Die Flüssigkeit kann nun verworfen werden. Der Filter wird folgend mit 700 µl der ersten Waschlösung gewaschen. Nach demselben Prinzip erfolgt ein erneutes Zentrifugieren und Verwerfen der Flüssigkeit. Hiernach erfolgt zweifaches Waschen mit den Waschlösungen Nr. 2/3 jeweils mit 500 µl. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt erfolgt ein erneutes Zentrifugieren für etwa 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit um alle Reste der Flüssigkeit zu entfernen. Im letzten Schritt erfolgt die Elution der isolierten RNA in Elutionspuffer. Hierzu verwenden wir 60 µl. Im Folgenden wird die Menge der isolierten RNA mittels Messung des Verhältnisses der optischen Dichte 260/280 nm photometrisch mittels NanoDrop™ bestimmt. Ein Extinktionsverhältnis von > 1,6 wurde als akzeptable Qualität angenommen.

#### 4.2.2.1.2 Synthese der cDNA

Es erfolgt erst eine Verdünnung der isolierten RNA auf 100 ng/µl. Zur Synthese der cDNA wurde das iScript Kit von Bio-Rad verwendet. Es wurde ein Ansatz von 20 µl/Probe wie folgt pipettiert:

Ansatz Umschreiben	1x
5x iScript reaction mix	4 µl
iScript reverse transcriptase	1 µl
H <sub>2</sub> O	5 µl
1 µg RNA	10 µl
Total	20 µl

Anschließend erfolgt die Umschreibereaktion im Thermocycler nach folgendem Programm:

5 min. 25°C

30 min. 42°C

5 min. 85°C

Hold 4°C

Die nun fertige cDNA wurde entweder umgehend weiterverwendet oder bei -80°C gelagert.

#### 4.2.2.1.3 Realtime-PCR mittels TaqMan-Sonden

Die quantitative Realtime-PCR der miRNAs erfolgte mit TaqMan® Sonden der Firma Applied Biosystems. Das Prinzip der quantitativen PCR mittels TaqMan® Sonden basiert auf einer speziellen Polymerase – der Taq Polymerase. Diese besitzt eine 5'-3' Exonukleaseaktivität. Mit Hilfe einer sequenzspezifischen fluorogenen Taq-Sonde, bestehend aus einem Oligonukleotid, welches am 5'-Ende mit einem Fluorophor, sowie am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff versehen ist, gelingt es während der Elongation durch Entfernung dieser Sonde durch die Taq-Polymerase ein der abgeschriebenen DNA-Menge proportionales Lichtsignal zu generieren. So lange die Sonde stabil an die DNA bindet, unterdrückt der Quencher das Lichtsignal des Farbstoffes. Während der Elongation hydrolysiert die Polymerase an den Matrizenstrang gebundene Sonden (nicht jedoch freie Sonden) und der Quencher kann das Lichtsignal nicht länger unterdrücken. Die Normierung der qPCR erfolgte durch den bereits in der Isolation der RNA vorgenommenen Spike-In von cel-miR-39 in definierter Menge. Unter sterilen Bedingungen wurde nun die PCR mit folgendem Ansatz in eine 96 well Platte pipettiert:

	1x
TaqMan Micro RNA Assay (20x)	1 $\mu$ l
Gene Expression Master-Mix (2x)	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7 $\mu$ l
cDNA template (10ng/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l each well
Total	20 $\mu$ l

1) Polymerase – activation + DNA denaturation	95°C 10 minutes	
2) Denaturation	95°C 15 seconds	} 40 cycles
3) Annealing/Extension/Plate Read	60°C 60 seconds	
5) Hold	4°C $\infty$	

Die CT Werte wurden aufgezeichnet, sowie der Threshold nach der letzten Platte angepasst. Um Vergleichbarkeit herzustellen wurden die Ergebnisse im Verhältnis zu cel-miR-39 berechnet. Diese c. elegans miRNA wurde den porcinen RNA Isolaten in definierter Menge hinzugefügt. Da sie einer anderen Spezies entstammt ist sie ohne Zugabe nicht detektierbar. In allen Fällen waren die Ergebnisse der Kontrollen aus ddH<sub>2</sub>O negativ.

#### 4.2.2.1.4 Primertest

Der Entwurf der Primer erfolgte mit dem Onlinetool Primer3<sup>125</sup>. Zur Testung erfolgte eine qPCR mit universal SYBR Green Supermix mit anschließender Schmelzkurvenanalyse sowie Gelelektrophorese nach folgendem Protokoll:

Als erstes wurde der iTaq™ Universal SYBR Green Supermix sowie die anderen gefrorenen Reagenzien getaut und gut gemischt. Danach wurde kurz zentrifugiert, um die Flüssigkeiten auf dem Boden der Tubes zu fangen, anschließend wurden die Tubes vor Licht geschützt auf Eis gelagert.

Nun wurde eine cDNA Standard-Verdünnungsreihe in 8 Stufen einer beliebigen cDNA aus totalRNA vom Schwein zum Testen vorbereitet.

Std1	25 ng/μl
Std2	12,5 ng/μl
Std3	6,25 ng/μl
Std4	3,12 ng/μl
Std5	1,56 ng/μl
Std6	0,78 ng/μl
Std7	0,38 ng/μl
Std8	0,16 ng/μl

Anschließend wurde die qPCR in einer 96-Well Platte nach folgendem Ansatz als Triplets pipettiert:

	1X
iTaq Universal SYBR Green Supermix	5 μl
vorwärts Primer (10 μM)	1,5 μl
rückwärts Primer (10 μM)	1,5 μl
H <sub>2</sub> O	1 μl
cDNA	1 μl
Total reaction volume	10 μl

Nun wurde die Platte versiegelt, gevortext und abzentrifugiert, um sodann bei folgendem Programm in den Thermocycler zu gehen:

1) Polymerase – activation + DNA denaturation	95°C 2 minutes	
2) Denaturation	95°C 15 seconds	} 40 cycles
3) Annealing/Extension/Plate Read	60°C 60 seconds	
4) melt curve analysis	65°C-95°C with 0.5°C increment for 5 sec./step	
5) Hold	4°C ∞	

Im Anschluss hieran wurde die Platte geöffnet und eine Gelelektrophorese der PCR angeschlossen. Hierzu wurde eine beliebige PCR/Primer ausgewählt und zusammen mit loading dye in das Gel geladen. Anhand eines DNA Ladders konnte nun die Fragmentlänge des PCR Produkts bestimmt und mit der zu erwartenden Ampliconlänge der Primer verglichen werden. Eine positive Analyse der Schmelzkurve gepaart mit einem passenden Fragment in der Elektrophorese wurde als hinreichender Beweis zur Funktion der entsprechenden Primer gewertet.

#### 4.2.2.1.5 Realtime-PCR mittels SYBR® Green

Die quantitative realtime-PCR der Zielgene erfolgte mittels iQTM SYBR® Green von Bio-Rad. SYBR Green I bindet als Cyanin-Farbstoff doppelsträngige DNA. Der daraus resultierende Komplex aus Farbstoff und DNA emittiert nun grünes Licht der Wellenlänge 521 nm. Nach jedem Elongationsschritt der PCR resultiert folglich eine steigende Emission grünen Lichts. Diese ist messbar und direkt proportional zur synthetisierten Menge der DNA. Der Mastermix von Bio-Rad enthält neben dem Farbstoff eine Taq-Polymerase mit 5'→3' Polymeraseaktivität, sowie alle erforderlichen Puffer und Stabilisatoren nebst qPCR geeigneten dNTPs. Unter sterilen Bedingungen wurde nun die PCR mit folgendem Ansatz in eine 96 well Platte pipettiert:

	1x	100x
iTaq Universal SYBR Green Supermix	5 µl	500 µl
Forward Primer (10µM)	1 µl	100 µl
Reward Primer (10µM)	1 µl	100 µl
H <sub>2</sub> O	1 µl	100 µl
cDNA template (10ng/µl)	2 µl each well	
Total	10 µl	

Die Platte wurde steril versiegelt und kurz zentrifugiert um eventuelle Luftblasen zu entfernen. Es folgte die eigentliche Reaktion in einem Real-Time Thermocycler von Bio-Rad nach folgendem Protokoll:

- |   |                                 |            |             |
|---|---------------------------------|------------|-------------|
| 1) Polymerase activation and DNA denaturation | 95°C                            | 2 minutes  | } 35 cycles |
| 2) Denaturation                               | 95°C                            | 15 seconds |             |
| 3) Annealing/Extension/Plate Read             | 60°C                            | 60 seconds |             |
| 4) Melt Curve Analysis                        | 65°C-95°C                       |            |             |
|   | 0,5°C increment for 5 sec./step |            |             |

Die CT Werte wurden aufgezeichnet, sowie der Threshold nach der letzten Platte angepasst. Um Vergleichbarkeit herzustellen wurden die Ergebnisse im Verhältnis zum Housekeeping Gen berechnet. In allen Fällen waren die Ergebnisse der Kontrollen aus ddH<sub>2</sub>O negativ, sowohl für die Proben als auch für das Housekeeping Gen.

#### 4.2.2.2 Proteinisolation

Zur Proteinisolation kamen in etwa 100 mg des kryoasservierten Gewebes zum Einsatz. Dieses wurde mithilfe eines Mörsers und Pistills unter ständigem gefroren halten zerkleinert und danach in folgendem Puffer homogenisiert:

Kraniaspuffer	
Tris 1,5 M pH 8,8	6 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	3 ml
NaF 1 M	9 ml
SDS 20%	45 ml
Glycerol	30 ml
H <sub>2</sub> O	207 ml
Total	300 ml

Zum homogenisieren wurde die Menge an Kraniaspuffer nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{(1 \text{ "Gewebe" } : 5 \text{ "Puffer"})}{1} + 5$$

Etwa 300 µl weniger Puffer als errechnet wurde zum homogenisieren verwendet, der Rest dann zum Spülen des Polytrons. Anschließend wurde das Homogenisat durch vortexen gut durchgemischt und anschließend bei Raumtemperatur und 900 x g für 15 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde anschließend in ein neues Tube überführt und mittels NanoDrop™ die Proteinkonzentration bestimmt.

## 4.2.2.3 Westernblot

## 4.2.2.3.1 Puffer

<b>Blotpuffer</b>	1x
Tris 25 mM	3,03 g
Glycin 192 mM	14,40 g
Methanol 20%	200 ml
H <sub>2</sub> O	Auf einen Liter auffüllen
<b>TBS</b>	10x
Tris HCl M	24 g
Tris Base M	5,6 g
NaCl M	88 g
H <sub>2</sub> O	Auf einen Liter auffüllen
pH auf 7,6 einstellen	
<b>TBST</b>	0,1%
TBS 10x	100 ml
H <sub>2</sub> O	900 ml
Tween20	1 ml
total	1001 ml
<b>APS</b>	10%
APS	0,15 g
H <sub>2</sub> O	1,5 ml



**Obergel**

a.d.	2,8
Tris 0,5 M pH 6,8	1,25
SDS 10 %	0,05
APS 10 %	0,05
Acrylamid	0,85
TEMED	0,005

## 4.2.2.3.3 Ablauf

Nachdem die Proteinkonzentration bestimmt war konnte nun eine definierte Menge von 20 µg isoliertem Protein in ein neues Tube überführt werden und mit dem doppelten Volumen Blotpuffer gemischt werden.

Nun wurden je nach Zielproteingröße die Gele vorbereitet.

<b>Proteingröße</b>	<b>Gel</b>
4 – 40 kDa	20 %
12 – 45 kDa	15 %
10 – 70 kDa	12,5 %
15 – 100 kDa	10 %
25 – 100 kDa	8 %

Diese Prozentwerte wurden als Richtlinie interpretiert – die optimalen Bedingungen für jeden Westernblot wurden einzeln herausgearbeitet.

Es wurden nun gleiche Mengen des Proteins gemeinsam mit einem Marker für molekulares Gewicht auf das Gel geladen. Das Gel befand sich in einer entsprechenden Gelkammer die mit SDS – Page running buffer gefüllt war. Anschließend wurde eine Spannung von 100 V für etwa 1 – 2 Stunden angelegt bis das Protein schön aufgetrennt war.

Anschließend wurde das aufgetrennte Protein mittels elektrischer Spannung auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Übertragung wurde dann durch Färbung mit Ponceau S überprüft und wenn ausreichend Protein auf die Membran übertragen wurde konnte fortgefahren werden.

Es folgten nun die Antikörper – Färbeschritte. Im ersten Schritt wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit blocking solution inkubiert. Danach wurde die Membran in der blocking solution mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration an primärem Antikörper bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran 3 Mal mit TBST Puffer für jeweils 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurde die Membran erneut in blocking buffer gelegt und nun mit der vom Hersteller empfohlenen Menge an HRP konjugiertem sekundärem Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Bewegung inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschrte wie oben beschrieben in TBST Puffer.

#### 4.2.2.3.4 Entwickeln

Zur Sichtbarmachung des Ergebnisses verwendeten wir das Pierce ECL Kit von Thermo-Fisher. Dieses basiert auf dem Konzept der Chemilumineszenz. Die horseradish Peroxidase (HRP) setzt in einer chemischen Reaktion Luminol um und dabei wird Licht emittiert. Dieses kann nun auf einem Film festgehalten werden.

Als erstes wurde die Arbeitslösung hergestellt indem zu gleichen Teilen die detection reagents eins und zwei gemischt wurden. Anschließend wurde die Membran für eine Minute bei Raumtemperatur mit der Arbeitslösung inkubiert. Wir verwendeten 0,125 ml Arbeitslösung pro Quadratzentimeter Membran.

Nach der Inkubation mit der Arbeitslösung wurde die Membran vorsichtig aber gründlich getrocknet und in Klarsichtfolie gelegt. Nach Möglichkeit wurden alle Luftblasen entfernt und die Membran konnte in einer Filmkassette platziert werden. Dabei zeigte die proteinbeladene Seite nach oben. Anschließend wurde ein Film auf der Membran platziert und in einem ersten Schritt für 60 Sekunden belichtet. Die optimale Belichtungszeit konnte nun individuell für jeden Blot gefunden werden.

#### 4.2.2.3.5 Westernblot Auswertung

Die digitale Auswertung des belichteten Bildmaterials der Blots erfolgte densitometrisch mittels der Bio-Rad Software Quantity One<sup>®</sup> nach Anleitung des Entwicklers.

#### 4.2.2.4 Histologie

Zur Quantifizierung der Fibrose erfolgte am Ende des Versuchs die Entnahme der Herzen der Versuchstiere. Es wurden transmurale Gewebeproben des linken Atriums sowie des linken Ventrikels entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in einem 5% Formalin-PBS-Gemisch gelagert.

Es erfolgte sodann die Paraffineinbettung nach Entwässerung der Gewebeproben durch eine aufsteigende Alkoholreihe sowie Durchmischung mit Xylol im Sinne eines Intermediums.

Anschließend erfolgte die Herstellung 10µm dicker Paraffinschnitte am Mikrotom. Diese wurden auf Glasträger gezogen und anschließend nach Masson-Trichrom gefärbt.

Hierzu erfolgte als erstes die Deparaffinisierung nach folgendem Schema:

Schnitte einlegen in:

Xylene	3x3 Minuten
100% Ethanol	3x3 Minuten
95% Ethanol	1x3 Minuten
80% Ethanol	1x3 Minuten
Deionisiertes Wasser	1x5 Minuten

Sodann Einlegen in Bouins Lösung über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag wurden die Schnitte unter Leitungswasser gewaschen und anschließend mit destilliertem Wasser ab gespült.

Es erfolgte eine Färbung mit Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin für 5 Minuten und anschließend erneutes Waschen mit destilliertem Wasser. Danach wurden die

Schnitte für 5-10 Minuten in eine aus Phosphotungstic und Phosphomolybdic Acid hergestellte Lösung gelegt. Ohne erneuten Waschschrift erfolgte nun die Färbung mit Anilin Blau für 5 Minuten. Nach erneutem Waschen mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit 1% Essigsäure für 3-5 Minuten gewaschen.

Zum Abschluss erfolgte eine erneute Dehydratation der Schnitte mittels Alkoholreihe:

95% Ethanol	2x3 Minuten
100% Ethanol	2x3 Minuten
Xylene	3x5 Minuten

Die Schnitte wurden dann in Xylene über Nacht belassen und abschließend am nächsten Morgen Polymount und einem Coverslip verschlossen. Nach ausreichender Austrocknung konnte die mikroskopische Begutachtung beginnen.

Es erfolgte die standardisierte Gewinnung von repräsentativen Gesichtsfeldern in unterschiedlichen Vergrößerungen sowie deren Digitalisierung.

Anschließend wurde die Fibrose wie von Li et al.<sup>126</sup> beschrieben digital quantifiziert. Die grafische Darstellung erfolgte als Prozentwert über das Referenzgesichtsfeld unter Ausschluss der Gefäße sowie des perivaskulären Gewebes. Die Resultate aus 5 nicht überlappenden Bildern wurden für jedes Versuchstier gemittelt und ausgewertet.

#### 4.2.2.5 Statistik

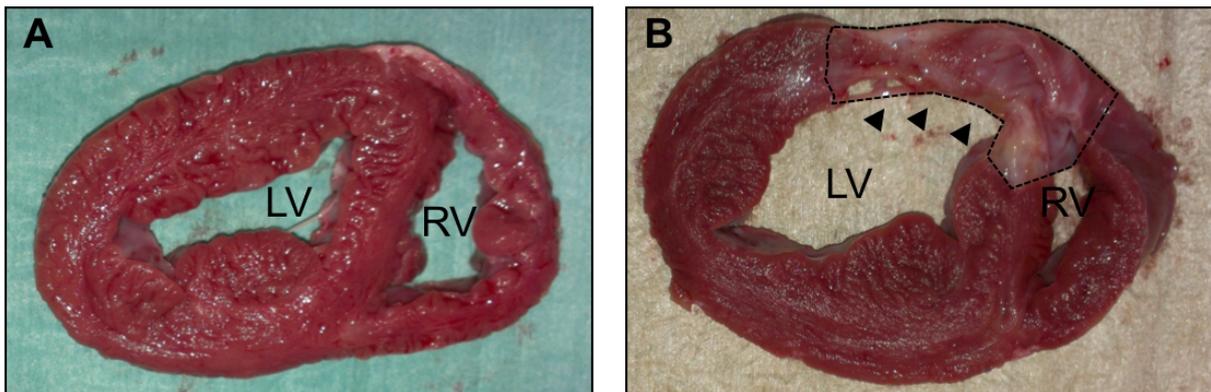
Die grafische Präsentation der Daten erfolgt als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler. Berechnungen erfolgten mit Microsoft Excel und Graphpad Prism Version 5.0. Für den Vergleich mehrerer Gruppen wurde ein One-way oder Two-way ANOVA (Analysis of Variance) mit einem Dunnet oder Bonferroni Posttest verwendet. Für den Vergleich zweier unpaarer Gruppen erfolgte ein t-test. Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als statistisch signifikant angenommen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Etablierung des Modells

#### 5.1.1 Anatomie und Histologie

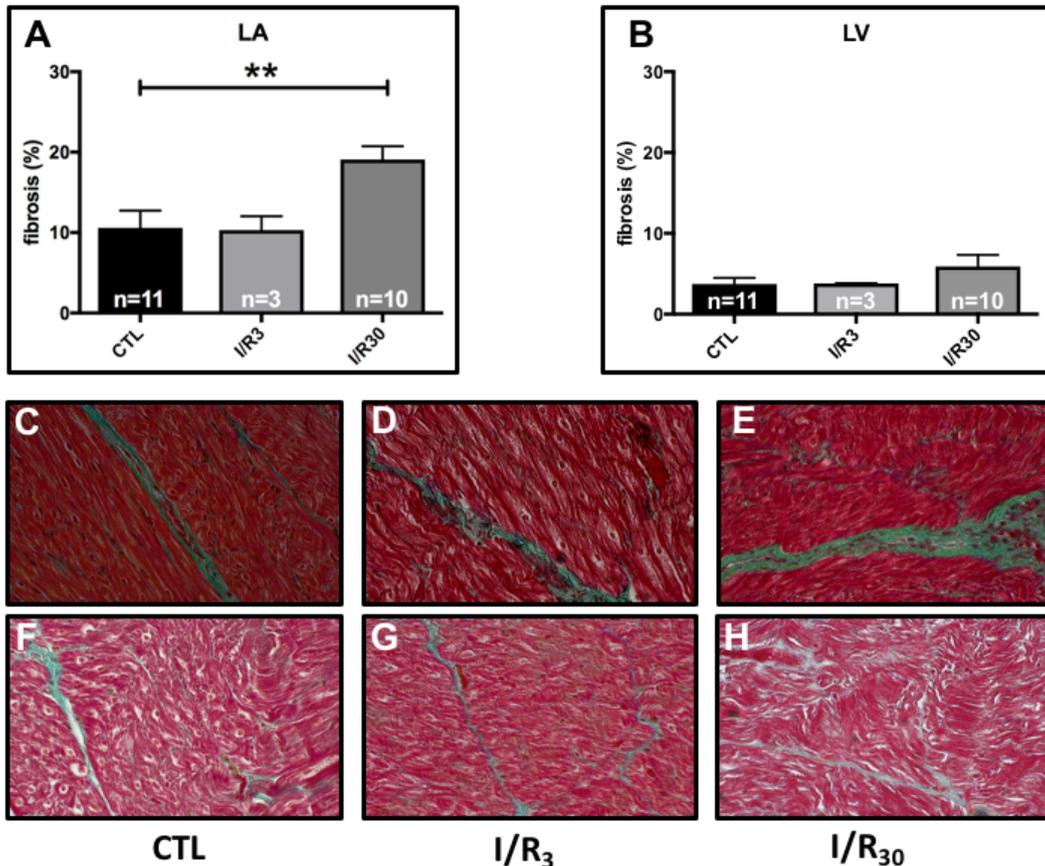
Durch die Ballonokklusion der LAD zeigte sich bei den Tieren der Gruppen I/R<sub>3</sub> und I/R<sub>30</sub> ein deutliches Infarktareal und damit der Nachweis eines transmuralen Myokardinfarkts (**Abbildung 6**).



**Abbildung 6.** Querschnitt durch den rechten (RV) und linken (LV) Ventrikel. **A**, Kontrolle. **B**, I/R mit Nachweis eines transmuralen Myokardinfarkts (◄).

Im nächsten Schritt erfolgte die Quantifizierung der interstitiellen Fibrose im linken Atrium sowie linken Ventrikel. Hier zeigte sich eine signifikante Fibrose des linken Atriums der Versuchstiere der Langzeitischämiegruppe I/R<sub>30</sub> (**Abbildung 7**; CTL  $10,6 \pm 0,02\%$  vs. I/R<sub>30</sub>  $19,1 \pm 0,02\%$ ,  $**p=0,0077$ ) während in der Gruppe der Kurzzeitischämie I/R<sub>3</sub> kein Unterschied zu den Kontrollen nachweisbar war (CTL  $10,6 \pm 0,02\%$  vs. I/R<sub>3</sub>  $10,3 \pm 0,02\%$ ,  $p=0,99$ ).

Ventrikulär war kein Unterschied der Fibrosierung nachzuweisen (**Abbildung 7**; CTL  $3,7 \pm 0,01\%$  vs. I/R<sub>3</sub>  $3,8 \pm 0,0002\%$  vs. I/R<sub>30</sub>  $5,9 \pm 0,01\%$ ).



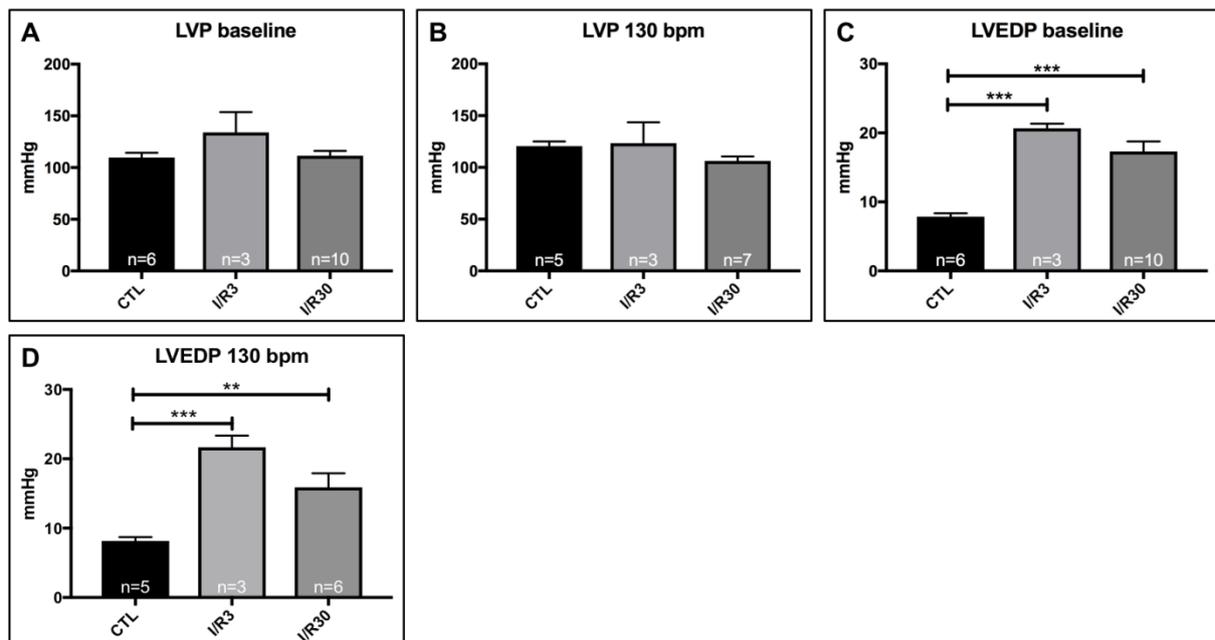
**Abbildung 7.** Histologische Untersuchung der interstitiellen Fibrose. **A**, Quantifizierung der Fibrose im linken Atrium (LA),  $**p < 0,01$ , One-Way ANOVA mit Dunnet Posttest. **B**, Quantifizierung der Fibrose im linken Ventrikel (LV). **C-E**, repräsentative Darstellung der Fibrose (grün gefärbt) im linken Vorhof in Kontrolle (**C**, CTL), Kurzzeitischämie (**D**, I/R<sub>3</sub>) und Langzeitischämie (**E**, I/R<sub>30</sub>). **F-H**, Repräsentative Darstellung der Fibrose im linken Ventrikel in Kontrolle (**F**, CTL), Kurzzeitischämie (**G**, I/R<sub>3</sub>) und Langzeitischämie (**H**, I/R<sub>30</sub>).

### 5.1.2 Häodynamik

Zur Beurteilung der Funktion des Herzens, respektive der entstandenen Herzinsuffizienz wurden häodynamische Parameter gemessen. Die Messungen erfolgten jeweils in Ruhe sowie bei 130 Schlägen/Minute. Der linksventrikuläre Druck zeigte hierbei keinen signifikanten Unterschied (**Abbildung 8**;  $LVP_{baseline}$  CTL  $109,8 \pm 4,5$  mmHg vs. I/R<sub>3</sub>  $134 \pm 19,7$  mmHg ( $p = 0,12$ ) vs. I/R<sub>30</sub>  $111,5 \pm 4,7$  mmHg

( $p=0,97$ ).  $LVP_{130\text{ bpm}}$  CTL  $120,5\pm 4,6\text{mmHg}$  vs.  $I/R_3$   $123,3\pm 20,3\text{mmHg}$  ( $p=0,97$ ) vs.  $I/R_{30}$   $106,2\pm 4,4\text{mmHg}$  ( $p=0,31$ )).

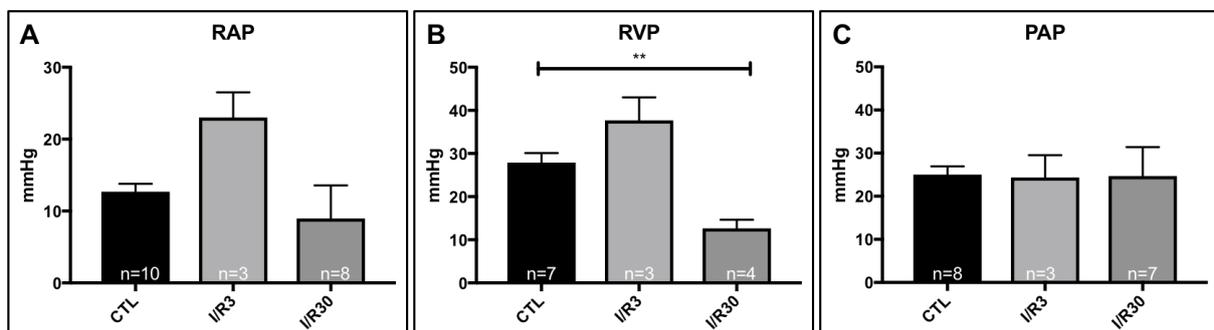
Im Unterschied hierzu zeigte der linksventrikuläre enddiastolische Druck als Maß der Vordehnung der Ventrikel zur Aufrechterhaltung des Schlagvolumens eine deutliche Zunahme sowohl in der Kurzzeit- als auch in der Langzeitischämiegruppe (**Abbildung 8**;  $LVEDP_{\text{Baseline}}$  CTL  $7,85\pm 0,52\text{mmHg}$  vs.  $I/R_3$   $20,67\pm 0,67\text{mmHg}$  ( $***p=0,0003$ ) vs.  $I/R_{30}$   $17,32\pm 1,44\text{mmHg}$  ( $***p=0,0002$ ).  $LVEDP_{130\text{bpm}}$  CTL  $8,17\pm 0,54\text{mmHg}$  vs.  $I/R_3$   $21,67\pm 1,67\text{mmHg}$  ( $***p=0,0007$ ) vs.  $I/R_{30}$   $15,88\pm 2,02\text{mmHg}$  ( $**p=0,0092$ )).



**Abbildung 8.** linksventrikuläre Hämodynamik. One-Way ANOVA mit Dunnet Posttest,  $**p<0,01$ ,  $***p<0,001$ . **A**, Systolischer linksventrikulärer Druck in Ruhe ( $LVP_{\text{baseline}}$ ). **B**, Systolischer linksventrikulärer Druck bei einer Frequenz von 130/min. ( $LVP_{130\text{bpm}}$ ). **C**, Linksventrikulärer enddiastolischer Druck in Ruhe ( $LVEDP_{\text{baseline}}$ ). **D**, Linksventrikulärer enddiastolischer Druck bei einer Frequenz von 130/min. ( $LVEDP_{130\text{bpm}}$ ).

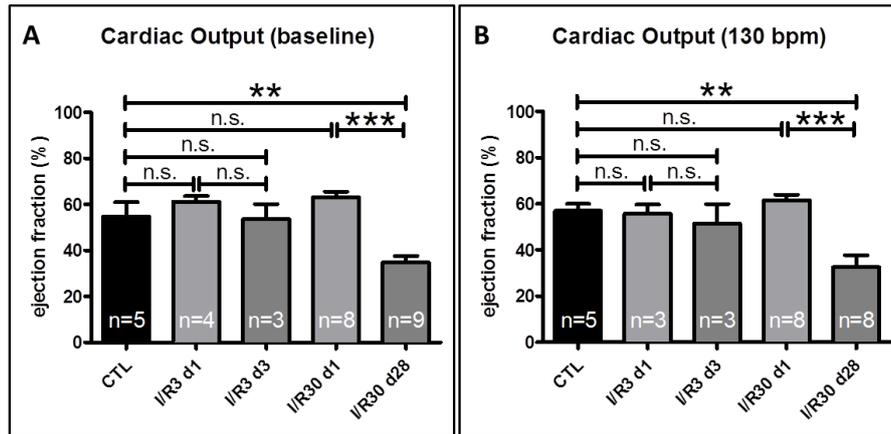
Des Weiteren erfolgte die Messung des rechtsatrialen Drucks. Dieser zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (**Abbildung 9**; CTL  $12,69\pm 1,10\text{ mmHg}$  vs.  $I/R_3$   $23\pm 3,51\text{ mmHg}$  ( $p=0,16$ ) vs.  $I/R_{30}$   $8,96\pm 4,60\text{ mmHg}$

( $p=0,58$ ). Der rechtsventrikuläre Druck zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Langzeitschämietieren  $I/R_{30}$  und den Kontrollen CTL (**Abbildung 9**; CTL  $27,9\pm 2,19$  mmHg vs.  $I/R_{30}$   $12,65\pm 1,98$  mmHg (\*\* $p=0,0044$ )) jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und den Kurzzeitschämietieren  $I/R_3$  (**Abbildung 9**; CTL  $27,9\pm 2,19$  mmHg vs.  $I/R_3$   $37,67\pm 5,36$  mmHg ( $p=0,08$ )). Der pulmonalarterielle Druck zeigte keinen Unterschied zwischen den Gruppen (**Abbildung 9**; CTL  $25\pm 1,92$  mmHg vs.  $I/R_3$   $24,33\pm 5,21$  mmHg ( $p=0,99$ ) vs.  $I/R_{30}$   $24,67\pm 6,75$  mmHg ( $p=0,99$ )).



**Abbildung 9.** Rechtsherzkatheteruntersuchung. One-Way ANOVA mit Dunnet Posttest, \*\* $p<0.01$ . **A**, Rechtsatrialer Druck (RAP). **B**, Rechtsventrikulärer Druck (RVP). **C**, Pulmonalarterieller Druck (PAP).

Als Maß für die Herzinsuffizienz bestimmten wir die Auswurfraction des Herzens mittels Laevokardiographie. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Auswurfleistung der Langzeitschämietiere sowohl verglichen mit den Kontrolltieren wie auch verglichen mit den Messungen vor Infarktinduktion an Versuchstag 1. Dieser Effekt zeigte sich in den Messungen in Ruhe (**Abbildung 10**;  $CO_{baseline}$  CTL  $54,8\pm 6,19$  % vs.  $I/R_{30,d1}$   $63,14\pm 2,36$  % ( $p=0,39$ ) vs.  $I/R_{30,d28}$   $34,8\pm 2,75$  % ( $p=0,003$ ).  $I/R_{30,d1}$  vs.  $I/R_{30,d28}$  ( $p<0.0001$ ) und unter Stimulation (130/min.) (**Abbildung 10**;  $CO_{130\ bpm}$  CTL  $56,92\pm 3,01$  % vs.  $I/R_{30,d1}$   $61,61\pm 2,31$  % ( $p=0,99$ ) vs.  $I/R_{30,d28}$   $32,64\pm 5,06$  % ( $p=0.0019$ ).  $I/R_{30,d1}$  vs.  $I/R_{30,d28}$  ( $p = <0.0001$ )).

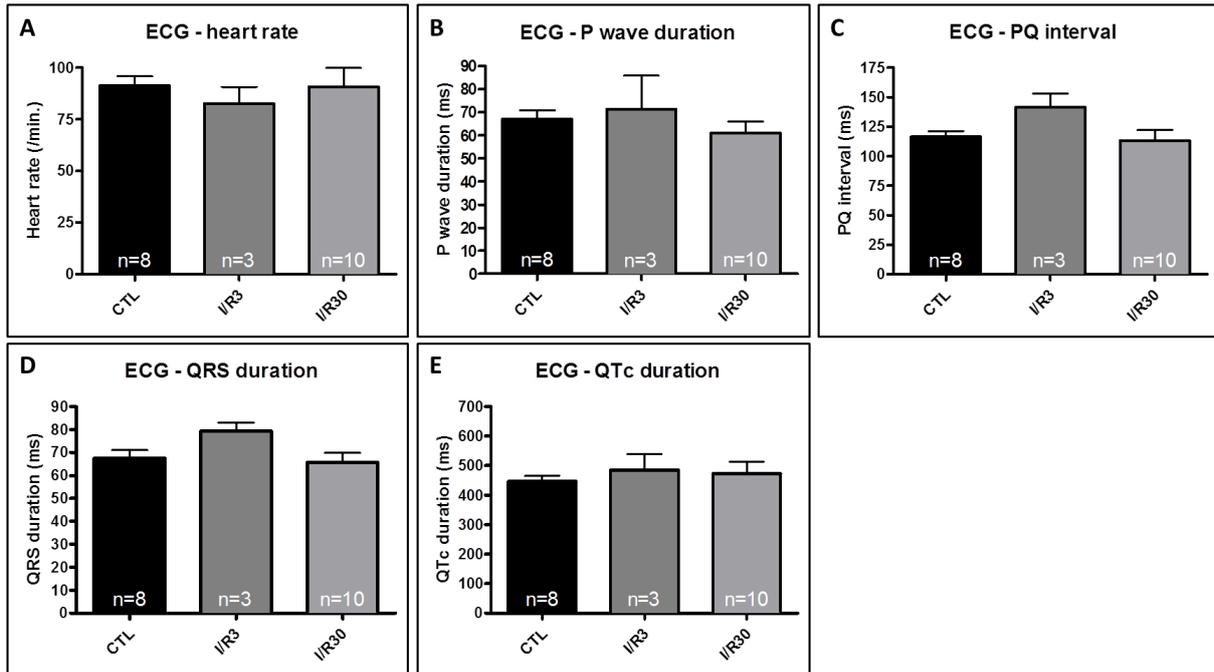


**Abbildung 10.** Auswurfraction des Herzens (Cardiac Output). One-way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparison test. **A.** Auswurfraction in Ruhe ( $CO_{\text{baseline}}$ ). **B.** Auswurfraction bei Stimulation mit 130/Minute ( $CO_{130\text{bpm}}$ ).

In den Kurzzeitischämietieren zeigte sich keine Veränderung der Pumpfunktion im Vergleich zu den Kontrollen, sowie über die Ischämie-Reperfusionsdauer (**Abbildung 10**).

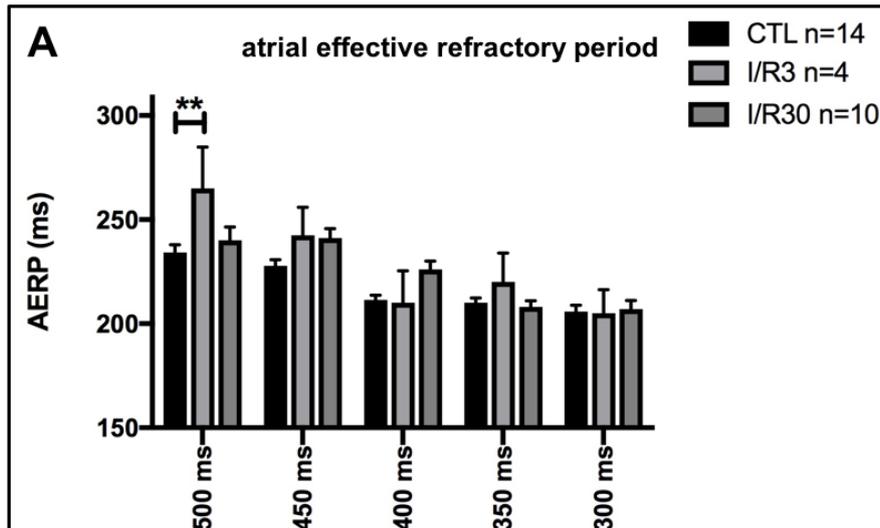
### 5.1.3 Elektrophysiologische Untersuchung

Vor Durchführung einer invasiven elektrophysiologischen Untersuchung (EPU) erfolgte die Aufzeichnung eines 12-Kanal-EKGs. Hierbei zeigte sich kein Unterschied in den EKG-Parametern Herzfrequenz, P-Wellen Dauer, PQ-Intervall, QRS-Dauer und  $QT_c$ -Zeit (**Abbildung 11**).



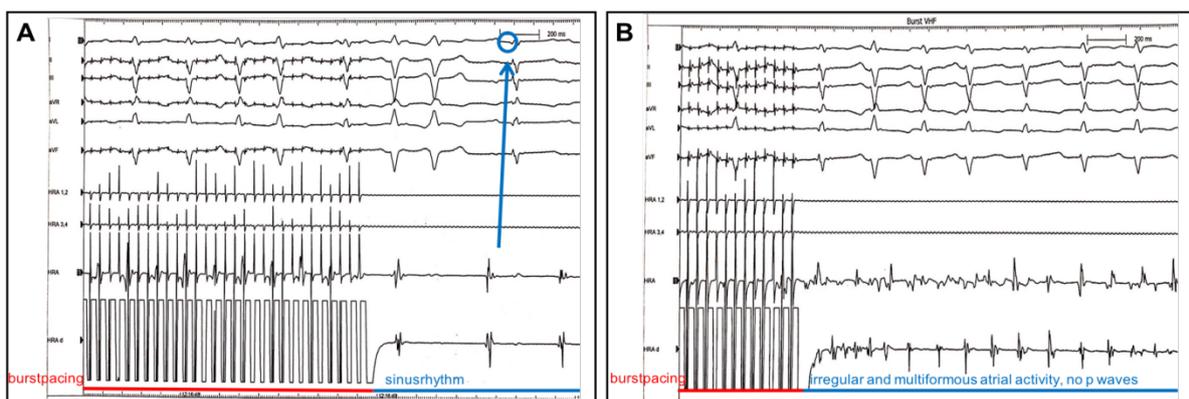
**Abbildung 11.** EKG Parameter. One-way ANOVA mit Dunnet Posttest.

Im Anschluss erfolgte die invasive elektrophysiologische Untersuchung. Bei der Messung der atrialen Refraktärzeiten ergab sich lediglich für die längste Basiszykluslänge von 500 ms eine signifikante Verlängerung der Refraktärzeit in den Kurzzeitischämietieren, alle weiteren Refraktärzeiten waren zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich (**Abbildung 12.** Atriale Refraktärperiode (AERP) zu verschiedenen Basiszykluslängen. Two-way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparison Test. \*\* $p < 0.01$ ).



**Abbildung 12.** Atriale Refraktärperiode (AERP) zu verschiedenen Basiszykluslängen. Two-way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparison Test. \*\* $p < 0.01$ .

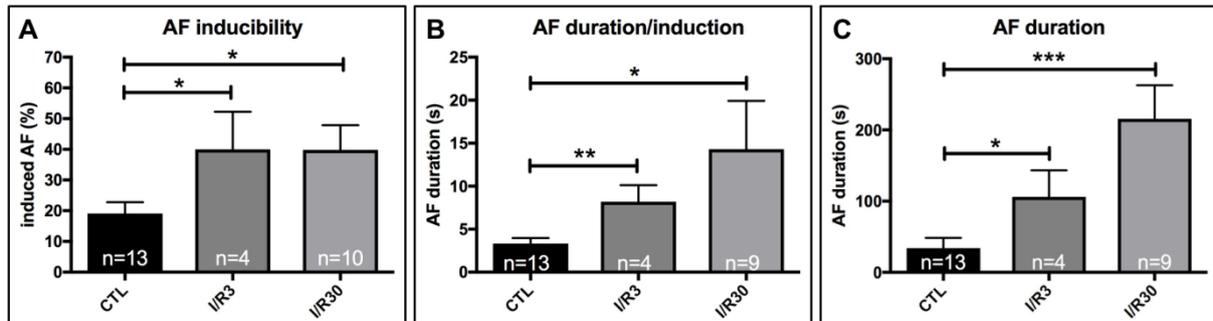
Zur Evaluation der erfolgreichen Etablierung unseres Modells erfolgte abschließend die Bestimmung der Induzierbarkeit von Vorhofflimmern durch Burstpacing (**Abbildung 13**).



**Abbildung 13.** Burstpacing. **A**, ohne Induktion von VHF, rot markiert ist das Burstpacing, blau eingekreist die auf eine Erregung folgende P-Welle. **B**, Burstpacing mit Induktion von VHF.

Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Induzierbarkeit von Vorhofflimmern sowohl in den Kurzzeit- als auch den Langzeitischämietieren (**Abbildung 14-A**). So waren

lediglich  $19.09 \pm 3.67$  % der Kontrollen induzierbar, während  $40 \pm 12.25$  % der Kurzzeitschämietiere I/R<sub>3</sub> (\*p=0,0390 vs. CTL) und  $39.82 \pm 8.07$  % der Langzeitschämietiere I/R<sub>30</sub> (\*p=0,0195 vs. CTL) Vorhofflimmern zeigten.



**Abbildung 14.** Induzierbarkeit und Dauer von induziertem Vorhofflimmern. Unpaarer zweiseitiger t-test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. **A**, Induzierbarkeit. **B**, Episodendauer. **C**, Gesamtlast (Burden).

Zudem war die Dauer der einzelnen Episoden in den Ischämietieren deutlich verlängert (**Abbildung 14-B**, CTL  $3.32 \pm 0.66$  s vs. I/R<sub>3</sub>  $8.2 \pm 1.91$  s (\*\*p=0,007) und CTL  $3.32 \pm 0.66$  s vs. I/R<sub>30</sub>  $14.31 \pm 5.62$  s (\*p=0,036).

Auch die gesamte Dauer aller VHF-Episoden (sogenannte „AF burden“) war für die Ischämietiere signifikant verlängert (**Abbildung 14-C**, CTL  $33.98 \pm 14.54$  s vs. I/R<sub>3</sub>  $106.1 \pm 37.21$  s (\*p=0,044). CTL  $33.98 \pm 14.54$  s vs. I/R<sub>30</sub>  $215.6 \pm 47.33$  s (\*\*p=0,0006)).

## 5.2 microRNA-Profil des Modells

Aus dem Gewebe des rechten und linken Atriums erfolgte die Bestimmung eines miRNA Profils mittels qPCR (Abbildung 15). Im rechten Atrium zeigte sich eine Verdopplung der miR-1 Expression bei I/R<sub>30</sub> Schweinen (CTL  $1,00 \pm 0,30$  vs. I/R<sub>3</sub>  $1,06 \pm 0,31$  (p=0,98) vs. I/R<sub>30</sub>  $2,18 \pm 0,21$  (\*p=0,012).

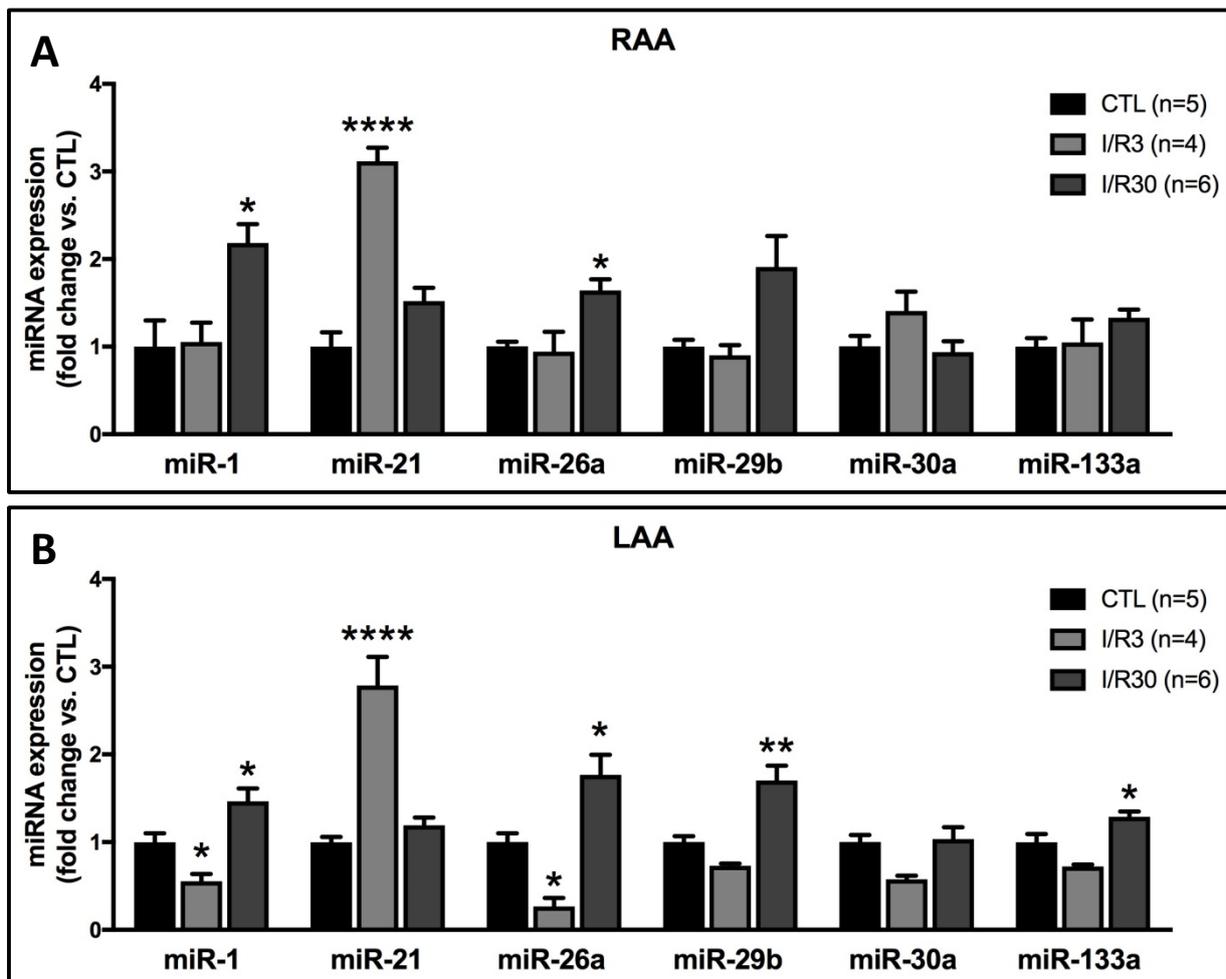
Für die miR-21 zeigte sich im rechten Atrium eine signifikant vermehrte Expression in der Kurzzeitschämiegruppe I/R<sub>3</sub> (CTL  $1,00 \pm 0,16$  vs. I/R<sub>3</sub>  $3,19 \pm 0,19$  (\*\*p=0,0001), während die Langzeitschämiegruppe keine signifikante Änderung zeigte (CTL  $1,00 \pm 0,16$  vs. I/R<sub>30</sub>  $1,51 \pm 0,15$  (p=0,068)).

Die miR-26a zeigte im rechten Atrium eine signifikante Erhöhung in der Gruppe der Langzeitischämietiere I/R<sub>30</sub> (CTL 1,00±0,05 vs. I/R<sub>3</sub> 0,96±0,32 (p=0,98) sowie CTL 1,00±0,05 vs. I/R<sub>30</sub> 1,64±0,13 (\*p=0,014)).

Die MiR-29b zeigte keine signifikante Veränderung, jedoch einen Trend zu erhöhter Expression in der Gruppe der Langzeitischämietiere I/R<sub>30</sub> (CTL 1,00±0,08 vs. I/R<sub>3</sub> 0,99±0,10 (p=0,99) sowie CTL 1,00±0,08 vs. I/R<sub>30</sub> 1,91±0,35 (p=0,05)).

Die miR-30a zeigte im rechten Atrium keine signifikanten Expressionsunterschiede (CTL 1,00±0,12 vs. I/R<sub>3</sub> 1,42±0,31 (p=0,21) sowie CTL 1,00±0,12 vs. I/R<sub>30</sub> 0,94±0,12 (p=0,93)).

Die miR-133a zeigte im Gewebe des rechten Atriums keine Expressionsunterschiede (CTL 1,00±0,10 vs. I/R<sub>3</sub> 1,11±0,36 (p=0,87) vs. I/R<sub>30</sub> 1,33±0,096 (p=0,23)).



**Abbildung 15.** Atriale miRNA Profile. One-Way ANOVA mit Dunnet post Test, \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. **A**, Rechtes Atrium. **B**, Linkes Atrium.

Im Vergleich hierzu zeigte sich im Gewebe des linken Atriums eine signifikant verminderte Expression der miR-1 in der Gruppe der Kurzzeitischämie sowie eine signifikant vermehrte Expression in der Gruppe der Langzeitischämie (CTL  $1,00 \pm 0,10$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,48 \pm 0,03$  ( $p=0,05$ ) vs. I/R<sub>30</sub>  $1,47 \pm 0,15$  ( $*p=0,033$ )).

Die Expressionsanalyse der miR-21 im linken Atrium zeigte hingegen eine signifikante Erhöhung in der Gruppe der Kurzzeitischämie I/R<sub>3</sub> (CTL  $1,00 \pm 0,06$  vs. I/R<sub>3</sub>  $2,53 \pm 0,29$  ( $***p=0,0001$ ) vs. I/R<sub>30</sub>  $1,20 \pm 0,09$  ( $p=0,41$ )).

Für die miR-26a zeigte sich linksatrial ein ähnliches Profil wie für miR-1 – in der Gruppe der Kurzzeitischämie I/R<sub>3</sub> zeigte sich eine signifikant verminderte Expression (CTL  $1,00 \pm 0,10$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,20 \pm 0,09$  ( $p=0,03$ )), sowie für die Gruppe der Langzeitischämie I/R<sub>30</sub> eine signifikant vermehrte Expression (CTL  $1,00 \pm 0,10$  vs. I/R<sub>30</sub>  $1,77 \pm 0,23$  ( $p=0,018$ )).

Die Expression der miR-29b war im linken Atrium im Vergleich der I/R<sub>3</sub> mit den Kontrollen unverändert (CTL  $1,00 \pm 0,07$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,74 \pm 0,03$  ( $p=0,40$ )), zeigte jedoch eine signifikante Erhöhung der Expression in den Tieren der Langzeitischämiegruppe I/R<sub>30</sub> (CTL  $1,00 \pm 0,07$  vs. I/R<sub>30</sub>  $1,70 \pm 0,17$  ( $**p=0,004$ )).

Die Analyse der Expression der miR-30a zeigte im Gewebe des linken Atriums keine Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen (CTL  $1,00 \pm 0,08$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,61 \pm 0,04$  ( $p=0,10$ ) vs. I/R<sub>30</sub>  $1,04 \pm 0,14$  ( $p=0,96$ )), jedoch einen Trend zur Expressionsverminderung für den Vergleich I/R<sub>3</sub> mit den Kontrollen ( $p=0,10$ ).

MiR-133a zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen im Gewebe des linken Vorhofs signifikant vermehrt exprimiert in der Gruppe der Langzeitischämietiere I/R<sub>30</sub> (CTL  $1,00 \pm 0,09$  vs. I/R<sub>30</sub>  $1,29 \pm 0,06$  ( $*p=0,02$ )). Kein signifikanter Unterschied, jedoch ein Trend zur Expressionsverminderung zeigte sich in der Gruppe der Kurzzeitischämie I/R<sub>3</sub> (CTL  $1,00 \pm 0,09$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,74 \pm 0,03$  ( $p=0,08$ )).

### 5.3 Veränderung potentieller Zielgene der miR-26a

#### 5.3.1 Targetscan *in silico* Analyse

In einem ersten Schritt erfolgte eine *in silico* Analyse möglicher Zielgene der miR-26a. Hierbei ergaben sich weit über 800 mögliche Zielgene. Es erfolgte eine Gruppierung nach Funktion, soweit diese bekannt war. Die Gruppen Ionenkanäle, Proteine des intrazellulären Signallings, extrazelluläre Matrixproteine,

Transkriptionsfaktoren, Proteinphosphatasen und eine Auswahl von anderen wurden als potentiell relevant für die Entstehung von Vorhofflimmern angesehen und im Folgenden weiter evaluiert.

Eine Literaturrecherche ergab eine in der untenstehenden Tabelle markierte Auswahl an bereits validierten Zielgenen. Anschließend erfolgte die der Tabelle 1 zu entnehmende Auswahl an Zielgenen zur Analyse. Wir fokussierten uns hierbei auf Gene, die bereits im Zusammenhang mit elektrischem und strukturellem Remodeling beschrieben sind.

Ionenkanäle	Intrazelluläres Signalling	Extrazellulärmatrix	Transkriptionsfaktoren	Phosphatasen	Andere
<b>TRPC3</b> <sup>54</sup>	<b>SMAD1</b> <sup>127</sup>	<b>COL1A2</b> <sup>128</sup>	<b>GATA4</b>	PPP3R1	ANK2
<b>KCNJ2</b> <sup>48</sup>	SMAD2	<b>COL5A1</b>	<b>ZFHX3</b>	PPP3CB	ESR1
<b>KCNQ4</b>	MAPK6		<b>CTGF</b> <sup>128</sup>	PPP2R5A	
<b>SCN5A</b>	MAP3K1			PPP2R3A	
KCNN3	MAP3K2				
<b>CACNA1C</b>	<b>GSK-3<math>\beta</math></b> <sup>129</sup>				
	<b>PTEN</b> <sup>72</sup>				

**Tabelle 1.** *In silico* Zielgenanalyse. Bereits **validierte Zielgene sind rot markiert**, im Rahmen der vorgelegten Arbeit **untersuchte Zielgene sind im Fettdruck dargestellt**.

### 5.3.2 qPCR

Im Gewebe des linken Vorhofs zeigte sich kein signifikanter Expressionsunterschied der mRNA von TRPC3, einem Kationenkanal, der in die Entstehung von Fibrose

durch Beeinflussung von Fibroblasten involviert ist (**Abbildung 16-A**, CTL  $1,00 \pm 0,14$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,74 \pm 0,14$  ( $p=0,37$ ) vs. I/R<sub>30</sub>  $0,98 \pm 0,21$  ( $p=0,96$ )).

Für die Expression von KCNJ2, dem einwärts gleichrichtenden Kaliumkanal, zeigte sich eine signifikante Verminderung der mRNA im Gewebe des linken Vorhofs der Langzeitischämietiere I/R<sub>30</sub> (**Abbildung 16-B**, CTL  $1,00 \pm 0,29$  vs. I/R<sub>30</sub>  $0,36 \pm 0,10$  ( $p=0,05$ )) ohne signifikante Veränderung der Expression in der Gruppe der Kurzzeitischämietiere I/R<sub>3</sub> im Vergleich zu den Kontrollen (CTL  $1 \pm 0,29$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,83 \pm 0,24$  ( $p=0,77$ )).

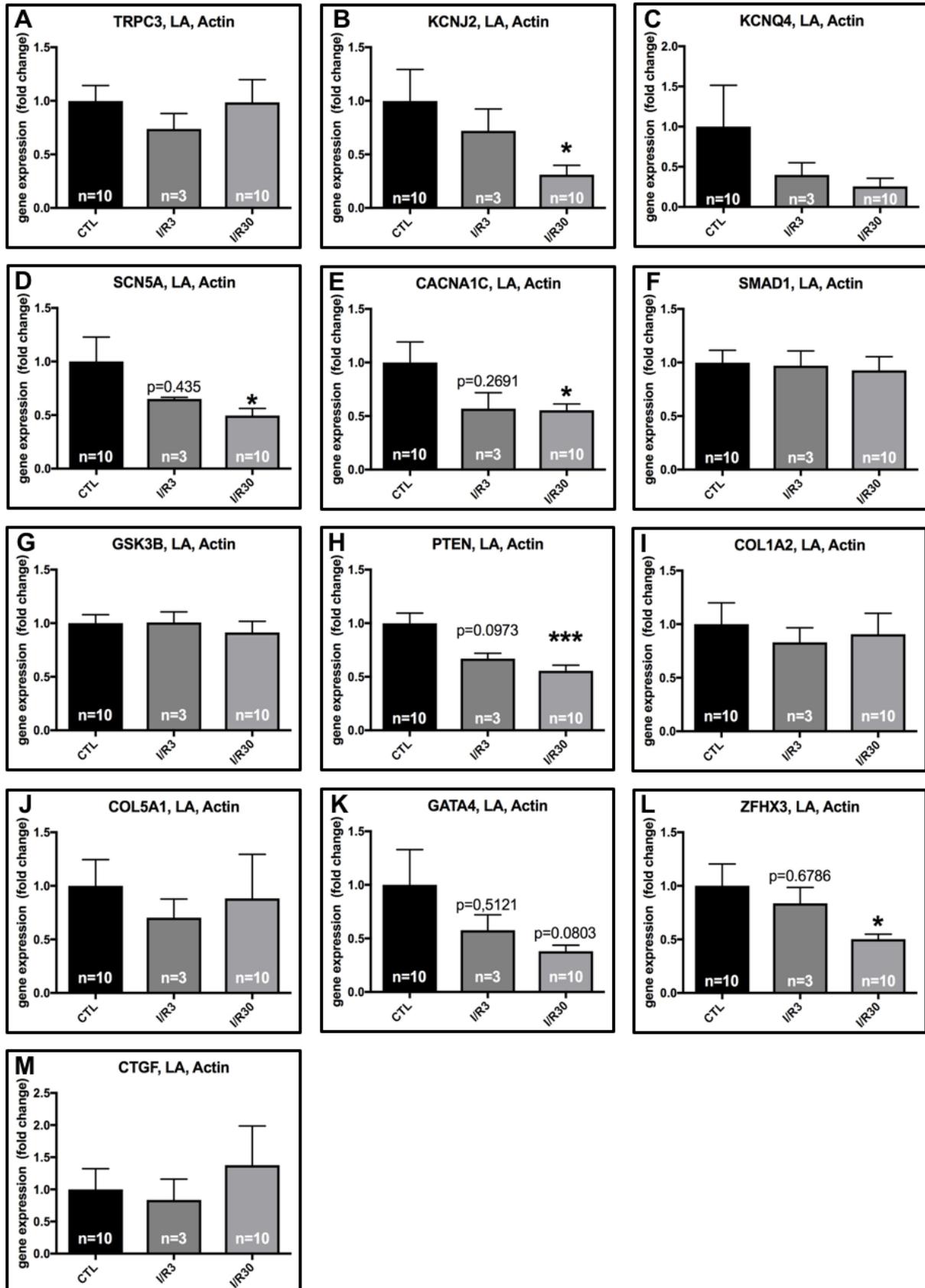
Die Expression der mRNA von KCNQ4 – einer Untereinheit des spannungsabhängigen Kaliumkanals  $K_{V7.4}$  – zeigte in beiden Interventionsgruppen keine signifikanten Unterschiede (**Abbildung 16-C**, CTL  $1 \pm 0,51$  vs. I/R<sub>30</sub>  $0,25 \pm 0,1$  ( $p=0,17$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,40 \pm 0,15$  ( $p=0,55$ )).

Für den Natriumkanal SCN5A zeigte sich in der Expressionsanalyse eine Verminderung der mRNA in der Gruppe der Langzeitischämietiere I/R<sub>30</sub> (**Abbildung 16-D**, CTL  $1 \pm 0,23$  vs. I/R<sub>30</sub>  $0,50 \pm 0,07$ ,  $p=0,05$ ) ohne signifikante Veränderung in der Gruppe der Kurzzeitischämietiere I/R<sub>3</sub> (CTL  $1 \pm 0,23$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,65 \pm 0,02$  ( $p=0,43$ )).

Die Analyse der Expression der mRNA von CACNA1C, der Alpha-Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals, im Gewebe des linken Atriums ergab eine verminderte Expression für die Interventionsgruppen wobei lediglich die Verminderung in der Gruppe I/R<sub>30</sub> Signifikanz erreichte (**Abbildung 16-E**). Die normierte Expression der Kontrollen betrug  $1 \pm 0,19$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,57 \pm 0,15$  mit einem p-Wert von 0,27. Für den Vergleich der Gruppe I/R<sub>30</sub> ( $0,56 \pm 0,06$ ) mit den Kontrollen CTL ergab sich ein p-Wert von 0,04.

Für die Analyse von SMAD1, einem profibrotischen Transkriptionsfaktor, ergab sich kein Unterschied zwischen den Gruppen (**Abbildung 16-F**), CTL  $1 \pm 0,12$  vs. I/R<sub>30</sub>  $0,93 \pm 0,13$  ( $p=0,68$ ) vs. I/R<sub>3</sub>  $0,97 \pm 0,14$  ( $p=0,91$ ).

Für die mRNA Expression im linken Atrium der Glykogen Synthase Kinase 3 Beta (GSK3B) zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den Kontrollen und den Interventionstieren (**Abbildung 16-G**). CTL  $1 \pm 0,08$  vs. I/R<sub>3</sub>  $1,01 \pm 0,10$  ( $p=0,98$ ) vs. I/R<sub>30</sub>  $0,91 \pm 0,10$  ( $p=0,51$ ).



**Abbildung 16.** Analyse der Zielgene auf mRNA-Ebene; ungepaarter Student t-Test, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , **A**, TRPC3. **B**, KCNJ2. **C**, KCNQ4. **D**, SCN5A. **E**,

CACNA1C. **F**, SMAD1. **G**, GSK3B. **H**, PTEN. **I**, COL1A2. **J**, COL5A1. **K**, GATA4. **L**, ZFH3. **M**, CTGF.

Des Weiteren erfolgte eine Analyse der Expression von PTEN im linken Atrium. Hierbei zeigte sich ein Trend zur Verminderung der Expression für die Tiere der Gruppe I/R<sub>3</sub> im Vergleich zu den Kontrollen (**Abbildung 16-H**). CTL  $1 \pm 0,10$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,67 \pm 0,05$  mit einem p-Wert von 0,10. Für die Tiere der Langzeitischämiegruppe zeigte sich eine signifikant verminderte Expression. CTL  $1 \pm 0,107$  vs. I/R<sub>30</sub>  $0,56 \pm 0,05$  mit einem p-Wert von 0,0007.

Die Expressionsanalyse von COL1A2 – einem Kollagenprotein – im linken Atrium zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (**Abbildung 16-I**, CTL  $1 \pm 0,20$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,83 \pm 0,14$  ( $p=0,66$ ) vs. I/R<sub>30</sub>  $0,91 \pm 0,20$  ( $p=0,74$ )).

Gleiches gilt für die Analyse der Expression auf mRNA-Ebene von COL5A1 – einem weiteren Kollagen. Auch hier zeigten sich im linken Atrium keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Tieren der Interventionsgruppen I/R<sub>3</sub> und I/R<sub>30</sub> (**Abbildung 16J**, CTL  $1 \pm 0,236$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,70 \pm 0,17$  ( $p=0,54$ ) vs. I/R<sub>30</sub>  $0,88 \pm 0,41$  ( $p=0,81$ )).

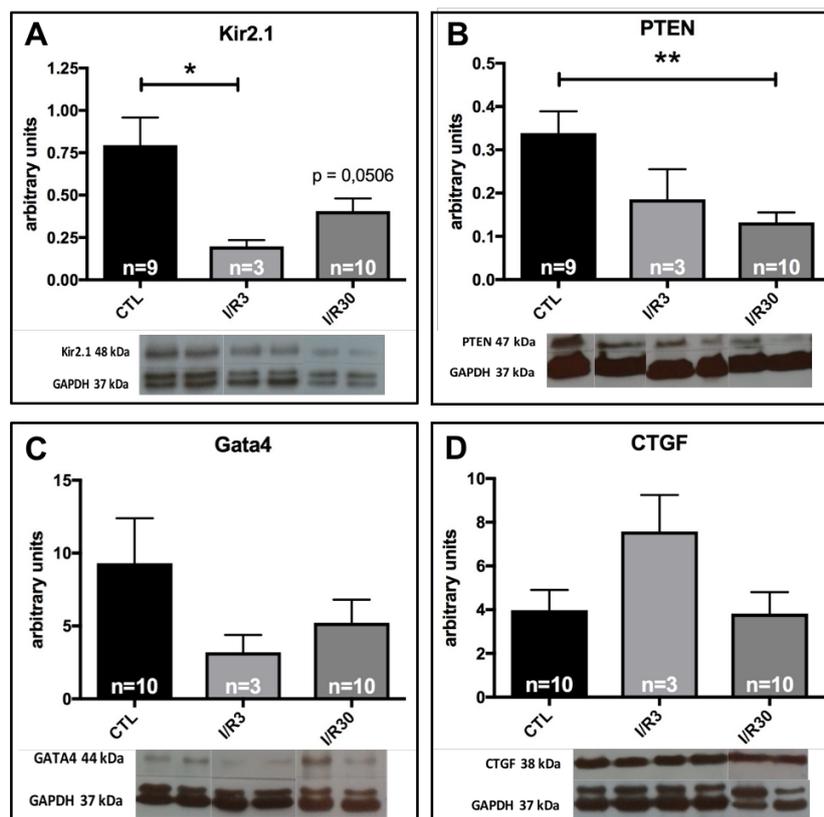
Für die Analyse der Expression von GATA4, einem Transkriptionsfaktor, welcher im Zusammenhang mit Vorhofflimmern bereits beschrieben wurde, ergaben sich eine nicht signifikante Verminderung im Vergleich zu den Kontrollen für die Kurzzeitischämiegruppe I/R<sub>3</sub> (**Abbildung 16-K**, CTL  $1 \pm 0,33$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,58 \pm 0,14$ ,  $p=0,51$ ) sowie eine nicht signifikante Verminderung für die Tiere der Langzeitischämiegruppe I/R<sub>30</sub> (CTL  $1 \pm 0,34$  vs. I/R<sub>30</sub>  $0,38 \pm 0,06$ ,  $p=0,08$ ).

Es erfolgte weiter eine Analyse der Expression der mRNA im Gewebe des linken Atriums von ZFH3, einem weiteren Transkriptionsfaktor, der in einer genomweiten Assoziationsstudie mit Vorhofflimmern in Verbindung gebracht wurde<sup>130</sup>. Diese zeigte keinen Unterschied zwischen den Kontrollen und den Tieren der Kurzzeitischämiegruppe I/R<sub>3</sub> (**Abbildung 16-L**). CTL  $1 \pm 0,20$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,84 \pm 0,15$ ,  $p=0,68$ . Eine signifikante Reduktion der Expression von ZFH3 im Gewebe des linken Atriums zeigte sich jedoch im Vergleich der Kontrollen mit den Tieren der Gruppe der Langzeitischämie I/R<sub>30</sub>. CTL  $1 \pm 0,20$  vs. I/R<sub>30</sub>  $0,50 \pm 0,05$  mit einem p-Wert von 0,03.

Zu guter Letzt erfolgte die Analyse der Expression von CTGF – einem profibrotischen Transkriptionsfaktor. Diese zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und den Versuchsgruppen (**Abbildung 16-M**, CTL  $1 \pm 0,32$  vs. I/R<sub>3</sub>  $0,84 \pm 0,32$  ( $p=0,80$ ) vs. I/R<sub>30</sub>  $1,38 \pm 0,61$  ( $p=0,59$ ).

### 5.3.3 Westernblot

In weiterer Folge wollten wir die Ergebnisse der qPCR (mRNA-Expression) durch Westernblots – also Expressionsanalyse auf Ebene der Proteine – im Gewebe des linken Atriums bestätigen. Es wurden Westernblots für Kir2.1, PTEN, Gata4 und CTGF durchgeführt.



**Abbildung 17.** Westernblots; One-Way-ANOVA mit Dunnet Posttest, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . **A**, Kir2.1. **B**, PTEN. **C**, Gata4. **D**, CTGF.

Die Analyse für Kir2.1 – eine Untereinheit des einwärts gleichrichtenden Kaliumkanals – ergab eine Reduktion der Expression auf Proteinebene für die Interventionsgruppen I/R<sub>3</sub> und I/R<sub>30</sub>. Blieb jedoch die Reduktion in der

Langzeitischämiegruppe I/R<sub>30</sub> lediglich ein Trend, so erreichte diese in der Kurzzeitischämiegruppe I/R<sub>3</sub> Signifikanz (

**Abbildung 17-A).** Im Vergleich zu den Kontrollen mit dem Mittelwert  $0,80 \pm 0,16$  zeigte sich eine Reduktion für I/R<sub>3</sub> auf  $0,20 \pm 0,0372$  mit einem p-Wert von 0,039. Für die Langzeitischämietiere der Gruppe I/R<sub>30</sub> ergab sich ein Mittelwert von  $0,41 \pm 0,08$  bei einem p-Wert von 0,051 (One-Way ANOVA mit Dunnet Posttest).

Die Analyse der Expression von PTEN im Gewebe des linken Atriums zeigte ebenfalls eine Reduktion der Expression in beiden Interventionsgruppen (

**Abbildung 17-B),** diese erreichte in der Gruppe der Langzeitischämietiere I/R<sub>30</sub> statistische Signifikanz. So erreichten die Kontrollen CTL einen Mittelwert von  $0,34 \pm 0,05$  und die Tiere der Gruppe I/R<sub>3</sub> einen Mittelwert von  $0,19 \pm 0,07$ . Hierfür ergab sich ein p-Wert von 0,11 was einem Trend zur Signifikanz entspricht. Die Versuchstiere der Gruppe I/R<sub>30</sub> erreichten einen Mittelwert von  $0,13 \pm 0,02$ , was im Vergleich mit den Kontrollen CTL zu einem p-Wert von 0,002 führte (

**Abbildung 17-B).**

Es folgte die Analyse der Expression von Gata4 im Gewebe des linken Atriums. Hier zeigte sich eine verminderte Expression im Vergleich zu den Kontrollen CTL in den Versuchstieren der Kurzzeitischämiegruppe I/R<sub>3</sub>, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Ebenfalls eine Verminderung war zu messen für die Expression in den Tieren der Langzeitischämiegruppe I/R<sub>30</sub> im Vergleich zu den Kontrollen, auch hier zeigte sich keine statistische Signifikanz (

**Abbildung 17-C,** CTL  $9,30 \pm 3,098$  im Vergleich zu I/R<sub>3</sub>  $3,20 \pm 1,18$ ,  $p=0,37$ . Im Vergleich zu I/R<sub>30</sub>  $5,22 \pm 1,59$  mit einem p-Wert von 0,38).

Zu guter Letzt analysierten wir die Expression von CTGF ebenfalls in Gewebe des linken Atriums. Hierbei zeigte sich eine vermehrte Expression der Kurzzeitischämiegruppe I/R<sub>3</sub> im Vergleich zu den Kontrollen, dieser Effekt war jedoch nicht statistisch signifikant (Abbildung 20-D; CTL  $3,98 \pm 0,92$  vs. I/R<sub>3</sub>  $7,58 \pm 1,67$  ( $p=0,15$ )). Kein Unterschied war nachweisbar im Vergleich der Langzeitischämietiere der Gruppe I/R<sub>30</sub> zu den Kontrollen (

**Abbildung 17-D;** CTL  $3,98 \pm 0,92$  vs. I/R<sub>30</sub>  $3,82 \pm 0,98$  ( $p=0,99$ )).

## 6 Diskussion

### 6.1 Die ischämische Kardiomyopathie als Modell für paroxysmales Vorhofflimmern

#### 6.1.1 Das Schwein als Modelltier für Vorhofflimmern

Die Herzinsuffizienz ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung von Vorhofflimmern und erhöht das Risiko auf das vier- bis sechsfache<sup>13, 131</sup>. Tiermodelle der Herzinsuffizienz werden daher häufig als Modelle für Vorhofflimmern gewählt, allerdings war die bevorzugte Tierspezies bislang der Hund<sup>77, 132</sup>. In der vorgelegten Arbeit wurde nach unserem Kenntnisstand zum ersten Mal der Modellorganismus Schwein hierfür verwendet.

Der Modellorganismus Schwein hat sich auch in der kardiovaskulären Forschung in den letzten Jahrzehnten bewährt<sup>133</sup>. Von besonderer Bedeutung für Infarktmodelle ist, dass die Koronaranatomie des porcinen Herzens der des Menschen fast komplett entspricht<sup>133</sup>. Zudem ist gerade im Unterschied zu anderen häufig verwendeten Spezies wie beispielsweise dem Hund kein ausgeprägtes Kollateralsystem vorhanden<sup>133</sup>. Bei Infarktmodellen ist also von einer ähnlichen Situation wie im humanen Organismus auszugehen bzw. es ist überhaupt möglich, einen transmuralen Myokardinfarkt zu induzieren. Ein größerer anatomischer Unterschied ist die Existenz einer linken Azygosvene, die in den Koronarsinus mündet<sup>133</sup>. Dies ist aber in dem von uns erzeugten Setting nicht von Relevanz.

Gerade auch in Bezug auf elektrophysiologische Fragestellungen hat das Schwein (als atriales Tachypacing-Modell) bereits erfolgreich Verwendung gefunden<sup>133</sup>. Dies ist insbesondere naheliegend, da gerade auf Ebene der Elektrophysiologie des Herzens große Ähnlichkeiten zum Menschen bestehen und damit eine Translation in eben diesen sinnvoll möglich scheint<sup>112</sup>. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten ist es zulässig anzunehmen, dass die Prozesse der De- und Repolarisation im porcinen Herzen ähnlich wie im humanen Herzen ablaufen. Folglich bietet sich der porcine Modellorganismus als besonders passend an.

#### 6.1.2 Anatomie und Histologie

Makroskopisch konnte die angestrebte Infarzierung des Stromgebiets der LAD distal des ersten Diagonalasts und damit die Effektivität des Modells nachgewiesen

werden. Mikroskopisch zeigte sich als Folge des Infarkts eine signifikante atriale Fibrose der Langzeitischämietiere I/R<sub>30</sub> im Vergleich zu den Kontrollen. Dieser Effekt war in den Kurzzeitischämietieren nicht festzustellen, was entsprechend der lediglich 3 Tage dauernden Reperfusionzeit anzunehmen war, da die Entwicklung einer Fibrose eine gewisse Zeit in Anspruch nimmt.

Konsistent mit den Ergebnissen von Hanna et al. aus einem Herzinsuffizienzmodell des Hundes zeigten auch unsere Tiere Fibrose vorwiegend im Atrium<sup>134</sup>. Ähnliche Ergebnisse zeigte auch die Arbeit von Kazui et al. in einem porcinen Herzinsuffizienzmodell erzeugt durch Tachypacing<sup>135</sup>. Hanna et al. induzierten in einem Hundemodell durch fünfwöchiges rechtsatriales Tachypacing eine Herzinsuffizienz und beschrieben die Unterschiede der Umbauvorgänge in Atrium und Ventrikel des linken Herzens. In Abhängigkeit der Zeit entwickelte sich in diesem Modell besonders atrial eine deutliche Fibrose, während ventrikulär auch nach 5 Wochen so gut wie keine Fibrose nachweisbar war<sup>134</sup>. Es ist interessant, dass dieser Effekt auch in unserem Modell zu sehen ist – haben wir doch einen völlig anderen Ansatz zur Entwicklung der Herzinsuffizienz verfolgt (atriales Tachypacing vs. ventrikuläre Myokardischämie). Dieser Umstand legt nahe, dass sich die Prozesse, die zur Entstehung der Fibrose bei Herzinsuffizienz führen, in Atrium und Ventrikel entscheidend unterscheiden. Bereits aus der Literatur ist bekannt, dass gerade die atriale Fibrose in Modellen der Herzinsuffizienz zum Vorhofflimmern ein, wenn nicht der entscheidende Faktor zur Entstehung eines proarrhythmogenen Substrats ist<sup>84</sup>.

### 6.1.3 Hämodynamik

Bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz durch eine Myokardischämie sind charakteristische Veränderungen hämodynamischer Parameter zu erwarten. Physiologisch stellen diese Veränderungen Kompensationsmechanismen dar, damit das Herz weiterhin einen adäquaten Kreislauf aufrechterhalten kann. Um ein stabiles Herzzeitvolumen nach dem Infarkt zu gewährleisten, muss das Herz sein Schlagvolumen möglichst gleich halten. Da jedoch nicht mehr die gleiche muskuläre Kraft zur Verfügung steht, bedarf dies einer höheren Vordehnung, die sich in einem größeren Füllungsvolumen am Ende der Diastole und einer geringeren Auswurfraction widerspiegeln, ein als Frank-Starling-Mechanismus bekannter Effekt<sup>136</sup>. Wir erwarteten also in unseren ischämischen Versuchstieren keine

Veränderung des linksventrikulären Drucks in der Systole, jedoch eine Zunahme des LVEDP sowie eine Abnahme der Ejektionsfraktion. Dies ist in unseren Versuchstieren der Langzeitischämiegruppe signifikant verändert verglichen mit Kontrolltieren.

Alle weiteren Drücke zeigten wie zu erwarten keine signifikanten Veränderungen zwischen den Gruppen. Lediglich der rechtsventrikuläre Druck der Langzeitischämietiere war im Vergleich zu den Kontrollen von  $27,9 \pm 2,2$  mmHg auf  $12,7 \pm 2,0$  mmHg signifikant erniedrigt. Dies ist durch die Versorgung von Teilen des rechten Ventrikels durch die linke Koronararterie zu erklären. Leider liegen speziell für den rechtsventrikulären Druck nicht von allen Versuchstieren Messungen vor, da die Drücke im Verlauf der Versuchsreihe nicht bei allen Tieren zu messen waren. Daher wird es nötig sein, diese hämodynamischen Messungen in einer Folgekohorte erneut zu bestimmen und unsere diesbezüglich vorläufigen Ergebnisse zu reproduzieren.

Die Bestimmung der linksventrikulären Ejektionsfraktion zeigt eine signifikante Abnahme in den Versuchstieren der I/R<sub>30</sub> Gruppe 4 Wochen nach Infarktinduktion, während sich in den Tieren der Kurzzeitischämiegruppe I/R<sub>3</sub> noch keine relevante Einschränkung der linksventrikulären Ejektionsfraktion zeigt.

In Zusammenschau der Befunde bestätigt sich, dass sich durch die Induktion des Infarkts in den Langzeitischämietieren I/R<sub>30</sub> eine relevante Herzinsuffizienz und damit eine ischämische Kardiomyopathie entwickelt hat.

#### 6.1.4 Elektrophysiologie

Von entscheidender Bedeutung für die Etablierung unseres Modells war die Frage, ob sich durch die Ischämie ein Effekt bezüglich der Induzierbarkeit von Vorhofflimmern zeigen würde. Diese Frage konnte diese Studie klar mit „ja“ beantworten. Sowohl in der Gruppe der Kurzzeitischämie wie auch der Gruppe der Langzeitischämie zeigte sich eine erhöhte Induzierbarkeit von Vorhofflimmern wie auch eine längere Dauer der einzelnen Episoden im Vergleich zu den Kontrollen. Das Modell der ischämischen Kardiomyopathie im Schwein konnte somit als adäquates Modell für paroxysmales Vorhofflimmern etabliert werden.

Im Weiteren konnten wir uns daher der Frage widmen, welche Mechanismen dem beobachteten Phänotyp zugrundeliegen könnten. In der elektrophysiologischen

Untersuchung unserer Versuchstiere ließ sich keine wesentliche Veränderung der atrialen effektiven Refraktärperiode (AERP) zeigen. Dies ist konsistent mit Ergebnissen aus einem Hundemodell der Herzinsuffizienz der Arbeitsgruppe um Stanley Nattel<sup>84</sup>. Eine verkürzte Refraktärzeit der atrialen Myozyten – wie sie beispielsweise in den Tachypacing-Modellen nachweisbar ist<sup>84</sup> – würde auf ein elektrisches Remodeling hindeuten und wäre demnach eine mögliche Erklärung für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern gewesen. Elektrisches Remodeling scheint jedoch in unserem Modell nicht der entscheidende Mechanismus zu sein, allerdings lässt sich dies zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht sicher ausschließen. Insbesondere, da in dem Hundemodell der Herzinsuffizienz von Nattel et al. als weitere mögliche Erklärung des Phänotyps lokale Reizleitungsveränderungen nachweisbar waren, beispielsweise verlängerte Weiterleitungsgeschwindigkeiten<sup>84</sup>, die wir in unserer Arbeit nicht untersucht haben und damit nicht abschließend ausschließen können.

In Anbetracht unserer Ergebnisse, insbesondere der signifikanten atrialen Fibrose, scheint ein strukturelles Remodeling als Ursache der gesteigerten Suszeptibilität für Vorhofflimmern jedoch wahrscheinlicher zu sein.

## **6.2 microRNA-Profil des Modells**

### **6.2.1 Allgemeine Überlegungen**

Unsere bisherigen Ergebnisse bezüglich der Etablierung des Modells waren konsistent mit den Funden anderer Arbeitsgruppen was die Ausprägung der Remodelingvorgänge im linken Herzen angeht<sup>67</sup>. Umso spannender war es nun für uns zu sehen, ob sich das porcine Ischämie-Reperusionsmodell der Herzinsuffizienz in seinem microRNA Profil von den durch Tachypacing induzierten Herzinsuffizienzmodellen unterscheidet.

Besonders eine Arbeit von Chen et al. bietet hier guten Einblick. In einem Kardiomyopathiemodell des Hundes induziert durch ventrikuläres Tachypacing verglichen sie die Dynamik der miRNA Veränderungen in Atrium und Ventrikel für 15 verschiedene miRNAs (miR-1, miR-21, miR-26a, miR-26b, miR-29b, miR-30a, miR-133a, miR-133b, miR-146a, miR-146b, miR-208a, miR-208b, miR214, miR-218 und miR-222)<sup>67</sup>. Es lässt sich hier festhalten, dass sich die von Chen et al. beschriebenen

Veränderungen im Hundemodell deutlich von unseren unterscheiden. Exemplarisch soll hier die von uns genauer untersuchte miR-26a herausgegriffen werden. Chen et al. konnten für diese miRNA in ihrem Modell in einer „whole tissue“ (wie auch von uns vorgenommen) Analyse keine signifikanten Veränderungen der Expression im linken Atrium feststellen, es zeigte sich lediglich ein Trend zur Runterregulation im Zeitverlauf<sup>67</sup>, während in unserem Modell eine signifikante Hochregulation der miR-26a nachgewiesen werden konnte. Der Beobachtungszeitraum von Chen et al. war mit 2 Wochen kürzer bemessen als in unserem Modell mit bis zu 30 Tagen Reperfusionsdauer. Die Arbeitsgruppe ging nun aber einen Schritt weiter und verglich spezifisch die Expression linksatrialer Fibroblasten und Kardiomyozyten: Hierbei ließ sich eine signifikante Abnahme der miR-26a-Expression in Fibroblasten nachweisen<sup>67</sup>, ein Effekt, der sich zuvor beispielsweise auch in einem Hypertrophiemodell der Maus zeigen ließ<sup>137</sup>. Generell ist es schwer die Ergebnisse von Chen et al. mit unseren zu vergleichen, da es sich um eine andere Spezies, eine andere Pathogenese der Herzinsuffizienz und einen differierenden Beobachtungszeitraum handelt. Nichtsdestotrotz liefert die konsistent vorhandene Alteration der miR-26a einen Hinweis auf ihre potentielle Relevanz in atrialen Umbauvorgängen.

Die Expressionszunahme der miR-26 in unserem Langzeitischämiemodell ist möglicherweise auch Produkt eines Kompensationsmechanismus und nicht Ausdruck der dem Phänotyp zu Grunde liegenden Veränderungen. Eine abschließende Antwort hierzu benötigt weitere umfassende Untersuchungen des gesamten miRNoms uns ist daher derzeit noch nicht möglich.

### 6.2.2 qPCR

TRPC3 ist ein Kationenkanal, der eine wichtige Rolle im Kalziumhandling der Fibroblasten spielt und bereits als Zielgen der miR-26 beschrieben wurde<sup>54</sup>. Er wird von miR-26 inhibiert, eine Herabregulation derselben würde also zu einer Zunahme der Expression von TRPC3 führen, welche wiederum zu vermehrter Fibrose führt<sup>67</sup>. War die Fibrose in unserem Modell linksatrial eindeutig nachzuweisen, so fehlte doch der Nachweis einer Expressionsveränderung von TRPC3 aus dem Gewebe des linken Atriums. Unter Umständen ist dies durch die Isolation der mRNA aus dem gesamten Gewebe zu erklären. Inhibiert die miR-26 TRPC3 beispielsweise spezifisch

in Fibroblasten, könnten die Effekte bei Untersuchung von kardialem Gewebe ohne Separierung einzelner Zelltypen abgeschwächt oder überhaupt nicht messbar sein. Weitere Untersuchungen unseres Modells hierzu sind vonnöten. Leider war eine Bestimmung der TRPC3 Proteinexpression nicht möglich, da bislang kein adäquater Antikörper zur Detektion von porcinem TRPC3 zur Verfügung steht.

Eine besondere Rolle im elektrischen Remodeling spielt der einwärts gleichrichtende Kaliumstrom  $I_{K1}$ . Seine Funktion ist die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials sowie die Regulation der Repolarisation, so dass Veränderungen in Funktion und Anzahl des Kanals zu signifikanten Veränderungen der atrialen Refraktärzeit führen<sup>26</sup>. Die Bedeutung speziell der Untereinheit Kir2.1 in der Entstehung von Vorhofflimmern geht aus unterschiedlichen Arbeiten hervor<sup>48, 138, 139</sup>. So ist eine Vermehrung des Kanals mit einer verkürzten Aktionspotentialdauer und damit der Stabilisation von kreisenden Erregungen assoziiert<sup>140</sup>. Luo et al. waren die Ersten, die eine mögliche Regulation von  $I_{K1}$  bei Vorhofflimmern mit miRNA-Veränderungen in Verbindung brachten<sup>48</sup>. Sie zeigten eine verminderte miR-26 Expression sowohl in einem Vorhofflimmermodell im Hund wie auch in humanen Proben und konnten schließlich die direkte Regulation der Expression von Kir2.1 durch die miR-26 Familie nachweisen<sup>48</sup>. Konsistent mit diesen Ergebnissen fanden sich auch in unserem Modell Veränderungen von KCNJ2 bzw. Kir2.1. Passend zur Erhöhung der miR-26 in unserer Langzeitischämiekohorte I/R<sub>30</sub> fand sich eine signifikante Herabregulation in KCNJ2 auf mRNA Ebene im Gewebe des linken Atriums. Auf Proteinebene blieb dieser Effekt ein nicht signifikanter Trend. Die in unserem Modell sichtbare Veränderung von miR-26a und konsekutiv KCNJ2/Kir2.1 steht jedoch im Kontrast zu den von Luo et al. gefundenen Veränderungen in Hunden und Menschen. Des Weiteren waren keine Veränderungen der atrialen Refraktärzeit in unserem Modell nachweisbar. Nicht im Widerspruch stehen unsere Ergebnisse beispielsweise mit denen von Kuomi et al., die eine deutliche Abnahme von  $I_{K1}$  in Patienten mit Herzinsuffizienz feststellen konnten<sup>141</sup>. In dieser Arbeit wurde jedoch keine Verbindung zum Vorhofflimmern hergestellt. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse in der Literatur ist die Komplexität der Erkrankung und die Mannigfaltigkeit der Subtypen sowie die unterschiedlichen Spezies und Modelle. So ist es durchaus wahrscheinlich, dass der von uns gesehene Effekt in einem größeren Kontext nicht alleine durch die Veränderung der miR-26 bedingt ist – vor allem gemessen an dem Umstand, dass auch in unserem Modell weitere

miRNAs verändert waren. Ebenso ist es möglich, dass endogene Prozesse der Gegenregulation zu einer Erhöhung der miR-26 Expression nach initialer Erniedrigung der Expression führen – der Phänotyp aber aufgrund anderer gegenläufiger Veränderungen dennoch persistiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Pathophysiologie der Erkrankung zu komplex ist, um sie mit der Veränderung einer einzelnen microRNA umfassend beschreiben zu können. Dennoch ist es wichtig einzelne Mechanismen zu identifizieren, um deren Relevanz im Hinblick auf spezielle Subtypen der Erkrankung in Modellen evaluieren zu können. So liefern Arbeiten wie die Vorliegende wichtige Erkenntnisse im Hinblick auf spezifische Aspekte der insgesamt komplexen Erkrankung.

In den letzten Jahren rückte zunehmend auch eine genetische Komponente von Arrhythmien und insbesondere Vorhofflimmern in den Fokus. So ist es erwiesen, dass besonders Formen des erblichen Long-QT-Syndroms mit vermehrtem Auftreten atrialer Arrhythmien vergesellschaftet sind<sup>142, 143</sup>. Lemoine et al. gelang es zu zeigen, dass in einem Mausmodell des Long-QT-Syndroms LQTS3 frühe Nachdepolarisationen durch Veränderung des Natriumstroms  $I_{NaL}$  Grund für das Auftreten von Vorhofflimmern sind<sup>144</sup>. So zeigten sich in der Arbeit an den isolierten Herzen des Modells besonders bei niedrigen Stimulationsfrequenzen viele frühe Nachdepolarisationen<sup>144</sup>. Die Arbeit von Makielski et al. aus dem Jahre 2016 zeigt auf, dass auch SCN5A – das Gen der  $\alpha$ -Untereinheit des Natriumkanals Nav<sub>1.5</sub> – am späten Natriumstrom beteiligt ist<sup>145</sup>. Es ist also anzunehmen, dass eine Zunahme des Natriumstroms in der Plateauphase des Aktionspotentials zu frühen Nachdepolarisationen (EAD) führt. In unserem Modell war jedoch die Expression von SCN5A als *in silico* identifiziertem Zielgen der miR-26 in den Langzeitischämietieren signifikant erniedrigt. Dies ist passend zur zeitgleich erhöhten Expression der miR-26 in unseren Langzeitischämietieren – steht jedoch in Kontrast zu den Ergebnissen von Lemoine et al. Durch die Herabregulation in den Langzeitischämietieren ist mit weniger EAD zu rechnen, was den Schluss nahelegt, dass der gesehenen Erniedrigung der Expression von SCN5A auf mRNA-Ebene entweder auf Translationsebene entgegengesteuert wird, oder der Phänotyp des Vorhofflimmerns in unserem Modell aufgrund anderer Mechanismen besteht. Leider war es nicht möglich auf Proteinebene die Expression von SCN5A zu untersuchen, da hierzu kein

funktionierender Antikörper gefunden werden konnte und damit kein aussagekräftiger Westernblot zu diesem Gen möglich war. Um diese Fragen in unserem Modell zu evaluieren, müssen in einem zukünftigen Versuch Messungen der Aktionspotentialdauer in unseren Versuchstieren vorgenommen werden, sowie ein funktionierender Antikörper für Nav<sub>1.5</sub> gefunden werden.

Eine weitere wichtige Komponente des elektrischen Remodelings ist das sogenannte Kalzium-Handling, es beschreibt den Umgang der Herzmuskelzelle mit Kalzium im Allgemeinen. Strömen Kalziumionen durch den L-Typ Kalzium Kanal in die Zelle, so führt dies zum sogenannten kalziumgetriggerten Kalziumausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum durch den Ryanodinrezeptor. Dieser systolische Kalziumstrom ist schlussendlich verantwortlich für die Kontraktion der Myozyten<sup>146</sup>. Diese können wieder entspannen, sobald der intrazelluläre Kalziumspiegel wieder gesunken ist, was durch die Aktivität des Kalziumaustauschers NCX1 sowie die ATPase SERCA bewerkstelligt wird<sup>146</sup>. Jedwede Störung dieses komplexen Zusammenspiels ist potentiell arrhythmogen.

In unserem Modell haben wir uns im Bezug dazu auf den L-Typ Kalzium Kanal Ca<sub>v1.2</sub>, bzw. dessen Alpha-1 Untereinheit konzentriert. Diese wird von dem Gen CACNA1C kodiert, welches ein potentielles Zielgen der miR-26a darstellt. Diese Untereinheit ist Bestandteil der Ionenpore und somit maßgeblich für die Funktion des Kanals verantwortlich<sup>147, 148</sup>. In mehreren Modellen des Vorhofflimmerns, wie auch in Gewebe von Patienten konnte eine Reduktion des Kalziumstroms I<sub>CaL</sub> gezeigt werden<sup>147, 149</sup>. Diese Verminderung führt isoliert zu einem verkürzten Aktionspotential<sup>147</sup>, was wiederum zu verkürzten Refraktärzeiten führt und daher kreisende Erregungen ermöglicht. Des Weiteren ist dies assoziiert mit der Entstehung von späten Nachdepolarisationen<sup>150</sup>. In unserem Modell ist jedoch keine verkürzte Refraktärzeit in den Interventionstieren nachweisbar und Aussagen über die Aktionspotentialdauer sind nicht möglich. Dennoch findet sich in unserer Arbeit eine verminderte Expression von CACNA1C auf mRNA-Ebene in den Langzeitischämietieren I/R<sub>30</sub>, welche durch die erhöhte Expression von miR-26 in diesen Versuchstieren erklärt werden könnte. *In silico* Analysen legen eine mögliche Regulation von CACNA1C durch miR-26a nahe, ein direkter Nachweis dieses Zusammenhangs ist jedoch noch ausständig. Inwiefern die veränderte Expression

von CACNA1C in unserem Modell zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern beiträgt bleibt daher noch unklar.

Ein bereits validiertes Zielgen der miR-26 ist PTEN<sup>72</sup>. Der Zusammenhang von PTEN mit der Entstehung von Vorhofflimmern ist anzunehmen, aber noch nicht ausreichend erforscht. Einen möglichen Ansatz zu besserem Verständnis liefert die Arbeit von Lorenzen et al.<sup>151</sup> In deren Modell in der Maus zeigte sich nach PTEN Knockout ein verbessertes Überleben der kardialen Fibroblasten, sowie eine vermehrte Entstehung von Extrazellulärmatrix<sup>151</sup>. Ein Review von Oudit et al. lieferte bereits einige Jahre früher Hinweise in eine ähnliche Richtung und brachte PTEN in Verbindung mit der Regulation der myokardialen Fibrose<sup>152</sup>. In unserem Modell ist die Expression von PTEN sowohl auf mRNA, wie auch auf Proteinebene in den Langzeitischämietieren vermindert. Dieser Umstand passt zur erhöhten miR-26a und liefert einen möglichen Erklärungsansatz für die vermehrte Fibrose in den Tieren der Langzeitischämiegruppe I/R<sub>30</sub>. Die Datenlage zu den Effekten von PTEN auf die verschiedenen kardialen Zelltypen und die Entstehung von Fibrose ist jedoch nicht einheitlich. Anhand der vorliegenden Daten kann derzeit noch keine abschließende Beurteilung hinsichtlich der Rolle von PTEN bei proarrhythmogener atrialer Fibrosebildung erfolgen. Dennoch liefert unsere Beobachtung einen interessanten Einblick und Anlass, die Forschung in Bezug auf diese Fragestellung zu vertiefen.

Anders als bei den bisher diskutierten Zielgenen verhält es sich bei ZFH3. Dieses Gen wurde in sogenannten „genome wide association studies“ (kurz GWAS) als Risikogen identifiziert, das mit Vorhofflimmern assoziiert ist<sup>130</sup>. Diese Form der Studie liefert jedoch keinen methodischen Hinweis hinsichtlich eines zugrundeliegenden Mechanismus. Daher ist es unbedingt vonnöten die derart gefundenen Loci weiter zu erforschen. Die Funktion des Transkriptionsfaktors ZFH3 im Herzen war zur Zeit der Entdeckung der Assoziation völlig unklar<sup>130</sup>. Erste Hinweise auf eine mögliche Rolle in der Pathogenese des Vorhofflimmerns liefert eine Arbeit von Kao et al. aus dem Jahr 2016. Sie konnten zeigen, dass ein Knockdown von ZFH3 in atrialen HL-1 Zellen zu vermehrter Suszeptibilität für Arrhythmien sowie einer Dysregulation der Kalziumhomöostase führt<sup>153</sup>. Bisher kannte man ZFH3 als Tumorsuppressor in einigen malignen Erkrankungen<sup>153</sup>. Kao et al. gelang es nun zumindest in atrialen

Kardiomyozyten der Maus bedeutsame Aspekte von ZFH3 für die Elektrophysiologie heraus zu arbeiten. So sahen sie in ihren HL-1 Zellen mit ZFH3 Knockdown erhöhten zellulären Kalziumgehalt, größere Kalziumtransienten sowie eine Kalziumleckage<sup>153</sup>. Zudem fand sich in dieser Arbeit ein verkürztes Aktionspotential<sup>153</sup>. Leider konnte die Arbeit von Kao et al. noch keinen Aufschluss darüber bieten, welche zellulären Veränderungen zu diesen Beobachtungen führen. Wir wissen jedoch, dass mögliche Erklärungen für die gesehenen Phänomene eine erhöhte Aktivität der SERCA oder des Ryanodinrezeptors sein können<sup>153</sup>. Es ist jedenfalls bekannt, dass Kalziumleckage sowie die Überladung der Zelle mit Kalzium eine Rolle für die Entstehung von Vorhofflimmern spielen<sup>66, 154</sup>. In unserem Modell zeigte sich eine verminderte Expression von ZFH3 auf mRNA Ebene in den Langzeitischämietieren I/R<sub>30</sub>. Jedoch ist auch hier anzumerken, dass wir keine elektrophysiologischen Veränderungen neben der erhöhten Induzierbarkeit von Vorhofflimmern in unseren Versuchstieren feststellen konnten. Dies steht in Kontrast zu den Ergebnissen von Kao et al. Es ist jedoch zu sagen, dass bei der Vielzahl an unterschiedlichen Einflüssen alleine der in unserem Modell untersuchten Gene, es durchaus denkbar ist, dass sich die verschiedenen Veränderungen soweit kompensieren, dass zwar ein veränderter Phänotyp resultiert, einzelne Effekte wie ein verkürztes Aktionspotential aber kaschiert werden. Zudem haben wir keine zelluläre Elektrophysiologie im Sinne von Kalziumtransienten oder Patch-clamp Messungen untersucht, so dass derzeit keine Aussagen hinsichtlich des Calciumhandlings oder der Ionenströme möglich sind.

### 6.2.3 Westernblot

Die Messung der Proteinexpression stellt im Schwein eine besondere Herausforderung dar, da die hierfür notwendigen Antikörper nur für sehr limitierte Proteine zur Verfügung stehen. Die spezielle Anfertigung spezifischer Antikörper ist natürlich möglich, jedoch mit großen Kosten verbunden und war daher für uns zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine Option. Daher haben wir es bisher nicht geschafft, zu allen Proteinen, die für uns von Interesse sind Westernblots anzufertigen. In unserer Arbeit ließen sich die auf mRNA-Ebene gesehenen Effekte für KCNJ2 und PTEN im Westernblot bestätigen. So waren die entsprechenden Proteine in den Langzeitischämietieren I/R<sub>30</sub> ebenfalls vermindert. Für Gata4 zeigte sich ein

ähnliches Ergebnis wie in der mRNA-Analyse, die Expression war in beiden Ischämiegruppen im Vergleich zu den Kontrollen vermindert, dieses Ergebnis erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Vermutlich würde hier bei einer entsprechend größeren Kohorte ein signifikanter Effekt resultieren.

### **6.3 Ausblick und Relevanz**

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es uns gelungen ist, ein porcines Modell für paroxysmales Vorhofflimmern zu etablieren. So zeigten unsere Versuchstiere eine gesteigerte Induzierbarkeit sowie Dauer von Vorhofflimmern auf dem Boden einer signifikanten atrialen Fibrose. Aufgrund der bereits zuvor ausführlich besprochenen Ähnlichkeiten des porcinen Modellorganismus mit dem humanen, ist die Untersuchung von spezifischen Fragestellungen in diesem Modell von besonderem Interesse und dank der vorliegenden Arbeit nun auch möglich.

Aufgrund unseres besonderen Interesses für microRNAs fokussierten wir uns in einem ersten Schritt hierauf und erstellten für dieses Modell ein miRNA-Profil. Interessanterweise zeigte sich hier ein Profil, das sich deutlich von anderen Modellen (z.B. den Tachypacingmodellen im Hund) unterscheidet. Kurz zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Veränderungen im Kurzzeitischämiemodell I/R<sub>3</sub> weitgehend konsistent sind mit beispielsweise den Ergebnissen von Chen et al.<sup>67</sup>. In beiden Modellen zeigt sich im Gewebe des linken Atriums eine verminderte Expression von miR-1 und eine erhöhte Expression von miR-21, eine verminderte Expression von miR-26a, miR-29b, miR-30a und miR-133a.

Interessanterweise sind nun all diese miRNAs in unseren Langzeitischämietieren gegenteilig reguliert. So ist im linken Vorhof die miR-1 überexprimiert, miR-21 und miR-30a unverändert verglichen mit den Kontrollen, miR-26a, miR-29b erhöht sowie miR-133a signifikant überexprimiert. Diese Veränderungen stehen nun bei nachgewiesenem Phänotyp im Kontrast zu anderen Modellen, wie beispielsweise dem Tachypacing-Modell im Hund, welches Chen et al. charakterisierten. Dies wirft vor allem unmittelbar die Frage auf, wie ein ähnlicher Phänotyp bei gegenteiligem miRNA-Profil resultieren kann. Sind es späte Kompensationsmechanismen, die zu dem veränderten Profil führen? Ist der Phänotyp durch die miRNA-Spiegel gar nicht beeinflusst? Wie verhält sich die Dynamik des miRNA-Profiles in unserem Modell nach einer, zwei oder drei Wochen? All dies sind Fragen, deren Beantwortung wir uns in

Zukunft widmen müssen, denn ohne Antworten auf diese und viele weitere Fragen, ist es nicht möglich einen Zusammenhang zwischen dem miRNA-Profil unseres Modells und dem beobachteten Phänotyp herzustellen.

Unsere Ergebnisse im Allgemeinen sind bislang deskriptiver Natur und erlauben keine Aussagen hinsichtlich der Kausalität spezifischer miRNA-Dysregulation. Da miRNAs in ein komplexes Netzwerk eingebettet sind und jede miRNA mehrere Zielgene bzw. verschiedene Zielgene von mehreren miRNAs reguliert werden, ist es derzeit methodisch nicht möglich, dieses komplexe Zusammenspiel in einem einzelnen Forschungsvorhaben zu adressieren. Daher verfolgten wir die Zielsetzung, zunächst einzelne spezifische miRNAs und deren Einfluss auf die Arrhythmogenese zu untersuchen. Aufgrund der kardialen Expression und ihrer bereits beschriebenen Effekte im strukturellen und elektrischen Remodeling haben wir den Fokus in dieser Arbeit auf die miR-26a gelegt, sind uns aber der immanenten Limitationen dieses Ansatzes bewusst und erheben ebenso wenig den Anspruch, durch die Effekte dieser spezifischen miRNA die komplexe Erkrankung Vorhofflimmern vollständig zu erklären. Dennoch liefert diese Arbeit einen interessanten Einblick in mögliche neue Mechanismen der proarrhythmogenen Fibroseentstehung.

Die Veränderung der miR-26a im linksatrialen Gewebe in unserem Modell des Vorhofflimmerns ist evident, und ihre möglichen Effektoren sind vielfältig. Wir konnten erste Hinweise für eine mögliche Rolle der miR-26a in der Entstehung von paroxysmalem Vorhofflimmern finden. So zeigen unsere Ergebnisse eine mögliche Verbindung zwischen miR-26a, PTEN und der Entstehung von Fibrose. Des Weiteren sehen wir Veränderungen der Expression von KCNJ2 und CACNA1C, deren gegenteilige Regulation einen Erklärungsansatz dafür darstellen könnte, dass die atriale Refraktärzeit unseres Modells unverändert war und damit einen möglichen Kompensationsmechanismus darstellen könnte. Möglicherweise gelingt es, in Zukunft durch die ersten Hinweise dieser Arbeit neuen Einblick in die Pathogenese des paroxysmalen Vorhofflimmerns zu erlangen und damit neue Wege für die Therapie dieser Erkrankung aufzuzeigen.

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1.</b> Mechanismen ektopter Erregungsbildung <sup>2</sup> .	23
<b>Abbildung 2.</b> Die 20 abundantesten miRNAs des Herzens <sup>1</sup> .	26
<b>Abbildung 3.</b> Überlegungen zur Wahl des geeigneten Tiermodells <sup>75</sup> .	40
<b>Abbildung 4.</b> Koronarangiographie. <b>A.</b> Darstellung der linken Koronararterie: LAD blau gestrichelt, erster Diagonalast gelb gestrichelt. <b>B.</b> Darstellung des rot umrahmten Ballons in Position. <b>C.</b> Zustand bei insuffliertem Ballon, zu sehen der Perfusionsabbruch im Stromgebiet nach dem Ballon.	51
<b>Abbildung 5.</b> Bestimmung der AERP mittels Extrastimuli. S1, Stimulus mit Basiszykluslänge 400 ms, S2, Extrastimulus mit einer Zykluslänge von 200 ms. Pfeile markieren die durch den Stimulus induzierten P-Wellen. Pfeilspitze markiert die ausbleibende P-Welle nach dem Extrastimulus.	53
<b>Abbildung 6.</b> Querschnitt durch den rechten (RV) und linken (LV) Ventrikel. <b>A,</b> Kontrolle. <b>B,</b> I/R mit Nachweis eines transmuralen Myokardinfarkts (◄).	75
<b>Abbildung 7.</b> Histologische Untersuchung der interstitiellen Fibrose. <b>A,</b> Quantifizierung der Fibrose im linken Atrium (LA), **p<0,01, One-Way ANOVA mit Dunnet Posttest. <b>B,</b> Quantifizierung der Fibrose im linken Ventrikel (LV). <b>C-E,</b> repräsentative Darstellung der Fibrose (grün gefärbt) im linken Vorhof in Kontrolle ( <b>C,</b> CTL), Kurzzeitischämie ( <b>D,</b> I/R <sub>3</sub> ) und Langzeitischämie ( <b>E,</b> I/R <sub>30</sub> ). <b>F-H,</b> Repräsentative Darstellung der Fibrose im linken Ventrikel in Kontrolle ( <b>F,</b> CTL), Kurzzeitischämie ( <b>G,</b> I/R <sub>3</sub> ) und Langzeitischämie ( <b>H,</b> I/R <sub>30</sub> ).	76
<b>Abbildung 8.</b> linksventrikuläre Hämodynamik. One-Way ANOVA mit Dunnet Posttest, **p<0.01, ***p<0.001. <b>A,</b> Systolischer linksventrikulärer Druck in Ruhe (LVP <sub>baseline</sub> ). <b>B,</b> Systolischer linksventrikulärer Druck bei einer Frequenz von 130/min. (LVP <sub>130bpm</sub> ). <b>C,</b> Linksventrikulärer enddiastolischer Druck in Ruhe (LVEDP <sub>baseline</sub> ). <b>D,</b> Linksventrikulärer enddiastolischer Druck bei einer Frequenz von 130/min. (LVEDP <sub>130bpm</sub> ).	77
<b>Abbildung 9.</b> Rechtsherzkatheteruntersuchung. One-Way ANOVA mit Dunnet Posttest, **p<0.01. <b>A,</b> Rechtsatrialer Druck (RAP). <b>B,</b> Rechtsventrikulärer Druck (RVP). <b>C,</b> Pulmonalarterieller Druck (PAP).	78

- Abbildung 10.** Auswurfraction des Herzens (Cardiac Output). One-way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparison test. **A.** Auswurfraction in Ruhe ( $CO_{baseline}$ ). **B.** Auswurfraction bei Stimulation mit 130/Minute ( $CO_{130bpm}$ ). 79
- Abbildung 11.** EKG Parameter. One-way ANOVA mit Dunnet Posttest. 80
- Abbildung 12.** Atriale Refraktärperiode (AERP) zu verschiedenen Basiszykluslängen. Two-way ANOVA mit Bonferroni's multiple comparison Test.  $**p < 0.01$ . 81
- Abbildung 13.** Burstpacing. **A,** ohne Induktion von VHF, rot markiert ist das Burstpacing, blau eingekreist die auf eine Erregung folgende P-Welle. **B,** Burstpacing mit Induktion von VHF. 81
- Abbildung 14.** Induzierbarkeit und Dauer von induziertem Vorhofflimmern. Unpaarer zweiseitiger t-test,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ . **A,** Induzierbarkeit. **B,** Episodendauer. **C,** Gesamtlast (Burden). 82
- Abbildung 15.** Atriale miRNA Profile. One-Way ANOVA mit Dunnet post Test,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ . **A,** Rechtes Atrium. **B,** Linkes Atrium. 83
- Abbildung 16.** Analyse der Zielgene auf mRNA-Ebene; ungepaarter Student t-Test,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ , **A,** TRPC3. **B,** KCNJ2. **C,** KCNQ4. **D,** SCN5A. **E,** CACNA1C. **F,** SMAD1. **G,** GSK3B. **H,** PTEN. **I,** COL1A2. **J,** COL5A1. **K,** GATA4. **L,** ZFH3. **M,** CTGF. 87
- Abbildung 17.** Westernblots; One-Way-ANOVA mit Dunnet Posttest,  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ . **A,** Kir2.1. **B,** PTEN. **C,** Gata4. **D,** CTGF. 89

## 8 Quellenverzeichnis

1. Krahn AD, Manfreda J, Tate RB, Mathewson FA, Cuddy TE. The natural history of atrial fibrillation: incidence, risk factors, and prognosis in the Manitoba Follow-Up Study. *Am J Med* 1995;**98**:476-484.
2. Schnabel RB, Yin X, Gona P, Larson MG, Beiser AS, McManus DD, Newton-Cheh C, Lubitz SA, Magnani JW, Ellinor PT, Seshadri S, Wolf PA, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D. 50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet* 2015;**386**:154-162.
3. Wilke T, Groth A, Mueller S, Pfannkuche M, Verheyen F, Linder R, Maywald U, Bauersachs R, Breithardt G. Incidence and prevalence of atrial fibrillation: an analysis based on 8.3 million patients. *Europace* 2013;**15**:486-493.
4. Miyasaka Y, Barnes ME, Gersh BJ, Cha SS, Bailey KR, Abhayaratna WP, Seward JB, Tsang TS. Secular trends in incidence of atrial fibrillation in Olmsted County, Minnesota, 1980 to 2000, and implications on the projections for future prevalence. *Circulation* 2006;**114**:119-125.
5. Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;**1**:62-73.
6. Heeringa J, van der Kuip DA, Hofman A, Kors JA, van Herpen G, Stricker BH, Stijnen T, Lip GY, Witteman JC. Prevalence, incidence and lifetime risk of atrial fibrillation: the Rotterdam study. *European heart journal* 2006;**27**:949-953.
7. Lloyd-Jones DM, Wang TJ, Leip EP, Larson MG, Levy D, Vasan RS, D'Agostino RB, Massaro JM, Beiser A, Wolf PA, Benjamin EJ. Lifetime risk for development of atrial fibrillation: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004;**110**:1042-1046.
8. Spyra A, Daniel D, Thate-Waschke IM, Berghaus S, Willich S, Zeymer U, Rychlik R. [Atrial fibrillation in Germany: A prospective cost of illness study]. *Dtsch Med Wochenschr* 2015;**140**:e142-148.

9. Wolowacz SE, Samuel M, Brennan VK, Jasso-Mosqueda JG, Van Gelder IC. The cost of illness of atrial fibrillation: a systematic review of the recent literature. *Europace* 2011;**13**:1375-1385.
10. Dobrev D, Nattel S. New antiarrhythmic drugs for treatment of atrial fibrillation. *Lancet* 2010;**375**:1212-1223.
11. Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim YH, McAnulty JH, Jr., Zheng ZJ, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJ. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation* 2014;**129**:837-847.
12. Alonso A, Krijthe BP, Aspelund T, Stepas KA, Pencina MJ, Moser CB, Sinner MF, Sotoodehnia N, Fontes JD, Janssens AC, Kronmal RA, Magnani JW, Witteman JC, Chamberlain AM, Lubitz SA, Schnabel RB, Agarwal SK, McManus DD, Ellinor PT, Larson MG, Burke GL, Launer LJ, Hofman A, Levy D, Gottdiener JS, Kaab S, Couper D, Harris TB, Soliman EZ, Stricker BH, Gudnason V, Heckbert SR, Benjamin EJ. Simple risk model predicts incidence of atrial fibrillation in a racially and geographically diverse population: the CHARGE-AF consortium. *J Am Heart Assoc* 2013;**2**:e000102.
13. Benjamin EJ, Levy D, Vaziri SM, D'Agostino RB, Belanger AJ, Wolf PA. Independent risk factors for atrial fibrillation in a population-based cohort. The Framingham Heart Study. *JAMA* 1994;**271**:840-844.
14. Abraham JM, Connolly SJ. Atrial fibrillation in heart failure: stroke risk stratification and anticoagulation. *Heart Fail Rev* 2014;**19**:305-313.
15. Camm AJ, Kirchhof P, Lip GY, 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 JY, Ponikowski P, Rutten FH, Guidelines ESCCfP. Guidelines for the management of atrial fibrillation: the Task Force for the Management of Atrial Fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC). *Europace* 2010;**12**:1360-1420.

16. Friberg L, Hammar N, Rosenqvist M. Stroke in paroxysmal atrial fibrillation: report from the Stockholm Cohort of Atrial Fibrillation. *European heart journal* 2010;**31**:967-975.
17. Task Force m, Brignole M, Vardas P, Hoffman E, Huikuri H, Moya A, Ricci R, Sulke N, Wieling W, Committee ESD, Auricchio A, Lip GY, Almendral J, Kirchhof P, Aliot E, Gasparini M, Braunschweig F, Document R, Lip GY, Almendral J, Kirchhof P, Botto GL, Committee ESD. Indications for the use of diagnostic implantable and external ECG loop recorders. *Europace* 2009;**11**:671-687.
18. Waldo AL. Rate control versus rhythm control in atrial fibrillation: lessons learned from clinical trials of atrial fibrillation. *Prog Cardiovasc Dis* 2015;**58**:168-176.
19. Stratton JR. Transesophageal echocardiography to guide cardioversion in patients with atrial fibrillation. *The New England journal of medicine* 2001;**345**:838-839.
20. Malone PC, Agutter PS. The aetiology of deep venous thrombosis. *Qjm* 2006;**99**:581-593.
21. Lip GY, Tse HF, Lane DA. Atrial fibrillation. *Lancet* 2012;**379**:648-661.
22. Gage BF, van Walraven C, Pearce L, Hart RG, Koudstaal PJ, Boode BS, Petersen P. Selecting patients with atrial fibrillation for anticoagulation: stroke risk stratification in patients taking aspirin. *Circulation* 2004;**110**:2287-2292.
23. Pisters R, Lane DA, Nieuwlaat R, de Vos CB, Crijns HJ, Lip GY. A novel user-friendly score (HAS-BLED) to assess 1-year risk of major bleeding in patients with atrial fibrillation: the Euro Heart Survey. *Chest* 2010;**138**:1093-1100.
24. Lip GY, Frison L, Halperin JL, Lane DA. Comparative validation of a novel risk score for predicting bleeding risk in anticoagulated patients with atrial fibrillation: the HAS-BLED (Hypertension, Abnormal Renal/Liver Function, Stroke, Bleeding History or Predisposition, Labile INR, Elderly, Drugs/Alcohol Concomitantly) score. *J Am Coll Cardiol* 2011;**57**:173-180.

25. Benjamin EJ, Chen PS, Bild DE, Mascette AM, Albert CM, Alonso A, Calkins H, Connolly SJ, Curtis AB, Darbar D, Ellinor PT, Go AS, Goldschlager NF, Heckbert SR, Jalife J, Kerr CR, Levy D, Lloyd-Jones DM, Massie BM, Nattel S, Olgin JE, Packer DL, Po SS, Tsang TS, Van Wagoner DR, Waldo AL, Wyse DG. Prevention of atrial fibrillation: report from a national heart, lung, and blood institute workshop. *Circulation* 2009;**119**:606-618.
26. Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002;**415**:219-226.
27. Clauss S, Sinner MF, Kaab S, Wakili R. The Role of MicroRNAs in Antiarrhythmic Therapy for Atrial Fibrillation. *Arrhythm Electrophysiol Rev* 2015;**4**:146-155.
28. Brundel BJ, Melnyk P, Rivard L, Nattel S. The pathology of atrial fibrillation in dogs. *J Vet Cardiol* 2005;**7**:121-129.
29. Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kleber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001;**103**:769-777.
30. Wakili R, Clauss S, Kaab S. [Molecular mechanisms of atrial fibrillation: potential role of microRNAs as new therapeutic targets and potential biomarkers]. *Herz* 2012;**37**:166-171.
31. Wakili R, Voigt N, Kaab S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *The Journal of clinical investigation* 2011;**121**:2955-2968.
32. Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, Sun Q, Wieland T, Ravens U, Nattel S, Wehrens XH, Dobrev D. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak and increased Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2012;**125**:2059-2070.

33. Dobrev D, Voigt N, Wehrens XH. The ryanodine receptor channel as a molecular motif in atrial fibrillation: pathophysiological and therapeutic implications. *Cardiovascular research* 2011;**89**:734-743.
34. Lai LP, Su MJ, Lin JL, Tsai CH, Lin FY, Chen YS, Hwang JJ, Huang SK, Tseng YZ, Lien WP. Measurement of funny current (I<sub>f</sub>) channel mRNA in human atrial tissue: correlation with left atrial filling pressure and atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999;**10**:947-953.
35. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;**75**:843-854.
36. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;**75**:855-862.
37. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;**116**:281-297.
38. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 2001;**107**:823-826.
39. Flynt AS, Lai EC. Biological principles of microRNA-mediated regulation: shared themes amid diversity. *Nature reviews Genetics* 2008;**9**:831-842.
40. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2014;**42**:D68-73.
41. Wang Z, Lu Y, Yang B. MicroRNAs and atrial fibrillation: new fundamentals. *Cardiovascular research* 2011;**89**:710-721.
42. Girmatsion Z, Biliczki P, Bonauer A, Wimmer-Greinecker G, Scherer M, Moritz A, Bukowska A, Goette A, Nattel S, Hohnloser SH, Ehrlich JR. Changes in microRNA-1 expression and IK1 up-regulation in human atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2009;**6**:1802-1809.

43. Yang B, Lin H, Xiao J, Lu Y, Luo X, Li B, Zhang Y, Xu C, Bai Y, Wang H, Chen G, Wang Z. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nat Med* 2007;**13**:486-491.
44. Jia X, Zheng S, Xie X, Zhang Y, Wang W, Wang Z, Zhang Y, Wang J, Gao M, Hou Y. MicroRNA-1 accelerates the shortening of atrial effective refractory period by regulating KCNE1 and KCNB2 expression: an atrial tachypacing rabbit model. *PLoS One* 2013;**8**:e85639.
45. Terentyev D, Belevych AE, Terentyeva R, Martin MM, Malana GE, Kuhn DE, Abdellatif M, Feldman DS, Elton TS, Gyorke S. miR-1 overexpression enhances Ca(2+) release and promotes cardiac arrhythmogenesis by targeting PP2A regulatory subunit B56alpha and causing CaMKII-dependent hyperphosphorylation of RyR2. *Circ Res* 2009;**104**:514-521.
46. Belevych AE, Sansom SE, Terentyeva R, Ho HT, Nishijima Y, Martin MM, Jindal HK, Rochira JA, Kunitomo Y, Abdellatif M, Carnes CA, Elton TS, Gyorke S, Terentyev D. MicroRNA-1 and -133 increase arrhythmogenesis in heart failure by dissociating phosphatase activity from RyR2 complex. *PLoS One* 2011;**6**:e28324.
47. Shan H, Zhang Y, Lu Y, Zhang Y, Pan Z, Cai B, Wang N, Li X, Feng T, Hong Y, Yang B. Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodelling in canines. *Cardiovascular research* 2009;**83**:465-472.
48. Luo X, Pan Z, Shan H, Xiao J, Sun X, Wang N, Lin H, Xiao L, Maguy A, Qi X-Y, Li Y, Gao X, Dong D, Zhang Y, Bai Y, Ai J, Sun L, Lu H, Luo X-Y, Wang Z, Lu Y, Yang B, Nattel S. MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier potassium current changes in atrial fibrillation. *The Journal of clinical investigation*; **123**:1939-1951.
49. Chiang DY, Kongchan N, Beavers DL, Alsina KM, Voigt N, Neilson JR, Jakob H, Martin JF, Dobrev D, Wehrens XH, Li N. Loss of microRNA-106b-25 cluster

- promotes atrial fibrillation by enhancing ryanodine receptor type-2 expression and calcium release. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2014;**7**:1214-1222.
50. Callis TE, Pandya K, Seok HY, Tang RH, Tatsuguchi M, Huang ZP, Chen JF, Deng Z, Gunn B, Shumate J, Willis MS, Selzman CH, Wang DZ. MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. *The Journal of clinical investigation* 2009;**119**:2772-2786.
  51. Lu Y, Zhang Y, Wang N, Pan Z, Gao X, Zhang F, Zhang Y, Shan H, Luo X, Bai Y, Sun L, Song W, Xu C, Wang Z, Yang B. MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation. *Circulation* 2010;**122**:2378-2387.
  52. Ling TY, Wang XL, Chai Q, Lau TW, Koestler CM, Park SJ, Daly RC, Greason KL, Jen J, Wu LQ, Shen WF, Shen WK, Cha YM, Lee HC. Regulation of the SK3 channel by microRNA-499--potential role in atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2013;**10**:1001-1009.
  53. Luo X, Xiao J, Lin H, Li B, Lu Y, Yang B, Wang Z. Transcriptional activation by stimulating protein 1 and post-transcriptional repression by muscle-specific microRNAs of IKs-encoding genes and potential implications in regional heterogeneity of their expressions. *J Cell Physiol* 2007;**212**:358-367.
  54. Harada M, Luo X, Qi XY, Tadevosyan A, Maguy A, Ordog B, Ledoux J, Kato T, Naud P, Voigt N, Shi Y, Kamiya K, Murohara T, Kodama I, Tardif JC, Schotten U, Van Wagoner DR, Dobrev D, Nattel S. Transient Receptor Potential Canonical-3 Channel-Dependent Fibroblast Regulation in Atrial Fibrillation. *Circulation* 2012;**126**:2051-2064.
  55. Luo X, Pan Z, Xiao J, Zhang J, Lu Y, Yang B, Wang Z. Abstract 19435: Critical Role of microRNAs miR-26 and miR-101 in Atrial Electrical Remodeling in Experimental Atrial Fibrillation. *Circulation* 2010;**122**:A19435-A19435.
  56. Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 2007;**8**:166.

57. Xiao J, Luo X, Lin H, Zhang Y, Lu Y, Wang N, Zhang Y, Yang B, Wang Z. MicroRNA miR-133 represses HERG K<sup>+</sup> channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts. *The Journal of biological chemistry* 2007;**282**:12363-12367.
58. Matkovich SJ, Wang W, Tu Y, Eschenbacher WH, Dorn LE, Condorelli G, Diwan A, Nerbonne JM, Dorn GW, 2nd. MicroRNA-133a protects against myocardial fibrosis and modulates electrical repolarization without affecting hypertrophy in pressure-overloaded adult hearts. *Circ Res* 2010;**106**:166-175.
59. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007;**316**:575-579.
60. Satoh M, Minami Y, Takahashi Y, Tabuchi T, Nakamura M. Expression of microRNA-208 is associated with adverse clinical outcomes in human dilated cardiomyopathy. *J Card Fail* 2010;**16**:404-410.
61. Ellinor PT, Lunetta KL, Glazer NL, Pfeufer A, Alonso A, Chung MK, Sinner MF, de Bakker PI, Mueller M, Lubitz SA, Fox E, Darbar D, Smith NL, Smith JD, Schnabel RB, Soliman EZ, Rice KM, Van Wagoner DR, Beckmann BM, van Noord C, Wang K, Ehret GB, Rotter JI, Hazen SL, Steinbeck G, Smith AV, Launer LJ, Harris TB, Makino S, Nelis M, Milan DJ, Perz S, Esko T, Kottgen A, Moebus S, Newton-Cheh C, Li M, Mohlenkamp S, Wang TJ, Kao WH, Vasani RS, Nothen MM, MacRae CA, Stricker BH, Hofman A, Uitterlinden AG, Levy D, Boerwinkle E, Metspalu A, Topol EJ, Chakravarti A, Gudnason V, Psaty BM, Roden DM, Meitinger T, Wichmann HE, Witteman JC, Barnard J, Arking DE, Benjamin EJ, Heckbert SR, Kaab S. Common variants in KCNN3 are associated with lone atrial fibrillation. *Nature genetics* 2010;**42**:240-244.
62. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008;**456**:980-984.

63. Roy S, Khanna S, Hussain SR, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovascular research* 2009;**82**:21-29.
64. Adam O, Lohfelm B, Thum T, Gupta SK, Puhl SL, Schafers HJ, Bohm M, Laufs U. Role of miR-21 in the pathogenesis of atrial fibrosis. *Basic Res Cardiol* 2012;**107**:278.
65. Cardin S, Guasch E, Luo X, Naud P, Le Quang K, Shi Y, Tardif JC, Comtois P, Nattel S. Role for MicroRNA-21 in atrial profibrillatory fibrotic remodeling associated with experimental postinfarction heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2012;**5**:1027-1035.
66. Yeh YH, Wakili R, Qi XY, Chartier D, Boknik P, Kaab S, Ravens U, Coutu P, Dobrev D, Nattel S. Calcium-handling abnormalities underlying atrial arrhythmogenesis and contractile dysfunction in dogs with congestive heart failure. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008;**1**:93-102.
67. Chen Y, Wakili R, Xiao J, Wu CT, Luo X, Clauss S, Dawson K, Qi X, Naud P, Shi YF, Tardif JC, Kaab S, Dobrev D, Nattel S. Detailed characterization of microRNA changes in a canine heart failure model: Relationship to arrhythmogenic structural remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2014;**77**:113-124.
68. Zhang ZH, Li J, Liu BR, Luo CF, Dong Q, Zhao LN, Zhong Y, Chen WY, Chen MS, Liu SM. MicroRNA-26 was decreased in rat cardiac hypertrophy model and may be a promising therapeutic target. *J Cardiovasc Pharmacol* 2013;**62**:312-319.
69. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;**105**:13027-13032.
70. Dawson K, Wakili R, Ordog B, Clauss S, Chen Y, Iwasaki Y, Voigt N, Qi XY, Sinner MF, Dobrev D, Kaab S, Nattel S. MicroRNA29: a mechanistic

- contributor and potential biomarker in atrial fibrillation. *Circulation* 2013;**127**:1466-1475, 1475e1461-1428.
71. Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, Leenders JJ, Lentink V, van der Made I, Herias V, van Leeuwen RE, Schellings MW, Barenbrug P, Maessen JG, Heymans S, Pinto YM, Creemers EE. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling. *Circ Res* 2009;**104**:170-178, 176p following 178.
  72. Li H, Li S, Yu B, Liu S. Expression of miR-133 and miR-30 in chronic atrial fibrillation in canines. *Mol Med Rep* 2012;**5**:1457-1460.
  73. Castoldi G, Di Gioia CR, Bombardi C, Catalucci D, Corradi B, Gualazzi MG, Leopizzi M, Mancini M, Zerbini G, Condorelli G, Stella A. MiR-133a regulates collagen 1A1: potential role of miR-133a in myocardial fibrosis in angiotensin II-dependent hypertension. *J Cell Physiol* 2012;**227**:850-856.
  74. Xu C, Lu Y, Pan Z, Chu W, Luo X, Lin H, Xiao J, Shan H, Wang Z, Yang B. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci* 2007;**120**:3045-3052.
  75. Wang JX, Jiao JQ, Li Q, Long B, Wang K, Liu JP, Li YR, Li PF. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med* 2011;**17**:71-78.
  76. Santulli G, Iaccarino G, De Luca N, Trimarco B, Condorelli G. Atrial fibrillation and microRNAs. *Front Physiol* 2014;**5**:15.
  77. Nishida K, Michael G, Dobrev D, Nattel S. Animal models for atrial fibrillation: clinical insights and scientific opportunities. *Europace* 2010;**12**:160-172.
  78. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;**92**:1954-1968.

79. Dudley SC, Jr., Hoch NE, McCann LA, Honeycutt C, Diamandopoulos L, Fukui T, Harrison DG, Dikalov SI, Langberg J. Atrial fibrillation increases production of superoxide by the left atrium and left atrial appendage: role of the NADPH and xanthine oxidases. *Circulation* 2005;**112**:1266-1273.
80. Chen CL, Huang SK, Lin JL, Lai LP, Lai SC, Liu CW, Chen WC, Wen CH, Lin CS. Upregulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinases in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2008;**45**:742-753.
81. Fareh S, Villemaire C, Nattel S. Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial electrical remodeling. *Circulation* 1998;**98**:2202-2209.
82. Gaspo R, Bosch RF, Talajic M, Nattel S. Functional mechanisms underlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model. *Circulation* 1997;**96**:4027-4035.
83. Anne W, Willems R, Holemans P, Beckers F, Roskams T, Lenaerts I, Ector H, Heidbuchel H. Self-terminating AF depends on electrical remodeling while persistent AF depends on additional structural changes in a rapid atrially paced sheep model. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2007;**43**:148-158.
84. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort. *Circulation* 1999;**100**:87-95.
85. Power JM, Beacom GA, Alferness CA, Raman J, Wijffels M, Farish SJ, Burrell LM, Tonkin AM. Susceptibility to atrial fibrillation: a study in an ovine model of pacing-induced early heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1998;**9**:423-435.
86. Tanaka K, Zlochiver S, Vikstrom KL, Yamazaki M, Moreno J, Klos M, Zaitsev AV, Vaidyanathan R, Auerbach DS, Landas S, Guiraudon G, Jalife J, Berenfeld O, Kalifa J. Spatial distribution of fibrosis governs fibrillation wave dynamics in the posterior left atrium during heart failure. *Circ Res* 2007;**101**:839-847.

87. Stambler BS, Fenelon G, Shepard RK, Clemo HF, Guiraudon CM. Characterization of sustained atrial tachycardia in dogs with rapid ventricular pacing-induced heart failure. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;**14**:499-507.
88. Shinagawa K, Shi YF, Tardif JC, Leung TK, Nattel S. Dynamic nature of atrial fibrillation substrate during development and reversal of heart failure in dogs. *Circulation* 2002;**105**:2672-2678.
89. Cha TJ, Ehrlich JR, Zhang L, Shi YF, Tardif JC, Leung TK, Nattel S. Dissociation between ionic remodeling and ability to sustain atrial fibrillation during recovery from experimental congestive heart failure. *Circulation* 2004;**109**:412-418.
90. Derakhchan K, Li D, Courtemanche M, Smith B, Brouillette J, Page PL, Nattel S. Method for simultaneous epicardial and endocardial mapping of in vivo canine heart: application to atrial conduction properties and arrhythmia mechanisms. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001;**12**:548-555.
91. Li D, Shinagawa K, Pang L, Leung TK, Cardin S, Wang Z, Nattel S. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on the development of the atrial fibrillation substrate in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Circulation* 2001;**104**:2608-2614.
92. Verheule S, Wilson E, Everett Tt, Shanbhag S, Golden C, Olgin J. Alterations in atrial electrophysiology and tissue structure in a canine model of chronic atrial dilatation due to mitral regurgitation. *Circulation* 2003;**107**:2615-2622.
93. Verheule S, Wilson E, Banthia S, Everett THt, Shanbhag S, Sih HJ, Olgin J. Direction-dependent conduction abnormalities in a canine model of atrial fibrillation due to chronic atrial dilatation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;**287**:H634-644.
94. Neuberger HR, Schotten U, Verheule S, Eijsbouts S, Blaauw Y, van Hunnik A, Allesie M. Development of a substrate of atrial fibrillation during chronic atrioventricular block in the goat. *Circulation* 2005;**111**:30-37.

95. Greiser M, Neuberger HR, Harks E, El-Armouche A, Boknik P, de Haan S, Verheyen F, Verheule S, Schmitz W, Ravens U, Nattel S, Allessie MA, Dobrev D, Schotten U. Distinct contractile and molecular differences between two goat models of atrial dysfunction: AV block-induced atrial dilatation and atrial fibrillation. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2009;**46**:385-394.
96. Page PL, Plumb VJ, Okumura K, Waldo AL. A new animal model of atrial flutter. *J Am Coll Cardiol* 1986;**8**:872-879.
97. Ortiz J, Niwano S, Abe H, Rudy Y, Johnson NJ, Waldo AL. Mapping the conversion of atrial flutter to atrial fibrillation and atrial fibrillation to atrial flutter. Insights into mechanisms. *Circ Res* 1994;**74**:882-894.
98. Remes J, van Brakel TJ, Bolotin G, Garber C, de Jong MM, van der Veen FH, Maessen JG. Persistent atrial fibrillation in a goat model of chronic left atrial overload. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;**136**:1005-1011.
99. Deroubaix E, Folliguet T, Rucker-Martin C, Dinanian S, Boixel C, Validire P, Daniel P, Capderou A, Hatem SN. Moderate and chronic hemodynamic overload of sheep atria induces reversible cellular electrophysiologic abnormalities and atrial vulnerability. *J Am Coll Cardiol* 2004;**44**:1918-1926.
100. Hirose M, Takeishi Y, Miyamoto T, Kubota I, Laurita KR, Chiba S. Mechanism for atrial tachyarrhythmia in chronic volume overload-induced dilated atria. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2005;**16**:760-769.
101. Solti F, Vecsey T, Kekesi V, Juhasz-Nagy A. The effect of atrial dilatation on the genesis of atrial arrhythmias. *Cardiovascular research* 1989;**23**:882-886.
102. Ravelli F, Allessie M. Effects of atrial dilatation on refractory period and vulnerability to atrial fibrillation in the isolated Langendorff-perfused rabbit heart. *Circulation* 1997;**96**:1686-1695.
103. Satoh T, Zipes DP. Unequal atrial stretch in dogs increases dispersion of refractoriness conducive to developing atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1996;**7**:833-842.

104. Kistler PM, Sanders P, Dodic M, Spence SJ, Samuel CS, Zhao C, Charles JA, Edwards GA, Kalman JM. Atrial electrical and structural abnormalities in an ovine model of chronic blood pressure elevation after prenatal corticosteroid exposure: implications for development of atrial fibrillation. *European heart journal* 2006;**27**:3045-3056.
105. Hashimoto N, Yamashita T, Tsuruzoe N. Tertiapin, a selective IKACH blocker, terminates atrial fibrillation with selective atrial effective refractory period prolongation. *Pharmacol Res* 2006;**54**:136-141.
106. Hashimoto N, Yamashita T, Tsuruzoe N. Characterization of in vivo and in vitro electrophysiological and antiarrhythmic effects of a novel IKACH blocker, NIP-151: a comparison with an IKr-blocker dofetilide. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2008;**51**:162-169.
107. Sinno H, Derakhchan K, Libersan D, Merhi Y, Leung TK, Nattel S. Atrial ischemia promotes atrial fibrillation in dogs. *Circulation* 2003;**107**:1930-1936.
108. Goldberger AL, Pavelec RS. Vagally-mediated atrial fibrillation in dogs: conversion with bretylium tosylate. *Int J Cardiol* 1986;**13**:47-55.
109. Wang Z, Page P, Nattel S. Mechanism of flecainide's antiarrhythmic action in experimental atrial fibrillation. *Circ Res* 1992;**71**:271-287.
110. Geddes LA, Hinds M, Babbs CF, Tacker WA, Schoenlein WE, Elabbady T, Saeed M, Bourland JD, Ayers GM. Maintenance of atrial fibrillation in anesthetized and unanesthetized sheep using cholinergic drive. *Pacing Clin Electrophysiol* 1996;**19**:165-175.
111. Liu L, Nattel S. Differing sympathetic and vagal effects on atrial fibrillation in dogs: role of refractoriness heterogeneity. *Am J Physiol* 1997;**273**:H805-816.
112. Kaese S, Frommeyer G, Verheule S, van Loon G, Gehrman J, Breithardt G, Eckardt L. The ECG in cardiovascular-relevant animal models of electrophysiology. *Herzschrittmacherther Elektrophysiol* 2013;**24**:84-91.

113. Milan DJ, Jones IL, Ellinor PT, MacRae CA. In vivo recording of adult zebrafish electrocardiogram and assessment of drug-induced QT prolongation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;**291**:H269-273.
114. Boixel C, Fontaine V, Rucker-Martin C, Milliez P, Louedec L, Michel JB, Jacob MP, Hatem SN. Fibrosis of the left atria during progression of heart failure is associated with increased matrix metalloproteinases in the rat. *J Am Coll Cardiol* 2003;**42**:336-344.
115. Choisy SC, Arberry LA, Hancox JC, James AF. Increased susceptibility to atrial tachyarrhythmia in spontaneously hypertensive rat hearts. *Hypertension* 2007;**49**:498-505.
116. Matsuyama N, Tsutsumi T, Kubota N, Nakajima T, Suzuki H, Takeyama Y. Direct action of an angiotensin II receptor blocker on angiotensin II-induced left atrial conduction delay in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2009;**32**:721-726.
117. Ono N, Hayashi H, Kawase A, Lin SF, Li H, Weiss JN, Chen PS, Karagueuzian HS. Spontaneous atrial fibrillation initiated by triggered activity near the pulmonary veins in aged rats subjected to glycolytic inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;**292**:H639-648.
118. Sinner MF, Ellinor PT, Meitinger T, Benjamin EJ, Kaab S. Genome-wide association studies of atrial fibrillation: past, present, and future. *Cardiovascular research* 2011;**89**:701-709.
119. Tucker NR, Clauss S, Ellinor PT. Common variation in atrial fibrillation: navigating the path from genetic association to mechanism. *Cardiovascular research* 2016;**109**:493-501.
120. Kirchhof P, Bax J, Blomstrom-Lundquist C, Calkins H, Camm AJ, Cappato R, Cosio F, Crijns H, Diener HC, Goette A, Israel CW, Kuck KH, Lip GY, Nattel S, Page RL, Ravens U, Schotten U, Steinbeck G, Vardas P, Waldo A, Wegscheider K, Willems S, Breithardt G. Early and comprehensive management of atrial fibrillation: executive summary of the proceedings from

the 2nd AFNET-EHRA consensus conference 'research perspectives in AF'. *European heart journal* 2009;**30**:2969-2977c.

121. Kirchhof P, Auricchio A, Bax J, Crijns H, Camm J, Diener HC, Goette A, Hindricks G, Hohnloser S, Kappenberger L, Kuck KH, Lip GY, Olsson B, Meinertz T, Priori S, Ravens U, Steinbeck G, Svernhage E, Tijssen J, Vincent A, Breithardt G. Outcome parameters for trials in atrial fibrillation: executive summary. *European heart journal* 2007;**28**:2803-2817.
122. Rai V, Sharma P, Agrawal S, Agrawal DK. Relevance of mouse models of cardiac fibrosis and hypertrophy in cardiac research. *Mol Cell Biochem* 2017;**424**:123-145.
123. Hughes HC. Swine in cardiovascular research. *Lab Anim Sci* 1986;**36**:348-350.
124. Lelovas PP, Kostomitsopoulos NG, Xanthos TT. A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2014;**53**:432-438.
125. Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 2007;**23**:1289-1291.
126. Li D, Fareh S, Leung TK, Nattel S. Promotion of Atrial Fibrillation by Heart Failure in Dogs. *Atrial Remodeling of a Different Sort* 1999;**100**:87-95.
127. Luzi E, Marini F, Tognarini I, Galli G, Falchetti A, Brandi ML. The regulatory network menin-microRNA 26a as a possible target for RNA-based therapy of bone diseases. *Nucleic Acid Ther* 2012;**22**:103-108.
128. Wei C, Kim IK, Kumar S, Jayasinghe S, Hong N, Castoldi G, Catalucci D, Jones WK, Gupta S. NF-kappaB mediated miR-26a regulation in cardiac fibrosis. *J Cell Physiol* 2013;**228**:1433-1442.
129. Mohamed JS, Lopez MA, Boriek AM. Mechanical stretch up-regulates microRNA-26a and induces human airway smooth muscle hypertrophy by suppressing glycogen synthase kinase-3beta. *J Biol Chem* 2010;**285**:29336-29347.

130. Benjamin EJ, Rice KM, Arking DE, Pfeufer A, van Noord C, Smith AV, Schnabel RB, Bis JC, Boerwinkle E, Sinner MF, Dehghan A, Lubitz SA, D'Agostino Sr RB, Lumley T, Ehret GB, Heeringa J, Aspelund T, Newton-Cheh C, Larson MG, Marciante KD, Soliman EZ, Rivadeneira F, Wang TJ, Eiriksdottir G, Levy D, Psaty BM, Li M, Chamberlain AM, Hofman A, Vasani RS, Harris TB, Rotter JI, Kao WHL, Agarwal SK, Stricker BHC, Wang K, Launer LJ, Smith NL, Chakravarti A, Uitterlinden AG, Wolf PA, Sotoodehnia N, Kottgen A, van Duijn CM, Meitinger T, Mueller M, Perz S, Steinbeck G, Wichmann HE, Lunetta KL, Heckbert SR, Gudnason V, Alonso A, Kaab S, Ellinor PT, Witteman JCM. Variants in ZFHX3 are associated with atrial fibrillation in individuals of European ancestry. *Nat Genet* 2009;**41**:879-881.
131. Kannel WB, Abbott RD, Savage DD, McNamara PM. Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation: the Framingham study. *N Engl J Med* 1982;**306**:1018-1022.
132. Sridhar A, Nishijima Y, Terentyev D, Khan M, Terentyeva R, Hamlin RL, Nakayama T, Gyorke S, Cardounel AJ, Carnes CA. Chronic heart failure and the substrate for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2009;**84**:227-236.
133. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Jr., Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Vet Pathol* 2012;**49**:344-356.
134. Hanna N, Cardin S, Leung TK, Nattel S. Differences in atrial versus ventricular remodeling in dogs with ventricular tachypacing-induced congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2004;**63**:236-244.
135. Kazui T, Henn MC, Watanabe Y, Kovacs SJ, Lawrance CP, Greenberg JW, Moon M, Schuessler RB, Damiano RJ, Jr. The impact of 6 weeks of atrial fibrillation on left atrial and ventricular structure and function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015;**150**:1602-1608.
136. Remme WJ. Congestive heart failure--pathophysiology and medical treatment. *J Cardiovasc Pharmacol* 1986;**8 Suppl 1**:S36-52.

137. Sayed D, Hong C, Chen IY, Lypowy J, Abdellatif M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res* 2007;**100**:416-424.
138. Dobrev D, Wettwer E, Kortner A, Knaut M, Schuler S, Ravens U. Human inward rectifier potassium channels in chronic and postoperative atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:397-404.
139. Zhang H, Garratt CJ, Zhu J, Holden AV. Role of up-regulation of IK1 in action potential shortening associated with atrial fibrillation in humans. *Cardiovasc Res* 2005;**66**:493-502.
140. Pandit SV, Berenfeld O, Anumonwo JM, Zaritski RM, Kneller J, Nattel S, Jalife J. Ionic determinants of functional reentry in a 2-D model of human atrial cells during simulated chronic atrial fibrillation. *Biophys J* 2005;**88**:3806-3821.
141. Koumi S, Arentzen CE, Backer CL, Wasserstrom JA. Alterations in muscarinic K<sup>+</sup> channel response to acetylcholine and to G protein-mediated activation in atrial myocytes isolated from failing human hearts. *Circulation* 1994;**90**:2213-2224.
142. Kirchhof P, Eckardt L, Franz MR, Monnig G, Loh P, Wedekind H, Schulze-Bahr E, Breithardt G, Haverkamp W. Prolonged atrial action potential durations and polymorphic atrial tachyarrhythmias in patients with long QT syndrome. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2003;**14**:1027-1033.
143. Johnson JN, Tester DJ, Perry J, Salisbury BA, Reed CR, Ackerman MJ. Prevalence of early-onset atrial fibrillation in congenital long QT syndrome. *Heart Rhythm* 2008;**5**:704-709.
144. Lemoine MD, Duverger JE, Naud P, Chartier D, Qi XY, Comtois P, Fabritz L, Kirchhof P, Nattel S. Arrhythmogenic left atrial cellular electrophysiology in a murine genetic long QT syndrome model. *Cardiovasc Res* 2011;**92**:67-74.
145. Makielski JC. Late sodium current: A mechanism for angina, heart failure, and arrhythmia. *Trends Cardiovasc Med* 2016;**26**:115-122.

146. Heijman J, Voigt N, Wehrens XH, Dobrev D. Calcium dysregulation in atrial fibrillation: the role of CaMKII. *Front Pharmacol* 2014;**5**:30.
147. Zhao Y, Yuan Y, Qiu C. Underexpression of CACNA1C Caused by Overexpression of microRNA-29a Underlies the Pathogenesis of Atrial Fibrillation. *Med Sci Monit* 2016;**22**:2175-2181.
148. Catterall WA. Structure and function of voltage-gated sodium and calcium channels. *Curr Opin Neurobiol* 1991;**1**:5-13.
149. Sabashnikov A, Weymann A, Haldar S, Soliman RF, Fatullayev J, Jones D, Hussain W, Choi YH, Zerriouh M, Dohmen PM, Popov AF, Markides V, Wong T, Bahrami T. Position of totally thoracoscopic surgical ablation in the treatment of atrial fibrillation: an alternative method of conduction testing. *Med Sci Monit Basic Res* 2015;**21**:76-80.
150. Andrade J, Khairy P, Dobrev D, Nattel S. The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circ Res* 2014;**114**:1453-1468.
151. Lorenzen JM, Schauerte C, Hubner A, Kolling M, Martino F, Scherf K, Batkai S, Zimmer K, Foinquinos A, Kaucsar T, Fiedler J, Kumarswamy R, Bang C, Hartmann D, Gupta SK, Kielstein J, Jungmann A, Katus HA, Weidemann F, Muller OJ, Haller H, Thum T. Osteopontin is indispensable for AP1-mediated angiotensin II-related miR-21 transcription during cardiac fibrosis. *Eur Heart J* 2015;**36**:2184-2196.
152. Oudit GY, Sun H, Kerfant BG, Crackower MA, Penninger JM, Backx PH. The role of phosphoinositide-3 kinase and PTEN in cardiovascular physiology and disease. *J Mol Cell Cardiol* 2004;**37**:449-471.
153. Kao YH, Hsu JC, Chen YC, Lin YK, Lkhagva B, Chen SA, Chen YJ. ZFH3 knockdown increases arrhythmogenesis and dysregulates calcium homeostasis in HL-1 atrial myocytes. *Int J Cardiol* 2016;**210**:85-92.

154. Voigt N, Heijman J, Wang Q, Chiang DY, Li N, Karck M, Wehrens XHT, Nattel S, Dobrev D. Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation. *Circulation* 2014;**129**:145-156.

## Eidesstattliche Versicherung

Philipp Tomsits

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **microRNA-vermitteltes atriales Remodeling in einem Schweinemodell für paroxysmales Vorhofflimmern**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München 01.04.2019

---

Ort, Datum

Philipp Tomsits

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand