

Untersuchung proarrhythmischer, zu Vorhofflimmern führender
Mechanismen bei Diabetes mellitus

von Christina Katharina Bleyer

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Untersuchung proarrhythmischer, zu Vorhofflimmern führender
Mechanismen bei Diabetes mellitus

von Christina Katharina Bleyer
aus Mindelheim

München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Angefertigt an der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Klinikums der
Universität München

Mentoren: Prof. Dr. med. Stefan Kääh

Dr. med. Sebastian Clauß

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf

Korreferent: Prof. Dr. Gerhard Wess

Tag der Promotion: 06. Februar 2021

Für meine Familie

und

für Stefan

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Diabetes mellitus.....	3
1.1.	Epidemiologie von Diabetes mellitus Typ 1 und 2	4
1.2.	Risikofaktoren für Diabetes mellitus.....	4
1.2.1.	Genetik	4
1.2.2.	Umwelteinflüsse und allgemeine Lebensweise.....	5
1.3.	Klinik des Diabetes mellitus	6
1.4.	Diagnostik von Diabetes mellitus	7
1.5.	Therapie des Diabetes mellitus	8
1.5.1.	Typ-1-Diabetes mellitus.....	8
1.5.2.	Typ-2-Diabetes mellitus.....	9
1.6.	Pathophysiologie des Diabetes mellitus.....	9
1.6.1.	Typ-1-Diabetes mellitus.....	9
1.6.2.	Typ-2-Diabetes mellitus.....	10
2.	Vorhofflimmern.....	12
2.1.	Epidemiologie von Vorhofflimmern.....	12
2.2.	Risikofaktoren für Vorhofflimmern	12
2.3.	Klinik von Vorhofflimmern	12
2.4.	Diagnostik von Vorhofflimmern.....	13
2.5.	Therapie von Vorhofflimmern	13
2.6.	Elektrophysiologie des Herzens	15
2.6.1.	Reizbildung und -leitung im Herzen	16
2.6.2.	Das kardiale Aktionspotential	17
2.7.	Pathophysiologie von Vorhofflimmern.....	21
2.7.1.	Ektopie	22
2.7.2.	Reentry	23
2.7.3.	Strukturelles Remodeling	24
2.7.4.	Elektrisches Remodeling.....	25
2.7.5.	Autonomes Remodeling.....	27
3.	Diabetes mellitus vermitteltes proarrhythmisches Remodeling	29
3.1.	Tiermodelle des Diabetes mellitus	29

3.1.1.	Tiermodelle des atrialen strukturellen Remodelings bei Diabetes mellitus ...	33
3.1.2.	Tiermodelle des atrialen elektrischen Remodelings bei Diabetes mellitus ...	36
3.2.	Zusammenfassung der Tiermodelle	38
III.	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	40
I.	<i>In vivo</i>	40
1.1.	Versuchstiere und Tierhaltung	40
1.2.	Materialien	41
1.2.1.	Geräte	41
1.2.2.	Verbrauchsmaterialien	42
1.2.3.	Medikamente	43
1.2.4.	Sonstiges.....	44
1.3.	<i>In vivo</i> Methoden.....	44
1.3.1.	Studiendesign	44
1.3.2.	Narkoseeinleitung.....	45
1.3.3.	Intubation und Beatmung	45
1.3.4.	Narkose.....	46
1.3.5.	Perioperatives Monitoring.....	46
1.3.6.	Anlage der Schleusen	47
1.3.7.	Messung des linksventrikulären Drucks (LVP und LVEDP)	49
1.3.8.	Rechtsherzkatheteruntersuchung.....	49
1.3.9.	Elektrophysiologische Untersuchung.....	49
1.3.10.	Herzentnahme.....	52
2.	<i>In vitro</i>.....	52
2.1.	Material	52
2.1.1.	Geräte	52
2.1.2.	Kits und Mastermixe	55
2.1.3.	Chemikalien	55
2.1.4.	Oligonukleotidprimer für die RT-qPCR	57
2.1.5.	TaqMan [®] -Sonden für die RT-qPCR	58
2.1.6.	Antikörper	58
2.1.6.1.	Primäre Antikörper.....	58
2.1.6.2.	Sekundäre Antikörper	59

2.1.7.	Software	59
2.2.	Methoden.....	59
2.2.1.	Proteinisolation.....	59
2.2.2.	Western Blot.....	60
2.2.2.1.	Puffer	60
2.2.2.2.	Gele	62
2.2.2.3.	Ablauf.....	62
2.2.2.4.	Auswertung der Western Blots	64
2.2.1.	Histologie	64
2.2.1.1.	Fibrorefärbungen.....	64
2.2.1.2.	Immunfluoreszenzfärbung	66
2.2.1.3.	Mikroskopie	67
2.2.2.	Genexpressionsanalyse.....	68
2.2.2.1.	Isolation der RNA aus Gewebe.....	68
2.2.2.2.	Synthese der cDNA.....	69
2.2.2.3.	Primertest	70
2.2.2.4.	Real-Time qPCR mittels SYBRGreen®	73
2.2.2.5.	Real-Time qPCR mittels TaqMan®-Sonden	74
2.2.3.	Statistik.....	76
IV.	ERGEBNISSE	77
1.	<i>In vivo</i> Charakterisierung von <i>INS^{C94Y}</i>- und WT-Schweinen	77
1.1.	Hämodynamik	78
1.2.	12-Kanal-EKG	80
1.3.	Elektrophysiologische Untersuchung.....	81
2.	Untersuchung des proarrhythmogenen Remodelings	86
2.1.	Genexpressionsanalyse.....	86
2.1.1.	Expression extrazellulärer Matrix und profibrotischer Mediatoren.....	86
2.1.2.	Expression von Ionenkanälen	89
2.1.3.	Connexine.....	92
2.2.	Western Blots	94
2.3.	Histologie	98
2.3.1.	Evaluation interstitieller Fibrose	98
2.3.2.	Immunfluoreszenzfärbung	102

V.	DISKUSSION	104
1.	Wahl der Tierart	104
2.	Das <i>INS^{C94Y}</i>-Schwein als Tiermodell des Diabetes mellitus.....	105
3.	Diskussion der Ergebnisse	108
3.1.	Hämodynamik	108
3.2.	12-Kanal-EKG	108
3.3.	EPU	109
3.4.	Histologie	111
3.5.	Genexpressionsanalyse.....	111
3.5.1.	Expression von Genen der extrazellulären Matrix und profibrotischer Mediatoren	111
3.5.2.	Expression von Ionenkanälen	113
3.5.3.	Expression von Connexinen.....	116
3.6.	Western Blots	118
3.7.	Immunfluoreszenzfärbung von Connexin-43.....	118
4.	Relevanz und Ausblick	118
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	121
VII.	SUMMARY.....	123
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	125
IX.	ANHANG	155
1.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	156
2.	TABELLENVERZEICHNIS	159
3.	DANKSAGUNG	160

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
ADA	American Diabetes Association (dt. Amerikanische Diabetes-Gesellschaft)
AERP	Atriale effektive Refraktärperiode
AF	Atrial fibrillation (dt. Vorhofflimmern)
AGEs	Advanced glycation end products (dt. Glykierungsendprodukte)
ANG II	Angiotensin II
APD	Aktionspotentialdauer
ATP	Adenosintriphosphat
AVERP	Atrioventrikuläre effektive Refraktärperiode
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BMI	Body-Mass-Index
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
Cav	Spannungsgesteuerter Calcium-Kanal
Cav1.2	Calcium-Kanal vom L-Typ
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (dt. komplementäre DNA)
CRP	C-reaktives Protein
CRT	Cardiac resynchronization therapy (dt. kardiale Resynchronisationstherapie)
CTGF	Connective tissue growth factor (dt. Bindegewebs-Wachstumsfaktor)
Cx	Connexin
DM	Diabetes mellitus
DNA	Desoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
ECM	Extracellular matrix (dt. extrazelluläre Matrix)
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESC	European Society of Cardiology (dt. europäische Fachgesellschaft der Kardiologen)
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAD	Glutaminsäure-Decarboxylase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GIPR ^{dn}	Dominant negative glucose-dependent insulinotropic polypeptid receptor (dt. dominant-negativer Rezeptor für das Glukose-abhängige insulinotrope Polypeptid)

GWAS	Genome-wide Association Studies (dt. Genomweite Assoziationsstudie)
HbA1c	Glykiertes Hämoglobin A1c
HCN	Hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels (dt. hyperpolarisationsaktivierte und zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle)
HLA	Human leukocyte antigen (dt. humanes Leukozyten-Antigen)
HRP	Horseradish peroxidase
I _{Ca,L}	Depolarisierender Ca ²⁺ -Einstrom
I _f	Funny current (dt. einwärtsgerichteter unspezifischer Kationenstrom)
I _{K1}	Einwärts gleichrichtender Kaliumstrom
I _{Kr}	Strom des schnell aktivierenden Kaliumstroms
I _{Ks}	Strom des langsam aktivierenden Kaliumstroms
I _{Kur}	Strom des ultra-schnell aktivierenden Kaliumstroms
INS ^{C94Y}	Mutiertes porcines Insulin-Gen
I _{to2}	Ca ²⁺ -aktivierter Chlorid-Kanal
I _{to,f}	Fast recovering transient outward current (dt. schnelle Komponente des kardialen transienten Auswärtsstroms)
I _{to,s}	Slow recovering transient outward current (dt. langsame Komponente des kardialen transienten Auswärtsstroms)
KHK	Koronare Herzkrankheit
K _{ir}	Inward rectifier (dt. einwärts gleichrichtender Kalium-Kanal)
LAA	Left atrial appendage (dt. linkes Herzohr)
LV	Linker Ventrikel
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVP	Linksventrikulärer Druck
M.	Musculus
MHC	Major histocompatibility complex (dt. Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex)
MIDY	Mutant Insulin-gene-induced Diabetes of Youth (dt. durch eine Mutation des Insulin-Gens hervorgerufener Diabetes mellitus, der bereits in jungen Jahren auftritt)
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young (dt. „Altersdiabetes“, der bereits in jungen Jahren auftritt)
mRNA	Messenger RNA (dt. Boten-RNA)
N.	Nervus
Nav	Spannungsgesteuerter Natrium-Kanal
NCX	Na ⁺ -Ca ²⁺ -Austauscher
PCR	Polymerase chain reaction (dt. Polymerase-Kettenreaktion)

PNDM	Permanenter neonataler Diabetes mellitus
PV	Pulmonalvene
RAA	Right atrial appendage (dt. rechtes Herzohr)
RNA	Ribonukleinsäure
RV	Rechter Ventrikel
ROS	Reactive oxygen species (dt. reaktive Sauerstoffspezies)
RT-qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RyR2	Ryanodin-Rezeptor 2
SERCA	SR-Ca ²⁺ ATPase
SDS	Sodium dodecyl sulfate (dt. Natriumdodecylsulfat)
SNRT	Sinus node recovery time (dt. Sinusknotenerholungszeit)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TEMED	Tetraethylethylendiamin
TGF- β 1	Transforming growth factor-beta 1 (dt. transformierender Wachstumsfaktor beta 1)
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
V.	Vena
VERP	Ventrikuläre effektive Refraktärperiode
WT	Wildtyp

I. EINLEITUNG

Bei Vorhofflimmern (VHF, engl. *atrial fibrillation*, AF) handelt es sich um die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen (NATTEL, 1995). Ein Risikofaktor für das Auftreten von Vorhofflimmern ist Diabetes mellitus (DM). Bereits 1994 konnte in der *Framingham Heart Study* belegt werden, dass Männer und Frauen mit Diabetes mellitus ein 40 % beziehungsweise 60 % höheres Risiko haben, an VHF zu erkranken (BENJAMIN et al., 1994). Die genauen proarrhythmogenen Mechanismen, die zu Vorhofflimmern bei Diabetes-Patienten führen, sind bislang jedoch unzureichend bekannt, zudem sind die zur Verfügung stehenden pharmakologischen und nicht-pharmakologischen Behandlungsmöglichkeiten unbefriedigend. Um die Komplexität der Elektrophysiologie und Arrhythmogenese zu verstehen und um künftig innovative therapeutische Optionen entwickeln zu können, bedarf es der möglichst kliniknahen Abbildung von Erkrankungen in Tiermodellen. Kleintiermodelle wie Maus und Ratte haben einen großen Beitrag dazu geleistet, fundamentale Mechanismen zu verstehen und therapeutische Ansätze zu entwickeln. Damit diese aber beim Menschen angewandt werden können, wird ein zusätzliches, dem menschlichen Organismus ähnlicheres Modell benötigt. Eine hierfür besonders geeignete Spezies stellt das Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) dar, da diverse physiologische und anatomische Eigenschaften denen des Menschen ähnlich sind, und insbesondere, da es seit einigen Jahren möglich ist, zuverlässig genetisch modifizierte Schweine zu erzeugen (CLAUSS et al., 2019).

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand eines Schweine-Modells, das einen permanenten neonatalen Diabetes mellitus (PNDM) entwickelt, in verschiedenen *in vivo* Untersuchungen sowie molekularbiologischen und histologischen Untersuchungen mögliche Mechanismen, die für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern im Rahmen einer Diabeteserkrankung verantwortlich gemacht werden, erforscht. Die Tiere wurden dabei *in vivo* charakterisiert (12-Kanal-EKG, Rechts- und Linksherzkatheteruntersuchung, invasive elektrophysiologische Untersuchung (EPU) mit Induktion von Vorhofflimmern mittels Burststimulation), ehe anschließend die Herzentnahme für weitere molekularbiologische und histologische Untersuchungen des proarrhythmogenen Remodelings stattfand. Hierfür wurden Real-Time qPCR

basierte Genexpressionsanalysen von Komponenten der extrazellulären Matrix und profibrotischen Mediatoren, Ionenkanälen und Connexinen durchgeführt. Die Expression von profibrotischen Mediatoren konnte zusätzlich durch Western-Blot-Analysen auf Proteinebene untersucht werden. Um die Diabetes-assoziierte interstitielle Fibrose zu evaluieren, wurde auf die Histologie zurückgegriffen: durch Masson Goldner Trichrom und Sirius Red Färbungen konnte in den Schweineherzen Interstitielle Fibrose dargestellt werden. Zuletzt wurden die Expression und räumliche Anordnung von Connexin-43 durch eine Immunfluoreszenzfärbung untersucht.

Insgesamt wurden 33 Schweine verwendet und in folgende Gruppen unterteilt: Schweine mit Diabetes mellitus (INS^{C94Y}/DM , n=15) sowie Geschwistertiere ohne Diabetes mellitus (Wildtyp/WT, n=18) als Kontrollen. Bei der INS^{C94Y} -Gruppe handelt es sich um genetisch veränderte Schweine, bei denen ein Aminosäureaustausch von Cystein nach Tyrosin (C94Y) in einer Insulin-Fehlfaltung, und letztlich der Apoptose der insulinproduzierenden Beta-Zellen im Pankreas resultiert. Die Tiere entwickeln einen stabilen diabetischen Phänotyp, was sie zu einem geeigneten Tiermodell für die Untersuchung verschiedener Diabetes-assoziiierter Pathomechanismen macht (RENNER et al., 2013). Welche Auswirkungen diese Mechanismen auf das Herz, und insbesondere die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern haben, war das Thema der vorliegenden Arbeit.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Diabetes mellitus

Diabetes mellitus zeichnet sich durch eine chronische Hyperglykämie und Veränderungen im Kohlenhydrat-, Fett-, und Proteinstoffwechsel aus, die durch eine teilweise oder vollständige Insuffizienz der Insulinsekretion und/oder Insulinwirkung gekennzeichnet ist (WU et al., 2014). Es gibt vier Hauptformen des Diabetes:

- Insulinabhängiger DM (Typ 1), der aus einer autoimmunen Zerstörung der Beta-Zellen resultiert und für gewöhnlich zu einem absoluten Insulinmangel führt.
- Nicht-insulinabhängiger DM (Typ 2), der aus dem progressiven Verlust der Insulinsekretion der Beta-Zellen resultiert, häufig vor dem Hintergrund einer Insulinresistenz.
- Schwangerschaftsdiabetes, definiert als Diabetes mellitus, der im zweiten oder dritten Schwangerschaftstrimester diagnostiziert wird.
- Andere Arten des Diabetes mellitus, die etwa 1 % der Fälle ausmachen. Hierzu zählen monogenetische diabetische Syndrome wie der neonatale Diabetes oder der Erwachsenendiabetes, der im Jugendalter auftritt (*Maturity onset diabetes of the young* (MODY)), oder der *Mutant Insulin-gene-induced Diabetes of Youth* (MIDY) sowie Diabetes mellitus hervorgerufen durch Krankheiten des exokrinen Pankreas (wie die zystische Fibrose), Infektionen, Endokrinopathien oder durch Medikamente und Chemikalien (unter anderem während einer AIDS-Behandlung, nach Organtransplantationen) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; PETERSMANN et al., 2019).

Diabetes mellitus und die damit assoziierten Komplikationen reduzieren die Lebensqualität der Betroffenen und verursachen enorme ökonomische und soziale Lasten (BOMMER et al., 2017; CANNON et al., 2018). Im Folgenden sollen nun die beiden am häufigsten vorkommenden Arten, der Typ-1- und Typ-2-Diabetes mellitus, genauer beschrieben werden.

1.1. Epidemiologie von Diabetes mellitus Typ 1 und 2

Der Typ 1 Diabetes mellitus tritt bei fünf bis zehn Prozent der Diabetespatienten auf und manifestiert sich bevorzugt in jüngeren Lebensjahren und nur selten im späteren Lebensalter (PETERSMANN et al., 2019).

Der Typ 2 Diabetes mellitus ist die am häufigsten auftretende Form des Diabetes mellitus, die zwischen 90 % und 95 % aller Patienten mit Diabetes mellitus und vor allem Menschen über 65 Jahre betrifft. Dennoch erkranken auch immer mehr jüngere Menschen an DMT2.

Aktuelle Ergebnisse des Robert-Koch-Instituts zeigen, dass im Jahr 2011 die Prävalenz der von DM betroffenen, gesetzlich Versicherten in Deutschland 9,7 % betrug (SCHMIDT et al., 2020). Allein im Jahr 2012 sind 565.040 Versicherte neu erkrankt; dies entspricht einem Prozent der Versicherten. Es wird erwartet, dass im Jahr 2030 die Zahl der weltweiten Diabetespatienten bis zu 578 Millionen – also 10,2 % der Erdbevölkerung - betragen wird (SAEEDI et al., 2019). Der Diabetes mellitus ist damit eine häufige Erkrankung, deren Inzidenz und Prävalenz weiter ansteigt.

1.2. Risikofaktoren für Diabetes mellitus

Eine genetische Komponente ist einer der Faktoren, die sowohl für das Auftreten von Typ-1- als auch Typ-2-DM verantwortlich gemacht werden (SLADEK et al., 2007). Außerdem werden auch Umwelteinflüsse und bestimmte Merkmale der allgemeinen Lebensweise zu den Risikofaktoren für Diabetes mellitus gezählt.

1.2.1. Genetik

Bei der Entstehung von Typ-1-DM machen Genvarianten in einem Locus des Leukozytenantigen-Systems (engl. *Human Leukozyte Antigen*, HLA) 50-60 % des genetischen Risikos aus (NOBLE et al., 2010). Das HLA-System hat einen wesentlichen Einfluss auf die Steuerung des Immunsystems, und somit auf die Bildung von Autoantikörpern. Beispielsweise sind bestimmte HLA-Konstellationen wie HLA-DR3 und HLA-DR4 mit einem erhöhten Risiko für Diabetes mellitus Typ 1 verbunden (ATKINSON & EISENBARTH, 2001). 50 weiteren Non-HLA-Risikogenen lassen sich außerdem jeweils kleinere Effekte zuordnen (COOPER et al., 2012). Insgesamt haben etwa 10 % der an Typ-1-Diabetes Erkrankten eine positive Familienanamnese (CANTOR et al., 1995; HUANG et al., 1996). Dennoch liegt die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen

bei unter 50 %, weshalb eine genetische Prädisposition als alleiniger Faktor in der Pathogenese von DM1 unwahrscheinlich ist (BUTALIA et al., 2016).

Bei Verwandten ersten Grades von Typ-2-Diabetespatienten ist das Risiko, diese Erkrankung selbst zu entwickeln, deutlich erhöht (ROTHER, 2007). Die Genloci, die mit dem Auftreten des Diabetes mellitus Typ 2 assoziiert sind, wurden im Rahmen von Genome-wide Association Studies (GWAS) untersucht (SLADEK et al., 2007). Darunter befinden sich zum Beispiel *KCNJ11*, das den ATP-sensitiven Kaliumkanal Kir6.2 der Inselzellen codiert, *TCF7L2*, das die Expression von Proglucagon reguliert und das Glucagon-like Peptid 1 produziert, sowie *IRS1*, das einen Einfluss auf die Wirkung von Insulin hat (MCCARTHY, 2010). Insgesamt wurden mehr als 130 mögliche Genvarianten entdeckt, die aber nur für weniger als 15 % der Erbllichkeit dieser Erkrankung verantwortlich sind (GAULTON et al., 2015). Als Grund hierfür werden Einflüsse von Gen-Gen-Interaktionen, Epigenetik und die Heterogenität der Krankheit vermutet.

1.2.2. Umwelteinflüsse und allgemeine Lebensweise

Bei Diabetes mellitus handelt es sich nicht um eine klassische Erbkrankheit, da seine Entstehung nicht allein auf der Vererbung von mutierten Genen oder Chromosomen beruht. Hinweise deuten darauf hin, dass Umweltfaktoren mit genetischen Komponenten interagieren, und dadurch das Aufkommen und Fortschreiten des DM mitbegünstigen (THAYER et al., 2012).

So kann die Exposition mit Ozon zur Bildung von freien Sauerstoffradikalen und folglich zur Schädigung von Beta-Zellen im Pankreas führen (BRENNER et al., 1993; HATHOUT et al., 2002). Zusätzlich haben verschiedenste Toxine und Chemikalien aus der Umwelt einen Einfluss auf den Glukosemetabolismus und die Entwicklung einer Autoimmunität, ein Effekt, der sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nachgewiesen werden konnte (ENAN & MATSUMURA, 1994; COOPER et al., 2008). Auch Krankheiten wie Mumps, Masern, Röteln und Infektionen mit dem Cytomegalie- oder Coxsackievirus scheinen einen Einfluss auf die Entstehung von Diabetes mellitus Typ 1 zu haben (BODANSKY et al., 1986; HELMKE et al., 1986; PAK et al., 1988; YEUNG et al., 2011). Neben jenen werden auch enterovirale Infektionen und eine veränderte Zusammensetzung des Mikrobioms des Darms als mögliche Ursachen der Entstehung dieser Krankheit genannt (GIONGO et al., 2011; SCHNEIDER & VON HERRATH, 2014). Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen einer zu kurzen Stillzeit nach der Geburt, einer zu

frühen Gabe von Kuhmilch an Kleinkinder sowie die Aufnahme von Giftstoffen wie Nitrosaminen über Lebensmittel und Trinkwasser und der Entstehung des Diabetes Typ 1 vermutet (BORCH-JOHNSEN et al., 1984; BENSON et al., 2010). Zuletzt scheinen die Häufigkeit und Dauer der Aufnahme von Gluten-haltigen Nahrungsmitteln die Beta-Zell-Autoimmunität zu verstärken (FUNDA et al., 1999; CHMIEL et al., 2015).

Der Einfluss der Ernährungsweise konnte auch beim Typ-2-Diabetes mellitus beobachtet werden: der häufige Verzehr von ungesättigten und trans-Fettsäuren sowie von Lebensmitteln mit einem niedrigen glykämischen Index kann Auswirkungen auf den Glukosemetabolismus und die Insulinresistenz haben (HU et al., 2001). Zu den Risikofaktoren für den Diabetes mellitus Typ 2 müssen zudem noch folgende Merkmale der allgemeinen Lebensweise genannt werden: ein bewegungsarmer Lebensstil (ZIMMET et al., 2001), Rauchen (MANSON et al., 2000) und Alkoholkonsum (CULLMANN et al., 2012). In einer Meta-Analyse konnte außerdem festgestellt werden, dass Patienten, die am Metabolischen Syndrom leiden, häufiger an DMT2 erkranken (FORD et al., 2008). Zusätzlich haben Übergewichtige (Body Mass Index (BMI) ≥ 25 kg/m²), auf die eines oder mehrere der folgenden Merkmale zutreffen, ein erhöhtes Risiko: Bewegungsmangel; Ethnie einer Hochrisikopopulation; Frau mit Schwangerschaftsdiabetes, dem polyzystischen Ovar-Syndrom oder mit einem Kind, das mehr als 4,5 kg bei der Geburt wog; Arterielle Hypertonie; niedrige Konzentrationen von HDL im Blut; hohe Konzentrationen von Triglyceriden im Blut; zuvor nachgewiesene pathologische Glukosetoleranz oder veränderte Nüchternglukose; sowie kardiovaskuläre Vorerkrankungen.

1.3. Klinik des Diabetes mellitus

Die direkten Folgen der Diabeteskrankheit sind Hyper- oder Hypoglykämien. Zu den Symptomen einer ausgeprägten Hyperglykämie zählen unter anderem Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust, der manchmal auch mit einem gesteigerten Appetit einhergehen kann, oder verschwommene Sicht. In der Folge können eine Beeinträchtigung des Körperwachstums und eine langfristig erhöhte Anfälligkeit für bestimmte Infektionskrankheiten auftreten. Akut lebensbedrohlich können sich Hyperglykämien mit Ketoazidose oder das nicht-ketotische hyperosmolare Syndrom darstellen.

Frühe Anzeichen einer Hypoglykämie sind unter anderem Zittern, Herzrasen, Kaltschweißigkeit und Heißhunger. Werden keine Gegenmaßnahmen von außen eingeleitet, sinkt der Blutzuckerspiegel weiter und es tritt eventuell eine Unterversorgung des Gehirns auf. Darauf hinweisend können sogenannte neuroglykopenische Symptome sein, zu denen zum Beispiel Müdigkeit, Kopfschmerzen und Konzentrationsschwäche zählen. Falls die Hypoglykämie weiter voranschreitet, kann ein ausgeprägter Glukosemangel in den Gehirnzellen entstehen und im schlimmsten Fall zu Krampfanfällen und Bewusstlosigkeit, und letztendlich zum Koma führen.

Neben den akuten Effekten des Diabetes mellitus kommt es im Verlauf von mehreren Jahren bei vielen Patienten zu einer progredienten Organschädigung. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind vielfältig und umfassen beispielsweise Störungen im Lipoproteinmetabolismus und eine Makro- und Mikroangiopathie von Blutgefäßen, die zu Atherosklerose und damit einer Organischämie führen. Diese können zu einer Reihe von Organschädigungen führen. Dazu zählen unter anderem: Retinopathie mit möglichem Verlust der Sehkraft; Nephropathie bis hin zum Nierenversagen; periphere Neuropathie mit fehlendem Schmerzempfinden und Risiko eines Fußgeschwürs, dem Charcot-Fuß und Amputationen; außerdem kann es zur Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen kommen, etwa Bluthochdruck, Vorhofflimmern, Schlaganfall, die periphere arterielle Verschlusskrankheit oder Herzinfarkt, wobei Herzinfarkte durch die vorhandene Neuropathie oft nicht bemerkt werden oder eine atypische Symptomatik zeigen (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

1.4. Diagnostik von Diabetes mellitus

Laut der *American Diabetes Association* (ADA) werden folgende diagnostische Tests für DM empfohlen (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018):

- Der orale Glukosetoleranztest
- Die Nüchternplasmaglukose, die bei einem Wert von ≥ 126 mg/dl ($\geq 7,0$ mmol/l) für das Vorliegen eines Diabetes mellitus spricht
- Das glykierte Hämoglobin A1c (HbA1c) zur Absicherung der Diabetesdiagnose ($\text{HbA1c} \geq 6,5\%$ / ≥ 48 mmol/mol) und zur Identifizierung von Personen mit erhöhtem Diabetesrisiko (HbA1c zwischen 5,7 und 6,4 % oder 39 – 48 mmol/mol)

Prinzipiell sollte beim Vorliegen von Symptomen des Diabetes und/oder eines

erhöhten Diabetesrisikos (Diabetes-Risiko-Test) der Nüchternplasmaglukosewert oder die Gelegenheitsplasmaglukose (Diabetes: ≥ 200 mg/dl / $\geq 11,1$ mmol/l) zur Diagnosesicherung bestimmt werden. Falls hierbei die Befunde bei vorhandenen Symptomen oder einem erhöhten Risiko unauffällig sind, oder grenzwertige Befunde vorliegen, wird eine weitere Diagnostik durch den oralen Glukosetoleranztest (2-h-Wert im venösen Plasma ≥ 200 mg/dl / $\geq 11,1$ mmol/l) oder die Bestimmung des HbA1c empfohlen (PETERSMANN et al., 2019).

1.5. Therapie des Diabetes mellitus

Je nach Form des Diabetes mellitus werden unterschiedliche Therapiestrategien angewandt. Das Behandlungskonzept besteht aus den Komponenten Basis- (also alle lebensstilmodifizierenden, nicht medikamentösen Maßnahmen wie Ernährungsumstellung, gesunde Lebensweise, Schulung, Glukoseselbstkontrolle) und Pharmakotherapie. Zudem müssen mögliche Komorbiditäten frühzeitig diagnostiziert und ggf. therapiert werden.

1.5.1. Typ-1-Diabetes mellitus

Die Indikation für eine Insulintherapie ist bei Typ-1-Diabetes immer und lebenslang gegeben. Gegenwärtig sind in Deutschland zwei unterschiedliche Gruppen von Insulinen zur Behandlung von Menschen mit Typ-1-Diabetes erhältlich: zur Gruppe der Humaninsuline zählen die sogenannten Normal- und Humaninsuline mit Verzögerungsprinzip (Insulin-Isophan). Sie stellen gegenwärtig die Standardpräparate der Insulinersatztherapie bei Typ-1-Diabetes dar. Die kurzwirksamen Präparate Lispro, Aspart/Niacinamid-Aspart, und Glulisin sowie die langwirksamen Insuline Glargin, Detemir und Degludec hingegen zählen zur Gruppe der Insulinanaloge. Die Präparate können als subkutane (Insulinpen) oder intravenöse Injektion oder via Pumpentherapie verabreicht werden.

Eine weitere mögliche Form der Therapie ist die Betazellersatztherapie (Insel- oder Pankreastransplantation). Diese wurde als neue Therapieform insbesondere in den USA und Kanada bei Patienten mit Typ-1-DM mit schweren Hypoglykämien und guter Nierenfunktion durchgeführt. Ziel war es, eine Unabhängigkeit von exogenem Insulin zu erreichen (SHAPIRO et al., 2000). Die Vorteile dieser Behandlung müssen einer lebenslangen Immunsuppression mit all ihren assoziierten Nebenwirkungen und Komplikationen gegenübergestellt werden (SHAPIRO et al., 2006).

Für Menschen mit Typ-1-Diabetes ist weder eine spezifische Ernährungsform oder Diät noch sind besondere „Diät-Lebensmittel“ erforderlich. Für sie gelten die allgemeinen Empfehlungen hinsichtlich einer gesunden Kost. Wichtiger Bestandteil der Basistherapie sind Schulungs- und Behandlungsprogramme sowie psychosoziale Betreuung (HAAK et al., 2019).

1.5.2. Typ-2-Diabetes mellitus

Die Wahl der Therapieziele des Typ-2-DM-Patienten hängt ab von der Komorbidität, dem Alter und der Lebenserwartung, der Patientenpräferenz, der Lebensqualität, den kulturellen Voraussetzungen, den psychosozialen Umständen und der Patientencompliance. Bei einem neu diagnostizierten Diabetes mellitus mit Stoffwechseldekompensation wird eine simultane Basis- (Ernährungstherapie, Schulung, Glukoseselbstkontrolle, Bewegung und eventuell Tabakentwöhnung) und Pharmakotherapie empfohlen. Hinsichtlich der Pharmakotherapie kann – im Gegensatz zur Therapie des Typ-1-DM - aus oralen Diabetika (z.B. Metformin, Sulfonylharnstoffe, SGLT2-Inhibitoren und GLP-1-Rezeptoragonisten) und Insulin gewählt und eventuell kombiniert werden (LANDGRAF et al., 2019).

1.6. Pathophysiologie des Diabetes mellitus

Die Pathophysiologie hinter der Entstehung von DM ist komplex und multifaktoriell. Zudem gibt es deutliche Unterschiede zwischen dem Typ-1- und dem Typ-2-Diabetes mellitus.

1.6.1. Typ-1-Diabetes mellitus

Bei der Entstehung von Typ-1-Diabetes mellitus spielt die genetische Komponente eine große Rolle (s.o.). Die dafür verantwortlichen Gene liegen auf dem kurzen Arm des Chromosoms Nummer 6. Diese gehören zum Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC), welche für die Immunerkennung, die Gewebeverträglichkeit (Histokompatibilität) bei Transplantationen und die immunologische Individualität wichtig sind (MICHELS et al., 2015). Das MHC ist der wichtigste Bestandteil des HLA-Systems. Falls hier eine Fehlfunktion oder Abnormalität auftritt, kann die Folge sein, dass Antigenpräsentationen stattfinden, die T-Helferzellen aktivieren, die wiederum eine Immunantwort gegen bestimmte Autoantigene der insulinproduzierenden Inselzellen hervorrufen. Zu dieser Antwort gehört die Bildung spezifischer T-Zellen, die die Inselzellen der Langerhans-Inseln zerstören, sowie die Bildung von

Autoantikörpern. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Antikörper gegen Inselzellen, Insulin, die Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) sowie die Tyrosin-Phosphatase (*Insulinoma associated Antigen*) IA-2 und IA-2 β , die sich in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Geweben nachweisen lassen (PALICKA, 2002).

Inselzellantikörper richten sich gegen Antigene, die sich im Zytoplasma der endokrinen Zellen der Pankreasinseln befinden, und können zum Untergang dieser Zellen führen. Sie können bei 70-80 % der neu diagnostizierten Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 gefunden werden. Im Verlauf der Erkrankung nimmt ihre Häufigkeit stetig ab, bis sie bei weniger als fünf Prozent zehn Jahre nach der Erstdiagnose liegt. Antikörper gegen Insulin treten auch bei anderen Autoimmunerkrankungen auf. Zu Beginn des DMT1 kommen sie in 50 % der betroffenen Kinder vor, bei Erwachsenen hingegen werden sie kaum gefunden. Ein gemeinsames Auftreten von diesen beiden Autoantikörpern erhöht das Risiko, einen Typ 1 zu entwickeln, signifikant.

Die GAD wird für die Produktion der Gamma-Aminobuttersäure (GABA) benötigt, dem wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter, der vor allem im Gehirn aber auch in den Beta-Zellen (in denen er die Insulinausschüttung und das Immunsystem reguliert) von Säugetieren vorkommt. Antikörper gegen dieses Enzym sind bereits zehn Jahre vor der klinischen Manifestation des Diabetes mellitus Typ 1 vorhanden. Das insulinomaassoziierte Antigen 2 ist eine enzymatisch inaktive Protein-Tyrosin-Phosphatase, die in den Beta-Zellen der Langerhans-Inseln exprimiert wird und an der Regulation der Insulinsekretion beteiligt ist. Bei mehr als 60 % der Patienten lassen sich zum Zeitpunkt der Diabetes-Diagnose insulinomaassoziierte Autoantikörper finden.

Die Zerstörung von Beta-Zellen beginnt bereits viele Jahre vor dem Sichtbarwerden klinischer Symptome – hierfür muss das Beta-Zellvolumen bereits um 10-20 % reduziert worden sein – und benötigt eine unterschiedlich lange Zeit: bei manchen Individuen (insbesondere Kindern) kann ein rapider Untergang festgestellt werden, bei anderen (meist Erwachsene) wird eine deutlich längere Dauer beobachtet.

1.6.2. Typ-2-Diabetes mellitus

In der Pathophysiologie des DMT2 gibt es zwei Hauptfaktoren: die Insulinresistenz und das Insulindefizit, deren Ursache die oben diskutierten genetischen, umweltbedingten und lebensstilbetreffenden Merkmale sind.

Die Insulinresistenz ist als eine verringerte biologische Antwort von peripherem Gewebe (vor allem Muskel, Leber und Fettgewebe) auf physiologische Konzentrationen von zirkulierendem Insulin definiert (PALICKA, 2002). Hierbei werden Defekte und eine reduzierte zelluläre Expression von Insulinrezeptoren sowie die Bildung von Autoantikörpern gegen Insulin als Ursache vermutet. Im Anfangsstadium der Erkrankung kann die Resistenz noch durch eine kompensatorisch gesteigerte Insulinsekretion ausgeglichen werden, was zu den häufig beobachteten postprandialen Hypoglykämien führt. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Zunahme der Resistenz und zu einer Reduktion der Sekretion des Hormons. Die kausale Folge sind eine gestörte Glukosetoleranz und postprandiale Hyperglykämien mit dem klassischen Bild des Diabetes mellitus.

Den zweiten Faktor stellt die Dysfunktion der Beta-Zellen im Pankreas dar, die durch die über lange Zeit vermehrte Produktion des Hormons entsteht. Im weiteren Verlauf kann dadurch die Insulinresistenz der peripheren Gewebe nicht mehr kompensiert werden. Das Resultat ist ein sogenanntes relatives Insulindefizit. Die zellulären Ursachen sind bisher noch weitgehend unerforscht. Als ein mögliches Erklärungsmodell werden seit einigen Jahren Veränderungen in den Mitochondrien diskutiert (PINTI et al., 2019). Untersuchungen an menschlichen Beta-Zellen ergaben, dass erhöhte Blutfett- und Blutzuckerwerte zum Untergang der Mitochondrien in den Zellen führen. Studien zeigten zudem, dass es bei insulinresistenten Personen zum vermehrten Auftreten von Mutationen in der mitochondrialen DNA und einer reduzierten Menge an DNA kam. Dies scheint eine verringerte Produktion von ATP durch die Mitochondrien in den Beta-Zellen, und somit eine abgeschwächte und verzögerte Insulinsekretion zur Folge zu haben.

Welcher dieser beiden Defekte der ursprüngliche Auslöser ist, wurde lange diskutiert. Die Resistenz scheint aber der primär zugrundeliegende pathologische Prozess zu sein, der im Laufe der Diabeteserkrankung zu einer Störung der Insulinsekretion führt: bis zu 20 Jahre vor dem Sichtbarwerden klinischer Symptome beginnt das periphere Gewebe bereits gegen Insulin resistent zu werden.

2. Vorhofflimmern

2.1. Epidemiologie von Vorhofflimmern

Bei Vorhofflimmern handelt es sich um die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen (NATTEL, 1995). Die Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung beträgt ca. 5,5 %, steigt jedoch mit zunehmendem Alter bis auf 17,8 % an, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen (HEERINGA et al., 2006). In einer älter werdenden Gesellschaft mit steigender Prävalenz des Vorhofflimmerns haben die hohe Mortalität und Morbidität vor allem durch Schlaganfälle und kardiale Dekompensation eine zunehmende gesundheitsökonomische Bedeutung (LAFUENTE-LAFUENTE et al., 2009).

2.2. Risikofaktoren für Vorhofflimmern

Neben dem bereits erwähnten Diabetes mellitus wurden weitere Risikofaktoren identifiziert, die das Risiko für Vorhofflimmern erhöhen. Die *Framingham Heart Study* beschreibt in diesem Zusammenhang neben Adipositas, zunehmendem Alter, männlichem Geschlecht, Schlafapnoe, Störungen des Schilddrüsenstoffwechsels, über Jahre bestehender arterieller Hypertonie auch die (ischämische) Herzinsuffizienz, vorangegangene Myokardinfarkte oder Klappenvitien (BENJAMIN et al., 1994).

2.3. Klinik von Vorhofflimmern

Die Klinik von Vorhofflimmern ist sehr vielfältig, und kann aus asymptomatischen und symptomatischen Phasen, die teils beim selben Patienten auftreten, bestehen. Dies konnte anhand von ambulanten EKG-Aufzeichnungen von Patienten mit VHF dargelegt werden (ISRAEL et al., 2004; PAGE et al., 1994). Wenn Symptome auftreten, können sie harmlose Palpitationen, aber auch verschiedene hämodynamische und thromboembolische Konsequenzen, wie zum Beispiel Schlaganfälle, umfassen (FUSTER et al., 2006). Mit der Zeit können die Palpitationen auch verschwinden, so dass Patienten, bei denen diese Arrhythmie permanent geworden ist, asymptomatisch werden, ein Phänomen, das sich besonders häufig bei älteren Patienten finden lässt (KERR et al., 1998). VHF, das mit einer schnellen ventrikulären Antwort vergesellschaftet ist, kann zu einer tachykardiemedierten Kardiomyopathie führen. Synkopen sind eine weitere Komplikation, die bei bradykarder AV-Überleitung, bei einer Konversion bei Patienten mit Sinusknotendysfunktion oder durch schnelle ventrikuläre Herzraten

bei einer zugrundeliegenden hypertrophen Kardiomyopathie oder Klappenstenosen der Aorta, auftreten kann.

2.4. Diagnostik von Vorhofflimmern

Laut der Leitlinie der *European Society of Cardiology* (ESC) wird Vorhofflimmern als Arrhythmie des Herzens mit folgenden Eigenschaften definiert (CAMM et al., 2010):

- RR-Intervalle im Oberflächen-EKG folgen keinem sich wiederholenden Schema. Damit ist die Arrhythmie als absolut zu bezeichnen („*Arrhythmia absoluta*“).
- Sofern sichtbar, beträgt die Frequenz des Vorhofs mehr als 300 Schläge pro Minute und ist damit stark erhöht.
- Das Oberflächen-EKG zeigt keine P-Wellen.

Die Einteilung des Vorhofflimmerns nach Art und Häufigkeit des Auftretens gegenüber einer streng ätiologischen Einteilung hat sich in der klinischen Praxis durchgesetzt. So unterscheidet man gemäß der Leitlinie der ESC zwischen:

- Paroxysmalem Vorhofflimmern, definiert als innerhalb von bis zu sieben Tagen spontan in den Sinusrhythmus konvertierend.
- Persistierendem Vorhofflimmern, definiert als Arrhythmie, die länger als sieben Tage andauert und nur durch Kardioversion beendet werden kann.
- Langanhaltendem, persistierendem Vorhofflimmern, dessen Dauer ein Jahr überschreitet.
- Permanentem Vorhofflimmern ohne beabsichtigte Rhythmuskontrolle (akzeptiertes VHF).
- Asymptomatischem Vorhofflimmern, dessen Erstmanifestation Komplikationen wie Tachymyopathie oder Schlaganfall sind. Diese Form kann sich als jede obige Form des VHF präsentieren.

2.5. Therapie von Vorhofflimmern

Die Vorhofflimmertherapie stützt sich auf drei Säulen: die Prävention von Folgeerscheinungen, Frequenzkontrolle und Rhythmuskontrolle, wobei die Frequenzkontrolle die Basistherapie jeder Behandlung von Vorhofflimmern darstellt. Zur Therapie des VHF stehen pharmakologische und nicht-pharmakologische Optionen zur Verfügung. Die medikamentöse Therapie ist jedoch unbefriedigend, da die eingesetzten Medikamente teilweise ineffektiv sind,

zum Teil proarrhythmisch wirken und bei Langzeittherapie sogar die Mortalität steigern können (DOYLE & HO, 2009; WASHAM et al., 2015). Die zur Prophylaxe thromboembolischer Ereignisse eingesetzte orale Antikoagulation (zum Beispiel mittels oraler Gabe von Vitamin K Antagonisten, Heparinen sowie direkte Faktor Xa bzw. Faktor II Inhibitoren) ist zudem ein ständiger Balanceakt zwischen den Risiken einer gesteigerten Blutungsneigung und einer fehlenden antikoagulatorischen Wirkung (TOSO et al., 2018).

Eine äußerst invasive Form der nicht-medikamentösen Frequenzkontrolle ist die Ablation des Atrioventrikularknotens (AV-Knoten) mit anschließender Implantation eines permanenten Schrittmachers. Diese Methode ist allerdings hauptsächlich älteren Patienten mit bedeutsamen Komorbiditäten vorbehalten. Als Folge des Eingriffs konnte in einer Studie ein Voranschreiten des paroxysmalen in persistierendes VHF bei bis zu 32% der behandelten Personen innerhalb von zwei Monaten beobachtet werden (OZCAN et al., 2003). Dennoch scheint die AV-Knotenablation hilfreich zu sein, wenn gleichzeitig eine kardiale Resynchronisationstherapie (CRT) durchgeführt wird. In einer systematischen Zusammenschau dreier Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der AV-Knotenablation in Kombination mit einer CRT und einer substantiellen Reduktion der Gesamtmortalität und der kardiovaskulären Mortalität im Vergleich zu einer medikamentösen Therapie bei Patienten mit VHF festgestellt (GASPARINI & GALIMBERTI, 2012).

Obwohl die Rhythmuskontrolle als ein attraktives therapeutisches Ziel erscheint, zeigten sowohl die AFFIRM (*AF Follow-Up Investigation of Rhythm Management*) als auch die RACE (*Rate Control versus Electrical Cardioversion for Persistent AF*) Studie, dass die Konversion in den Sinusrhythmus keine Vorteile für Patienten, sondern sogar eher einen negativen Effekt hatte, verglichen mit der alleinigen Frequenzkontrolle (GUPTA & FIGUEREDO, 2014; VAN GELDER et al., 2002). Wesentliche Gründe hierfür scheinen insbesondere die Nebenwirkungen aber auch die Ineffektivität der antiarrhythmischen Medikation zu sein. Eine in den obigen Studien nicht untersuchte, aber mittlerweile regelhaft angewandte nicht-medikamentöse therapeutische Variante, den Sinusrhythmus wiederherzustellen, ist die Katheterablation. In den meisten Fällen wird paroxysmales VHF durch ektope Trigger ausgelöst, die in der Muskulatur der Pulmonalvenen (PV) entstehen. Die zirkumferentielle Ablation der Pulmonalvenen verursacht eine elektrische Isolation der Vorhofmuskulatur nahe der Einmündung der Pulmonalvenen und führt dazu,

dass ektope elektrische Aktivität aus den PV nun nicht mehr auf das Vorhofmyokard übergreifen kann. Bei etwa 30-40 % der Patienten gelingt es jedoch nicht, lückenlose Ablationslinien zu erzeugen, so dass es zu Rekonnektionen und damit zu Rezidiven von Vorhofflimmern kommen kann, die einen erneuten Eingriff erforderlich machen (ANSELMINO et al., 2016).

Insgesamt lässt sich sagen, dass keine dieser etablierten Methoden eine kausale Behandlung darstellt. Daher ist es von großer Bedeutung, an neuen Therapiekonzepten zu forschen. Zur Entwicklung eben solcher Konzepte ist ein umfassendes Verständnis der Pathophysiologie unverzichtbar, weshalb Grundlagenforschung, und damit auch die Abbildung komplexer Krankheitsmechanismen im Tiermodell zwingend notwendig sind.

2.6. Elektrophysiologie des Herzens

Um alle Zellen des Körpers mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen zu können, ist das Säugetierherz auf seine Pumpwirkung, die auf seiner rhythmischen Erschlaffung und Kontraktion beruht, angewiesen. Hierbei ist die aufeinanderfolgende Aktivierung von sogenannten Schrittmacherzellen (engl. *pacemaker cells*) in spezialisierten Regionen des Herzens und die Ausbreitung der Erregung durch die Vorhöfe und Ventrikel essenziell (NERBONNE & KASS, 2005). Die Kraftamplitude und der Rhythmus der daraus resultierenden Kontraktionen des Arbeitsmyokards werden durch Aktionspotentiale in den Herzmuskelzellen gesteuert. Das Aktionspotential ist ein elektrischer Impuls, die Kontraktion die mechanische Antwort darauf, ein Vorgang, der „elektromechanische Kopplung“ genannt wird. Die Erregungsausbreitung und die Regulation der elektromechanischen Funktion des Myokards sind zudem abhängig von Interaktionen zwischen den Zellen. Zuständig hierfür sind Gap Junctions, die als direkte Zell-Zell-Verbindungen die Membranen benachbarter Kardiomyozyten durchqueren und somit deren Cytoplasma miteinander verknüpfen (KANNO et al., 2001).

Die Bildung eines Aktionspotentials spiegelt die aufeinanderfolgende Aktivierung und Inaktivierung von Ionenkanälen der Kardiomyozyten wider. Diese leiten depolarisierende, einwärtsgerichtete (Na^+ , Ca^{2+}) und repolarisierende, auswärtsgerichtete (K^+) Ionenströme. Veränderungen der Ionenkanäle, die beispielsweise aus Genmutationen oder Herzmuskelerkrankungen resultieren, können zu Abweichungen der Aktionspotentialmorphologie, -synchronisation und

-ausbreitung führen (NERBONNE & GUO, 2002). Dadurch kann der Weg für die Entstehung von Arrhythmien, wie beispielsweise Vorhofflimmern, geebnet werden.

2.6.1. Reizbildung und -leitung im Herzen

Die elektrische Aktivität des Myokards wird von den Schrittmacher-Zellen im Sinusknoten (SN) initiiert (**Abb. 1**; NERBONNE & KASS, 2005). Diese Sinusknotenzellen, die bei einem normalen Erregungszyklus im Herzen des Menschen eine Frequenz von ca. 70 Schlägen pro Minute erzielen, bilden den sogenannten primären Schrittmacher. Auch Schrittmacherzellen in anderen Regionen des Erregungsleitungssystems wie etwa dem AV-Knoten oder den Tawara-Schenkeln können durch spontane Depolarisationen (s.u.) elektrische Reize generieren. Man nennt sie sekundäre beziehungsweise tertiäre Schrittmacher, da die von ihnen generierte Frequenz niedriger als die des Sinusknotens ist und normalerweise von der höherfrequenten Spontanaktivität des SN überdeckt wird.

Das elektrische Signal wird sodann über die beiden Vorhöfe, was als P-Welle im EKG beschrieben wird und die Kontraktion der Atrien zur Folge hat, weiter zum AV-Knoten geleitet. Wegen des Herzskeletts, einer bindegewebigen Schicht, die sich zwischen den Vorhöfen und den Herzkammern befindet und als elektrische Isolationsschicht dient, stellt der AV-Knoten die einzige elektrische Verbindung zwischen den Atrien und Ventrikeln dar und verlangsamt die Erregungsausbreitung. Die Strecke von P-Welle bis zum Beginn der negativen Q-Zacke im EKG ist Abbild der atrioventrikulären Leitungszeit. Danach breitet sich das elektrische Signal vom His-Bündel über den linken und rechten Tawara-Schenkel bis in die Purkinje-Fasern aus. Von dort geht die Erregung in die Kammermuskulatur über und führt zur synchronen Kontraktion der beiden Ventrikel. Im EKG beschreibt der QRS-Komplex die ventrikuläre Erregung, wobei die Steilheit des Anstiegs der R-Zacke die Dauer der ventrikulären Reizübertragung darstellt. Die ST-Strecke im EKG zeigt die Depolarisation der Ventrikel mit nachfolgender Repolarisation (T-Welle) an (**Abb. 1**). Die Gesamtzeit von Erregungsausbreitung und -rückbildung der Kammer wird durch die QT-Zeit dargestellt; diese ist abhängig von der Schlagfrequenz des Herzens, und wird deshalb meist in der auf die Frequenz korrigierten Form angegeben (QT_c , *corrected QT*, DREW et al., 2004).

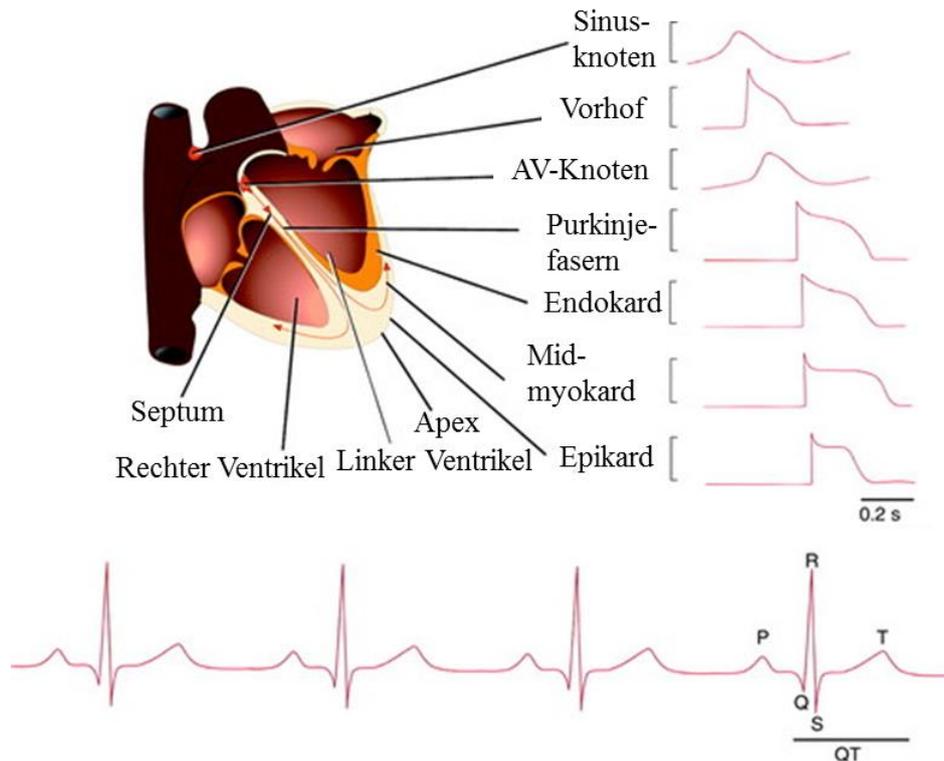


Abbildung 1: Elektrische Aktivität im Myokard. Oben: die schematische Darstellung des menschlichen Herzens mit den elektrisch aktiven Strukturen und ihren jeweiligen charakteristischen Aktionspotentialen. Unten: Aufnahme eines Elektrokardiogramms; der letzte Komplex ist zeitlich synchron zu den Aktionspotentialen abgebildet (modifiziert nach NERBONNE & KASS, 2005).

2.6.2. Das kardiale Aktionspotential

Morphologisch und funktionell lassen sich zwei Typen von Herzmuskelzellen unterscheiden: Zellen des Arbeitsmyokards für die Pumparbeit und die des spezifischen Erregungsbildungs- und Erregungsleitungssystems für die Herzerregung (THEWS & VAUPEL, 2005). Für die Weiterleitung einer Erregung müssen sich die Kardiomyozyten zunächst in einem elektrisch ruhenden Zustand befinden, in dem das sogenannte Ruhemembranpotential besteht. Während dieser Ruhephase liegt die Spannung im Inneren der Zellen bei etwa -80 mV, ein Wert, der sich dem Gleichgewichtspotential von Kalium annähert. Grund dafür ist die Durchlässigkeit der Zellmembran größtenteils für Kalium, und weniger für Natrium und Calcium. In den Schrittmacher-Zellen des Sinus- und AV-Knotens lässt sich jedoch kein stabiles Ruhemembranpotential nachweisen, da diese keine einwärts gerichteten Kaliumkanäle (K_{ir}) exprimieren, die im Arbeitsmyokard für ein stabiles Ruhepotential sorgen (DIFRANCESCO, 2019). Eine weitere Besonderheit

sind die für die Schrittmacher spezifischen hyperpolarisationsaktivierten Kationenkanäle (*hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated channels*, HCN-Kanäle), die einen einwärtsgerichteten Kationenstrom (I_f , *funny current*) generieren, welcher eine spontane Depolarisation in diesen Zellen auslöst. In atrialen und ventrikulären Kardiomyozyten resultiert der schnelle Aufstrich (*upstroke*) des Aktionspotentials während der Phase 0 aus der Aktivierung von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen (Nav). Diese Öffnung bewirkt einen schnellen Einstrom von Na^+ in das Zellinnere, wodurch das Membranpotential sich weiter dem Gleichgewichtspotential von Natrium annähert (FOZZARD, 2002). In den Schrittmacherzellen des Sinusknotens und des AV-Knotens läuft die Phase 0 deutlich langsamer als in den Atrien oder Ventrikeln ab, da die Nav -Kanäle hier keine große Bedeutung für die Depolarisation haben. Anschließend kommt es in den Kardiomyozyten der Vorhöfe und der Kammern zu einer ersten Repolarisationsphase (Phase 1), die durch das Schließen der Nav -Kanäle und die Aktivierung spannungsabhängiger Kalium-Kanäle mit einem schnellen K^+ -Einstrom ($I_{to,f}$, *fast recovering transient outward current*) gekennzeichnet ist. Neben diesem schnell reaktivierenden Strom gibt es auch eine langsame Komponente, $I_{to,s}$, die nur im Ventrikelmyokard vorhanden ist. Zu Beginn der Plateau-Phase findet sich beim Menschen, Schwein, Hund und Kaninchen eine charakteristische „Kerbe“ (engl. *notch*), die durch den kurzzeitigen Ausstrom von K^+ -Ionen induziert wird (CLAUSS et al., 2019). Die anschließende Plateau-Phase (Phase 2) ist durch das empfindliche Gleichgewicht zwischen depolarisierendem Ca^{2+} -Einstrom ($I_{\text{Ca,L}}$) durch den Calcium-Kanal vom L-Typ und dem beginnenden repolarisierenden K^+ -Ausstrom durch die schnelle (I_{Kr} , *rapidly activating*) und langsame (I_{Ks} , *slowly activating*) Komponente der *delayed rectifier*-Kaliumkanäle gekennzeichnet. Der Einstrom von Ca^{2+} während der Plateau-Phase löst zudem einen Calcium-Ausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum aus, der zur Kontraktion der Kardiomyozyten (und damit zur Systole des Herzzyklus) führt (FABIATO & FABIATO, 1979). Bei der darauffolgenden Phase 3 sorgt das Überwiegen von I_{Kr} und I_{Ks} bei gleichzeitiger Abnahme von $I_{\text{Ca,L}}$ für die endgültige Repolarisation und die Beendigung des Aktionspotentials (**Abb. 2**). Das Zusammenspiel von sogenannten Einwärtsgleichrichtern (*inward rectifier*) des $\text{K}_{ir2.x}$ -Typs, die den I_{K1} bilden, stabilisiert das Membranpotential wieder bei -80 mV.

Im Gegensatz zu Nav - und Cav -Kanälen, gibt es eine Vielzahl verschiedener Arten

von Kalium-Kanälen, die zu einem Kalium-Ausstrom und der Repolarisation des kardialen Aktionspotentials beitragen. Die beiden Hauptkomponenten, I_{Ks} und I_{Kr} , sind stärker im Ventrikel als im Vorhof ausgeprägt. Der I_{Kur} (*ultra-rapidly activating*) hingegen scheint spezifisch in den Atrien vorzukommen und könnte zur schnelleren Repolarisation in den atrialen im Vergleich zu den ventrikulären Kardiomyozyten beitragen (**Abb. 2**, NERBONNE & KASS, 2005).

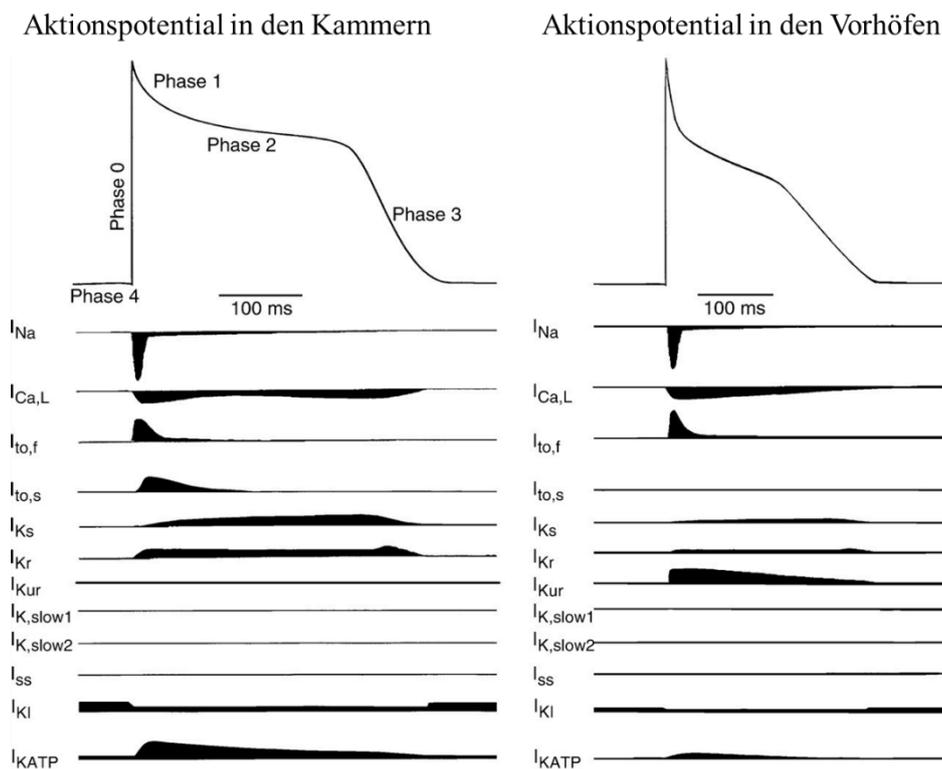


Abbildung 2: Darstellung charakteristischer kardialer Aktionspotentiale beim Menschen, aufgezeichnet in ventrikulären (links) und atrialen (rechts) Kardiomyozyten, mit den jeweils beteiligten Ionenströmen. Im oberen Teil der Abbildung sind die Aktionspotentiale als Verlauf der Spannung gegen die Zeit dargestellt. Darunter befinden sich die aktiven Ionenströme als relativer Strom gegen die Zeit, wobei die dunklen Flächen unter- bzw. oberhalb der Nulllinie den Einstrom bzw. Ausstrom der jeweiligen Ionen darstellen (NERBONNE & KASS, 2005).

Die Ausstattung mit repolarisierenden Kalium-Kanälen variiert jedoch nicht nur in den Herzregionen, sondern auch zwischen verschiedenen Spezies, wodurch die Morphologie des tierischen Aktionspotentials teilweise stark von der des Menschen abweichen kann (CLAUSS et al., 2019). Dies kann auf Unterschiede in der Expression und Aktivität von Ionenkanälen zurückgeführt werden. Durch seine dem Menschen sehr ähnlichen elektrophysiologischen Eigenschaften stellt das

Schwein beispielsweise ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung von proarrhythmogenen Mechanismen dar (**Abb. 3**, CLAUSS et al., 2019). So können die bedeutendsten Ionenströme $I_{Ca,L}$, I_{Na} , I_{Kr} , I_{Ks} und I_{K1} auch in porzinen Herzmuskelzellen gemessen werden, lediglich der I_{to} fehlt beim Schwein (MOW et al., 2008). Dennoch konnte auch ein *Notch* im Aktionspotential von porzinen ventrikulären Kardiomyozyten beobachtet werden, wobei der sogenannte Ca^{2+} -aktivierte Chlorid-Kanal (I_{to2}) als Träger der Repolarisation während der Phase 1 gilt (LI et al., 2003).

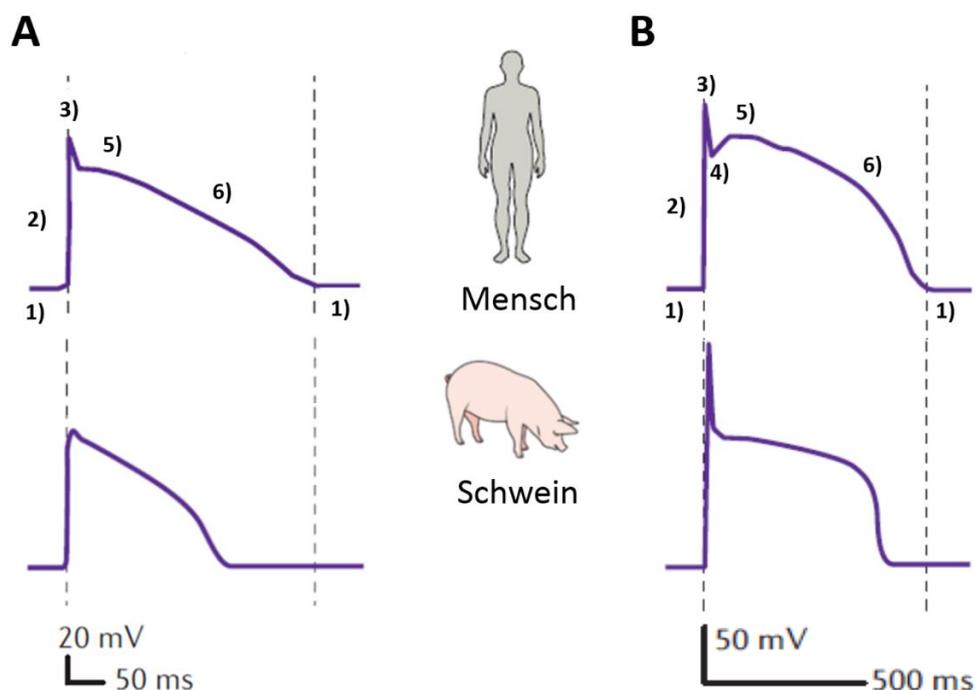


Abbildung 3: Das atriale (A) und ventrikuläre (B) Aktionspotential beim Menschen und beim Schwein, gemessen in isolierten Kardiomyozyten (modifiziert nach CLAUSS et al., 2019). **1) Phase 4:** Ruhephase, in der das Ruhemembranpotential von Einwärtsgleichrichtern (*inward rectifier*) des $K_{ir2.x}$ -Typs ($K_{ir2.1}$, $K_{ir2.2}$, $K_{ir2.3}$) dominiert wird, die den I_{K1} -Strom bilden; **2) Phase 0:** schneller Na^+ -Einstrom durch das spannungsabhängige Öffnen der $Na_v1.5$ -Kanäle verursacht die Depolarisation; **3) Phase 1:** die Repolarisation wird durch das zeitabhängige Schließen der $Na_v1.5$ -Kanäle und die spannungsabhängige Aktivierung von Kalium-Kanälen ($K_v4.2/4.3$), die hauptsächlich an der Bildung des $I_{to,f}$ -Stroms (*fast recovering transient outward current*) beteiligt sind, initiiert; **4) Sog. Notch**, nur im ventrikulären AP, hervorgerufen durch I_{to} - und I_{NCX} -Kanäle. Dieser ist typisch für das AP im Menschen und kann auch beim Schwein beobachtet werden; **5) Phase 2:** Plateau-Phase, die im atrialen verglichen mit dem ventrikulären AP weniger ausgeprägt ist und in der der Einstrom von depolarisierendem Ca^{2+} durch L-Typ ($Ca_v1.2$)-Kanäle der Repolarisation entgegenwirkt und dadurch große Mengen von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) freigesetzt werden, was letztlich zur Kontraktion des

Kardiomyozyten führt; **6) Phase 3:** die Repolarisation schreitet durch das Schließen der $Ca_v1.2$ -Kanäle und die Verstärkung des I_K -Stroms weiter voran. Der für die Vorhöfe spezifische I_{Kur} -Strom scheint für die vergleichsweise schnelle Repolarisation in den Zellen der Atrien verantwortlich zu sein (NERBONNE & KASS, 2005).

2.7. Pathophysiologie von Vorhofflimmern

Die Pathophysiologie, die der Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern zugrunde liegt, ist komplex und multifaktoriell (NATTEL, 2002; WAKILI et al., 2011). Die damit zusammenhängenden Mechanismen konnten trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Als mögliche Ursachen werden Veränderungen in der Expression und Funktion von Ionenkanälen, gesteigerte atriale Automatizität, eine Umverteilung von Gap Junctions, Störungen der Calciumhomöostase, autonome Dysfunktion sowie strukturelle Veränderungen des Vorhofs (z.B. Fibrose, Dilatation, Entzündung) diskutiert, die zu proarrhythmogenen Veränderungen, dem sog. Remodeling im Vorhof führen (**Abb. 4**). Die elektrophysiologischen Konsequenzen dieser Remodeling-Prozesse sind Ektopie und Reentry, die schließlich zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern führen (CLAUSS et al., 2015).

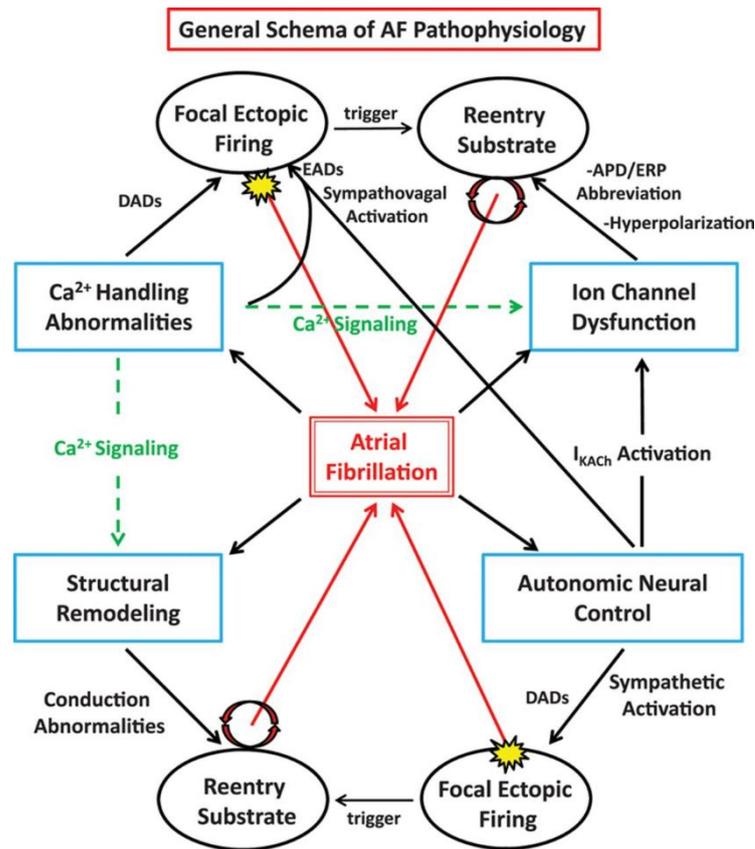


Abbildung 4: Darstellung verschiedener Mechanismen des strukturellen, elektrischen und autonomen Remodelings, die im Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern stehen (ANDRADE et al., 2014).

2.7.1. Ektopie

Unter Ektopie versteht man einen nicht dem Sinusknoten entspringenden Impuls, der zur Erregung des Arbeitsmyokards führt. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen beinhalten Veränderungen der Expression und Funktion von Ionenkanälen, veränderte Calciumhomöostase und Umverteilung der Gap Junctions. Die drei Hauptursachen für fokale ektope Aktivität im Vorhof sind: gesteigerte atriale Automatizität, frühe Nachdepolarisationen und späte Nachdepolarisationen. Im gesunden Herzen dominiert der Sinusknoten die Bildung der elektrischen Impulse. Es ist jedoch möglich, dass eine Zelle außerhalb des Sinusknotens ein verfrühtes, höherfrequentes ektopes Signal abgibt, das zu atrialer Tachykardie führen kann. Hierbei könnten Veränderungen in der Calciumhomöostase der Zelle eine bedeutende Rolle spielen, was bereits in

Patienten mit VHF und zahlreichen Tiermodellen gezeigt werden konnte (WAKILI et al., 2011).

Frühe Nachdepolarisationen entstehen, wenn die Dauer des Aktionspotentials stark verlängert wird, wie beispielsweise bei einigen Arrhythmiesyndromen (z.B. Long-QT-Syndrom). In diesem Zusammenhang sollte ein weiteres Phänomen erwähnt werden: die Dispersion der Repolarisation. Im gesunden Myokard wird die Entstehung von Arrhythmien durch eine mehr oder weniger homogene Verteilung von Repolarisationen verhindert. Im kranken Myokard jedoch kann durch die oben genannten Remodeling-Prozesse ein Substrat geschaffen werden, das durch die entstandene elektrophysiologische Heterogenität für die Entstehung von Arrhythmien empfänglich ist. Schrittmacherzellen exprimieren außerdem eine bestimmte Art von Natriumkanälen, die bereits genannten *Funny Channels*, welche wie oben beschrieben für die spontanen diastolischen Depolarisationen in diesen Zellen verantwortlich sind. Deshalb könnte auch eine Hochregulation der *Funny Channels* zu einer gesteigerten atrialen Automtizität führen – ein Vorgang, der im Rahmen einer Herzinsuffizienz nachgewiesen werden konnte (LAI et al., 1999).

Bei späten Nachdepolarisationen stellt ein unphysiologischer Calciumausstrom aus dem SR die Ursache dar. Normalerweise wird Ca^{2+} mittels zweier Transportsysteme, der SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) und dem Na^{+} - Ca^{2+} -Austauscher (NCX), während der Diastole ausgeschleust. Damit wird die Ionenhomöostase am Ende des Herzzyklus wiederhergestellt. Wenn jedoch eine atriale Tachykardie vorliegt, wird Calcium fortlaufend in der Zelle angesammelt. Schuld daran ist die wiederholte Aktivierung des Ca^{2+} -Kanals vom L-Typ. Als Folge führt dieser Überfluss an Ca^{2+} unter anderem zu einer gleichzeitigen Fehlfunktion des Ryanodin-Rezeptors. Dadurch kann es zu spontanen Calciumausschüttungen im SR während der Diastole kommen (sog. Calcium-Leck). Dies kann wiederum den Natrium-Calcium-Austauscher aktivieren, was einen depolarisierenden Einwärtsstrom – also späte Nachdepolarisationen – auslöst. Das Resultat dieser Vorgänge sind eine fortlaufende Depolarisation der Zelle und damit ektope Erregungen (VOIGT et al., 2012).

2.7.2. Reentry

Reentry (dt. „kreisende Erregung“) wird zumeist durch eine vorausgehende ektope Erregung getriggert. Um dies im Myokard zu ermöglichen, bedarf es zunächst eines vulnerablen Substrats, welches durch elektrisches oder strukturelles Remodeling

entstehen kann (WAKILI et al., 2011). So spielt eine Veränderung der Refraktärzeit und der Leitungsgeschwindigkeit eine entscheidende Rolle: trifft eine elektrische Erregung auf eine Zelle, die eigentlich noch refraktär sein sollte, aber durch Umbauprozesse des Gewebes bereits wieder erregbar ist, kann eine Art Kurzschlussverbindung entstehen. Hier müssen mehrere Zellen bereits nicht mehr refraktär sein, da nun dieser Impuls weitergeleitet werden und eine kreisende Erregung entstehen kann. Beispiele für solche Umbauprozesse sind Vorhofdilatation und Fibrose: durch verlängerte Leitungswege, verlangsamte Erregungsleitung, und neu entstandene Leitungsbarrieren werden die Entstehung und Aufrechterhaltung von zahlreichen irregulären Reentry-Kreisen, und somit anhaltendes VHF begünstigt (NATTEL et al., 2008).

2.7.3. Strukturelles Remodeling

Das strukturelle Remodeling ist ein bedeutender Faktor der Arrhythmogenese (ANDRADE et al., 2014). Es beschreibt Veränderungen der Eigenschaften des Vorhofgewebes, wie Fibrose, Größe und Ultrastruktur der Zellen (Myolyse, Anreicherung von Glykogen, Veränderungen des Chromatins in den Zellkernen, der Mitochondrien und des sarkoplasmatischen Retikulums) (AUSMA et al., 1997; AUSMA et al., 2003). Diese Abweichungen in der Ultrastruktur können zu der für Vorhofflimmern charakteristischen Hypokontraktilität der Vorhöfe führen und dadurch die Entstehung der atrialen Dilatation vorantreiben (SCHOTTEN et al., 2002; ALLESSIE et al., 2002). Anhand echokardiographischer Messungen konnte unter anderem auch bei Patienten mit Diabetes mellitus eine Größenzunahme des linken Vorhofs und eine Zunahme der Masse des linken Ventrikels festgestellt werden (RUTTER et al., 2003). Durch dieses strukturelle Remodeling entsteht ein proarrhythmogenes Substrat, das kreisende Erregungen (Reentry) zulässt.

Fibrose stellt jedoch den wohl bedeutendsten und am meisten untersuchten Faktor des strukturellen Remodelings dar. Zahlreiche Pathomechanismen, die mit der Entstehung von Vorhofflimmern zusammenhängen, wie mechanische Dehnung der Zellen, oxidativer Stress, neurohumorale Aktivierung und sogar VHF selbst, können zu Fibrosierungen führen (BURSTEIN et al., 2007; BURSTEIN et al., 2008; YEH et al., 2011). Diese können wiederum als eine physikalische Barriere zwischen den Muskelfasern agieren und dadurch die Erregungsleitung stören oder vollständig blockieren, was als ein Auslöser für Reentry gilt (BURSTEIN et al., 2009; SPACH et al., 2004). Zusätzlich steht Fibrose im Zusammenhang mit der

Proliferation und Differenzierung von kardialen Fibroblasten in Myofibroblasten. Durch diese Aktivierung kommt es zu einer inadäquaten Produktion und Verteilung von Kollagen, wodurch ein proarrhythmogenes Substrat geschaffen wird (WANG et al., 2019). So konnte in den atrialen Fibroblasten von Diabetes-Typ-2 Patienten eine erhöhte Kollagensynthese, gekennzeichnet durch eine verstärkte Expression von Typ-I-Kollagen, nachgewiesen werden (SEDGWICK et al., 2014). Dabei wird unter anderem der *Connective Tissue Growth Factor (CTGF)* als einer der bedeutendsten pathogenetischen Faktoren in der Entstehung von Fibrose genannt. Außerdem führt die Aktivierung von Fibroblasten zu einer vermehrten Interaktion mit Kardiomyozyten. Hier konnten das Auftreten von Reentry und spontaner Ektopie häufiger beobachtet werden (MIRAGOLI et al., 2007; ZLOCHIVER et al., 2008). Die Interaktionen haben auch einen Effekt auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kardiomyozyten: es zeigen sich eine verlangsamte Erregungsleitung und Depolarisation des Aktionspotentials sowie spontane Depolarisationen während der Phase 4 (PATTERSON et al., 2005). Außerdem wiesen Proben aus den Atrien von Patienten mit Diabetes mellitus aufgrund von Veränderungen im Mitochondrienmetabolismus und dem Elektronentransport eine erhöhte Produktion von Reactive-Oxygen Species (ROS) auf (ANDERSON et al., 2009). Bei den ROS handelt es sich um profibrotische Signalmoleküle, die die Kollagensynthese der kardialen Fibroblasten verstärken, und damit einen Faktor für die erhöhte Anfälligkeit des Herzens für Vorhofflimmern darstellen. Zusätzlich führt die reduzierte Expression von Enzymen wie der Superoxid-Dismutase und der Glutathion-Peroxidase, die normalerweise ROS abbauen, zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses (ZIOLO & MOHLER, 2015). Letztlich kann die Akkumulation von ROS eine vermehrte *TGF- β* - und *TNF- α* -Expression und dadurch atriale Fibrose verursachen.

2.7.4. Elektrisches Remodeling

Kennzeichen des elektrischen Remodelings bei Vorhofflimmern sind Veränderungen des Calciumhandlings, der Ionenkanäle und der Gap Junctions. Abweichungen im Calciumhandling können dabei sowohl zur Entstehung als auch der Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern führen (HEIJMANN et al., 2014). Calcium wird im sarkoplasmatischen Retikulum der Kardiomyozyten gespeichert und durch spezifische Stimuli freigesetzt. Im Rahmen des VHF kommt es zu einer unkontrollierten Freisetzung von Ca^{2+} , ausgelöst durch eine verstärkte Aktivierung

des Ryanodin-Rezeptors 2 (RyR2) oder eine Ca^{2+} -Überladung des SR. Bei Ryanodin-Rezeptoren handelt es sich um eine Familie von Ionenkanälen, die durch den Einstrom von Calciumionen ($I_{\text{Ca,L}}$) aktiviert werden und dabei große Mengen von Ca^{2+} aus dem SR in das Zytosol freisetzen, was letztlich die Muskelkontraktion auslöst. Bei Patienten konnte nachgewiesen werden, dass *Gain-of-function* Mutationen des RyR2 eine Prädisposition für die catecholaminerge polymorphe ventrikuläre Tachykardie (CPVT) und Vorhofflimmern zur Folge hat (SUMITOMO et al., 2007; ZHABYEYEV et al., 2013). In einem transgenen Maus-Modell, bei dem ein Mangel an der den RyR2 stabilisierenden Untereinheit *FKBP12.6* erzeugt wurde, wurden durch das unkontrollierte Entweichen von Calciumionen DADs induziert. Zudem konnte durch Burststimulation vermehrt Vorhofflimmern bei diesen Mäusen ausgelöst werden (SOOD et al., 2008). Ferner kann Vorhofflimmern selbst zu einem Defizit des Calciumhandlings führen: durch Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (CaMKII) wird das Öffnen von Ryanodin-Rezeptoren verstärkt, ein Effekt, der bei Patienten mit chronischem VHF beobachtet werden kann (WAKILI et al., 2011). Bei aus den Vorhöfen von Hunden isolierten Kardiomyozyten hatte die Tachypacing-induzierte Steigerung der Frequenz der atrialen Depolarisation die Anreicherung von intrazellulärem Calcium zur Folge. Dadurch kam es zu einer reduzierten Expression des $\text{Ca}_v1.2$ (QI et al., 2008). Anhand verschiedener Tiermodelle konnte belegt werden, dass dies zu einer Verkürzung der APD und der AERP führt, aus der kreisende Erregungen hervorgehen können (YUE et al., 1997; SCHOTTEN et al., 2003).

Erhöhte Kaliumströme spielen beim elektrischen Remodeling bei Vorhofflimmern eine bedeutende Rolle (PELLMAN & SHEIKH, 2015). Der I_{K1} -Strom wird beispielsweise bei VHF verstärkt, wodurch das Ruhemembranpotential und der Beginn der Phase 3 beeinflusst werden, sodass die atriale Refraktärzeit verkürzt wird (VOIGT et al., 2007; VOIGT et al. 2008). Grund hierfür stellt höchstwahrscheinlich die Hochregulation der Expression des für den Hauptanteil des I_{K1} -Stroms verantwortlichen Kaliumkanals Kir2.1 dar. Diese Regulation kann insbesondere bei Vorhofflimmern beobachtet werden. Es wird weiterhin vermutet, dass die Genexpression von Kir2.1 durch microRNAs reguliert wird. Hierbei stehen vor allem die miR-1 und -26, die bei VHF reduziert sind, im Fokus (LUO et al., 2013; GIRMATSION et al., 2009). Dabei scheint der Mangel an diesen microRNAs zu einer Vermehrung von Kaliumkanälen und -strömen zu führen,

wodurch die atriale Refraktärzeit verkürzt und schließlich Reentry-Kreise ermöglicht werden.

Daneben ist die Funktion der Gap Junctions bei Vorhofflimmern beeinträchtigt (PELLMAN & SHEIKH, 2015). Diese ist direkt mit der Leitungsgeschwindigkeit, die einen entscheidenden Faktor der Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF darstellt, verbunden: ist die Leitungsgeschwindigkeit verlangsamt, kann dies Reentry-Erregungen verursachen. In verschiedenen Tiermodellen des Vorhofflimmerns und in klinischen Studien konnte eine heterogene Verteilung von Connexin-40 beschrieben werden (VAN DER VELDEN et al., 2000; ZHANG et al., 2009; GOLLOB et al., 2006). Zudem konnte ein Zusammenhang zwischen Mutationen im Connexin-40 Gen (*GJA5*) und der Anfälligkeit für VHF belegt werden (FIROUZI et al. 2004). Auch Mutationen im *GJA1*-Gen, das für Connexin-43 codiert, tragen zur Heterogenität der elektrischen Leitung bei, aus der sich kreisende Erregungen und letztlich Vorhofflimmern entwickeln können (THIBODEAU et al., 2010).

2.7.5. Autonomes Remodeling

Das autonome Nervensystem spielt eine wesentliche Rolle für die Initiation und Termination von Vorhofflimmern, wobei die Steuerung über autonome Ganglien erfolgt. Das Herz wird dabei sowohl durch intrinsisches (Ganglien im Herzen) als auch extrinsisches (Ganglien außerhalb des Herzens und N. vagus) Nervengewebe innerviert (KAWASHIMA et al., 2005). Hiermit verbundene Fehlfunktionen stehen in direktem Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern (SHEN et al., 2011). Einen möglichen Pathomechanismus stellt eine erhöhte Sympathikusaktivität dar. Jayachandran et al. nutzten Hydroxyephedrin, um sympathische Nervenendigungen in den Herzen von Hunden, bei denen zuvor VHF durch Burststimulation induziert wurde, zu markieren (JAYACHANDRAN et al., 2000). Dabei konnten sie eine Zunahme der heterogenen Innervation in den Atrien feststellen. Später wurde die Erhöhung der sympathischen Nervendichte, das sogenannte *Nerve Sprouting*, durch immunhistochemische Färbungen mit Tyrosin-Hydroxylase-Antikörpern in den Herzen von Hunden mit Tachypacing-induziertem Vorhofflimmern bestätigt (CHANG et al., 2001). *Nerve Sprouting* und sympathische Hyperinnervation lassen sich auch nach Induktion eines ventrikulären Myokardinfarkts beobachten und verursachen eine erhöhte Inzidenz und Dauer von VHF (AJIJOLA et al., 2013,

VASEGHI et al., 2012). Als Ursache für die gesteigerte Arrhythmogenität werden Veränderungen der atrialen Refraktärzeit, welche das Entstehen kreisender Erregungen begünstigen, gemacht (KIM et al., 1996; OLGIN et al., 1998). Bei Patienten mit Diabetes mellitus scheinen vermehrt auftretende Episoden einer ausgeprägten Hypoglykämie mit der Aktivierung des Sympathikus, der Verkürzung der Refraktärzeit und dem erhöhten Risiko für VHF zusammenzuhängen (HANEFELD et al., 2016; GU et al., 2017). Daneben kann ein Ungleichgewicht von sympathischer und parasympathischer Versorgung zur Entstehung von Vorhofflimmern beitragen. Die kardiale autonome Neuropathie, die charakterisiert ist durch parasympathische Denervierung, unregelmäßige sympathische Aktivität und folgende sympathische Denervierung, ist eine wichtige Komplikation des Diabetes mellitus (KUEHL & STEVENS, 2012). Entsprechend konnte bei Patienten eine signifikant niedrigere Herzfrequenzvariabilität, ein Marker für autonome Dysfunktion, festgestellt werden (BENICHOU et al., 2018). Zudem korrelierte insbesondere die Erhöhung der *low-to-high frequency ratio* (LF/HF), einem Kennwert der sympathovagalen Balance, stark mit dem Auftreten von asymptomatischem Vorhofflimmern (RIZZO et al., 2015).

3. Diabetes mellitus vermitteltes proarrhythmisches Remodeling

In den letzten Jahren konnte die direkte Verbindung zwischen einer Diabeteserkrankung und dem Auftreten von Arrhythmien mit Hilfe von epidemiologischen Studien nachgewiesen werden (RENNER et al., 2020). Wie bereits beschrieben, stellen elektrische, strukturelle und autonome Remodeling-Prozesse die Kennzeichen der Arrhythmogenese dar. Diabetes mellitus konnte sowohl als indirekter als auch direkter Auslöser einiger dieser Prozesse ausgemacht werden. Einen großen Beitrag hierzu leisteten verschiedene Tiermodelle. Dennoch bleiben trotz intensiver Forschung viele der spezifischen Diabetes-assoziierten zellulären und molekularen Mechanismen weiterhin unvollständig entschlüsselt (BOHNE et al., 2019).

3.1. Tiermodelle des Diabetes mellitus

Generell lassen sich vier verschiedene Methoden der Induktion des Diabetes mellitus bei Tiermodellen unterscheiden: die Applikation von Betazell-toxischen Chemikalien, die chirurgische Entfernung von insulinproduzierenden Zellen, die genetische Modifikation bestimmter Gene des Glukosestoffwechsels sowie die Fütterung einer bestimmten hochkalorischen Diät.

Zahlreiche Kleintiermodelle des Diabetes mellitus konnten mit Hilfe dieser Methoden generiert werden. Zum Chemikalien-induzierten Diabetes mellitus gehören Nager- und Kaninchen-Modelle, bei denen durch Injektion von Substanzen wie Streptozotocin oder Alloxan aufgrund ihrer toxischen Wirkung auf die Beta-Zellen des Pankreas ein Typ-1-DM ausgelöst werden konnte (WATANABE et al., 2012; FU et al., 2015; YI et al., 2015; HAYAMI et al., 2016; LIU et al., 2017).

Auch genetisch veränderte Kleintiermodelle des Diabetes mellitus wurden erzeugt, so etwa das Akita-Mausmodell, bei dem sich durch Mutationen des Insulin-2-Gens ein Typ-1-DM manifestiert und das viele der Komplikationen des Diabetes widerspiegelt, wie etwa Retinopathie, Neuropathie, Nephropathie und erhöhten oxidativen Stress (HSUEH et al., 2007). Die am häufigsten verwendeten Kleintiermodelle des Typ-2-DM sind mit Fettleibigkeit verbunden. Dazu gehören monogene Modelle der Leptin- (ob/ob Mouse) oder Leptinrezeptor-Defizienz (db/db Mouse, Zucker Fatty Rat und Diabetic Fatty Rat) (KING, 2012; LINZ et al., 2016; FUKUI et al., 2017).

Modelle des metabolischen Syndroms zeichnen sich durch zentrale Fettleibigkeit, Hyperlipidämie, Glukoseintoleranz und Hypertension aus, und wurden durch eine Kombination aus einer *High Fat* (HFD) und *High Sucrose* Diät bei Nagern und Kaninchen induziert (ARIAS-MUTIS et al., 2017; HOHL et al., 2017; ZARZOSO et al., 2014).

Im Bereich der Großtiermodelle soll aufgrund der Bedeutung für diese Arbeit im Folgenden auf die verschiedenen Schweine-Modelle für Diabetes mellitus eingegangen werden.

Ähnlich der Kleintiermodelle konnte auch bei Schweinen mittels Injektion von Streptozotocin oder Alloxan Diabetes mellitus induziert werden (SOROP et al., 2020).

Die komplette chirurgische Entfernung des Pankreas (Pankreatektomie) ist ein in der Diabetes-Forschung häufig verwendetes Schweine-Modell für die präklinische Inselzelltransplantation (RENNER et al., 2020). Da es sich hierbei aber um einen äußerst invasiven Eingriff handelt, werden für die Induktion von DM andere Modelle bevorzugt.

Auch bei Schweinen konnte mit Hilfe von HFD und *High Energy* Diät die Merkmale des metabolischen Syndroms zusammen mit einer reduzierten Glukosetoleranz und einer Insulinresistenz beobachtet werden (RENNER et al., 2016).

Seit einigen Jahren ist es auch möglich, genetisch veränderte Schweine-Modelle zu erzeugen. Das *GIPR^{dn}*-Schwein, das einen dominant-negativen Glukose-abhängigen insulinotropen Peptid-Rezeptor in den Beta-Zellen exprimiert und damit verbunden eine reduzierte Glukosetoleranz, Insulinsekretion und Beta-Zellproliferation aufweist, dient beispielsweise als Modell für Diabetes mellitus Typ 2 (RENNER et al., 2016). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *INS^{C94Y}*-Schwein führt die Fehlfaltung von Insulin zu einer Reduktion von Beta-Zellen mit Hypoinsulinämie, erhöhten Nüchternblutzuckerwerten und reduziertem Körperwachstum (RENNER et al., 2013). Der Aminosäureaustausch von Cystein nach Tyrosin resultiert in einer Insulin-Fehlfaltung, die zu einer Ansammlung von Proinsulin im endoplasmatischen Retikulum (ER) und schließlich zu chronischem ER-Stress führt, der von intrinsischen Reparaturmechanismen nicht mehr bewältigt werden kann. Dies führt letztendlich zur Apoptose von Betazellen im Pankreas. Die Expression von mutierten Insulinmolekülen kann – in Abhängigkeit von der Art der Mutation und der Expressionshöhe – zu einem permanenten neonatalen Diabetes

mellitus führen (RENNER et al., 2013). Dieser wird auch als *Mutant Insulin-gene-induced Diabetes of Youth* (MIDY) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine sehr seltene Art des Diabetes mellitus, die sich innerhalb der ersten Lebenswochen oder -monate entwickelt. Sogenannte *Missense*-Mutationen des Insulins und seiner Vorgänger, Präproinsulin und Proinsulin, beeinflussen dabei die Insulinstruktur und -biosynthese und stellen somit einen Faktor in der Entstehung von Diabetes mellitus dar (STOY et al., 2007). Eine dieser beim Menschen bekannten Mutationen ist *INS^{C96Y}*, durch die es zur Durchtrennung von Disulfidbrücken im Proinsulin kommt, was – ähnlich der *INS^{C94Y}*-Mutation – eine Fehlfaltung dieses Proteins auslöst. Zudem wurde eine Proteinüberladung mit anschließender Induktion von ER-Stress beschrieben, was die Apoptose der Beta-Zellen zur Folge hat (RAJAN et al. 2010).

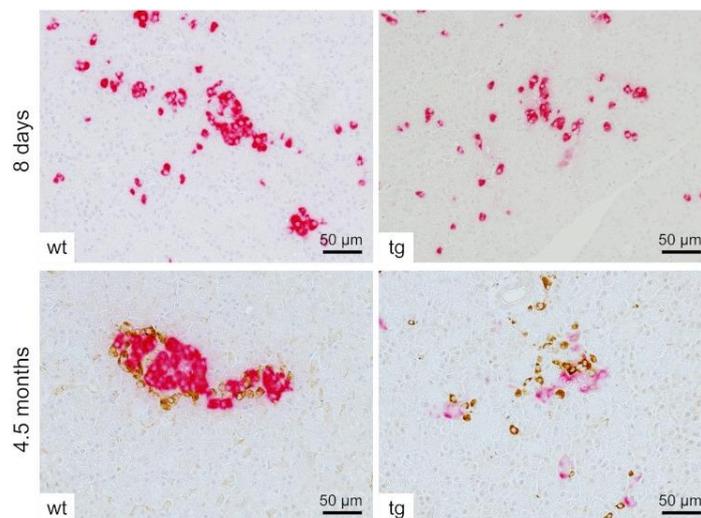


Abbildung 5: Reduzierte Beta-Zellmasse bei 4,5 Monate alten *INS^{C94Y}*-Schweinen, dargestellt durch immunohistochemische Färbungen. Cofärbung von Insulin (pink), Glukagon, Somatostatin und pankreatischem Polypeptid (braun) bei acht Tage (oben) sowie 4,5 Monate (unten) alten Wildtyp- (wt) und *INS^{C94Y}*- (tg) Schweinen (RENNER et al., 2013).

Durch ein Defizit der Insulinsekretion entwickeln die *INS^{C94Y}*-Schweine innerhalb der ersten Lebenswoche einen diabetischen Phänotyp. Zu diesem Zeitpunkt war die Betazell-Masse noch unverändert, mit Fortschreiten der Erkrankung konnte jedoch ein Betazell-Verlust beobachtet werden. Mit 4,5 Monaten trat ein Rückgang der Betazell-Masse bei genetisch veränderten Tieren im Vergleich zu Wildtypen von mehr als 70 % auf; zusätzlich zeigten die Beta-Zellen deutliche morphologische

Zeichen von ER-Stress (**Abb. 5**). Zudem konnte eine Reduktion des Körpergewichts um ca. 41 % bei diesen Schweinen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren festgestellt werden (**Abb. 6**). Durch die exogene Substitution von Insulin ließen sich dennoch eine Normoglykämie und ein annähernd normales Wachstum erreichen.

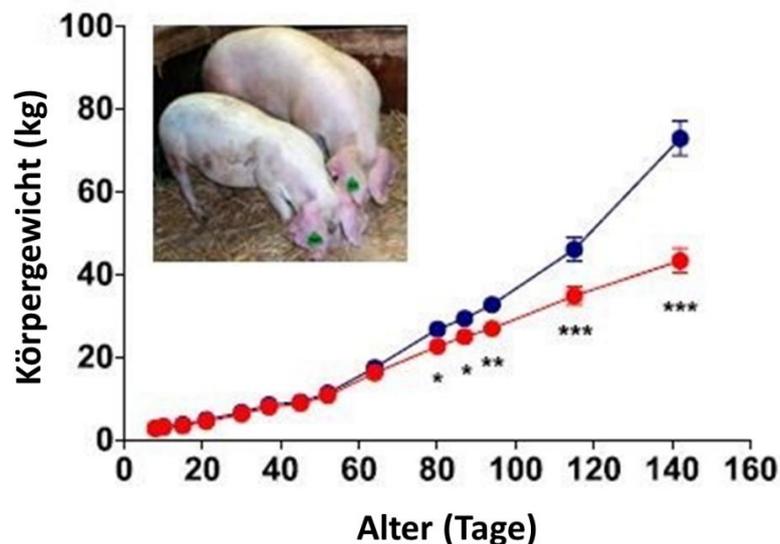


Abbildung 6: Zunahme des Körpergewichts bei *INS^{C94Y}*-Schweinen (rote Kreise; n=9) und Wildtypen (blaue Kreise; n=7) bis zum Alter von 4,5 Monaten; *p<0.05, ***p<0.001 (modifiziert nach RENNER et al., 2013).

Die Gewichte der meisten Organe waren proportional dazu verringert. Eine Ausnahme hierbei stellte jedoch die Niere dar, da ihr Gewicht nur um ca. 15 % reduziert war, das relative Gewicht jedoch bedeutend erhöht war. Die diabetischen Nieren zeigten keine histologischen Anzeichen einer Nierenerkrankung.

Bereits im Alter von fünf Monaten ließ sich bei genetisch veränderten Schweinen eine verminderte Kapillarisation des Herzmuskelgewebes feststellen, die zu einer Minderdurchblutung des Myokards führen kann. Dies konnte ebenfalls im Herzmuskelgewebe diabetischer Patienten nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich in fünf Monate alten *INS^{C94Y}*-Schweinen nach experimenteller Induktion einer Myokardischämie eine vermehrte Fibrose (HINKEL et al., 2017).

Die Insulin-Genmutation *INS^{C93S}* führt hingegen zu einer geringeren Expression von mutiertem Inulin im Vergleich zu den eben genannten genetisch veränderten Schweinen, weshalb diese Tiere einen mildereren diabetischen Phänotypen zeigen

mit unverändertem Wachstum, milder Hyperglykämie bei Nüchternheit, reduzierter Glukosetoleranz und geringgradigem Verlust von Beta-Zellen (RENNER et al., 2019).

Insgesamt ist jedoch festzuhalten, dass diese verschiedenen Modelle des Diabetes mellitus bisher kaum für die Erforschung der Elektrophysiologie und insbesondere des Vorhofflimmerns eingesetzt wurden. Einige der gegenwärtig bekannten Tiermodelle und die damit untersuchten Remodeling-Prozesse, die im Zusammenhang mit Vorhofflimmern stehen, sollen nun beschrieben werden.

3.1.1. Tiermodelle des atrialen strukturellen Remodelings bei Diabetes mellitus

Diabetes ist dafür bekannt, die interstitielle Fibrose in den Atrien zu verstärken, ein Effekt, der sowohl in Tierstudien als auch – wie oben erläutert - bei Humanpatienten nachgewiesen werden konnte (KATO et al., 2008; WATANABE et al., 2012; LAMBERTS et al., 2014; LI et al., 2016). Kato et al. konnten sowohl bei Ratten, die einen Typ-1-Diabetes ausgeprägt hatten, als auch bei genetisch veränderten Tieren mit Typ-2-Diabetes zeigen, dass durch vermehrte interstitielle Fibrose im Vorhof ein wichtiges arrhythmogenes Substrat für Diabetes-assoziierte atriale Tachyarrhythmien geschaffen werden kann. Wie bereits zuvor beschrieben, spielt hierbei die Aktivierung der kardialen Fibroblasten eine entscheidende Rolle (**Abb. 7**). Ähnliche Resultate konnten auch anhand von db/db Mäusen - einem monogenen Modell der Leptinrezeptor-Defizienz, das einen Typ-2-Diabetes mellitus verbunden mit Fettleibigkeit exprimiert - erzielt werden: nach Isolation und Kultivierung von ventrikulären Fibroblasten wurde eine erhöhte Expression von Typ-I-Kollagen und des *transforming growth factor- β 1* (*TGF- β 1*) nachgewiesen, welche in diesem Modell für die vermehrte Fibrose verantwortlich zu sein schienen (HUTCHINSON et al., 2013). Ob diese Ergebnisse auch in den Atrien reproduzierbar sind, untersuchten Krishnaswamy et al. in ihrem Akita-Mausmodell: hier konnte eine verstärkte Fibrosierung und eine damit assoziierte Hochregulation der Expression von Typ-I- und Typ-III-Kollagen gezeigt werden (KRISHNASWAMY et al., 2015). Besonders erwähnenswert ist, dass sich dieser Effekt durch eine Langzeittherapie mit Insulin verhindern ließ.

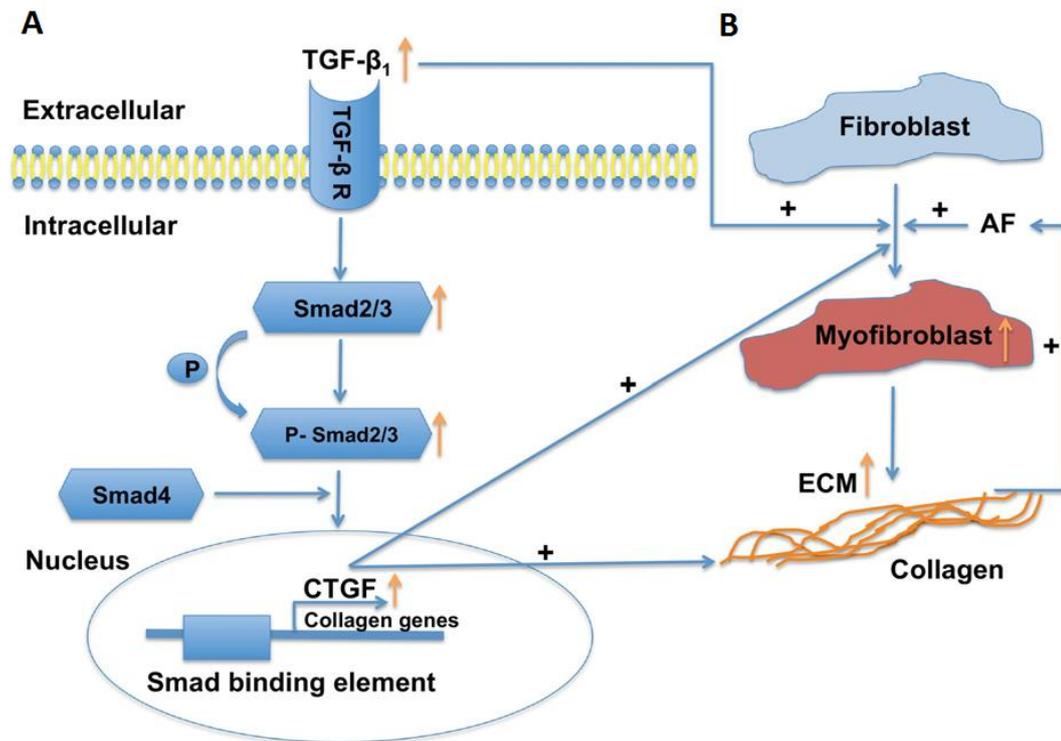


Abbildung 7: Überblick über das profibrotische Remodeling durch Veränderung der Proteinexpression (A) oder der Zellmenge (B) im Rahmen von VHF. Eine Hochregulation von *TGF- β 1*, das vermehrt an seine Rezeptoren bindet, triggert eine Signalkaskade, durch welche inaktives *SMAD2/3* durch Phosphorylierung aktiviert wird und an *SMAD4* bindet, wodurch der *SMAD*-Komplex gebildet wird. Nach Translokation in den Nucleus wird die Transkription von *CTGF* initiiert, was zu einer gesteigerten Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) und der Aktivierung von Myofibroblasten führt (LUGENBIEL et al., 2017).

Die durch eine Diabeteserkrankung entstehende Hyperglykämie ist assoziiert mit verstärktem Angiotensin-II- (ANG II) und *TGF- β 1*-Signaling und einer erhöhten ROS-Produktion, was anhand von aus Herzen von Ratten isolierten Fibroblasten nachgewiesen werden konnte (FIASCHI et al., 2014). Zusätzlich stimulieren erhöhte Blutzuckerwerte die Produktion von AGEs, die eine Vermehrung der interstitiellen Fibrose durch die Ausbildung von Quervernetzungen zwischen Kollagen und Laminin hervorrufen (RUSSO & FRANGOIANNIS, 2016). Dabei kommt es durch die Aktivierung ihrer Rezeptoren (RAGEs), die sich auf der Oberfläche von kardialen Fibroblasten befinden, zu einer Hochregulation des *connective tissue growth factors* und einer Stimulation der Fibroblastenproliferation (**Abb. 8**), was mit Hilfe eines Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus bei Ratten nachgewiesen werden konnte (KATO et al., 2008). Damit wurde das sogenannte AGE-RAGE-System als ein weiterer wichtiger

Mediator des profibrotischen Signalweges in diabetischen Atrien identifiziert.

Des Weiteren scheinen Adipokine einen Einfluss auf die Bildung eines proarrhythmogenen Substrats in den Vorhöfen zu haben. Hierbei handelt es sich um Signalmoleküle, die in der epikardialen Fettschicht gebildet werden, und durch ihre parakrine Wirkung zudem begünstigend auf die Entstehung atrialer Fibrose wirken (BOHNE et al., 2019). Zu diesen zählen unter anderem Leptin und Adiponektin. Leptinspiegel sind bei Fettsucht und DM erhöht, was eine verstärkte Ausprägung von atrialer Fibrose zur Konsequenz hat (KARMAZYN et al., 2008). Bei db/db Mäusen konnte dieser Effekt nachgewiesen werden, indem nach einer ANG-II-Therapie erhöhte Leptin-Spiegel zu einer gesteigerten Anfälligkeit für VHF durch eine vermehrte Fibrosierung der Atrien führten. Verantwortlich hierfür schienen die Hochregulation von Leptin durch ANG II in atrialen Fibroblasten und ein gesteigertes *TGF- β 1*-Signaling zu sein. Bei Leptin-defizienten ob/ob Mäusen hingegen war der gegenteilige Effekt zu beobachten (FUKUI et al., 2013).

Die häufig mit Diabetes mellitus Typ 2 verbundene Fettsucht kann auch zu einer Zunahme der Dicke der epikardialen Fettschicht führen, die auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der Atrien proarrhythmisch wirkt (MAHAJAN et al., 2015). Als Folge nimmt nicht nur dessen Volumen zu, sondern auch die Infiltration des atrialen Epikards durch das Fettgewebe. Dies führt dazu, dass unter physiologischen Bedingungen vorkommendes Fett durch fibrös-fettige Infiltrate ersetzt wird und vermehrt interstitielle Fibrose entsteht. In einem Schafmodell, bei dem durch langanhaltendes atriales Rapid Pacing VHF ausgelöst wurde, konnte dieser Mechanismus belegt werden: in der VHF-Gruppe konnte signifikant mehr Fettgewebe in den rechten und linken Atrien, und damit verbunden mehr Infiltrate und interstitielles Bindegewebe im Vergleich zu den Tieren aus der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (HAEMERS et al., 2017). Durch die neuentstandenen physikalischen Barrieren zwischen den Kardiomyozyten konnte außerdem eine Veränderung der atrialen Leitungsgeschwindigkeit und Homogenität festgestellt werden. Zusätzlich führt die parakrine Wirkung des Fettgewebes zu einer Ausschüttung von Zytokinen, die das atriale Remodeling und damit die Entstehung und Aufrechterhaltung von VHF begünstigt (NAGY et al., 2017).

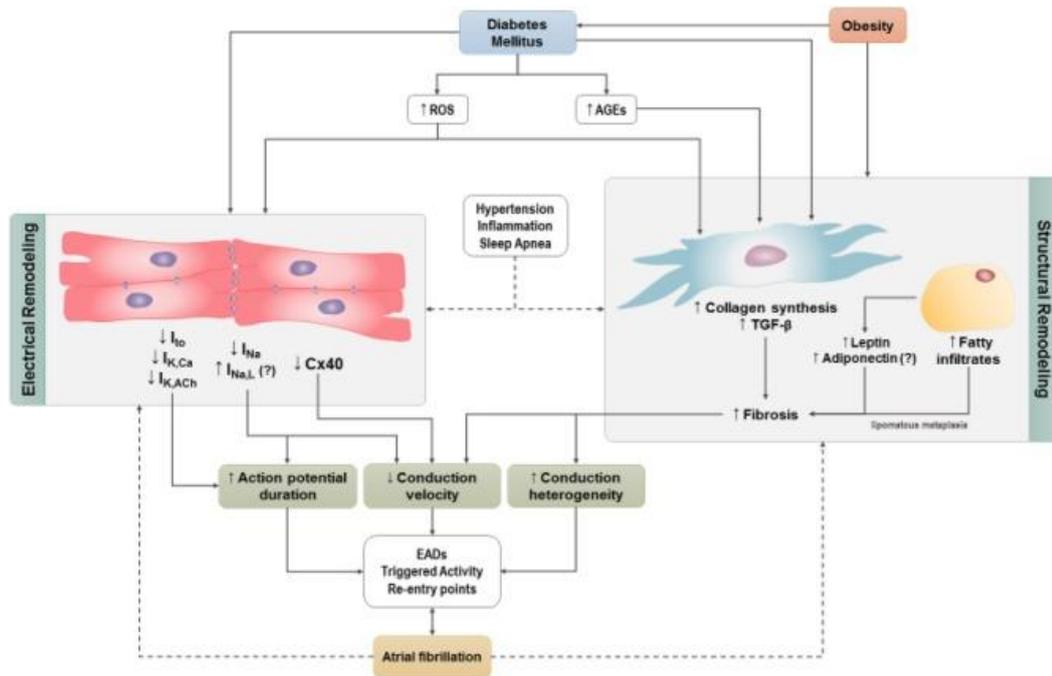


Abbildung 8: Zelluläre Mechanismen, durch die Diabetes mellitus die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern triggert. Durch die vermehrte Bildung von ROS und AGEs wird elektrisches und strukturelles Remodeling in den Atrien ausgelöst. Zusätzlich wird durch die Fettleibigkeit, die auch unabhängig von DM vorhanden sein kann, das strukturelle Remodeling sowie durch die häufig mit DM erscheinenden Begleitkomplikationen obstruktive Schlafapnoe, systemische Inflammation und Hypertonie elektrisches Remodeling getriggert. (BOHNE et al., 2019).

3.1.2. Tiermodelle des atrialen elektrischen Remodelings bei Diabetes mellitus

Auch wenn die genauen Mechanismen noch nicht vollständig entschlüsselt werden konnten, scheinen Veränderungen der Morphologie des atrialen Aktionspotentials eine große Rolle im elektrischen Remodeling bei DM zu spielen (BOHNE et al., 2019). In einem Diabetesmodell der Ratte wurde eine verlangsamte Erregungsleitung, eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer und Veränderungen der Aktionspotentiale in unterschiedlichen Regionen des Herzens, und daraufhin eine erhöhte Anfälligkeit für Vorhofflimmern beobachtet (WATANABE et al., 2012). Dabei wurden vor allem Veränderungen der Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺- Kanäle sowie der Connexine als treibende Kräfte vermutet (**Abb. 8**).

In einer Studie mit Kaninchen mit induziertem DM Typ 1 konnte eine Reduzierung des I_{Na} in den Atrien festgestellt werden (LIU et al., 2017). Interessanterweise

wurde bei Ratten, die einen Typ 2 ausgeprägt hatten, keine Regulation dieses Ionenkanals beobachtet (LI et al., 2016). Es muss also noch geklärt werden, wie der I_{Na} im Rahmen der unterschiedlichen Diabeteserkrankungen reguliert wird, da er einen entscheidenden Einfluss auf die Dauer des atrialen Aktionspotentials, und somit auf die Entstehung von kreisenden Erregungen hat.

Kaliumkanäle tragen entscheidend zur Repolarisation des Aktionspotentials bei, wodurch sie seine Dauer, und damit auch die Anfälligkeit für beispielsweise frühe Nachdepolarisationen regulieren. In verschiedenen Studien konnte der Einfluss von Diabetes mellitus auf die atrialen K^+ -Kanäle, und somit auf die Entstehung von Arrhythmien nachgewiesen werden: bei Mäusen, bei denen durch eine hochkalorische Diät Fettsucht und Typ-2-DM ausgelöst wurde, konnte eine Reduktion von Kv4.2/4.3 in atrialen Kardiomyozyten festgestellt werden, den Kanälen, die zusammen den I_{to} bilden. Der genaue Mechanismus muss noch geklärt werden. Es schien jedoch eine Veränderung im Insulinsignaling eine Rolle zu spielen, da die Expression des Kv4.2 auch in einer herzspezifischen Insulinrezeptor-Knockoutmaus herabgesetzt war (LOPEZ-IZQUIERDO et al., 2014).

Auch die Calciumregulation ist im diabetischen Herzen verändert (ANDRADE et al., 2014). Ursächlich hierfür scheint eine veränderte Expression der Calciumkanäle zu sein. So konnte in einem Ratten-Modell des Typ-1-DM gezeigt werden, dass sowohl die mRNA als auch die Proteinexpression des Cav1.2 in den Atrien signifikant reduziert waren, während die des Cav3.1 signifikant erhöht waren, was zu einer Verlängerung der APD führte (PAN et al., 2016). Jedoch konnte keine Veränderung der Expression des Cav3.2 in diesem Modell festgestellt werden. Bei Kaninchen, bei denen durch Gabe von Alloxan ein Insulin-abhängiger Diabetes ausgelöst wurde, wurde mit Hilfe von Patch-Clamp-Untersuchungen interessanterweise eine erhöhte Dichte der Calciumkanäle vom L-Typ ($I_{Ca,L}$) beobachtet (LIU et al., 2012). Zudem führte bei diesen Tieren eine erhöhte APD zu einer gesteigerten Induzierbarkeit von VHF. Es lässt sich also festhalten, dass die Regulation dieser Ionenkanäle - abhängig vom Tiermodell - in bisherigen Studien unterschiedlich ausgefallen ist. Ob nun eine Hoch- oder doch eine Runterregulation von Calciumkanälen im Rahmen von DM Typ 1 oder Typ 2 die Entstehung von Vorhofflimmern begünstigt, und welche die genauen Zusammenhänge hierbei sind, muss noch weiter untersucht werden.

Auch wenn zur Bedeutung von Gap Junctions für das Diabetes-assoziierte

elektrische Remodeling nur wenige Daten zur Verfügung stehen, scheint eine Diabeteserkrankung Einfluss auf die Connexin-Expression und deren Funktion zu haben (**Abb. 8**). In einem Ratten-Modell des Typ-1-DM wurde beispielsweise eine reduzierte Cx40-Expression in den Atrien festgestellt. Außerdem zeigten Optical Mapping Experimente eine Abnahme der Leitungsgeschwindigkeit in den Atrien und der Homogenität der Erregungsleitung (WATANABE et al., 2012). Ähnliche proarrhythmogene Veränderungen der Atrien entdeckten Hagendorff et al. während ihrer Untersuchungen an Cx40-Knockoutmäusen (HAGENDORFF et al., 1999). In der zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit verfügbaren Literatur fanden sich keine Untersuchungen des Cx43, bei denen Expressionsänderungen im Rahmen des DM Typ 1 oder Typ 2 festgestellt werden konnten. Es gibt jedoch Hinweise, dass seine zelluläre Verteilung verändert sein könnte. Zum Beispiel konnten keine Alterationen der Expression von Cx43 in Typ-2-DM Ratten festgestellt werden, stattdessen zeigten die Tiere eine vermehrte Lateralisierung dieses Connexins im linken Atrium (LI et al., 2016). Bei dieser Umverteilung kann es zu einer erhöhten Heterogenität der Erregungsleitung kommen, da weniger Cx43-beinhaltende Gap Junctions in den Glanzstreifen der Kardiomyozyten vorhanden sind. Diese Hypothese konnte in einem Ratten-Modell des Typ-1-DM bestätigt werden: in den Ventrikeln dieser Tiere zeigten sich die Lateralisierung von Cx43 und eine veränderte Erregungsleitung (NYGREN et al., 2007).

3.2. Zusammenfassung der Tiermodelle

Die oben aufgeführten Tiermodelle lieferten wichtige Erkenntnisse zu den bislang bekannten Pathomechanismen des Diabetes-assoziierten Vorhofflimmerns. Dabei handelte es sich hauptsächlich um Versuche an der Maus und der Ratte. Den Vorteilen von Kleintiermodellen, insbesondere der Maus – wie beispielsweise die geringeren Kosten pro Tier, die kurze Gestationszeit von 19 bis 21 Tagen mit ca. 15 Tieren pro Wurf, die zahlreichen genetischen Modelle und die hohe soziale Akzeptanz – sind Nachteile entgegenzustellen wie die durchaus fragliche Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen (CLAUSS et al., 2019). Besonders im Hinblick auf die kardiovaskuläre Forschung stellen Unterschiede in der Elektrophysiologie und Herzanatomie einen wichtigen Faktor dar. Zum Beispiel schlägt das Mäuseherz mit bis zu 800 bpm – das des Menschen und auch des Schweines mit ca. 70-100 bpm. Deshalb sind geeignete Großtiermodelle für bestimmte Fragestellungen unerlässlich. Hunde-Modelle haben Limitationen

hinsichtlich ihrer Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus, beispielsweise durch ihre ausgeprägte respiratorische Arrhythmie und Unterschiede bei der Repolarisation in den Ventrikeln. Zudem sind aktuell keine genetischen Modelle verfügbar. Die Forschung an Hunden weist außerdem eine sehr geringe gesellschaftliche Akzeptanz auf und wird auch nicht mehr von den zuständigen Behörden unterstützt. Das Schwein bietet sich jedoch als Modelltier an, da die Anatomie des porcinen Herzens der des Menschen ähnelt: die Größe des Herzens und das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht entsprechen denen des Menschen, was es ermöglicht, für die Humanmedizin hergestelltes Equipment im Schwein einzusetzen. Auch können die hämodynamischen Parameter und die Klappen- und Koronaranatomie des Schweines mit denen des Menschen verglichen werden (LELOVAS et al., 2014). Zudem sind die Ernährungsweise und die gastrointestinale Struktur dieser beiden omnivoren Spezies gleich (RENNER et al., 2016). Anhand der bisher vorhandenen Schweine-Modelle für Diabetes mellitus wurden die spezifischen Diabetes-induzierten Remodeling-Prozesse bei Vorhofflimmern jedoch noch nicht untersucht. Somit ist die Etablierung eines solchen Modells von großer Bedeutung, um die oben im Kleintiermodell beschriebenen Pathomechanismen in einer dem Menschen ähnlicheren Spezies zu untersuchen, und dadurch eine bessere Übertragbarkeit der Daten auf Humanpatienten zu gewährleisten. Daher ist das Ziel der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung des *INS^{C94Y}*-Phänotyps hinsichtlich Veränderungen des Herzens auf struktureller und elektrophysiologischer Ebene und seiner Eignung als Großtiermodell des Diabetes-assoziierten Vorhofflimmerns.

III. TIERE, MATERIAL UND METHODEN

1. *In vivo*

1.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Als Tierspezies wurde das Schwein eingesetzt. Je nach Genotyp wurden die Tiere in die beiden folgenden Versuchsgruppen aufgeteilt: 1) Kontrolle (WT) oder 2) Diabetes (*INS^{C94Y}*). Insgesamt wurden 33 Tiere untersucht, davon 18 in der Kontrollgruppe und 15 in der *INS^{C94Y}*-Gruppe. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere zwischen fünf und sechs Monate alt und wogen abhängig vom Genotyp ungefähr 80 (WT) beziehungsweise 50 (*INS^{C94Y}*) kg. Alle Versuche wurden zuvor von der Regierung von Oberbayern genehmigt (ROB-55.2-2532.Vet_02-18-69).

Die (Auf-) Zucht der Tiere fand am Moorversuchsgut des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität München in Oberschleißheim statt. Die *INS^{C94Y}*-Schweine wurden durch die Methode des Zellkerntransfers erzeugt (RENNER et al., 2013). Dafür wurde das porcine *INS*-Gen, in dem ein Basenaustausch von G→A erzeugt wurde, was wiederum den Aminosäureaustausch von Cystein nach Tyrosin an der Position 94 (C94Y) zur Folge hat, zusammen mit essentiellen regulatorischen Elementen und einer Neomycin-Selektionskassette in einen *INS^{C94Y}*-Expressionsvektor eingebaut. Dieser wurde dann in primäre, fetale Fibroblasten männlicher Schweine transferiert. Für den Zellkerntransfer wurde eine Ansammlung stabiler Zellklone verwendet, um nach Implantation in scheinträchtige Empfängertiere genetisch veränderte Gründerschweine zu generieren. Zur Bestätigung des Genotyps wurden PCR-Analysen mit transgenspezifischen Vorwärts- (CAG CTG TGC TCG ACG TTG TC) und Rückwärtsprimern (GAG TCA ACT AGT CCT CAG AAG AAA G) sowie Southern-Blot-Analysen zum Nachweis der Neomycin-Kassette durchgeführt.

Im Moorversuchsgut erhielten die *INS^{C94Y}*-Schweine außerdem eine Behandlung mit Insulin. Um das Krankheitsbild, einen ausgeprägten, beziehungsweise schlecht kontrollierten diabetischen Status und den Verlauf so getreu wie möglich nachzubilden, wurde jedoch auf eine intensivierete Insulintherapie verzichtet. Im Alter von fünf bis maximal sechs Monaten wurden die Schweine sodann an das Walter-Brendel-Zentrum transportiert. Dies fand zur Akklimatisierung der Tiere drei Tage vor dem Endversuch statt. Während dieser Zeit wurden die Tiere täglich

in Augenschein genommen und insbesondere auf mögliche Komplikationserscheinungen in Zusammenhang des *INS^{C94Y}*-Phänotyps untersucht. Dabei wurde auch der Nüchternblutzuckerwert mit Hilfe eines Glukometers bestimmt: nach Hautdesinfektion einer Stelle am Ohr wurde aus dieser mittels Lanzettspitze ein Blutropfen gewonnen, in dem der Blutzucker gemessen wurde. Falls dieser überhalb von 300 mg/dl lag, erhielten die Schweine Acarbose (Glucobay®; 2 x 50 mg pro Tag) p.o., welches ihnen fünf Minuten vor der Fütterung mit einem Stück Apfel angeboten wurde.

In der Versuchstierhaltung im Walter-Brendel-Zentrum sind die erforderlichen Stallungen entsprechend den Voraussetzungen S1 nach der Gentechnik-Sicherheitsverordnung von 1990 vorhanden. Die Innenboxen (1,5 x 2,0 m) sind zur Trinkwasserversorgung mit automatischen Nippeltränken versehen. Ihre Liegeflächen sind mit speziellen Fliesen ausgekleidet. Zusätzlich wurde täglich nach Reinigung frisches Stroh in die Innenboxen eingelegt. Zu überdachten Außenausläufen (4 m x 4 m), deren Boden aus Beton besteht, mit Tageslicht herrschte stets freie Zugangsmöglichkeit. Zum Enrichment der Tierhaltung im Walter-Brendel-Zentrum zählten Tierbälle in den Ausläufen sowie trockene Nudeln im Stroh in den Innenboxen. Die Tiere erhielten Wasser ad libitum und ein geeignetes Pelletfutter. Zusätzlich wurden Luzerne, Vollkorn-, Obst- und Gemüseprodukte von den Betreuern angeboten. Zu Futter und Wasser bestand freier Zugang.

1.2. Materialien

1.2.1. Geräte

300A Servo Ventilator, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen
C-Bogen Exposcop 8000 Ziehm GmbH, Nürnberg
Druckabnehmer Statham Transducer, P23 ID Statham Instruments, Inc., Oxnard, California, USA
Elektrokauter VIO® 50 C, Erbe, Tübingen
HP Codemaster XL Defibrillator, Soma Tech Intl., Bloomfield, CT, USA
MLCL CardioLab System, GE Healthcare, USA

Modul für Multiparameter-Monitor Infinity Hemo4, Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck
OP-Sauger KATASPIR PRO, Medutek, Bremen
Perfusor Space, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Pulsoxymeter Ohmeda BIOX 3700e, Ohmeda Louisville, CO, USA
RAPIDLab® 1200 Blutgasmessgerät, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen
SC 9000XL Patientenmonitor, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen
Universal Heart Stimulator UHS 20, Biotronik, Baar, Schweiz

1.2.2. Verbrauchsmaterialien

Blue Sensor® VL-00S EKG-Elektroden, Ambu GmbH, Bad Nauheim
Ethibond Excel Sutupak 6 x 45 cm Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
6-F Super Torque Plus pigtail diagnostic catheter, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
Gaze NobagazeR Kompressen, Noba Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter
Judkins-Links-Katheter JL4 Thrulumen, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
Judkins-Rechts-Katheter JR4 Thrulumen, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
Katheterschleusen 8-F arterial sheath Avanti+, 9-F venous sheath Avanti+, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
Klebeplaster LeucoplastR, hospital BSN medical GmbH, Hamburg
Multipolarer Diagnostikkatheter, BIOTRONIK SE & Co. KG, Berlin
Rüsch Super SafetyClear Endotrachealtubus 6.5-8.0 mm, Wolfram Droh GmbH,

Mainz
Swan-Ganz Katheter 7-F, Edwards Lifesciences LLC, USA
Vicryl CTX Plus 70 cm Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt

1.2.3. Medikamente

Narkotika

Azaperon 40 mg, Injektionslösung
Ketaset 100 mg/ml, Injektionslösung
Midazolam Amp. 15 mg / 3 ml
Propofol 2% IFL 1000 mg / 50 ml

Analgetika

Carprofen 100 mg, Kautabletten
Fentadon 50 µg/ml, Injektionslösung

Infusionslösungen

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

Antikoagulation

Heparin-NaIFL, 25.000 IE / 5 ml

Antidiabetika

Acarbose, 50 mg Tabletten

Sonstiges

Atropinsulfat Amp. 0,5 mg / 1 ml

Bepanthen Augensalbe

Kaliumchloridlösung 7,45 % Amp. 20 ml

Magnesiumsulfat-7H ₂ O Amp. 5 g / 10 ml
--

Kontrastmittel

Imeron 350, Iomeprol Bracco Imaging, Konstanz

1.2.4. Sonstiges

Ambu [®] Silikon-Beatmungsbeutel, Ambu GmbH, Bad Nauheim

Glukometer ACCU-Chek Performa, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim

HEINE Standard Laryngoskop-Batteriegriff, HEINE Optotechnik GmbH & Co. KG, Gilching

Miller VET F.O. LED Laryngoskop-Spatel, Covetrus AT GmbH, Brunn am Gebirge
--

PORTEX [®] Intubationsmandrin, Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn
--

1.3. In vivo Methoden**1.3.1. Studiendesign**

Der Versuchsaufbau sah einen einzigen Versuchstag vor. Im Zuge des Eingriffes erfolgte die invasive Bestimmung hämodynamischer Basisparameter mittels Links-

und Rechtsherzkatheteruntersuchung. Im Anschluss wurde eine elektrophysiologische Untersuchung (EPU) mit Induktion von Vorhofflimmern mittels Burststimulation durchgeführt. Zuletzt erfolgte die schmerzfreie Euthanasie der Tiere sowie die Entnahme der Herzen zur weiteren molekularbiologischen und histologischen Untersuchung.

1.3.2. Narkoseeinleitung

Nachdem sie für ca. zwölf Stunden nüchtern gehalten worden waren, erhielten WT- und *INS^{C94Y}*-Schweine im Alter von fünf bis sechs Monaten eine intramuskuläre Narkoseeinleitung mittels Ketamin (20 mg/kg), Azaperon (2 mg/kg) und Atropinsulfat (0,05 mg/kg). Diese Substanzen wurden in einer Spritze als Mischung aufgezoogen und in die Nackenmuskulatur hinter dem Ohr am Übergang der unbehaarten zur behaarten Haut injiziert. Durch Verwendung einer Heidelberger Verlängerung konnte auch nach der initialen Schreckreaktion bei der unmittelbaren Punktion eine Verabreichung der Medikamente erfolgen, wodurch einerseits eine vollständige Medikamentengabe, andererseits eine Reduzierung der Belastung der Tiere (z.B. durch Vermeidung einer weiteren Punktion) erreicht wurde. Nach Eintreten der Narkose und einer Wartezeit von ca. fünf Minuten wurde ein periphervenöser Zugang an der lateralen Ohrvene gelegt, über den die Narkose mittels Midazolam (0,5 mg/kg i.v.) vertieft wurde.

1.3.3. Intubation und Beatmung

Anschließend wurden die Schweine in den OP-Raum und für die orale Intubation in Bauchlage gebracht. Dies kann insbesondere bei Schweinen durch die besonderen anatomischen Gegebenheiten des Maul-Rachenraums (langer Rüssel, dicker, fleischiger Zungengrund, weit in den Rachenraum hineinragender weicher Gaumen, Lage der Epiglottis) eine Herausforderung darstellen. Die endotracheale Intubation wurde in der vorliegenden Arbeit folgendermaßen durchgeführt: nachdem der Kopf des Tieres von einem Assistenten leicht angehoben wurde und die Maulhöhle des Schweines mit Hilfe zweier Gazetücher geöffnet wurde, wurde ein Laryngoskop in die Maulhöhle eingeführt. Dieses wurde hierbei in der nicht-dominanten Hand gehalten. Unter leichtem Druck auf die Zunge wurde sodann versucht, die Stimmbänder darzustellen. Falls sie durch die Epiglottis verlegt waren, konnte diese durch zusätzlichen Druck des Laryngoskops auf den Zungengrund oder unter Einsatz eines Yankauer Saugansatzes vorsichtig aus dem

weichen Gaumen befreit werden. Nach Identifizierung der Stimmritze wurde mit der dominanten Hand ein Tubus (6,0–8,5 mm innerer Durchmesser und 26–28 cm Länge, je nach Körpergewicht des Tieres) unter ständiger Sichtkontrolle zwischen den beiden Ligamenta vocalia in die Trachea eingeführt. Dieser Vorgang wurde unter Zuhilfenahme eines Intubationsmandrins durchgeführt. Wurde hierbei ein Widerstand festgestellt, wurde die Sedation mit Hilfe eines Bolus Propofol (0,5-1 mg/kg i.v.) vertieft. Hiernach wurde der Tubus mit Hilfe einer 20 ml Spritze geblockt. Nachdem die Intubation erfolgt war und durch Auskultation der beiden Thoraxhälften von lateral während manueller Beatmung mittels Beatmungsbeutel überprüft wurde, wurde der Tubus mit einem Gazetuch am Oberkiefer des Schweines fixiert. Im Anschluss wurden die Schweine in Rückenlage auf den OP-Tisch gebracht und druckkontrolliert beatmet. Dafür wurde ein initialer Beatmungsdruck von 20-25 mbar, ein PEEP von 5 mbar und eine Atemfrequenz von 16/min., um ein Atemzugvolumen von 8-12 ml/kg Körpergewicht zu erreichen, gewählt. Weitere Anpassungen der Beatmungsparameter erfolgten entsprechend der wiederholten Blutgasanalysen im Verlauf. Folgende Werte wurden hierbei als Normalwerte der arteriellen Blutgasanalyse betrachtet: pH: 7,36 - 7,44; pCO₂: 35 - 45 mmHg; HCO₃⁻: 22 - 26 mmol/l; pO₂: 75 - 100 mmHg; sO₂ > 95 % (HANNON et al., 1990).

1.3.4. Narkose

Die Analgesie wurde dann mittels Fentanyl (0,05-0,1 mg/kg i.v.) erreicht, welches im Folgenden zur perioperativen Analgesie im Abstand von 30 Minuten appliziert wurde. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch Allgemeinanästhesie mit Propofol (0,5 mg/kg/min i.v.). Die Überprüfung der Narkosetiefe erfolgte durch Testung des Afterklauenreflexes sowie durch Überwachung der Herzfrequenz.

1.3.5. Perioperatives Monitoring

Über den gesamten Verlauf des Versuchs wurde die Körpertemperatur mittels Rektalsonde ermittelt. Sollte diese auf unter 37,5 °C abfallen, war eine Versorgung der Tiere mit körperwarmen Infusionslösungen vorgesehen. Zusätzlich wurden kontinuierlich die Vitalparameter bestimmt: Puls und Sauerstoffsättigung über ein Pulsoxymeter am Schwanz des Schweines sowie der arterielle Blutdruck über die invasive Messung nach Anlage der arteriellen Schleuse. Außerdem fand eine ständige Überwachung der Tiere mit Hilfe einer EKG-Ableitung statt.

Die Messung des arteriellen Blutdrucks erfolgte invasiv über die arterielle Schleuse durch ein Druckwandlersystem. Dieser konnte sodann durch optische Darstellung auf einem Monitor überprüft werden. Der Nullabgleich wurde gegen den atmosphärischen Druck durchgeführt. Im Anschluss wurde getestet, ob das komplette System luftleer und mit 0,9 %iger NaCl-Lösung befüllt war. Erst dann begann die eigentliche Messung, die kontinuierlich über den gesamten restlichen Versuch hinweg erfolgte.

Zur Aufzeichnung eines 12-Kanal-EKGs wurden insgesamt zehn Klebeelektroden verwendet. An jeder Extremität wurde jeweils eine Elektrode aufgeklebt, im Bereich des Brustkorbs wurden sechs weitere Elektroden angebracht: parasternal rechts auf Höhe des vierten Interkostalraums (Elektrode V1), parasternal links auf Höhe des vierten Interkostalraums (Elektrode V2), zwischen V2 und V4 (Elektrode V3), auf den Schnittpunkt des fünften Interkostalraums und der Medioclavicularlinie links (Elektrode V4), vordere Axillarlinie links auf Höhe des fünften Interkostalraums (Elektrode V5), sowie mittlere Axillarlinie links auf Höhe des fünften Interkostalraums. Vorab wurden die benötigten Stellen rasiert, um eine bessere Kontaktfläche und damit ein besseres Signal zu erhalten. Die Elektroden wurden anschließend mit einem entsprechenden Gerät verbunden und ein 12-Kanal-EKG aufgezeichnet.

1.3.6. Anlage der Schleusen

Vor Beginn der Messungen wurde das OP-Feld rasiert und mit Alkohol desinfiziert. Nun wurde der *M. sternocleidomastoideus* palpiert und eine ca. vier cm lange Inzision auf Höhe der Drosselrinne mit Hilfe eines Elektrokauters gemacht, wobei die analgetische Abdeckung durch den zuvor applizierten Bolus Fentanyl (0,05 mg/kg i.v.) gesichert wurde (s.o.). Dann wurde das subkutane Gewebe stumpf mit einer Klemme präpariert, bis der Muskel freigelegt war. Um die *V. jugularis externa* darzustellen, musste das Gewebe lateral davon stumpf sezirt und die Vene von der sie umgebenden Faszie befreit werden, bis die Adventitia sichtbar war (**Abb. 9**). Für die Schleusenanlage wurden zwei chirurgische Fäden benötigt: mit dem einen wurde die Vene weiter distal vom Herzen ligiert und der Faden unter mäßigem Zug mit einer Klemme an der Haut fixiert, mit dem anderen wurde weiter proximal eine Schlaufe um das Gefäß gelegt, aber nicht festgezogen, sondern durch einen Assistenten unter Spannung gehalten, so dass kein Blutfluss mehr stattfand. In der Mitte der Vene wurde sodann ein ca. drei mm langer Schnitt mit Hilfe einer

Irisschere gesetzt und die venöse Katheterschleuse (11 F) eingebracht. Nachdem diese festgeknotet worden war, konnte die Schleuse mit 0,9 % NaCl gespült werden. Im Anschluss erfolgte die prophylaktische Gabe von 5.000 IE Heparin. Zur Anlage der arteriellen Schleuse (9 F) wurde die Karotisscheide medial des *M. sternocleidomastoideus* stumpf seziiert und die *A. carotis interna* unter Schonung der *V. jugularis interna* und des *N. vagus* freipräpariert. Um die Arterie zu lokalisieren war es hilfreich, den Karotispuls zu palpieren. Dann wurde das oben beschriebene Vorgehen wiederholt, und zum Schluss eine arterielle Blutprobe zur Blutgasmessung entnommen. Dabei wurde insbesondere auf den Kaliumwert geachtet; Werte zwischen 3,4 und 5,0 mmol/l wurden als normal erachtet. Bei einem Wert von $< 3,4$ mmol/l wurden zusätzlich 40 mmol/l K^+ über die Infusion gegeben und das Kalium im weiteren Verlauf engmaschig kontrolliert.

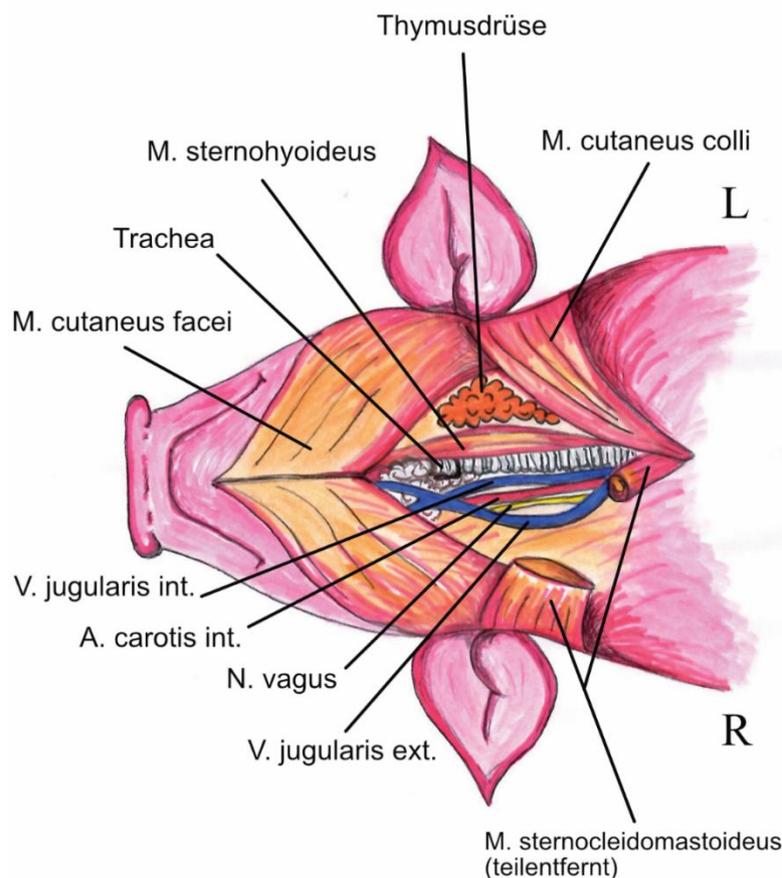


Abbildung 9: Skizzierung der Anatomie des Halses des Schweines mit Zugang zur V. jugularis externa und A. carotis interna (Zeichnung angefertigt nach McCALL et al., 2012).

1.3.7. Messung des linksventrikulären Drucks (LVP und LVEDP)

Mittels des Pigtailkatheters (s.o.) konnten die linksventrikulären Drücke unter Ruhebedingungen (baseline) und unter Stimulation bei 130/min. gemessen werden. Es wurden jeweils der systolische linksventrikuläre Druck (LVP) sowie der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) gemessen.

1.3.8. Rechtsherzkatheteruntersuchung

Für die Bestimmung des Drucks im rechten Atrium (RA), im rechten Ventrikel (RV), der Pulmonalarterie (PA) sowie des PCWPs wurde ein Swan-Ganz-Katheter verwendet, der über die venöse Schleuse in einen Endast der Pulmonalarterie eingeschwenkt wurde. Durch Insufflation eines an der Katheterspitze angebrachten Ballons konnte der sogenannte pulmonalarterielle Verschlussdruck (auch Wedge-Druck oder PCWP) gemessen werden, der dem linksatrialen Druck entspricht: da sich der Druckabnehmer vor dem Ballon befindet, entsteht bei offener und nicht-stenosierter Mitralklappe eine stehende Flüssigkeitssäule vom linken Vorhof bis zum Druckabnehmer in der Pulmonalarterie und erlaubt damit die indirekte Messung des LA-Drucks. Nach Desufflation des Swan-Ganz-Katheters konnte der Druck in der Pulmonalarterie bestimmt werden. Hiernach wurde der Katheter unter Durchleuchtung und Kontrolle der Druckkurven am Monitor langsam aus der Pulmonalarterie über den rechten Ventrikel in den rechten Vorhof zurückgezogen, um dort die jeweiligen Drücke zu messen.

1.3.9. Elektrophysiologische Untersuchung

Die EPU wurde mit einem MLCL CardioLab System (GE Healthcare, USA) durchgeführt. Über die venöse Katheterschleuse wurde ein multipolarer Stimulationskatheter eingeführt und im hohen rechten Vorhof nahe des Sinusknotens platziert. Anschließend wurden verschiedene Messungen und Stimulationsmanöver vorgenommen:

Intrinsische Zykluslänge: Die Zeit zwischen zwei intrinsischen atrialen Signalen, die mit dem EP-Katheter gemessen wurde.

Stimulationsreizschwelle: Das Herz wurde mit einer schnelleren Frequenz als der intrinsischen Zykluslänge stimuliert und hierbei die Stromstärke schrittweise reduziert, bis der Stimulus keine erkennbare Erregung mehr auslöste. Die Stromstärke, die gerade noch eine Erregung auslöst, stellt die Stimulationsreizschwelle dar. Für die nachfolgenden Stimulationsmanöver wurde

zur Sicherheit mit einer doppelten Sicherheitsmarge stimuliert.

Sinusknotenerholungszeit (engl. *sinus node recovery time, SNRT*): Es erfolgte die zweimalige Stimulation im Vorhof mit Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms für die Dauer von 30 Sekunden. Unter der Sinusknotenerholungszeit versteht man das Intervall zwischen dem letzten Stimulus und dem ersten intrinsischen Signal im Vorhof.

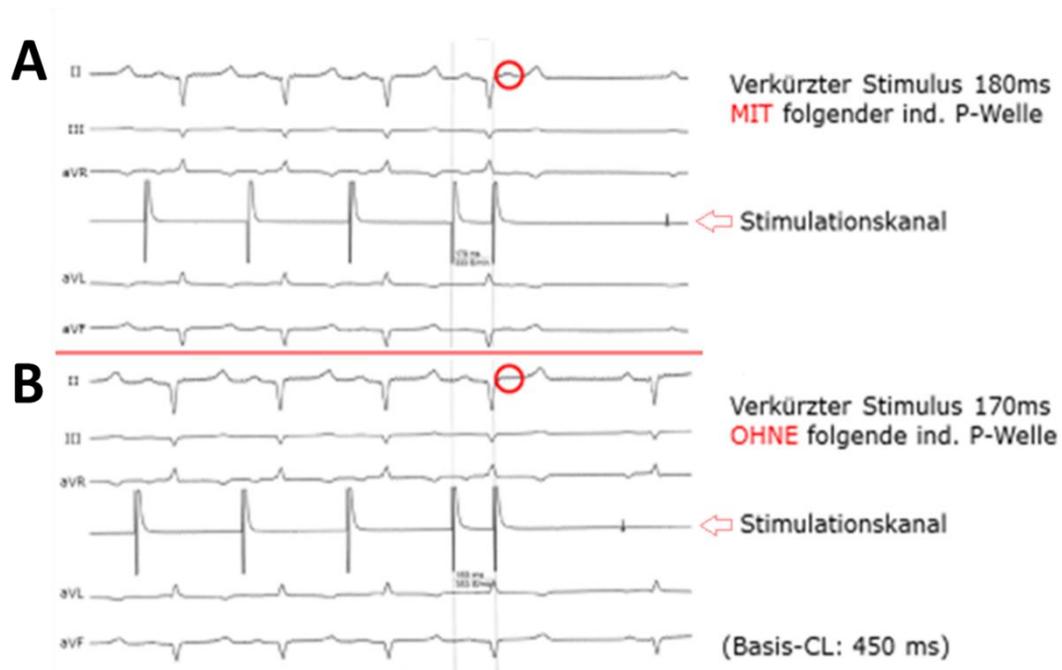


Abbildung 10. Bestimmung der atrialen effektiven Refraktärperiode (AERP) in einem *INS^{C94Y}*-Schwein bei einer Basiszykluslänge von 450 ms mittels Extrastimulus. Repräsentative EKG-Aufzeichnungen mit den Ableitungen II, III, aVR, aVL, aVF und dem Stimulationskanal, aufgenommen mit Hilfe des EP-Katheters, der im hohen rechten Atrium (HRA) platziert wurde. Bei einem verkürzten Stimulus (S2) von 180 ms folgte eine P-Welle (A: roter Kreis), bei 170 ms war diese nicht mehr zu beobachten (B: roter Kreis) und damit die AERP bestimmt.

Refraktärzeiten: Sieben Basisschlägen (S1) bei verschiedenen Basiszykluslängen (500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms) folgte ein vorzeitiger Extrastimulus (S2), welcher immer kürzer angekoppelt wurde (in 10 ms Dekrementen), bis dieser Stimulus keine erkennbare Erregung mehr auslöste, das Gewebe damit bereits refraktär war. Die effektive Refraktärperiode entspricht demzufolge der Zykluslänge des letzten vorzeitigen Stimulus, der gerade noch eine Erregung auslösen konnte. Es wurden die atriale (AERP; **Abb. 10**), die

atrioventrikuläre (AVERP) und die ventrikuläre (VERP) effektive Refraktärzeit bestimmt.

Bestimmung des Wenckebachpunkts: Der Vorhof wurde schrittweise schneller stimuliert (die Stimulationszykluslänge wurde in 10 ms Dekrementen reduziert), was zu einer zunehmenden Verlängerung der AV-Überleitung führte. Der Wenckebachpunkt wurde erreicht, sobald eine ventrikuläre Erregung ausfiel, d.h. keine 1:1-AV-Überleitung erfolgte.

Induktion von Arrhythmien in Vorhof: mittels Burst-Stimulation (1200 bpm; 20 Hz) für sechs Sekunden erfolgte die Induktion von Arrhythmien (**Abb. 11**). Falls kein VHF ausgelöst werden konnte, wurde 30 Sekunden lang gewartet bevor das nächste Manöver gestartet wurde. Dieses Vorgehen wurde zehn Mal pro Schwein wiederholt. VHF war als eine atriale arrhythmische Episode mit irregulären RR-Intervallen, die mindestens 30 Sekunden andauerte, definiert. Eine Episode von 30 Minuten wurde als persistierendes Vorhofflimmern gewertet. In diesem Fall wurden die Tiere mit Hilfe externer Kardioversion wieder in den Sinusrhythmus konvertiert. Dafür wurde das EKG-Kabel des Defibrillators an das Schwein angeschlossen. Die Schockabgabe wurde dabei mit 200 Joule und R-Zackensynchronisiert durchgeführt, um nicht in der vulnerablen Phase Kammerflimmern auszulösen.

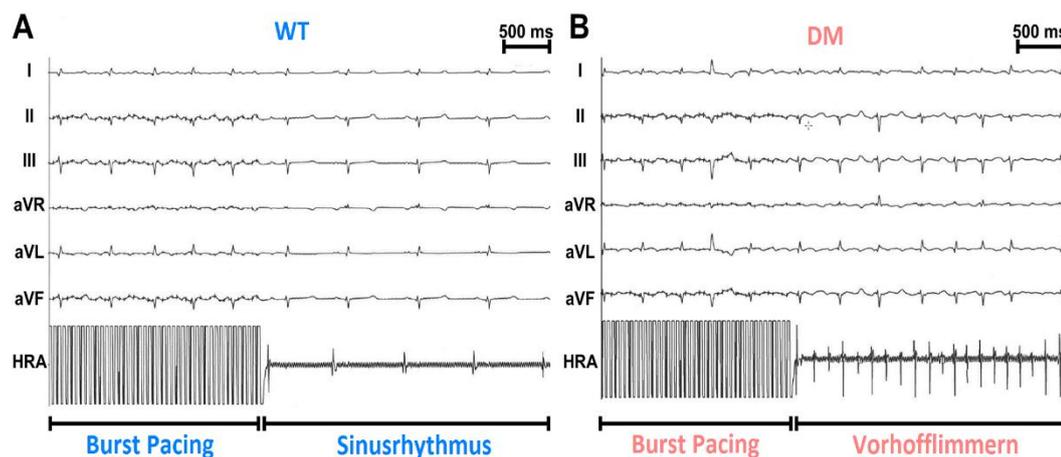


Abbildung 11: Repräsentative Aufzeichnungen (Registriereschwindigkeit 50 mm/s) einer EPU bei einem WT (A)- und einem DM (B)-Schwein. Von oben nach unten sind die EKG-Ableitungen I, II, III, aVR, aVL und aVF sowie das intrakardiale Elektrogramm dargestellt, das mit Hilfe des im hohen rechten Atrium (HRA) platzierten EP-Katheters aufgezeichnet wurde. Die hochfrequenten Stimulationsartefakte in der linken Bildhälfte repräsentieren das Burst Pacing, in der rechten Bildhälfte zeigt sich stabiler Sinusrhythmus bei den WT-Schweinen (A) bzw. Vorhofflimmern mit schneller atrialer Frequenz und Absoluter Arrhythmie bei DM-Tieren (B).

1.3.10. Herzentnahme

Im Anschluss an die EPU wurden den Schweinen 0,05-0,1 mg/kg Fentanyl und 0,5 mg/kg Midazolam i.v. verabreicht und der Thorax nach fünfminütiger Wartezeit durch mediane Thorakotomie eröffnet. Das Herz wurde vom Perikard befreit. Dann wurden die Tiere durch Durchtrennung der großen Herzgefäße und sofortiges Entbluten schmerzfrei getötet. Nach der Herzentnahme wurden Gewebeproben aus vier verschiedenen Regionen (rechter und linker Vorhof (jeweils Herzohr), rechter und linker Ventrikel) gesammelt und für nachfolgende histologische und molekularbiologische Untersuchungen asserviert. Dafür wurden die Proben entweder in Histosetten gegeben und für ca. 24 Stunden in 4 % Formalinlösung gelagert, bis sie anschließend in 70 % Ethanol aufbewahrt wurden, oder zusammen mit wasserlöslichem Einbettmedium für Kryostatschnitte in Kryoeinbettformen auf Trockeneis platziert, bevor sie bei -80 °C asserviert wurden.

2. *In vitro*

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Sterilbank

Hera Safe Heraeus Instruments, Hanau

Zentrifugen

MiniSpin plus Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

Zentrifuge 5430R Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
--

PCR-Cycler

C1000 Touch Thermal Cycler Bio-Rad, München

CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, München
--

Waagen

Pioneer PA114C Ohaus, Pine Brook, USA
Präzisionswaage EWJ, Kern, Balingen
Sartorius BP 610 Sartorius, Göttingen

Mikroskope

Axio Imager 2 Forschungsmikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Digitales Forschungsmikroskop DM6 B, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Sonstiges

AccuJet Pipette Brand, Wertheim
COP 30 Cooling Plate, Medite GmbH, Burgdorf
CryoStar™ NX70 Kryostat, Thermo-Fisher, München
Cryovial sterile 2ml, Simport, Bernard-Pilon, Canada
Eismaschine Ziegra, Isernhagen
Färbekammer StainTray™, Carl Roth, Karlsruhe
Färbekasten ROTILABO®, Carl Roth, Karlsruhe
Gefrierschrank -20 °C, Comfort Liebherr, Biberach an der Ris
Gelrunner Power Pac 3000, Bio-Rad, München
Gelkammer, Bio-Rad, München
Gelviewer GelDoc 2000, Bio-Rad, München
Imager Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH, Herrsching
Kochplatte RCT Basic, IKA Labortechnik, Staufen
Konische Zentrifugenröhrchen 50ml Falcon, Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Kühlschrank KT1530, Liebherr, Biberach an der Ris

Magnetrührer IKAMAG-REO, IKA Labortechnik, Staufen
Menzel-Gläser Deckgläser, Thermo Scientific, Braunschweig
Menzel-Gläser Objektträger Superfrost Plus, Thermo Scientific, Braunschweig
Microm HM 340E Mikrotom, Thermo-Fisher, München
Mikrotom RM2245, Leica, Wetzlar
NanoDrop™ 2000 Photometer, Thermo Fisher Scientific, München
Nitrocellulose, 0,2 µm Pore Size Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Nitrocellulose, 0,45 µm Pore Size Invitrogen, Carlsbad, California, USA
Objektträgerhalter ROTILABO®, Carl Roth, Karlsruhe
pH-Meter pH538, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pipetten Eppendorf Research Plus, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Wesseling-Berzdorf
Pipetten pipetman® 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl, Gilson, Villiers le bel, Frankreich
PMR-30 Mini Rocker-Shaker, Grant Instruments, Cambridge, United Kingdom
Super PAP Pen Liquid Blocker, Science Services, München
Thermomixer®, Eppendorf, Hamburg
Tissue Embedder EG1150H, Leica, Wetzlar
TT Cryomold® Standard, square (25x20x5mm), 4557, Sakura Finetek USA. Inc. Torrance, CA
Ultraschallhomogenisator Ultra-Turrax, Janke&Kunkel, Staufen, Breisgau
Ultratiefkühlschrank CryoCube® F740hi, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Westernrunner Power Pac HC, Bio-Rad, München

2.1.2. Kits und Mastermixe

LMW-SDS Marker Kit, GE Healthcare, Freiburg
MagicMark™ XP Western Protein Standard, Life Technologies, Darmstadt
NucleoSpin® RNA aus Plasma, Macherey-Nagel, Düren
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x), Life Technologies, Darmstadt
Pierce BCA Protein Assay Thermo-Fisher, München
Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo-Fisher, München
Precision Plus Dual Color Standards, Bio-Rad, München
Pierce Western Blot Signal Enhancer, Thermo-Fisher
Spectra Multicolor High Range Protein-Marker, Thermo Scientific
SuperScript IV Reverse Transcriptase, Thermo-Fisher Scientific, Lithuania
SYBRGreen®, Bio-Rad, München
TaqMan® MicroRNA RT Kit, Applied Biosystems, Darmstadt
TaqMan® Universal PCR Mastermix, Applied Biosystems, Darmstadt

2.1.3. Chemikalien

Albumin Fraktion V (BSA), Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat, Carl Roth, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAPI, Hoechst 33342, Trihydrochloride, Invitrogen
EDTA, Carl Roth, Karlsruhe
Fluorescence Mounting Medium, Dako North America, Inc., Carpinteria, California
Formaldehyde solution, 16 %, methanol free, 10ml, Thermo Scientific

Glycerol, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycine, Serva, Heidelberg
Masson-Goldner-Trichrom Staining Kit 3459.1, Carl Roth, Karlsruhe
Methanol, Merck, Darmstadt
Milchpulver, Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid, Carl Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid, Carl Roth, Karlsruhe
Normal Donkey Serum, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nuclease-Free Water, Qiagen, Hilden
Natriumfluorid, Carl Roth, Karlsruhe
Pertex [®] , Medite, Burgdorf
Picrosirius Red Stain Kit 250ml, Polysciences, Eppelheim
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor, Roche, Unterhaching
Ponceau S Solution, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Roti-Free Stripping Puffer, Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 30, Carl Roth, Karlsruhe
SDS ultra pure, Carl Roth, Karlsruhe
TEMED, Carl Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek [®] O.C.T [™] Compound, Sakura Finetek USA. Inc. Torrance, CA
TRIS, Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-Hydrochlorid, Carl Roth, Karlsruhe
TRIzol [™] Reagenz, Invitrogen [™] , Thermo Scientific
TRIzol [™] Reagenz, Invitrogen [™] , Thermo Scientific
TWEEN [®] 20, P2287, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.4. Oligonukleotidprimer für die RT-qPCR

CACNA1C Forward Primer	GTC CAT GAA CAT GCC CCT GA
CACNA1C Reverse Primer	GCG TAA AAC TTG CCA ACC GT
EMILIN1 Pig, PrimePCR SYBRGreen [®] Assay Bio-Rad (Assay ID: qSscCED0008548)	
FBN1 Pig, PrimePCR SYBRGreen [®] Assay Bio-Rad (Assay ID: qSscCID0004466)	
FN1 Pig, PrimePCR SYBRGreen [®] Assay Bio-Rad (Assay ID: qSscCID0003939)	
GAPDH Forward Primer	TCG GAG TGA ACG GAT TTG
GAPDH Reverse Primer	CCT GGA AGA TGG TGA TGG
GJA1 Forward Primer	CTC TGA GGC GTG CCT ACT T
GJA1 Reverse Primer	TCC AGC GGT GGA ATA GGC TT
GJA4 Forward Primer	GAG GAT GGT CAC CTG CGA AT
GJA4 Reverse Primer	TAG AGA CGC CAC TGG CCA TA
GJA5 Forward Primer	CGG AAA TTC CAG ACA GGA GGA A
GJA5 Reverse Primer	AGG AAG CTC CAG TCT CCC AT
GJC1 Forward Primer	GGA ATC TGG AAA AGT TGG AAG C
GJC1 Reverse Primer	CAA ACT TGC TCT GCT CGT CG
KCNA4 Pig, PrimePCR SYBRGreen [®] Assay Bio-Rad (Assay ID: qSscCED0022004)	
KCND2 Forward Primer	GAT GTG TGG AGA GAA CCC CG
KCND2 Reverse Primer	GCC TTC AGG GGT GGT TAC TG
KCND3 Forward Primer	AGA GAG CTG ATA AGC GCA GG
KCND3 Reverse Primer	CAA GAT AGG ACA ACC CAG TGG T
KCNE1 Forward Primer	CCG GTG GTG TCA AGT CTG AA
KCNE1 Reverse Primer	GAT CAT CCT GAG TGG CAG GG
KCNE2 Forward Primer	ACG AGA ACA CTC CAA CGA CC

KCNE2 Reverse Primer	TGG ATG GTG GCC CTT GAT TC
KCNJ2 Forward Primer	GAG AAC CAA CCG CTA CAG CA
KCNJ2 Reverse Primer	CCA CGT TGA TGA ACT GCA CG
KCNJ4 Forward Primer	CTG CCA CTG AAA TCG GTT CG
KCNJ4 Reverse Primer	TGC ATT GGC CGT TCT TCT TG
KCNJ12 Forward Primer	TAG CCT CAG ACC CCA CTC TC
KCNJ12 Reverse Primer	CCA CAG GGA CTC CAC ATC AC
KCNQ1 Forward Primer	CAG TTC ACG AGA ACC AAC AGC
KCNQ1 Reverse Primer	GCC TTG GGA GTA CTG CTC TAT
SCNA5 Forward Primer	AAT GGC ACC TCC GAT GTG TT
SCNA5 Reverse Primer	GCG TCA TCA GTC GGA AGA GT

2.1.5. TaqMan® Sonden für die RT-qPCR

Collagen I, Ss03373340_m1, Life Technologies
Collagen III, Ss04323794_m1, Life Technologies
CTGF, Ss03392397_m1, Life Technologies
GAPDH, Ss03374854_g1, Life Technologies
SMAD3, Ss03382808_u1, Life Technologies
TGF- β 1, Ss03382325_u1, Life Technologies

2.1.6. Antikörper

2.1.6.1. Primäre Antikörper

Goat polyclonal to Desmin Antibody, NBP1-45143, Novus biologicals
Rabbit anti-CTGF Antibody, ab5097, Abcam
Rabbit anti-GAPDH Antibody - Loading Control, ab190304, Abcam

Rabbit anti-pSmad3 Antibody, NBP1-77836, Novus Biologicals
Rabbit anti-Smad3 Antibody, NB100-56479, Novus Biologicals
Rabbit anti-TGF beta 1 Antibody, ab92486, Abcam
Rabbit polyclonal to Connexin 43 / GJA1 Antibody, ab11370, Abcam

2.1.6.2. Sekundäre Antikörper

Donkey anti-goat H&L IgG (Cy3) Secondary Antibody, ab6949, Abcam
Donkey anti-rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488, Thermo Fisher
Goat anti-rabbit IgG (HRP) Secondary Antibody, ab97051, Abcam

2.1.7. Software

Adobe Photoshop CS3 Extended Version 10.0
GraphPad Prism Version 8.0.1.244, GraphPad Software Inc. La Jolla, USA
ImageJ National Institute of Health, USA
Microsoft Office Suite 2016, Microsoft Corporation, Redmond, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Proteinisolation

Zur Proteinisolation wurden 100 bis 200 mg von Gewebeproben aus den folgenden Herzregionen verwendet: LAA, LV, RAA, RV. Diese waren zuvor kontinuierlich bei -80 °C asserviert worden. Sobald geeignete Stücke abgewogen waren, wurden sie in folgender Lösung homogenisiert:

Kraniaspuffer	300 ml
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 ₂ O	207 ml

Daraus wurde dann eine Kraniaslösung nach dem folgenden Prinzip hergestellt: pro zehn ml Kraniaspuffer wurden je eine Tablette *cOmplete Mini* Protease Inhibitor und eine Tablette des *PhosSTOP* Phosphatase Inhibitor dazugegeben und durch kräftiges Durchmischen darin gelöst.

Die Homogenisierung des Gewebes fand unter Verwendung eines Ultraschallhomogenisators statt. Dafür wurde die fünffache Menge an Kraniaslösung in μ l zusammen mit dem Gewebestück in ein Rundbodenröhrchen gegeben und zerkleinert. Anschließend wurde das Homogenisat bei Raumtemperatur und $900 \times g$ für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Tube überführt und mittels NanoDropTM BCA Protein Assay die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.2. Western Blot

2.2.2.1. Puffer

Blotpuffer	1x
Tris 25 mM	3,03 g
Glycin 192 mM 14,40 g	14,40 g
Methanol 20 % 200 ml	200 ml
H ₂ O	Auf einen Liter auffüllen

TBS	10x
Tris HCl	24 g
Tris Base	5,6 g
NaCl	88 g
H ₂ O	Auf einen Liter auffüllen

pH auf 7,6 einstellen

TBST 0,1 %	
TBS 10x	100 ml
H ₂ O	900 ml
Tween [®] 20	1 ml

APS 10 %	
APS	0,15 g
H ₂ O	1,5 ml

Blocking Solution 0,1 %	
TBS-T 0,1 %	100 ml
Milchpulver	5 g

BSA Solution 5 %	
TBS-T 0,1 %	100 ml
BSA	5 g

SDS-Page Running Buffer	10x
Tris 125 mM	30,3 g
Glycin 960 mM	144 g
SDS 1 %	10 g
H ₂ O	Auf einen Liter auffüllen

2.2.2.2. Gele

Für vier Gele wurde Folgendes benötigt (Angaben in ml):

Trenngel	6 %	8 %	10 %	12 %	15 %	18 %
a.d.	10,6	9,2	8,0	6,6	4,6	2,6
Tris 1,5 M	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
SDS 10 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
APS 10 %	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Acrylamid	4,0	5,4	6,6	8,0	10,0	12,0
TEMED	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016

Außerdem wurde das Obergel folgendermaßen zusammengesetzt (Angaben in ml):

a.d.	Tris 1,5 M	SDS 10 %	APS 10 %	Acryl- amid	TEMED
10,6	9,2	8,0	6,6	4,6	2,6

2.2.2.3. Ablauf

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine definierte Menge von 30 µg Protein in ein neues Tube pipettiert und mit Blotpuffer im Verhältnis 4:1 vermischt. Je nach Größe des zu untersuchenden Proteins wurden folgende Gele vorbereitet:

Proteingröße (kDa)	% Gel
4 - 40	20
12 - 45	15
10 - 70	12,5
15 - 100	10
25 - 100	8

Zusammen mit je einem *Prestained* und einem *MagicMark*TM Proteinmarker wurden die vorher errechneten, gleichen Mengen an Protein in die Wells des Gels, das sich in einer mit SDS-Page Running Buffer befüllten Gelkammer befand, pipettiert. Im Anschluss fand die Proteinauftrennung zunächst bei einer Spannung von 80 V für 15 Minuten, danach bei 100 V für ca. 60 Minuten statt. Nun wurden die aufgetrennten Proteine bei einer Spannung von 120 V 90 Minuten lang auf eine Nitrozellulosemembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Proteine > 20 kDa) übertragen. Danach wurden die Membranen mit TBS-T 0,1 % gewaschen und mit Hilfe einer Ponceau S Färbung der Erfolg des Transfers überprüft. Nach erneutem Waschen wurden die Membranen mit Blocking Solution für eine Stunde auf einem Rollen-Laborschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte über Nacht und bei 4 °C die Inkubation des primären Antikörpers, der in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration mit Blocking Solution verdünnt wurde. Am nächsten Morgen wurde mit dem Waschen der Membranen begonnen und im Anschluss mit einem passenden sekundären, Horseradish Peroxidase (HRP)-konjugierten Antikörper, der zuvor mit Blocking Solution im Verhältnis 1:5000 verdünnt worden war, inkubiert. Dies fand auf dem Rollen-Laborschüttler bei Raumtemperatur für 90 Minuten statt. Auch hiernach wurde der Waschschrift mit TBS-T 0,1 % wiederholt.

Zur Sichtbarmachung des Ergebnisses wurde das *Pierce ECL Kit* von ThermoFisher verwendet. Dieses basiert auf dem Konzept der Chemilumineszenz: die HRP setzt in einer chemischen Reaktion Luminol um, wobei Licht emittiert wird. Dieses konnte dann mit Hilfe des Hamamatsu Imagers detektiert und in digitalen Bildern festgehalten werden. Hierfür wurde in einem ersten Schritt eine Arbeitslösung hergestellt, indem die beiden Komponenten des Kits im Verhältnis 1:1 in einem 50

ml Falcon vermischt wurden. Danach wurde eine der Membranen in diese Lösung für zehn Sekunden unter Drehen des Falcons bei Raumtemperatur gelegt. Im Anschluss wurde die Membran auf ein Tablett platziert und mit einer Klarfolie unter Vermeidung von Luftblasen und Falten abgedeckt. Dabei zeigte die proteinbeladene Seite nach oben. Nun wurde die Membran für 30 Sekunden belichtet.

2.2.2.4. Auswertung der Western Blots

Die Auswertung des belichteten Bildmaterials der Blots fand mit Hilfe der ImageJ®-Software statt. Dabei mussten die Blots zuvor als Graustufenbilder abgespeichert werden. Das Programm quantifizierte dann die von der Kamera aufgezeichneten Graustufen. Die gewünschten Proteinbanden auf der Membran wurden markiert und von dem Programm wurde die Intensität dieser Banden - also die Dichte der Pixel - gemessen. Dies geschah anhand von Histogrammen, mit denen die Banden auf einem Blot miteinander verglichen und semiquantitativ ausgewertet werden konnten.

2.2.1. Histologie

2.2.1.1. Fibrosefärbungen

Zur Quantifizierung der Fibrose erfolgte am Ende des Versuchs die Entnahme der Herzen der Schweine. Es wurden Gewebeproben des linken und rechten Atriums sowie des linken und rechten Ventrikels entnommen und in einer vierprozentigen Formalinfixierlösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Bis zur Weiterverarbeitung erfolgte die Lagerung bei Raumtemperatur in 70%igem Ethanol. Die Paraffineinbettung fand nach Entwässerung der Gewebeproben durch eine aufsteigende Alkoholreihe sowie Durchmischung mit Xylol mit Hilfe eines Karussell-Gewebeeinbettautomaten statt. Am darauffolgenden Tag wurden Paraffinblöcke gegossen, welche am Mikrotom für die weitere histologische Analyse 5 µm dünn geschnitten wurden. Diese Schnitte wurden, nachdem sie für ein paar Sekunden auf die Wasseroberfläche eines ca. 40 °C warmen Wasserbads platziert worden waren, auf Glasträger gezogen und anschließend nach Masson Goldner Trichrom oder Sirius Red gefärbt. Hierzu erfolgte im ersten Schritt die Entparaffinierung nach folgendem Schema:

1. Xylol 1

10 Minuten

2. Xylol 2	10 Minuten
3. Ethanol (100 %) 1	5 Minuten
4. Ethanol (100 %) 2	5 Minuten
5. Ethanol (96 %)	5 Minuten
6. Ethanol (70 %)	5 Minuten
7. Destilliertes Wasser	waschen

Die Sirius Red Färbungen wurden mit Hilfe eines Färbekits mit den folgenden Reagenzien durchgeführt:

Solution A - Phosphomolybdic Acid

Solution B - Picosirius Red F3BA Stain

Solution C - 0.1 M Hydrochloride Acid (100 ml Aqua dest. + 1 ml 32 % HCl)

Zunächst wurde eine Kernfärbung mit Weigerts Hämatoxylin acht Minuten lang durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für zwei Minuten in *Solution A* gegeben, erneut gewaschen und für 50 Minuten in *Solution B* inkubiert. Danach wurden sie direkt für zwei Minuten in *Solution C* gegeben und schließlich wieder gewaschen, nach folgender Reihenfolge dehydriert und zum Schluss mit Pertex® und einem Deckgläschen eingedeckt:

1. Wasser	10x tunken
2. Ethanol (70 %)	10x tunken
3. Ethanol (96 %)	10x tunken
4. Ethanol 2	10x tunken
5. Ethanol 1	10x tunken
6. Xylol 2	5 Minuten
7. Xylol 1	5 Minuten

Für die MT-Färbungen wurde ein Masson-Goldner-Trichrom-Färbekit verwendet:

Weigerts Hämatoxylinlösung A

Weigerts Hämatoxylinlösung B

Goldner-Lösung I (Ponceau-Säurefuchsin)

Goldner-Lösung II (Phosphorwolframsäure-Orange G)

Goldner-Lösung III (Lichtgrün SF)

Hierfür wurde als Erstes wieder eine Kernfärbung gemacht: die Objektträger wurden für 2,5 Minuten in Weigerts Eisenhämatoxylin (Lösung A und B, 1:1 vermischt) gegeben und im Anschluss für 15 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Darauf folgte die Inkubation mit Goldner-Lösung I für neun Minuten. Nach einem Waschschrift in einprozentiger Essigsäure für 30 Sekunden wurden die Schnitte in Goldner-Lösung II fünf Minuten lang inkubiert, wiederrum in Essigsäure gegeben und anschließend für fünf Minuten in Goldner-Lösung III belassen. Es wurde ein letztes Mal mit Essigsäure gewaschen, bevor die Schnitte in der oben genannten Reihenfolge wieder dehydriert und eingedeckt wurden. Zuletzt wurden die Präparate über Nacht unter einem Abzug zum Trocknen gelegt.

2.2.1.2. Immunfluoreszenzfärbungen

Nachdem ein bis zwei cm große Gewebestücke aus verschiedenen Herzregionen entnommen worden waren, wurden sie sofort in Einbetttschälchen gelegt und mit O.C.T.TM Compound zur Vermeidung von Gefrierschäden eingebettet. Anschließend wurden sie auf Trockeneis gefroren und in einem -80°C-Ultragefrierschrank asserviert. Für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Gewebestücke zunächst am Kryostat bei -18 °C in 5 µm dünne Scheiben geschnitten, und sogleich auf Objektträger aufgezogen. Danach wurden die Schnitte in einer mit wassergetränkten Zellstofftüchern ausgelegten Dunkelfärbekammer platziert.

Vor Beginn der Färbung wurden folgende Lösungen hergestellt:

Washing-Solution

1x PBS	1000 ml
Tween [®] 20	1 ml
Bovine Serum Albumin	5 g

Stock-Solution

1x PBS	50 ml
Bovine Serum Albumin	0,5 g
Saponin	0,25 g

Blocking-Solution

Stock Solution	4,5 ml
100% Donkey Serum	0,5 ml

Vor der Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung wurden die Gewebeschnitte mit einem Liquid-Blocker-Pen auf den Objektträgern umschrieben und mit Hilfe von vierprozentiger Formaldehydlösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie insgesamt drei Mal mit Washing-Solution für jeweils fünf Minuten auf einem Wippschüttler gewaschen. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Blocking-Solution für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um danach die primären Desmin- und Cx43-Antikörper (1:500 in Blocking-Solution) inkubieren zu lassen. Nach zwei Stunden wurden die oben genannten Waschschriffe wiederholt und der sekundäre *Donkey anti-Goat* bzw. *Donkey anti-Rabbit* Antikörper (1:1000 in Stock-Solution verdünnt) auf die Objektträger pipettiert und für eine Stunde darauf belassen. Dieser Schritt musste komplett im Dunkeln ablaufen. Auch im weiteren Verlauf waren die Objektträger lichtgeschützt aufzubewahren. Danach wurde wieder drei Mal gewaschen, dieses Mal allerdings mit 1x PBS. Zum Schluss wurde eine Zellkernfärbung mit Hilfe von DAPI (1:1000 in 1x PBS) durchgeführt und die Objektträger mittels eines Tropfens *Fluorescence Mounting Mediums* und eines Menzel-Deckgläschens versiegelt. Bis zur Mikroskopie fand die Lagerung im Dunkeln bei 4 °C im Kühlschrank statt.

2.2.1.3. Mikroskopie

Nachdem die Gewebeschnitte mit Sirius Red, Masson Trichrom oder Immunfluoreszenz gefärbt worden waren, erfolgte die standardisierte Gewinnung von repräsentativen Gesichtsfeldern in verschiedenen Vergrößerungen sowie deren Digitalisierung. Hierfür wurde das Leica DM6 B Mikroskop für die

Nativmikroskopie der Fibrosefärbungen und der Zeiss Imager M2 für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet.

Für die Masson Trichrom und Sirius Red Färbungen wurden insgesamt fünf nichtüberlappende Bilder pro Herzregion (LAA, LV, RAA, RV) und Tier bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen und mit Hilfe von Adobe Photoshop CS3 Extended verblindet ausgewertet. Dabei wurden Fibrose-Areale unter Ausschluss der Gefäße sowie des perivaskulären Gewebes für den Messvorgang ausgewählt; die Fibrose wurde dabei als relativer Anteil an der Gesamtpixelzahl pro Bild gemessen und in Prozent angegeben. Diese Werte wurden dann in eine Excel-Tabelle eingefügt. Aus den Messdaten konnten im Anschluss die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet werden.

Für die Auswertung der Connexin-Färbung wurde folgendes Vorgehen gewählt: es wurden insgesamt fünf nicht-überlappende Bilder pro Herzregion (LAA, LV, RAA, RV) und Tier bei 40-facher Vergrößerung aufgenommen, und im Anschluss die grün gefärbten Connexine pro Bild ausgezählt. Die Werte wurden wiederum in eine Excel-Tabelle eingefügt und die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

2.2.2. Genexpressionsanalyse

2.2.2.1. Isolation der RNA aus Gewebe

Von den Schweinen wurde bei der Entnahme der Herzen Gewebe aus den Vorhöfen und Ventrikeln entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Nun erfolgte die Isolation der RNA aus diesem Gewebe mit der Trizol-Methode. Zum Homogenisieren der Proben wurde in unserem Labor folgendes Vorgehen etabliert:

50-100 mg schwere, gefrorene Stückchen wurden in einen Umschlag aus Alufolie gebettet und dieser an allen Seiten so gefaltet, bis er dicht war. Unter wiederholtem Eintauchen in flüssigen Stickstoff erfolgte nun die Zerkleinerung des Gewebes mit einem Hammer. Dieses wurde sodann in ein Tube mit einem ml Trizol gegeben und nach dem *TRIzol Reagent User Guide* (November 2016) folgendermaßen weiter verfahren:

Nach einer Inkubationszeit von mindestens fünf Minuten wurden 0,2 ml Chloroform dazugegeben und für drei Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Tubes für 15 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. Die wässrige Phase,

die die RNA enthielt, wurde in ein neues Tube zusammen mit 0,5 ml Isopropanol pipettiert. Nach zehn Minuten wurde erneut bei 12.000 $\times g$ und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurde das Pellet in einem ml Ethanol (75 %) resuspendiert. Bevor es bei 7.500 $\times g$ und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert wurde, wurde das Tube kurz gevortext. Der Überstand wurde wiederum abpipettiert und das RNA-Pellet für fünf bis zehn Minuten luftgetrocknet. Zum Schluss wurde mit 50 μl RNase-freiem Wasser resuspendiert, bei 56 °C für ca. 15 Minuten inkubiert und die Menge der isolierten RNA durch Messung des Verhältnisses der optischen Dichte 260/280 nm photometrisch mittels NanoDrop™ bestimmt. Ein Extinktionsverhältnis von $> 1,6$ wurde als akzeptable Qualität angenommen und die isolierte RNA auf 100 ng/ μl verdünnt. Danach erfolgte die sofortige Asservierung der Proben bei -80 °C.

2.2.2.2. Synthese der cDNA

Zur Synthese der cDNA aus RNA wurde das *SuperScript IV Reverse Transcriptase*® Kit verwendet. Es wurde ein Gesamtvolumen von 20 μl /Probe wie folgt angesetzt:

Ansatz umschreiben	1x
50 μM Random Hexamers	1 μl
10 mM dNTP mix	1 μl
Template RNA (100 ng/ μl)	10 μl
Nuklease-freies Wasser	1 μl

Dieser Ansatz wurde gut vermischt und kurz zentrifugiert. Dann wurde er bei 65 °C für fünf Minuten erhitzt und auf Eis eine Minute lang inkubiert. Der 5x SSIV Puffer musste kurz zentrifugiert werden, bevor er mit folgenden Reagenzien zusammenpipettiert wurde:

Ansatz umschreiben	1x
5x SSIV Buffer	4 μ l
100 mM DTT	1 μ l
RNaseOUT™ Recombinant RNase Inhibitor	1 μ l
SuperScript® IV Reverse Transcriptase (200 U/ μ l)	1 μ l

Das Tube wurde im Anschluss wiederum zentrifugiert und der Inhalt zum RNA-Ansatz dazupipettiert. Danach erfolgte die Transkription im Thermocycler nach folgendem Programm:

10 min.	23 °C
10 min.	55 °C
10 min.	80 °C

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

2.2.2.3. Primertest

Die Primer wurden mit Hilfe des Onlinetools Primer-BLAST designt (YE et al., 2012). Zur Testung erfolgte eine qPCR mit SYBRGreen® mit anschließender Schmelzkurvenanalyse sowie Gelelektrophorese nach folgendem Protokoll:

Als erstes wurde der iTaq™ Universal SYBRGreen® Supermix sowie die anderen gefrorenen Reagenzien aufgetaut und gut gemischt. Danach wurden die Tubes kurz zentrifugiert und anschließend vor Licht geschützt auf Eis gelagert. Dann wurde eine cDNA Standard-Verdünnungsreihe in acht Stufen mit jeweils einer aus LAA, LV, RAA oder RV isolierten cDNA aus total RNA vorbereitet:

Standard 1	25 ng/ μ l
Standard 2	12,5 ng/ μ l
Standard 3	6,25 ng/ μ l
Standard 4	3,12 ng/ μ l
Standard 5	1,56 ng/ μ l
Standard 6	0,78 ng/ μ l

Standard 7	0,38 ng/ μ l
Standard 8	0,16 ng/ μ l

Nun wurde die qPCR in einer 96-Well-Platte nach folgendem Ansatz jeweils in Duplikaten pipettiert:

			1x
iTaq	Universal	SYBRGreen [®]	5 μ l
Supermix			
Vorwärtsprimer (10 μ M)			1 μ l
Rückwärtsprimer (10 μ M)			1 μ l
H ₂ O			2 μ l
cDNA			1 μ l

Danach wurde die Platte versiegelt und abzentrifugiert. Folgendes Programm wurde im Thermocycler eingestellt:

1) Polymeraseaktivierung, DNA-Denaturierung	95 °C 10 min.	
2) Denaturierung	95 °C 15 sec.	} 40 Zyklen
3) Annealing/Extension/Plate Read	60 °C 60 sec.	
4) Schmelzkurvenanalyse	65 °C-95 °C	
(mit Erhöhung der Temperatur um 0,5 °C für fünf Sekunden pro Schritt)		
5) Hold	4 °C ∞	

Nach Ablauf der qPCR wurde die Platte geöffnet und der Inhalt der Wells jeweils mit 2 μ l *6x Loading Dye* für die Gelelektrophorese vermischt. Nach folgendem Ansatz wurde zudem ein *PCR-DNA-Ladder*, anhand dessen die Fragmentlängen der PCR-Produkte bestimmt werden konnten, hergestellt:

		1x
Ladder 50 bp		2 μ l
6x Loading Dye		3 μ l
H ₂ O		1 μ l

Zusammen mit dem Inhalt aus den Wells wurde der DNA-Ladder in das Gel geladen und bei 120 V für 60 Minuten aufgetrennt. Mit Hilfe des Geldocs wurden

die Banden anschließend sichtbar gemacht und die Fragmentlängen der PCR-Produkte konnten mit den zu erwartenden Ampliconlängen der Primer verglichen werden. Bei einer optimalen qPCR-Reaktion sollte die Schmelzkurve nur einen Peak aufweisen, der einer einzelnen Bande auf dem Agarosegel entsprach. Anhand des Peaks der Schmelzkurve ließen sich spezifische PCR-Produkte von anderen Produkten, die bei unterschiedlichen Temperaturen schmelzen, wie zum Beispiel Primer-Dimere, unterscheiden. Wegen ihrer geringen Länge weisen Primer-Dimere für gewöhnlich einen niedrigeren Schmelzpunkt als den des gesuchten PCR-Produkts auf, wohingegen bei unspezifischen Amplifikationen Produkte entstehen, deren Schmelztemperaturen unter- oder oberhalb dessen liegen. Eine positive Analyse der Schmelzkurve gepaart mit einem passenden Fragment in der Elektrophorese wurde in dieser Arbeit als hinreichender Beweis für die Funktion der entsprechenden Primer gewertet.

<u>Strom</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Ionenkanal</u>	<u>Gen beim Schwein</u>
I_{Na}	sodium current	$Na_v1.5$	<i>SCN5A</i> (Chromosom 13)
$I_{Ca,L}$	calcium current L-type	$Ca_v1.2$	<i>CACNA1C</i> (Chromosom 5)
$I_{to,f}$	transient outward current, fast	$Kv4.2$ $Kv4.3$	<i>KCND2</i> (Chromosom 18) <i>KCND3</i> (Chromosom 4)
$I_{to,s}$	transient outward current, slow	$Kv1.4$ $Kv1.7$ $Kv3.4$	<i>KCNA4</i> (Chromosom 2) <i>KCNA7</i> (Chromosom 6) <i>KCNC4</i> (Chromosom 4)
I_{Kr}	delayed rectifier, fast	HERG, β -subunit	<i>KCNE2</i> (Chromosom 13)
I_{Ks}	delayed rectifier, slow	KVLQT1, α -subunit minK, β -subunit	<i>KCNQ1</i> (Chromosom 2) <i>KCNE1</i> (Chromosom 13)
I_{K1}	inward rectifier	$Kir2.1$ $Kir2.2$ $Kir2.3$	<i>KCNJ2</i> (Chromosom 12) <i>KCNJ12</i> (Chromosom 12) <i>KCNJ4</i> (Chromosom 5)

Tabelle 1. Ionenkanäle, die auch im porzinen Herzen exprimiert werden und durch Genexpressionsanalysen untersucht wurden.

<u>Connexin</u>	<u>Exprimiert in</u>	<u>Gen</u>	<u>Gen beim Schwein</u>
Connexin 40	Human	<i>GJA5</i>	<i>GJA5</i> (Chromosom 4)
Connexin 43	Human	<i>GJA1</i>	<i>GJA1</i> (Chromosom 1)
Connexin 45	Human	<i>GJC1</i>	<i>GJC1</i> (Chromosom 12)
Connexin 37	Maus	<i>GJA4</i>	<i>GJA4</i> (Chromosom 6)

Tabelle 2. Connexine, die auch im porzinen Herzen exprimiert werden und durch Genexpressionsanalysen untersucht wurden.

2.2.2.4. Real-Time qPCR mittels SYBRGreen®

Die quantitative Real-Time PCR der Gene erfolgte mittels SYBRGreen® von Bio-Rad. SYBRGreen® 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 und qPCR geeignete dNTPs. Unter sterilen Bedingungen wurde nun für die qPCR folgender Ansatz in Duplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert:

	1x	100x
iTaq Universal SYBRGreen® Supermix	5 µl	500 µl
Vorwärtsprimer (10 µm)	1 µl	100 µl
Rückwärtsprimer (10 µm)	1 µl	100 µl
H ₂ O	1 µl	100 µl
cDNA Template (10 ng/µl)	2 µl pro Well	
Total	10 µl	

Danach wurde die Platte versiegelt und kurz zentrifugiert. Nach folgendem Protokoll fand die qPCR in einem Real-Time Thermocycler von Bio-Rad statt:

- | | | |
|---|---------------|-------------|
| 1) Polymeraseaktivierung, DNA-Denaturierung | 95 °C 2 min. | } 35 Zyklen |
| 2) Denaturierung | 95 °C 15 sec. | |
| 3) Annealing/Extension/Plate Read | 60 °C 60 sec. | |
| 4) Schmelzkurvenanalyse | 65 °C-95 °C | |

(mit Erhöhung der Temperatur um 0,5 °C für fünf Sekunden pro Schritt)

In allen Fällen waren die Ergebnisse der Kontrollen aus ddH₂O sowohl für die Proben als auch für das Housekeeping-Gen negativ.

Der Threshold wurde nach der letzten Platte angepasst. Es wurde der höchste aufgezeichnete Threshold für alle Platten verwendet.

Als Quantifizierungsmethode wurde die relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten Housekeeping-Gens normalisiert (RASMUSSEN, 2001). Dies bedeutet, dass keine absoluten Zahlen der Startkopien oder -konzentrationen bestimmt werden, sondern die Genexpression des Target-Gens auf ein weiteres, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen (Housekeeping-Gen) bezogen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression der Zielgene auf die der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) bezogen, die für ein Enzym der Glykolyse codiert und somit unentbehrlich für die Zelle und alle Lebewesen ist.

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes wurde wie folgt durchgeführt: zunächst wurde für jede Probe der C_t -Wert (Cycle Threshold) von *GAPDH* vom C_t -Wert des Target-Gens abgezogen ($\Delta C_t = C_t \text{ Target-Gen} - C_t \text{ GAPDH}$). Hiernach fand die Subtraktion des ΔC_t -Wertes aus der Kontrollgruppe (WT) vom ΔC_t -Wert aus der Versuchsgruppe (*INS^{C94Y}*) statt ($\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ INS}^{C94Y} - \Delta C_t \text{ WT}$). Der relative Expressionsunterschied (Ratio) einer Probe zwischen der Diabetesgruppe und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Bei dieser Formel wird jedoch von dem idealisierten Fall einer Verdopplung der Kopien pro PCR-Zyklus ausgegangen. Unter optimierten Bedingungen liegt die Effizienz in der Realität aber zwischen 1,7 und 1,9. Deswegen muss eine Modifikation entsprechend der relativen Expression durchgeführt werden:

$$\text{Relative Expression} = (E_{\text{Target-Gen}})^{\Delta C_t \text{ Target-Gen (WT - INS}^{C94Y})}$$

Zur Qualitätssicherung, und um verlässliche Ergebnisse aus den Daten der Realtime-qPCR zu erhalten, sollten sich die C_t -Werte der Doppelbestimmungen um maximal 0,75 C_t -Werte unterscheiden und möglichst vor dem 35. PCR-Zyklus erreicht werden.

Expressionsunterschiede wurden relativ zum Mittelwert der Kontrollproben abgegeben.

2.2.2.5. Real-Time qPCR mittels TaqMan[®]-Sonden

Die Real-Time qPCR der Fibrose-assoziierten Gene *COL1A1*, *COL3A1*, *CTGF*, *GAPDH*, *SMAD3* und *TGF- β 1* erfolgte mit TaqMan[®]-Sonden der Firma Life Technologies. Das Prinzip der quantitativen PCR mittels dieser Sonden basiert auf

einer speziellen Polymerase - der Taq-Polymerase. Diese besitzt eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität. Mit Hilfe einer Sequenz-spezifischen 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 zu der abgeschriebenen DNA-Menge proportionales Lichtsignal zu generieren. Solange die Sonde stabil an die DNA bindet, unterdrückt der Quencher das Lichtsignal des Farbstoffes. Während der Elongation hydrolysiert die Polymerase die an den Matrizenstrang gebundenen Sonden, nicht jedoch freie Sonden, und der Quencher kann das Lichtsignal nicht länger unterdrücken. Unter sterilen Bedingungen wurde die PCR mit folgendem Ansatz in eine 96-Well-Platte pipettiert:

	1x
TaqMan [®] RNA Assay	1 µl
Gene Expression Master Mix (2x)	10 µl
H ₂ O	7 µl
cDNA Template (10 ng/µl)	2 µl pro Well

Dann wurde der Thermocycler folgendermaßen eingestellt:

1) Polymeraseaktivierung, DNA-Denaturierung	95 °C 10 min.	} 40 Zyklen
2) Denaturierung	95 °C 15 sec.	
3) Annealing/Extension/Plate Read	60 °C 60 sec.	
4) Hold	4 °C ∞	

Die CT-Werte wurden aufgezeichnet sowie der Threshold nach der letzten Platte angepasst. Es wurde der höchste aufgezeichnete Threshold für alle Platten verwendet. Damit die Ergebnisse vergleichbar waren, wurden sie im Verhältnis zu *GAPDH* berechnet. In allen Fällen waren die Ergebnisse der Kontrollen aus ddH₂O negativ.

2.2.3. Statistik

Die grafische Präsentation der Daten erfolgte als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM). Der SEM wurde berechnet, indem die Standardabweichung der Stichprobe durch die Wurzel der Stichprobengröße n geteilt wurde. Berechnungen wurden mit Microsoft Excel und Graphpad Prism Version 8.0.1 durchgeführt. Ein t-Test wurde zum Vergleich zweier unpaarer Gruppen benutzt. Für den Vergleich zweier kategorialer Variablen wurde der Exakte Fisher-Test verwendet. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

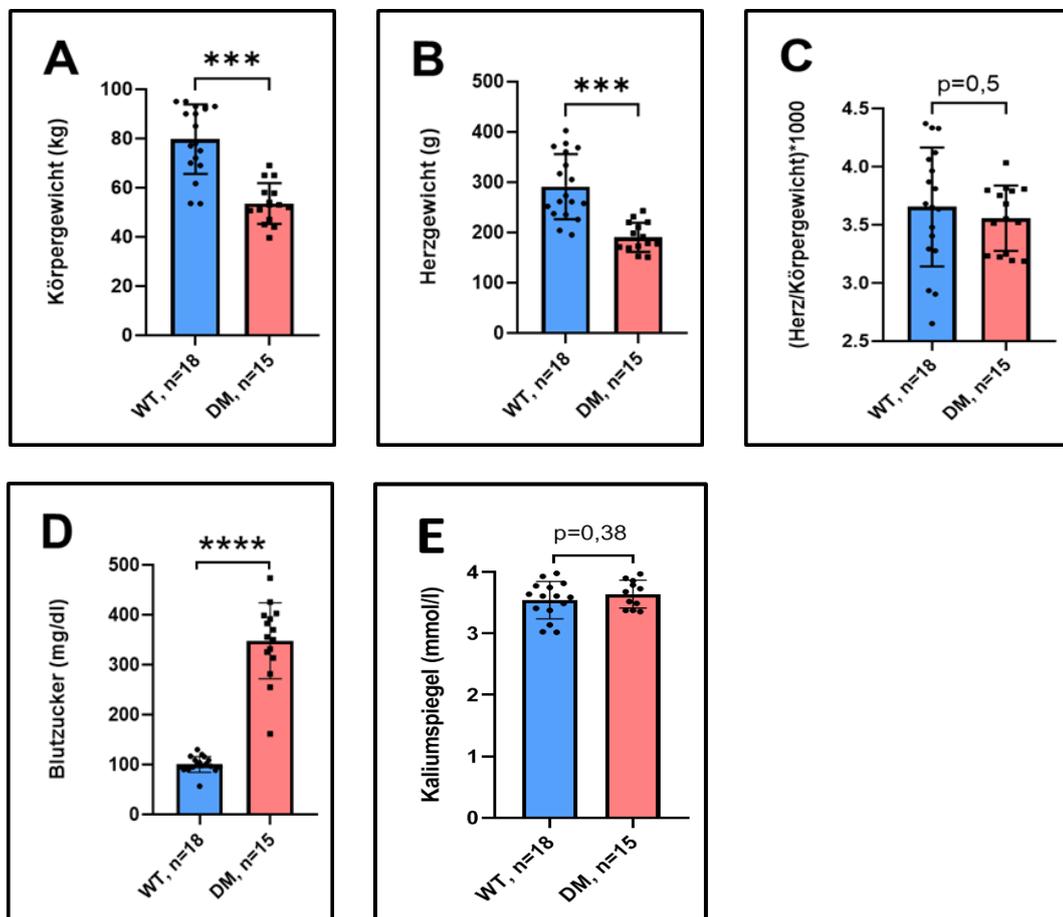
IV. ERGEBNISSE

1. *In vivo* Charakterisierung von *INS^{C94Y}*- und WT-Schweinen

Einen Tag vor Beginn der Versuche wurden die Schweine gewogen. Das Körpergewicht der Diabetes-Schweine unterschied sich dabei deutlich von dem ihrer Geschwistertiere: mit $53,61 \pm 2,62$ kg waren diese hoch signifikant leichter als die Wildtypen ($79,77 \pm 4,46$ kg) ($p < 0,001$, **Abb. 12-A**).

Nach dem Eingriff wurden die Tiere schmerzfrei euthanasiert und die Herzen entnommen und gewogen. Das Herzgewicht der Diabetes-Schweine war im Vergleich zu ihren WT-Geschwistertieren signifikant erniedrigt ($190,07 \pm 9,09$ g vs. $290,89 \pm 20,49$ g) ($p < 0,001$, **Abb. 12-B**).

Das Herz-/Körpergewichtverhältnis war jedoch zwischen den Gruppen unverändert (**Abb. 12-C**), hier konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden (WT: 3,66, DM: 3,56, $p = 0,5$).



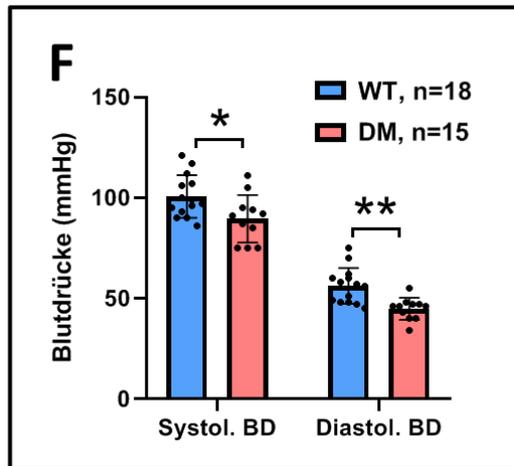


Abbildung 12: Vergleich von Körper- (A), Herz- (B) und Herz-/Körpergewicht (C), Nüchternblutzuckerkonzentrationen (D), Kaliumspiegeln (E) sowie der systolischen und diastolischen Blutdrücke (BD) (F) bei WT (n=18) und DM (n=15); ungepaarte Student t-Tests, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Zusätzlich wurde zu Beginn der Versuche der Nüchternblutglukosespiegel gemessen, der bei den *INS^{C94Y}*-Schweinen mit durchschnittlich 348,3 mg/dl gegenüber 100,7 mg/dl bei den Wildtypen signifikant erhöht war (**** $p < 0,0001$, **Abb. 12-D**).

Mit Hilfe des Blutgasanalysegerätes wurden außerdem die Kaliumspiegel bestimmt. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Diabetes- ($3,64 \pm 0,07$ mmol/l) und der Kontrollgruppe ($3,55 \pm 0,10$ mmol/l) gefunden werden ($p = 0,38$, **Abb. 12-E**).

Die invasiv gemessenen systolischen (WT: $100,60 \pm 3,34$ mmHg; DM: $89,55 \pm 3,77$ mmHg, $p = 0,022$) und diastolischen (WT: $56,14 \pm 2,82$ mmHg; DM: $44,73 \pm 1,72$ mmHg, $p = 0,002$) Blutdrücke waren in der Wildtyp- im Vergleich zur *INS^{C94Y}*-Gruppe signifikant erhöht (**Abb. 12-F**).

1.1. Hämodynamik

Zur Beurteilung der Funktion des Herzens wurden Links- und Rechtsherzkatheteruntersuchungen durchgeführt, um hämodynamische Parameter bestimmen zu können. Die Messungen des linksventrikulären systolischen Drucks (LVP) und linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) erfolgten in Ruhe (*baseline*; durchschnittliche Herzfrequenz WT: $82,56 \pm 7,41$ bpm; DM: $76,13 \pm 3,57$ bpm, **Abb. 14**) sowie im Sinne einer verbesserten Vergleichbarkeit noch

einmal mit Pacing bei 130/min. mittels eines passageren Schrittmachers (*paced*). Der linksventrikuläre systolische Druck zeigte hierbei keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollen und DM-Schweinen (**LVP *baseline*** WT: $107,7 \pm 6,1$ mmHg; DM: $95,3 \pm 3,2$ mmHg, $p=0,21$; **LVP *paced*** WT: $125,6 \pm 5,4$ mmHg; DM: $104,1 \pm 9,0$ mmHg, $p=0,13$) (**Abb. 13**).

Ebenso konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bei der Untersuchung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks, der als Maß der Vordehnung der Ventrikel zur Aufrechterhaltung des Schlagvolumens dient, gefunden werden (**LVEDP *baseline*** WT: $10,6 \pm 0,9$ mmHg; DM: $16,0 \pm 5,2$ mmHg, $p=0,55$; **LVEDP *paced*** WT: $14,5 \pm 1,4$ mmHg; DM: $16,1 \pm 1,3$ mmHg, $p=0,63$) (**Abb. 13**).

Der Aortendruck (**AoP**) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (WT: $86,5 \pm 2,6$ mmHg; DM: $76,1 \pm 2,7$ mmHg, $p=0,10$, **Abb. 13**).

Bei dem mittels Rechtsherzkatheter gemessenen pulmonalarteriellen Druck (**PAP**) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden (WT: $22,89 \pm 0,9$ mmHg; DM: $21,33 \pm 0,7$ mmHg, $p=0,44$) (**Abb. 13**).

Auch der Lungenkapillarenverschlussdruck (**PCWP** WT: $15,56 \pm 1,0$ mmHg; DM: $15,47 \pm 1,3$ mmHg) konnte keine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen erreichen ($p=0,94$, **Abb. 13**).

Selbiges gilt für die Messungen des rechtsatrialen Drucks (**RAP** WT: $10,22 \pm 0,8$ mmHg; DM: $11,20 \pm 1,1$ mmHg) und des rechtsventrikulären Drucks (**RVP** WT: $25,94 \pm 1,5$ mmHg; DM: $23,47 \pm 1,5$ mmHg): es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Diabetes- und den Wildtyp-Schweinen gefunden werden (**RAP** $p=0,63$; **RVP** $p=0,55$, **Abb. 13**).

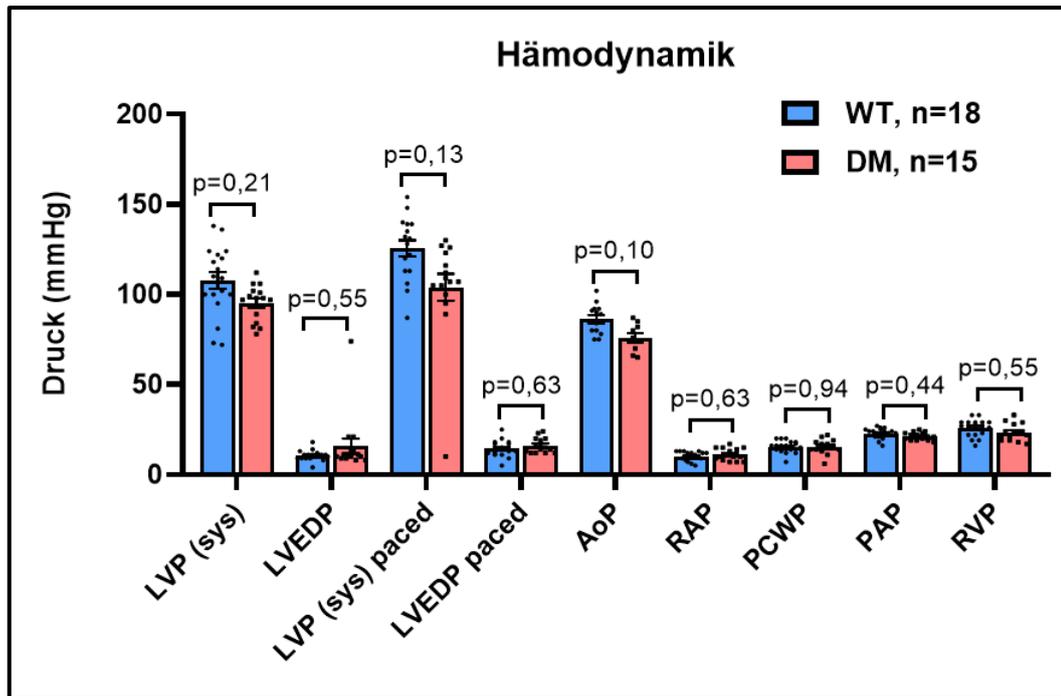


Abbildung 13: Hämodynamische Messungen im linken und im rechten Herzen von WT- und DM-Schweinen; jeweils ungepaarte Student t-Tests.

1.2. 12-Kanal-EKG

Bevor die invasive elektrophysiologische Untersuchung (EPU) durchgeführt wurde, erfolgte die Aufzeichnung eines 12-Kanal-EKGs. Hierbei betrug die durchschnittliche Herzfrequenz der Wildtypen $82,56 \pm 7,41$ bpm, die der Diabetes-Schweine $76,13 \pm 3,57$ bpm, was keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen darstellte ($p=0,34$, **Abb. 14**).

Es zeigte sich zudem kein Unterschied in den EKG-Parametern **RR**-Intervall, Dauer der **P**-Welle, **PR**-Intervall und **QT**- sowie frequenzkorrigierte QT (**QTc**) - Zeit (**Abb. 15**). Die **QRS**-Dauer war jedoch in der Gruppe der Diabetiker verglichen mit der der Wildtypen hoch signifikant reduziert ($p<0,001$).

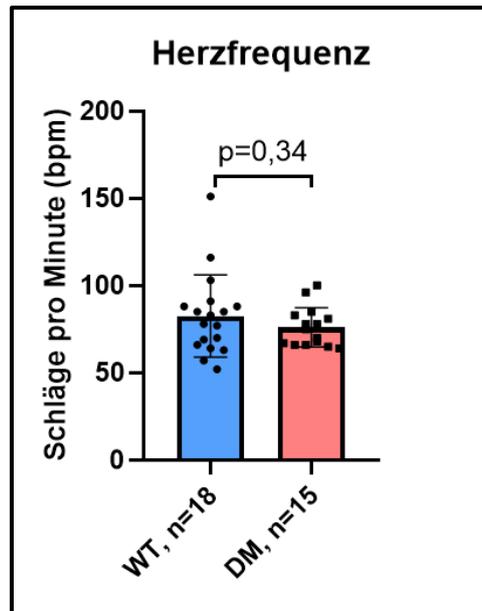


Abbildung 14: Messung der Herzfrequenz mittels 12-Kanal-EKG bei Wildtypen (WT) und Diabetes-Schweinen (DM) vor der elektrophysiologischen Untersuchung; ungepaarter Student t-Test.

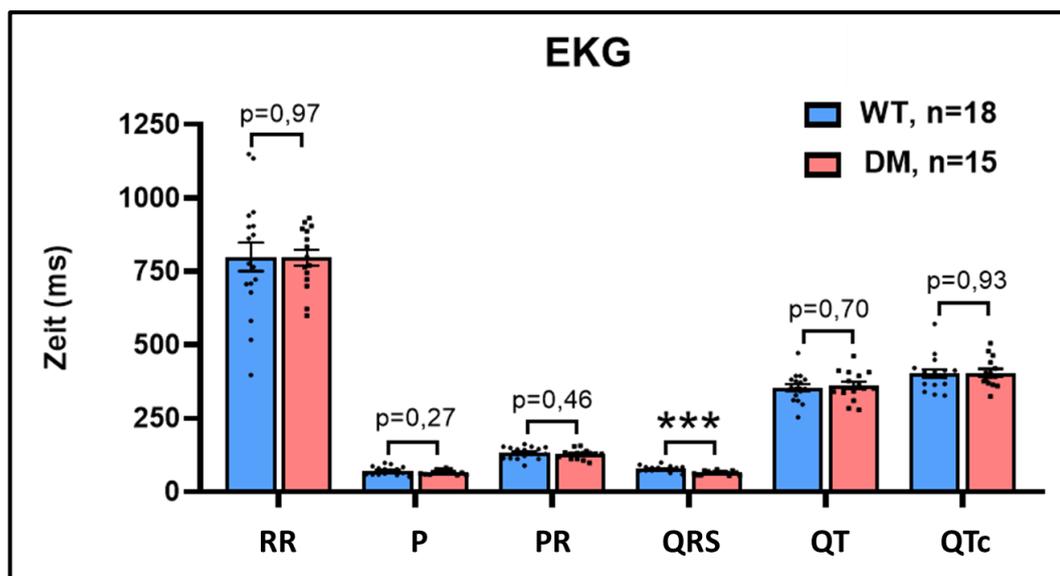


Abbildung 15: Elektrokardiografische Messungen in den Herzen von WT- und DM-Schweinen; es wurden die EKG-Parameter RR-Intervall, P-Welle, PR-Intervall, QRS-Dauer, QT- und QTc-Zeit ausgewertet; jeweils ungepaarte Student t-Tests, *** $p < 0,001$.

1.3. Elektrophysiologische Untersuchung

Im Anschluss erfolgte die elektrophysiologische Untersuchung. Die Bestimmung

des Wenckebach-Punkts, der ein Parameter für die AV-Knotenleitung ist, wurde durch Stimulationen mit immer kürzer werdenden Zykluslängen, bis keine 1:1-Überleitung mehr erfolgte, durchgeführt. Hierbei konnte kein Signifikanzniveau erreicht werden ($p=0,074$, **Abb. 16**).

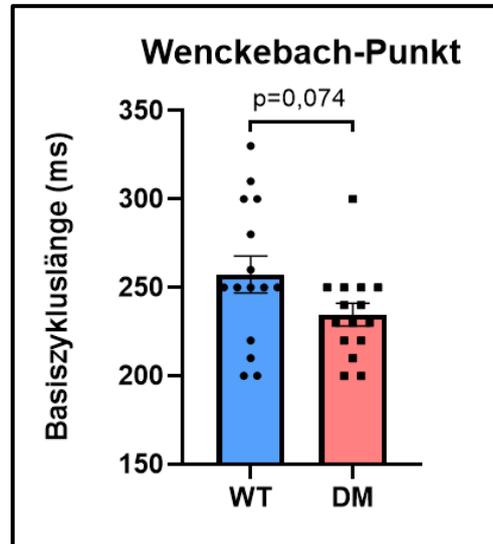


Abbildung 16: Messung des Wenckebach-Punkts bei WT- und DM-Schweinen; ungepaarter Student t-Test.

Bei der Messung der Sinusknotenerholungszeit (engl. *Sinusnode Recovery Time*, SNRT) erfolgte die zweimalige Stimulation im Vorhof mit Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms für die Dauer von 30 Sekunden. Dabei konnte für keine der sechs getesteten Basiszykluslängen ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden (**Abb.17**).

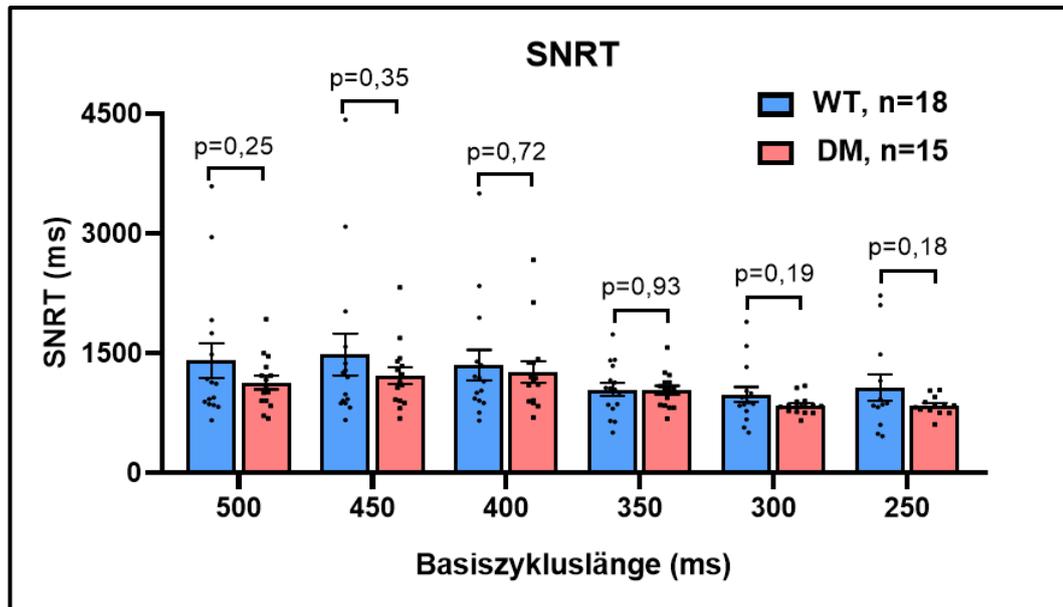


Abbildung 17: Messung der Sinusknotenerholungszeit (SNRT) von WT- und DM-Schweinen; diese wurde bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms durchgeführt; jeweils ungepaarte Student t-Tests.

Ein weiterer wichtiger EPU-Parameter ist die Messung der atrialen effektiven Refraktärperiode (AERP). Sieben Basisschlägen (S1) bei den oben genannten Basiszykluslängen folgte ein vorzeitiger Extrastimulus. Die Messung ergab für alle sechs Basiszykluslängen einen signifikanten Unterschied zwischen Diabetiker- und Wildtyp-Gruppe (**Abb. 18**).

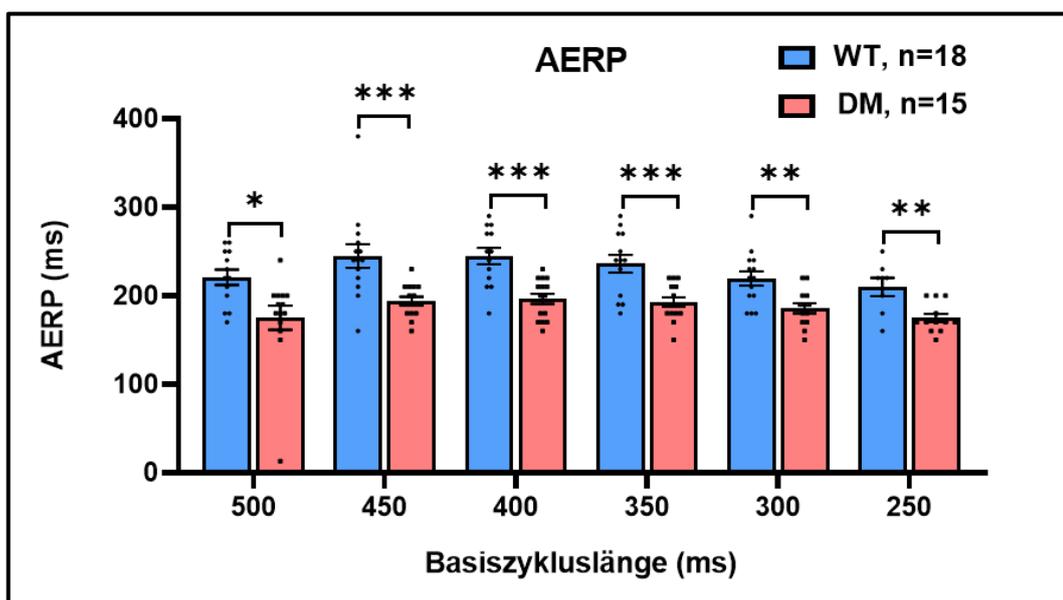


Abbildung 18: Messung der AERP in den Herzen von WT- und DM-Schweinen; diese wurde

bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms durchgeführt; jeweils ungepaarte Student t-Tests, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Bei der Messung der atrioventrikulären effektiven Refraktärperiode (AVERP) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden (**Abb. 19**). Für die AVERP-Messung wurde das AERP-Stimulationsprotokoll verwendet; die AVERP wurde definiert als diejenige Zykluslänge, die bei Vorhofstimulation gerade noch eine Erregung der Kammern auslösen konnte.

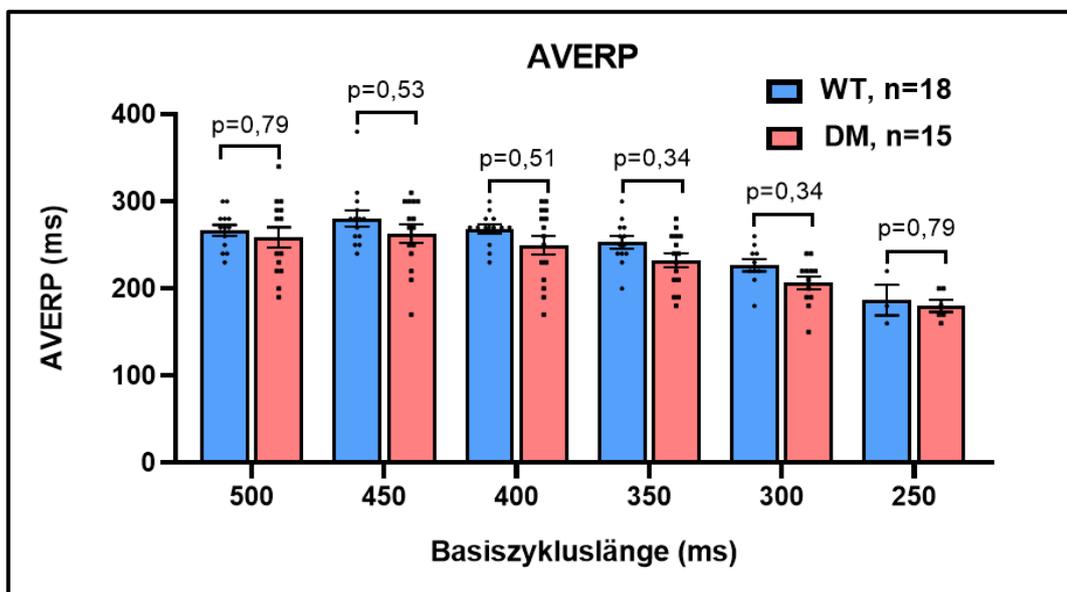


Abbildung 19: Messung der AVERP in den Herzen von WT- und DM-Schweinen; diese wurde bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms durchgeführt; jeweils ungepaarte Student t-Tests.

Die Messung der effektiven Refraktärperiode im Ventrikel (VERP), durchgeführt nach ähnlichem Protokoll im Rechten Ventrikel, ergab für keine der sechs Basiszykluslängen einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (**Abb. 20**).

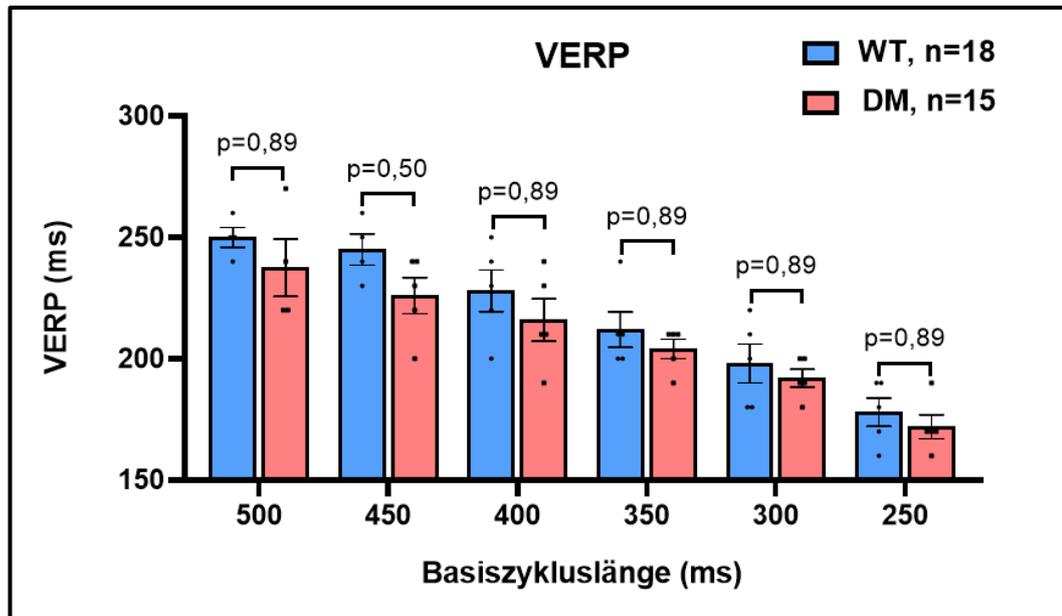


Abbildung 20: Messung der VERP in den Herzen von WT- und DM-Schweinen; diese wurde bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms, 300 ms und 250 ms durchgeführt; jeweils ungepaarte Student t-Tests.

Zuletzt wurden zur Evaluation der Induzierbarkeit von Vorhofflimmern atriale Burstmanöver durchgeführt. VHF war als eine atriale arrhythmische Episode mit irregulären RR-Intervallen, die mindestens 30 Sekunden andauerte, definiert. Eine Episode von 30 Minuten wurde als persistierendes Vorhofflimmern gewertet.

Der Anteil der Diabetes-Schweine, bei denen eine Episode von mindestens 30 Sekunden ausgelöst werden konnte, lag bei 61,5 %, bei den Wildtypen nur bei 10 % und war damit signifikant erhöht (**Abb. 21-A**).

Bei 30,8 % der DM-Schweine konnte persistierendes VHF ausgelöst werden, bei der Kontrollgruppe waren es 10 % (**Abb. 21-B**). Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p=0,34$).

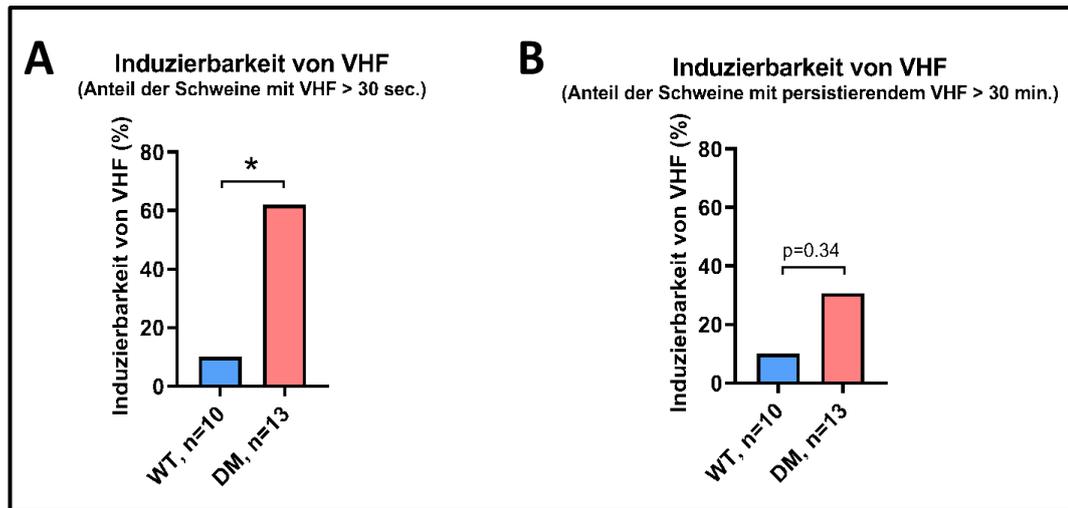


Abbildung 21: Darstellung des prozentualen Anteils der WT- und DM-Schweine, bei denen durch Stimulationsmanöver Vorhofflimmern (>30 sec.) sowie derjenigen Schweine, bei denen persistierendes Vorhofflimmern (>30 min.) ausgelöst werden konnte; exakter Fisher Test; * $p < 0,05$.

Es konnten jedoch nicht alle Tiere in die Auswertung mitaufgenommen werden. Bei den Wildtypen ($n=10$) sowie den Diabetes-Schweinen ($n=13$) mussten teils aus technischen Gründen (EPU-Anlage defekt), teils aufgrund physiologischer Eigenheiten mancher Schweine (plötzlich auftretender Sinusarrest oder -tachykardie, Induktion von VHF beim Platzieren des Stimulationskatheters mit bereits zuvor ausgeprägter Bradyarrhythmie, Kaliumwerte von $3,1 \text{ mmol/l}$) einzelne Tiere aus der Studie ausgeschlossen werden.

2. Untersuchung des proarrhythmogenen Remodelings

2.1. Genexpressionsanalyse

2.1.1. Expression extrazellulärer Matrix und profibrotischer Mediatoren

Aus dem Gewebe der beiden Vorhöfe und Kammern erfolgte die Isolation von RNA und die nachfolgende Analyse der Genexpression von Genen der extrazellulären Matrix und profibrotischer Mediatoren mittels Real-Time qPCR (Abb. 22). Die Auswertung von *SMAD3* (Abb. 22-A) und *TGF- β 1* (Abb. 22-B) ließ signifikante Unterschiede zwischen der WT- und der DM-Gruppe in allen Herzregionen, insbesondere dem LV deutlich werden. Bei den anderen

untersuchten Genen, *CTGF* (**Abb. 22-C**) und den Kollagenen *COL1A1* (**Abb. 22-D**) und *COL3A1* (**Abb. 22-E**), konnten keine signifikanten Veränderungen der Expression festgestellt werden. Dennoch zeigte *CTGF* bei den DM-Schweinen einen Trend zu einer erhöhten Genexpression im LAA ($p=0,09$), LV ($p=0,05$) und RV ($p=0,08$) im Vergleich zu den WT-Tieren. Weitere wichtige Strukturproteine der extrazellulären Matrix sind der Elastin Microfibril Interfacer 1 (*EMILIN1*), Fibrillin 1 (*FBNI*) und Fibronectin 1 (*FNI*). Die Genexpression von *EMILIN1*, das sich in elastischen Fasern an der Schnittstelle von Elastin und Microfibrillen befindet, war in allen untersuchten Herzregionen der Diabetes-Schweine signifikant erhöht (**Abb. 22-F**). Fibronectin hingegen war nur im LAA ($p=0,019$) und RV ($p=0,012$) im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (**Abb. 22-G**). Für *FBNI* konnte nur im RV eine signifikante Veränderung der Genexpression nachgewiesen werden ($p=0,01$, **Abb. 22-H**).

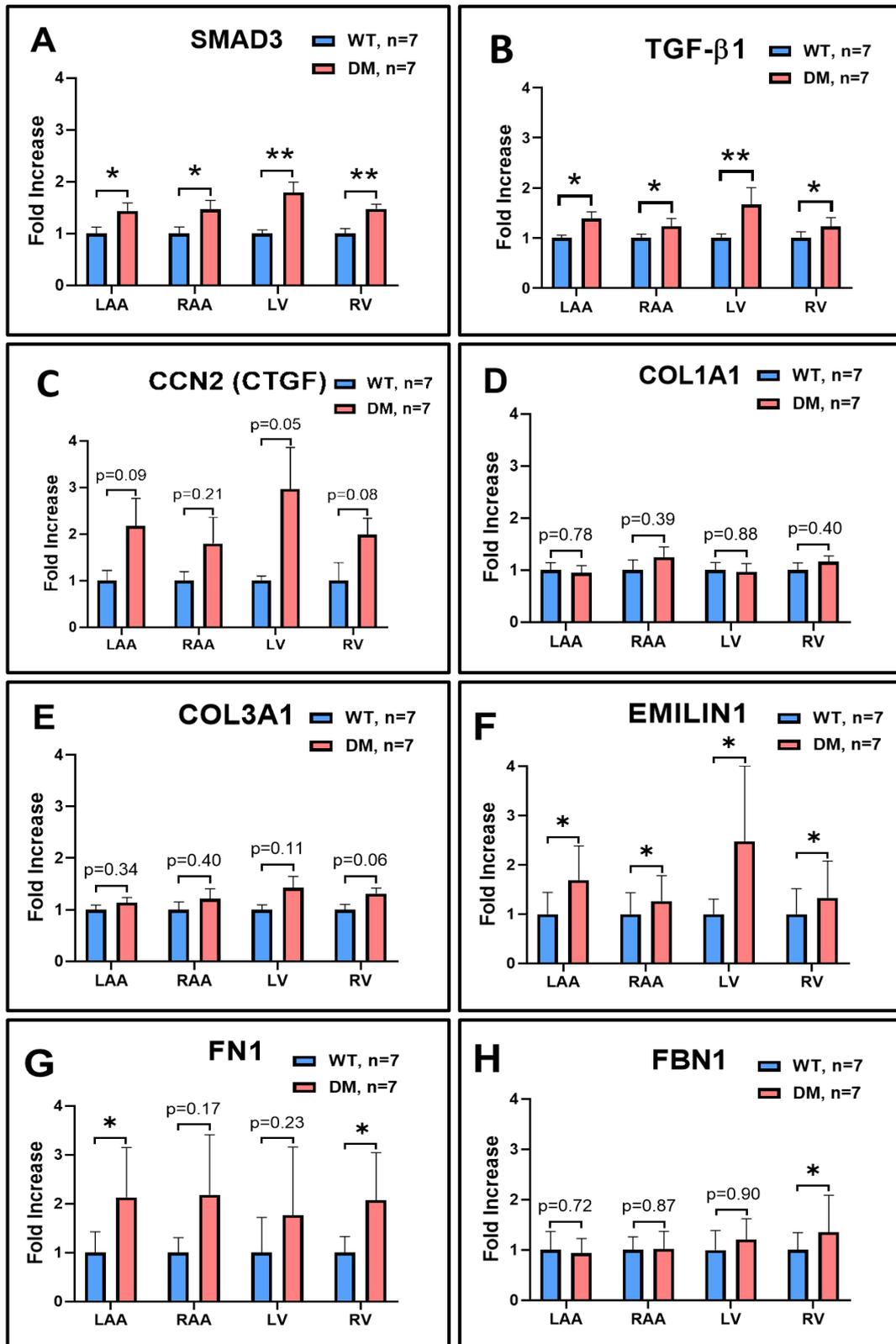


Abbildung 22: Analyse der profibrotischen Gene auf mRNA-Ebene; jeweils ungepaarte Student t-Tests, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

2.1.2. Expression von Ionenkanälen

Für das *SCN5A*-Gen, das für die alpha-Untereinheit des Nav1.5-Kanal codiert, welcher den Einstrom von Natriumionen (I_{Na}) über die Zellmembran während der Phase 0 vermittelt und an der schnellen Depolarisierung des kardialen Aktionspotentials beteiligt ist, zeigte sich in der Expressionsanalyse keine signifikante Veränderung der mRNA in beiden Gruppen, wobei aber ein Trend zur Hochregulation bei den Diabetes-Schweinen insbesondere im RAA ($p=0,05$) zu beobachten war (**Abb. 23-A**).

Die Analyse des *KCND2*, das für den Kv4.2-Kanal codiert und zusammen mit Kv4.3 an der Bildung der schnellen Komponente des transienten K^+ -Auswärtsstroms ($I_{to,f}$; *transient outward current, fast*) beteiligt ist, der hauptsächlich für die erste, schnelle Repolarisation während der Phase 1 des Aktionspotentials (*notch*) verantwortlich ist, ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (**Abb. 23-B**).

Selbiges konnte für *KCND3*, also den Kv4.3-Kanal des $I_{to,f}$ -Stroms, ermittelt werden: auch hier wurde keine signifikante Veränderung zwischen den Gruppen nachgewiesen (**Abb. 23-C**).

KCNA4 codiert für den spannungsabhängigen Kv1.4-Kanal, die langsame Komponente des transienten K^+ -Auswärtsstroms ($I_{to,s}$; *transient outward current, slow*) und trägt somit zur Repolarisation während der Phase 1 des Aktionspotentials bei. Für dieses Gen konnte bei der Expressionsanalyse keine signifikante Veränderung der mRNA in beiden Gruppen gefunden werden (**Abb. 23-D**).

Die Analyse der Expression der mRNA von *CACNA1C*, das für die alpha-Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals (*voltage-gated L-type calcium channel*, LTCC; Cav1.2) codiert und durch seine depolarisierende Wirkung essentiell für die Plateau-Phase des Aktionspotentials ist, ergab eine erhöhte Expression in allen vier Regionen für die Diabetes-Gruppe, wobei lediglich die Erhöhung im Gewebe des RV (WT vs. DM: $p=0,172$) keine Signifikanz erreichte (LAA: $p=0,032$; RAA: $p=0,019$; LV: $p=0,027$, **Abb. 23-E**).

KCNE2, das für die beta-Untereinheit des Kalium-Kanals MiRP1 codiert, und als schnelle Komponente des Kaliumausstroms (I_{Kr} ; *rapid delayed rectifier*) zusammen mit I_{Ks} während der Phase 2 als repolarisierender Strom dem Calciumstrom entgegenwirkt, und mit Beginn der Phase 3 (Repolarisationsphase) überwiegt und dadurch das Aktionspotential beendet, zeigte in den Expressionsanalysen keinen Unterschied zwischen den Gruppen (**Abb. 23-F**).

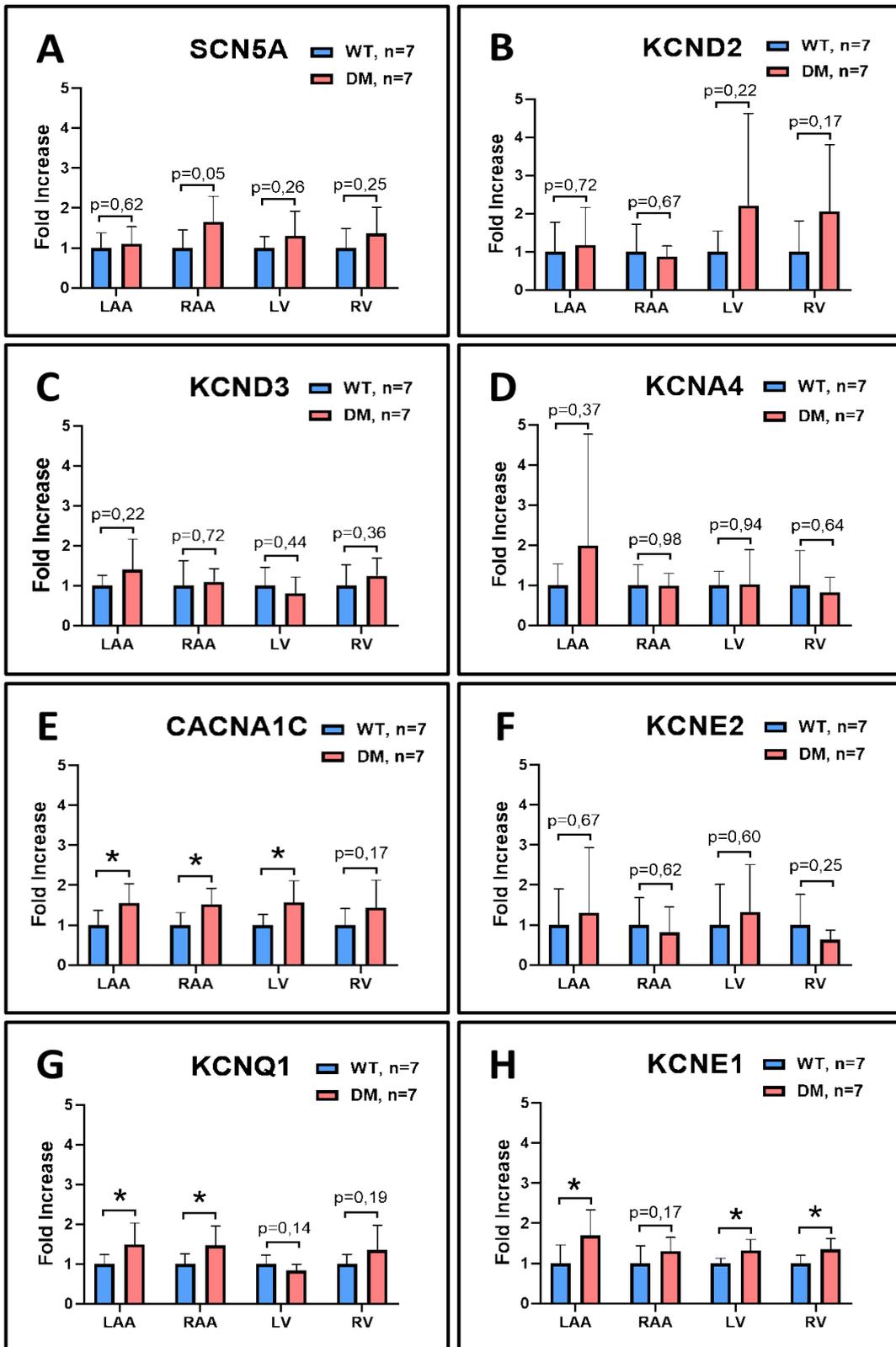
KCNQ1 codiert für die alpha-Untereinheit des $K_v1.7.1$, der einen Teil des I_{Ks} - (*slow delayed rectifying*) Stroms während der Phase 3 bildet, und dadurch zur Repolarisation der Zellen beiträgt. Bei der Expressionsanalyse zeigte sich nur in den beiden Atrien eine signifikante Hochregulation dieses Kanals (LAA: $p=0,048$; RAA: $p=0,042$, **Abb. 23-G**).

Für *KCNE1*, der beta-Untereinheit des gleichen Kalium-Kanals, ließ sich eine erhöhte Expression in allen Herzregionen der Diabetes-Schweine nachweisen, die nur im RAA keine Signifikanz erreichte ($p=0,17$) (**Abb. 23-H**).

Für die Expression von *KCNJ2* zeigte sich eine signifikante Veränderung der mRNA im Gewebe aller Regionen der *INS^{C94Y}*-Tiere: in allen vier Herzregionen war sie bei diesen Schweinen signifikant erhöht (LAA: $p=0,041$; RAA: $p=0,035$; LV: $p=0,027$; RV: $p=0,005$, **Abb. 23-I**). Dieses Gen codiert für die alpha-Untereinheit des $K_{ir}2.1$, das zusammen mit $K_{ir}2.2$ und $K_{ir}2.3$ den I_{K1} -Strom bildet, und gegen Ende von Phase 3 und in der Ruhephase (Phase 4) des Aktionspotentials die Stabilisierung des Membranpotentials bei -80 mV bewirkt.

Bei der Analyse von *KCNJ12*, dem Gen, das für die alpha-Untereinheit des $K_{ir}2.2$ desselben Stroms codiert, konnte keine signifikante Expressionsänderung zwischen den Gruppen festgestellt werden (**Abb. 23-J**).

KCNJ4, das für die alpha-Untereinheit des $K_{ir}2.3$ codiert, war lediglich im RAA der Diabetes-Schweine verändert: in dieser Herzregion war die Expression signifikant hochreguliert ($p=0,030$, **Abb. 23-K**).



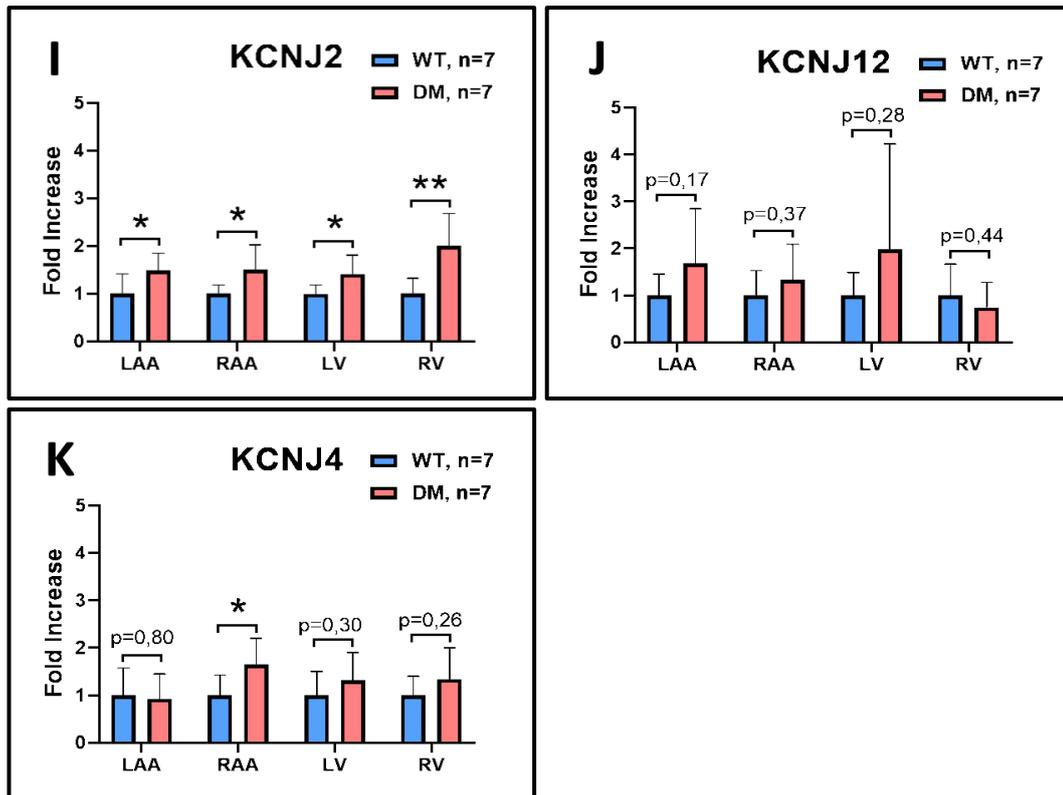


Abbildung 23. Analyse der Genexpression der Ionenkanäle auf mRNA-Ebene; jeweils ungepaarte Student t-Tests, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

2.1.3. Connexine

Für die untersuchten Connexine 37, 40, 43 und 45 konnten folgende Daten ermittelt werden:

Für die Expressionsanalyse des *GJA4*, das für das Cx37 codiert und vor allem in endothelialen und endokardialen Zellen und in Teilen des Kammermyokards gefunden werden kann (HAEFLIGER et al., 2000), konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch ein Trend in Richtung einer Verringerung der Expression in den beiden Vorhöfen der Diabetes-Schweine (LAA: $p=0,09$; RAA $p=0,08$, **Abb. 24-A**).

Bei *GJA5*, das für das Cx40 codiert und zusammen mit Cx43 den Hauptbestandteil der Gap Junctions in den atrialen Kardiomyozyten ausmacht sowie in Zellen des ventrikulären Leitungssystems hoch exprimiert ist (KANAGARATNAM et al., 2002), war die Genexpression in allen Regionen der Diabetes-Schweine hochreguliert und konnte nur im linken Ventrikel ($p=0,21$) keine statistische Signifikanz erreichen (**Abb. 24-B**).

Cx43 (*GJA1*) ist das im Herzen am häufigsten vorkommende Connexin; es lässt

sich im Vorhof- und Kammermyokard, den Tawara-Schenkeln und den Purkinje-Fasern finden (GIOVANNONE et al., 2012). Auch hier konnte eine Expressionsänderung festgestellt werden: in allen Herzregionen der Diabetesgruppe war GJA1 signifikant hochreguliert, insbesondere im RAA ($p < 0,01$, **Abb. 24-C**).

Bei der Analyse der Expression von *GJCI*, das für Cx45 codiert und vor allem in Sinus- und AV-Knotenzellen gefunden werden kann (SOMMER, 2010), deutete sich eine Erhöhung an, die aber nur im LAA ($p = 0,013$) und RV ($p = 0,048$) eine statistische Signifikanz erreichte (**Abb. 24-D**).

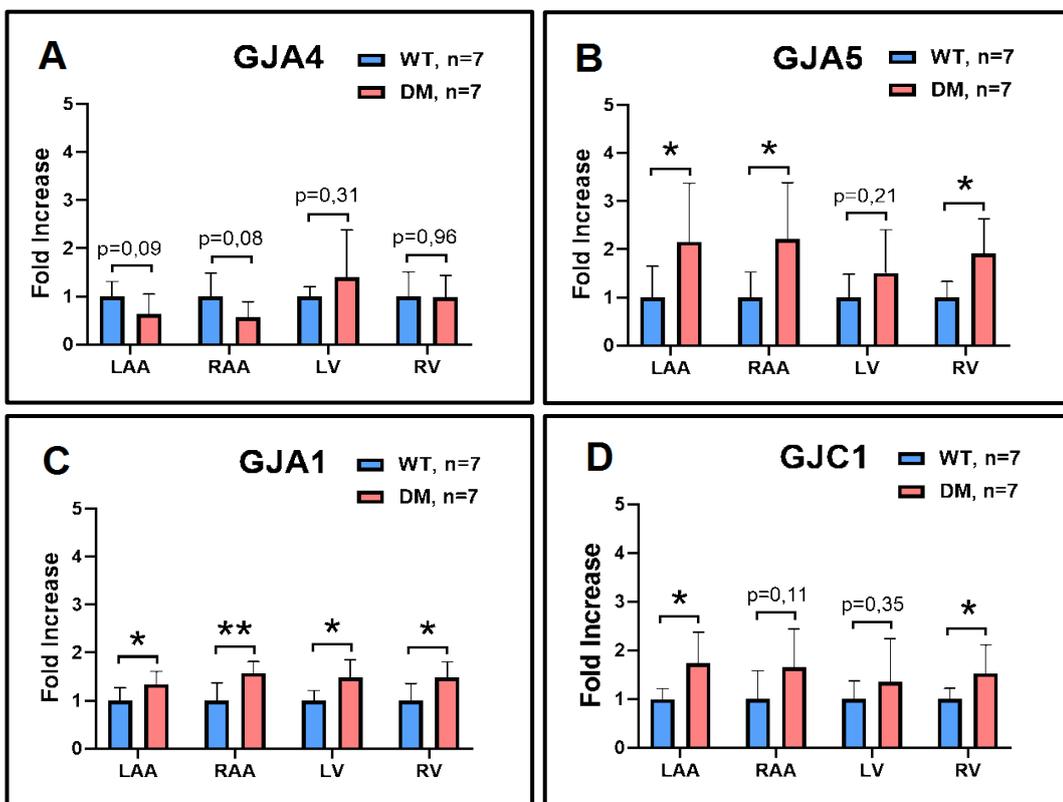


Abbildung 24. Analyse der Genexpression der Connexine 37 (*GJA4*), 40 (*GJA5*), 43 (*GJA1*) und 45 (*GJCI*) auf mRNA-Ebene; jeweils ungepaarte Student t-Tests, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

2.2. Western Blots

Um eine Expressionsanalyse auf Ebene der Proteine durchzuführen, folgte die Analyse der Fibrose-Marker CTGF, TGF- β 1, SMAD3 und des phosphorylierten SMAD3 (Phospho-SMAD3) mit Hilfe von Western Blots. Hierfür wurden Proteine, die zuvor aus dem LAA, LV, RAA und RV isoliert worden waren, verwendet.

Die Analyse für TGF- β 1 ergab eine signifikante Hochregulation der Proteinexpression im LAA (WT: $0,869 \pm 0,049$; DM: $1,126 \pm 0,058$, $p=0,044$, **Abb. 25-A**), LV (WT: $0,524 \pm 0,096$; DM: $2,626 \pm 0,622$, $p=0,046$, **Abb. 25-B**) und RAA (WT: $0,745 \pm 0,096$; DM: $1,194 \pm 0,081$, $p=0,035$, **Abb. 25-C**) der Diabetes-Schweine im Vergleich zu den Wildtypen. Lediglich im RV (WT: $0,861 \pm 0,159$; DM: $1,158 \pm 0,186$, $p=0,416$) konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden (**Abb. 25-D**).

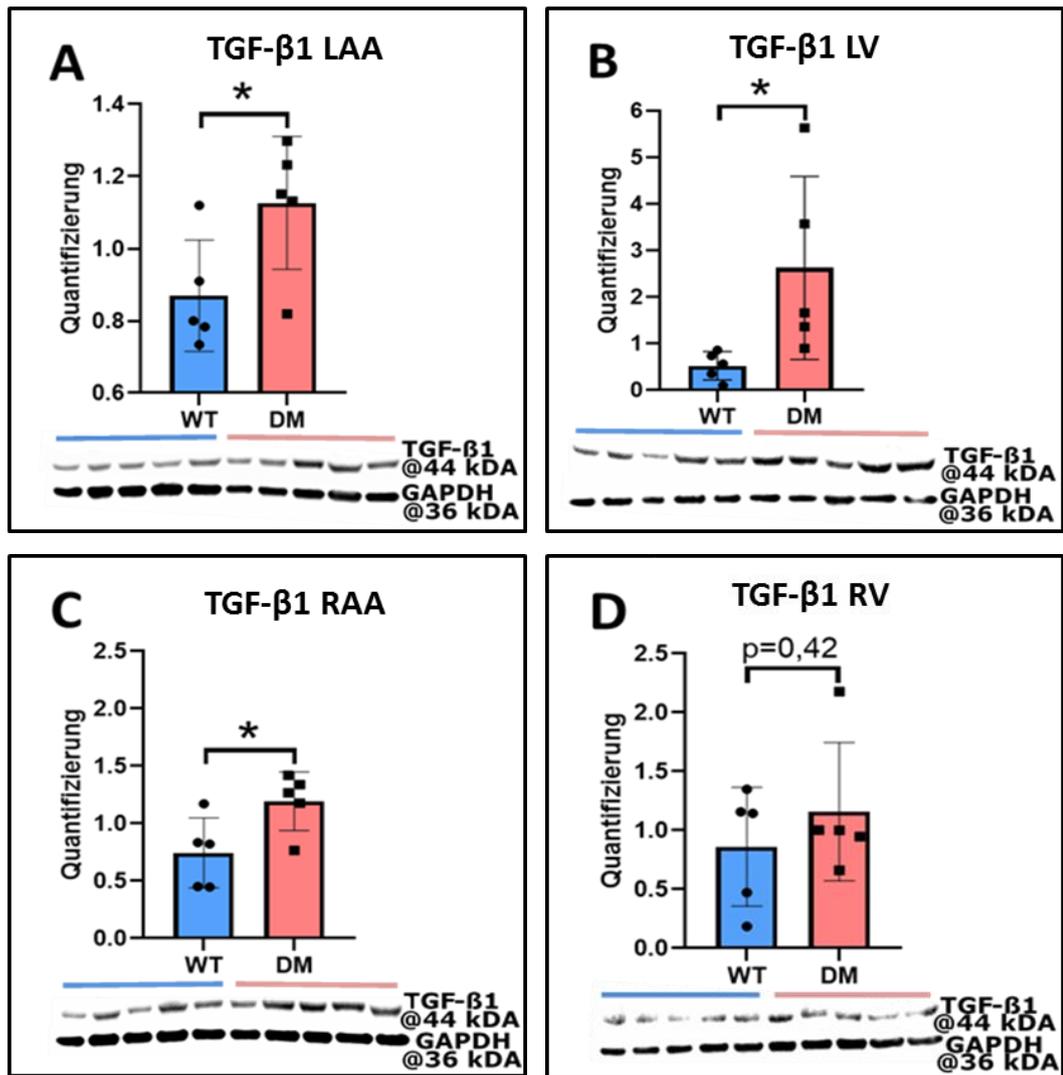


Abbildung 25: Analyse der Proteinexpression von TGF-β1 mit Hilfe von Western Blots im LAA (A), LV (B), RAA (C) und RV (D) bei WT- und DM-Schweinen; jeweils ungepaarte Student t-Tests, * $p < 0,05$.

Die Auswertung von SMAD3 ergab folgende Ergebnisse (**Abb. 26**): die Proteinexpression war bei den DM-Tieren im Vergleich zu den Kontrollen in allen vier Herzregionen signifikant erhöht. Im LAA war diese Hochregulation besonders deutlich zu sehen (WT: $0,359 \pm 0,056$; DM: $1,007 \pm 0,053$, $p < 0,001$, **Abb. 26-A**).

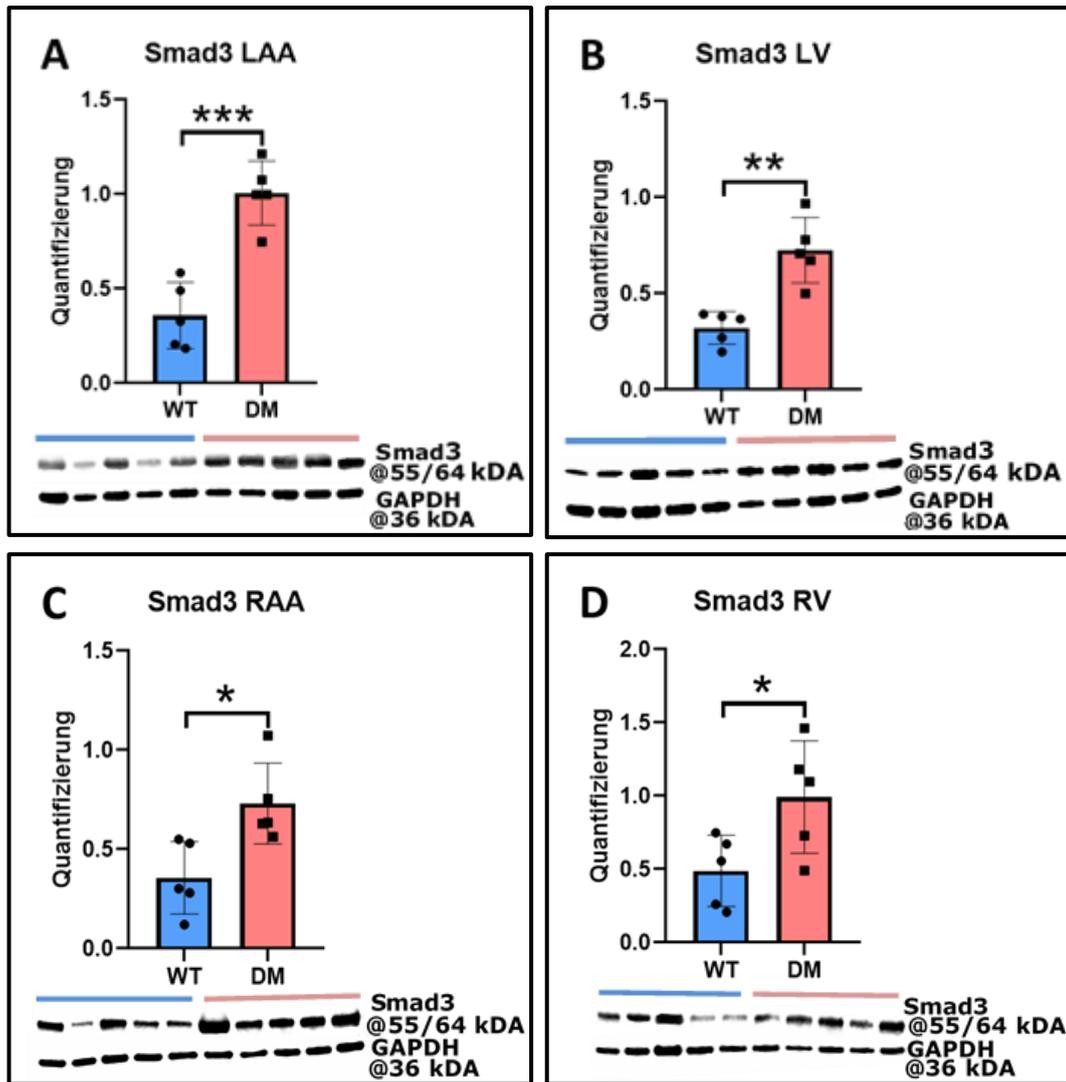


Abbildung 26: Analyse der Proteinexpression von SMAD3 mit Hilfe von Western Blots im LAA (A), LV (B), RAA (C) und RV (D) bei WT- und DM-Schweinen; jeweils ungepaarte Student t-Tests, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ebenso zeigte sich bei der Untersuchung von phosphoryliertem SMAD3 eine Hochregulation bei den Diabetes-Schweinen; im LAA (WT: $0,321 \pm 0,065$; DM: $0,699 \pm 0,094$, **Abb. 27-A**), im LV (WT: $0,234 \pm 0,028$; DM: $0,535 \pm 0,084$, **Abb. 27-B**) und im RAA (WT: $0,353 \pm 0,062$; DM: $1,203 \pm 0,094$, **Abb. 27-C**) konnte diese Signifikanzniveau erreichen. Lediglich im RV (WT: $0,308 \pm 0,061$; DM: $0,680 \pm 0,131$, **Abb. 27-D**) konnte keine statistisch signifikante Veränderung festgestellt werden ($p=0,107$).

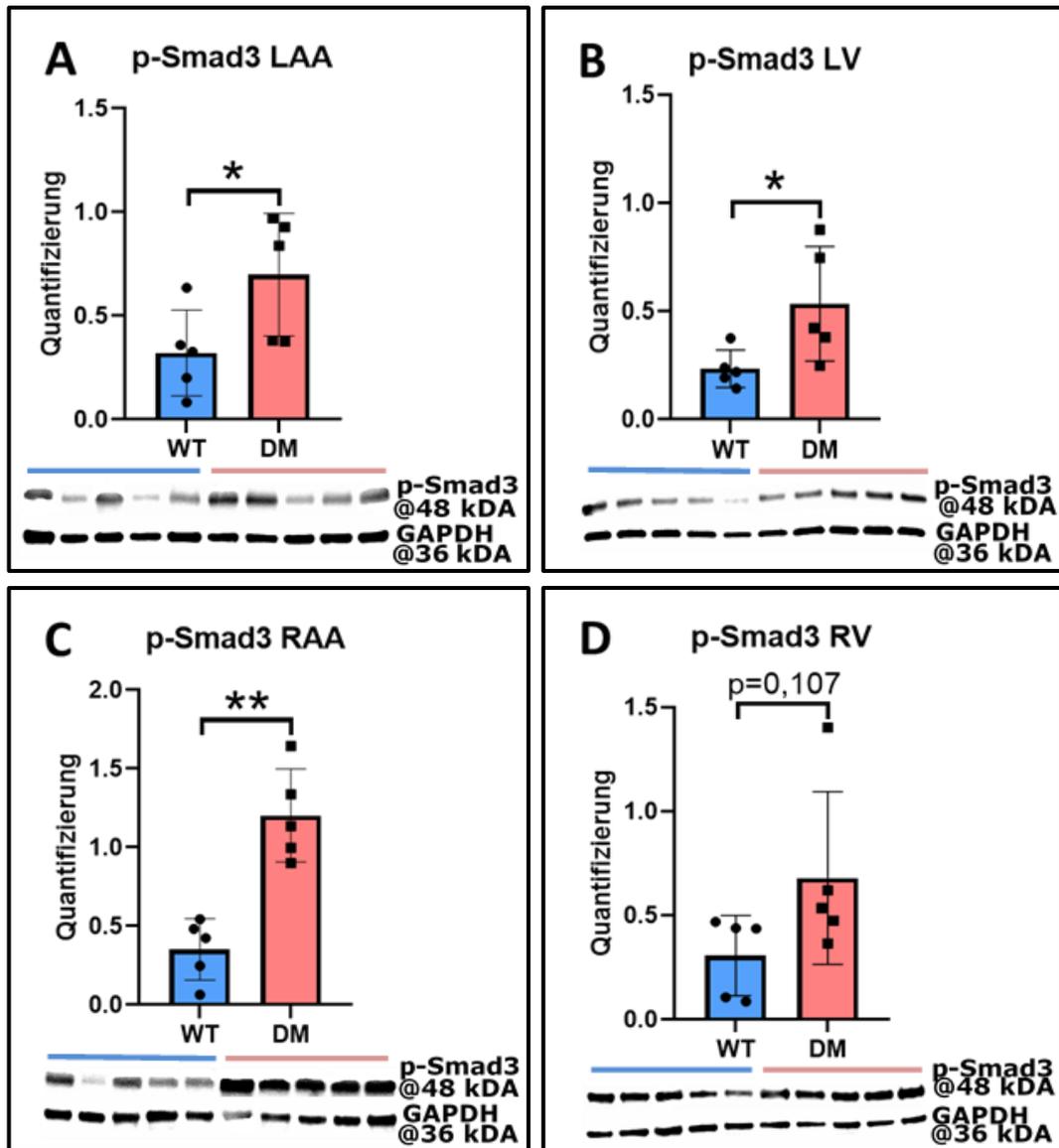


Abbildung 27: Analyse der Proteinexpression von phosphoryliertem SMAD3 (p-SMAD3) mit Hilfe von Western Blots im LAA (A), LV (B), RAA (C) und RV (D) bei WT- und DM-Schweinen; jeweils ungepaarte Student t-Tests, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Ebenso ergab die Analyse der Proteinexpression von CTGF in allen Herzregionen außer dem RV (WT: $0,892 \pm 0,200$; DM: $1,293 \pm 0,158$, $p = 0,299$, **Abb. 28-D**) eine signifikante Hochregulierung bei den DM-Tieren: im LAA zeigte sich bei diesen ($1,278 \pm 0,095$) im Vergleich zu den Kontrollen ($0,686 \pm 0,130$) eine Hochregulierung mit einem p-Wert von 0,031 (**Abb. 28-A**); im LV (WT: $0,776 \pm 0,067$; DM: $1,213 \pm 0,114$, $p = 0,048$, **Abb. 28-B**) und auch im RAA (WT: $0,783 \pm 0,080$; DM: $1,283 \pm 0,127$, $p = 0,046$, **Abb. 28-C**) konnte dieser Effekt bei den *INS^{C94Y}*-Tieren verglichen mit den Wildtypen nachgewiesen werden.

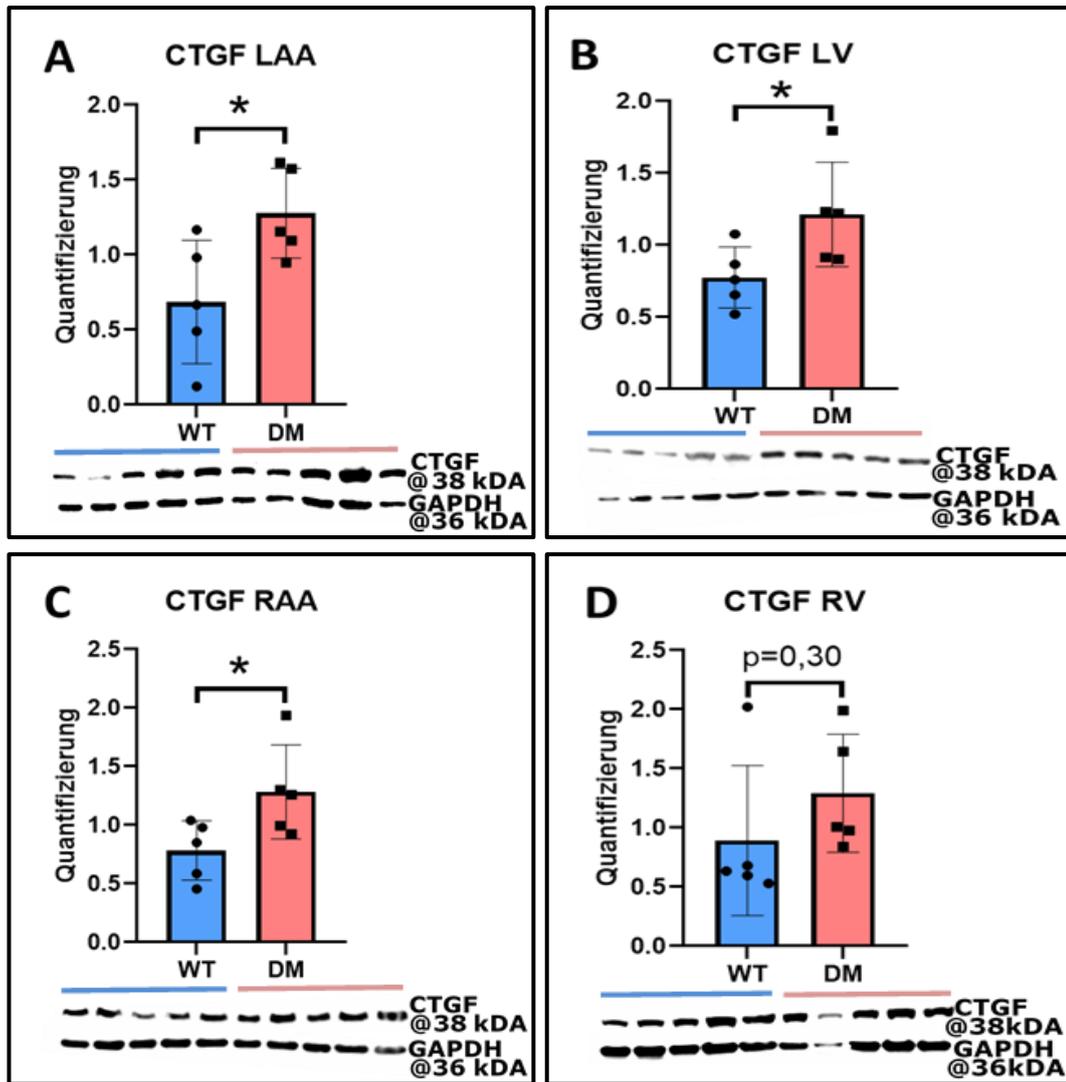


Abbildung 28: Analyse der Proteinexpression von CTGF mit Hilfe von Western Blots im LAA (A), LV (B), RAA (C) und RV (D) bei WT- und DM-Schweinen; jeweils ungepaarte Student t-Tests, * $p < 0,05$.

2.3. Histologie

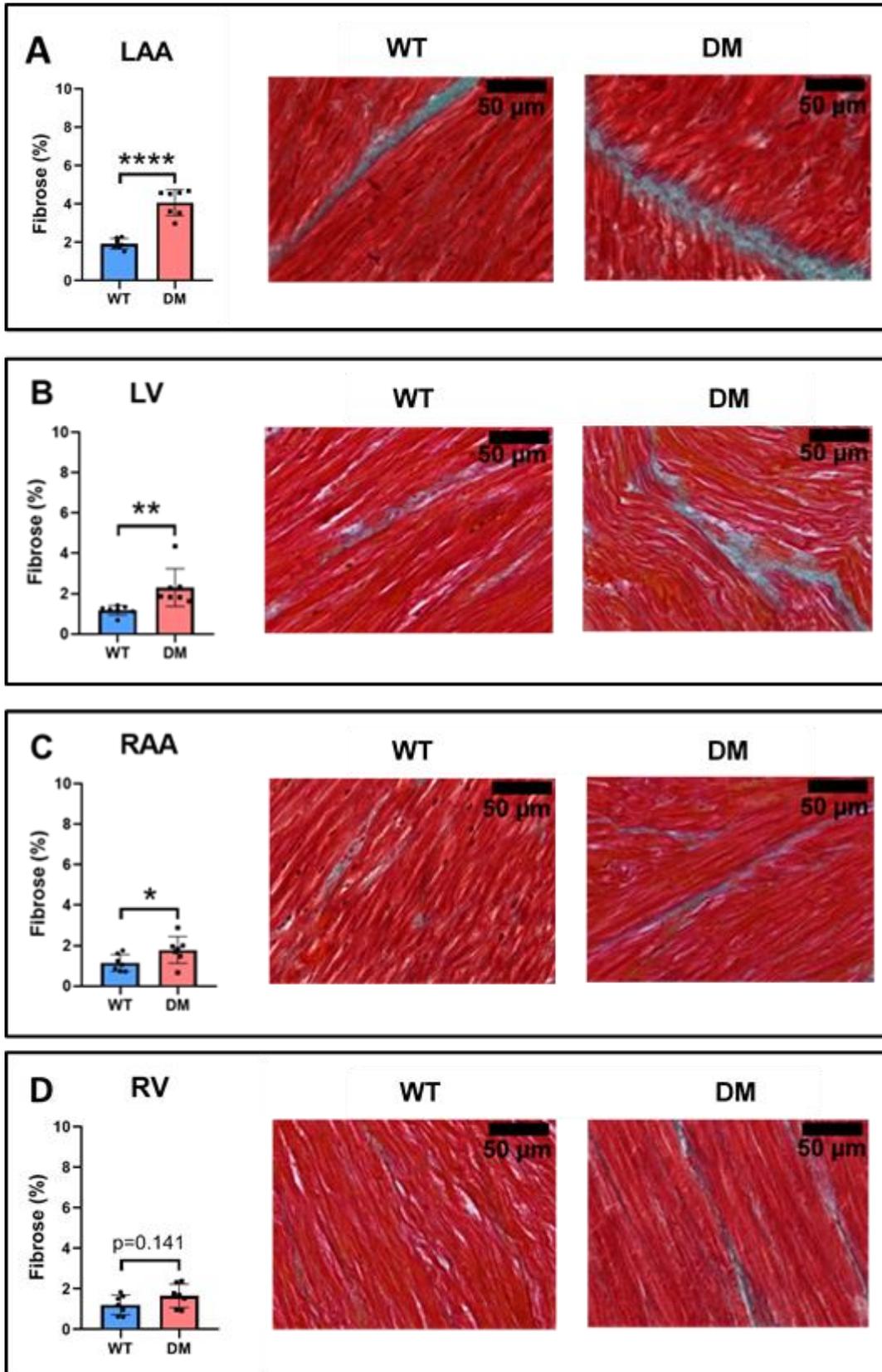
2.3.1. Evaluation interstitieller Fibrose

Im nächsten Schritt erfolgte die Quantifizierung der interstitiellen Fibrose in den beiden Vorhöfen und Ventrikeln. Hierfür wurden sowohl eine Masson Goldner Trichrom (MT) als auch eine Sirius Red (SR) Färbung von allen vier Herzregionen durchgeführt.

Mit Hilfe der MT-Färbung, bei der sich Bindegewebe grün und das Myokard rot anfärbt, konnte eine signifikante Fibrose bei drei der untersuchten Regionen nachgewiesen werden: im LAA (Abb. 29-A) war diese bei den DM-Schweinen

besonders stark ausgeprägt im Vergleich mit den Wildtypen (WT: $1,924 \pm 0,089$ %; DM: $4,070 \pm 0,216$ %, $p < 0,0001$), im LV (**Abb. 29-B**) war der Unterschied hoch signifikant ($p = 0,0098$) zwischen den Gruppen (WT: $1,184 \pm 0,075$ %; DM: $2,306 \pm 0,297$ %), und im RAA (**Abb. 29-C**) mit $p = 0,0493$ noch signifikant (WT: $1,144 \pm 0,131$ %; DM: $1,791 \pm 0,210$ %). Im RV hingegen konnte mit Hilfe der MT-Färbung keine signifikante Veränderung ($p = 0,141$) zwischen den Diabetes- ($1,651 \pm 0,183$ %) und den Wildtyp- ($1,200 \pm 0,154$ %) Schweinen gefunden werden (**Abb. 29-D**).

Außerdem wurde als zweite Fibrose-Färbung Sirius Red verwendet, da diese für die Anfärbung von interstitieller Fibrose etwas sensitiver als Masson Trichrom ist, und somit auch kleinere Unterschiede detektiert werden können. Bei Sirius Red erscheint das Bindegewebe rot auf einem gelb-orangen Hintergrund. Die Färbung wurde mit Gewebeschnitten aus den Herzen der gleichen Schweine durchgeführt. Auch hier konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden: im LAA war die Fibrose bei den DM-Schweinen ($6,983 \pm 0,859$ %) im Vergleich zu den Wildtypen ($3,431 \pm 0,219$ %) hoch signifikant ($p = 0,0058$) vermehrt (**Abb. 29-E**), im LV (WT: $3,031 \pm 0,178$ %; DM: $4,620 \pm 0,333$ %, **Abb. 29-F**) und RAA (WT: $2,513 \pm 0,117$ %; DM: $3,234 \pm 0,176$ %, **Abb. 29-G**) war dieser Unterschied mit $p = 0,0042$ beziehungsweise $p = 0,0144$ ebenfalls signifikant. Nur im RV (**Abb. 29-G**) konnte die Zunahme der Fibrose bei den Diabetes-Schweinen ($3,344 \pm 0,397$ %) im Vergleich zu den Kontrollen ($2,711 \pm 0,154$ %) keine statistische Signifikanz erreichen ($p = 0,238$).



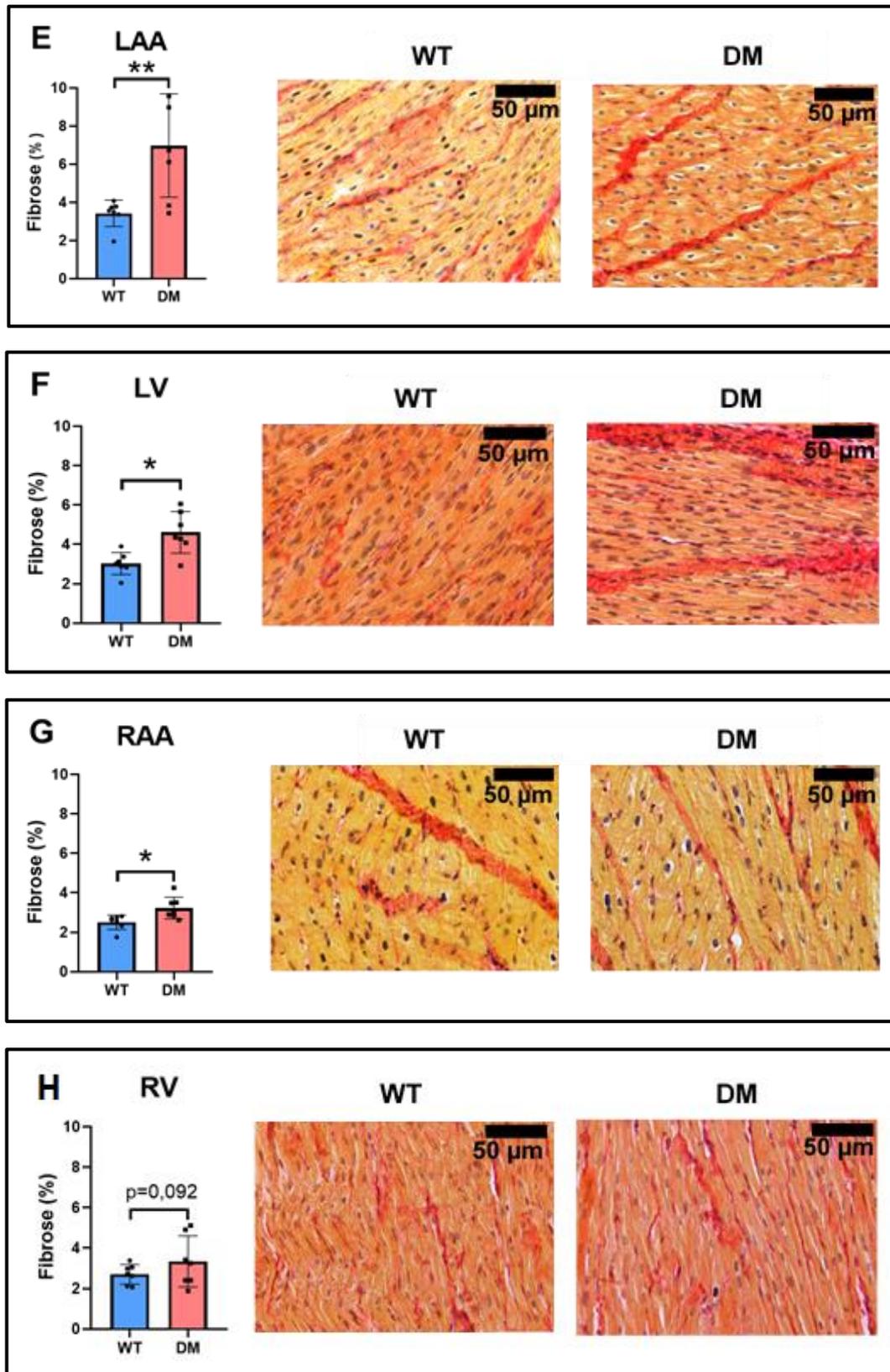
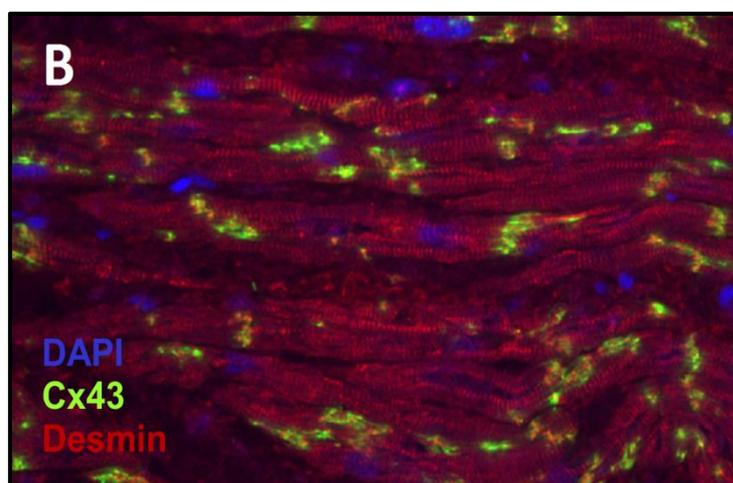
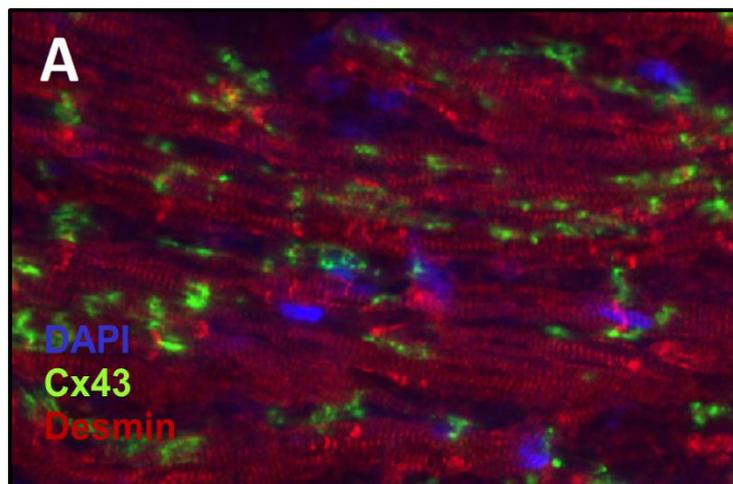


Abbildung 29. Histologie: Quantifizierung der Fibrose mittels Masson Goldner Trichrom (A-D) und Sirius Red (E-H) Färbung im LAA, LV, RAA und RV bei WT- (n=7) und DM- (n=7) Schweinen. jeweils ungepaarte Student t-Tests; *p<0,05, ** p<0,01, ****p<0,0001.

2.3.2. Immunfluoreszenzfärbung

Zuletzt wurden durch Immunfluoreszenzfärbung die Expression und räumliche Anordnung von Cx43 in gefrorenen Gewebeschnitten bei DM- (**Abb. 30-A**) sowie WT- (**Abb. 30-B**) Schweinen beurteilt, da bei Vorhofflimmern eine Lateralisierung von Connexin-43 beschrieben wurde (LI et al., 2016). Da es sich außerdem bei Cx43 um das am häufigsten vorkommende Connexin handelt und es sowohl in den Vorhöfen als auch in den Kammern exprimiert wird, wurde es für die Färbungen verwendet. Hierbei konnte im LAA und LV ein Trend zu einer vermehrten Expression von Cx43 bei den Diabetes-Tieren ($p=0,114$), der im LAA nur knapp das Signifikanzniveau verfehlte ($p=0,072$), beobachtet werden. Im RAA konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden ($p=0,975$). Lediglich im RV war der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant: bei den *INS^{C94Y}*-Schweinen konnte signifikant mehr Cx43 angefärbt werden als bei den Kontrollen ($p=0,027$) (**Abb. 30-C**). Eine Lateralisierung konnte durch die Analyse mit Hilfe des Zeiss Imager M2 nicht nachgewiesen werden.



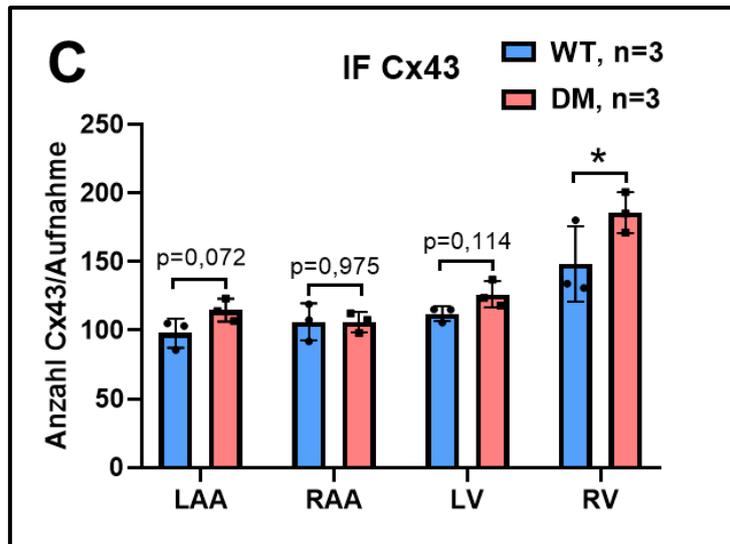


Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung (IF) bei DM- (A) und WT- (B) Schweinen mit Cx43- (grün) und Desmin- (rot) Antikörpern sowie einer Zellkernfärbung mittels DAPI (blau); repräsentative Aufnahmen aus dem RV (40-fache Vergrößerung) mit Quantifizierung (C) von Cx43 im LAA, RAA, LV und RV bei WT- (n=3) und DM- (n=3) Schweinen. jeweils ungepaarte Student t-Tests; *p<0,05.

V. DISKUSSION

1. Wahl der Tierart

Diabetes mellitus ist ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung von Vorhofflimmern: Männer mit Diabetes mellitus haben ein 40 % höheres Risiko, an Vorhofflimmern zu erkranken, bei Frauen liegt es sogar bei 60 % (BENJAMIN et al., 1994). Einige der damit verbundenen strukturellen, elektrischen und autonomen Remodeling-Prozesse konnten anhand von Studien an Patienten identifiziert werden. Zusätzlich sind bereits Tiermodelle des Diabetes-assozierten Vorhofflimmerns beschrieben, die bevorzugten Tierspezies waren dabei Maus, Ratte und Kaninchen (BOHNE et al., 2019). Die oben aufgelisteten Nachteile von Kleintier-Modellen stellen jedoch einen limitierenden Faktor dar. In der vorliegenden Arbeit wurde nach meinem Kenntnisstand zum ersten Mal der Modellorganismus Schwein für die Untersuchung der Diabetes-assozierten Remodeling-Prozesse, die zu Vorhofflimmern führen, verwendet.

So eignet sich das Schwein insbesondere durch seinen dem des Menschen sehr ähnlichen Stoffwechsel als Modelltier für Diabetes mellitus. Unter anderem lassen sich der porcine zirkadiane Rhythmus (tagaktiv) und die Ernährungsweise (Omnivore mit tagsüber stattfindender Nahrungsaufnahme) mit denen des Menschen vergleichen; bei den nachtaktiven und sich fast ausschließlich von pflanzlicher Kost ernährenden Mäusen und Ratten ist dies nicht der Fall (RENNER et al., 2016). Das porcine Insulin unterscheidet sich vom humanen nur durch eine Aminosäure, weshalb es vor Entwicklung des rekombinanten Humaninsulins zur Behandlung des Diabetes mellitus bei Patienten eingesetzt wurde. Zuletzt weisen der Aufbau und die Vaskularisation der Inselzellen im Pankreas, die Verteilung von endokrinen Zellen und die Beta-Zellmasse bei Menschen und Schweinen eine Vielzahl an Gemeinsamkeiten auf (RENNER et al., 2020).

In den letzten Jahren ist die Verwendung des Modellorganismus Schwein in der kardiovaskulären Forschung deutlich gestiegen, auch weil es mittlerweile möglich ist, zuverlässig genetisch veränderte Schweine zu generieren (CLAUSS et al., 2019; WOLF et al., 2019; LÄNGIN et al., 2018; WOLF et al., 2013). Von besonderer

Bedeutung ist hierbei außerdem, dass sich die Anatomie und Elektrophysiologie des Herzens sowie der Metabolismus von Menschen und Schweinen stark ähneln. Die Herzgröße, das Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht, die Koronar- und Klappenanatomie sowie hämodynamische (Herzzeitvolumen, Atemfrequenz, etc.) und elektrophysiologische Parameter (Expression von Ionenkanälen, Morphologie des Aktionspotentials, Herzfrequenz, etc.) ähneln bei Schweinen deutlich mehr denen des Menschen als es bei Nagern der Fall ist. Gerade auch in Bezug auf elektrophysiologische Fragestellungen hat das Schwein bereits erfolgreich Verwendung gefunden: das porcine atriale Tachypacing-Modell ist ein bedeutsames Modell für die Vorhofflimmern-Forschung (SWINDLE et al., 2012). Das große Potential des Schweines als Tiermodell für die translationale kardiovaskuläre Forschung konnte dabei eine Studie von Quintanilla et al. darlegen: mit ihrem Schweine-Modell, bei dem eine AV-Knoten-Ablation kombiniert mit der Implantation eines Zweikammerschrittmachers durchgeführt wurde, gelang es, nach durchschnittlich 4,4 Monaten des atrialen Tachypacings ein sich selbst erhaltendes, persistierendes Vorhofflimmern auszulösen (QUINTANILLA et al., 2019). Dieses persistierende Vorhofflimmern hatte eine durchschnittliche Dauer von 4,1 Monaten und erlaubte damit die Erprobung einer neuartigen Strategie des *in vivo* Mappings und der Ablation, die im Anschluss erfolgreich bei Patienten eingesetzt werden konnte.

Darüber hinaus eignen sich Schweine durch ihre der des Menschen sehr ähnliche Anatomie der Koronargefäße zur Untersuchung des Remodelings aufgrund von ischämischer Kardiomyopathie: nach Verschluss des *Ramus interventricularis anterior* der linken Koronararterie für 90 Minuten konnten strukturelles Remodeling mit verstärkter interstitieller Fibrose in den Atrien, und folglich vermehrt Episoden von Vorhofflimmern mittels Burststimulation induziert werden (CLAUSS et al., 2020).

2. Das *INS*^{C94Y}-Schwein als Tiermodell des Diabetes mellitus

Wie bereits beschrieben, gibt es vier verschiedene Methoden, mit denen Diabetes mellitus in Schweine-Modellen induziert werden kann. Die genetische Modifikation und insbesondere die Mutation des *INS*^{C94Y}-Gens haben aber entscheidende Vorteile gegenüber der Induktion mittels Applikation von Beta-Zell-

toxischen Substanzen, durch Pankreatektomie oder einer speziellen hochkalorischen Diät (RENNER et al., 2020). Der Vorteil eines Tiermodells des Diabetes mellitus mit einem klar definierten Krankheitsbeginn ist unter anderem, dass die Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System mit dem Voranschreiten der Erkrankung evaluiert werden können.

Bei der Verwendung von Streptozotozin, einem zytotoxischen Glukose-Analogen, das über den Glukose-Transporter 2 (GLUT 2) in die Beta-Zellen gelangt und dadurch Nekrotisierungen und schließlich den Zelltod dieser hervorruft, müssen einige Limitationen hinsichtlich der Induzierbarkeit von Diabetes beachtet werden. So weisen Jungtiere generell eine hohe Beta-Zell-Regeneration auf, was insbesondere bei der Verwendung von Schweinen zu Schwierigkeiten führen kann, da diese aufgrund ihres schnellen Wachstums meist bereits im Alter von drei bis vier Monaten in der Forschung eingesetzt werden. Zudem exprimieren porcine Beta-Zellen im Vergleich zu Ratten oder Primaten geringe Mengen von GLUT 2, was die Aufnahme von Streptozotozin in die Zellen verzögert (DUFRANE et al., 2006). Letztlich gilt für alle Spezies, dass individuelle Schwankung bei der Sensitivität für diese Chemikalie die Induktion und Steuerung des Streptozotozin-vermittelten Diabetes mellitus erschweren.

Die Pankreatektomie stellt einen äußerst invasiven chirurgischen Eingriff dar und wird fast ausschließlich als Modell für die präklinische Inselzelltransplantation verwendet (RENNER et al., 2020).

Der fütterungsinduzierte Diabetes mellitus löst viele der beim menschlichen metabolischen Syndrom beschriebenen Symptome aus: Fettsucht, Dyslipidämie, verringerte Glukose-Toleranz und Insulin-Resistenz (RENNER et al., 2016). Dennoch kann allein über die Diät keine anhaltende Hyperglykämie im Schwein hervorgerufen werden (PANASEVICH et al., 2018). Außerdem zeigen sich deutliche Unterschiede bezüglich des Ansprechens auf die Diät-vermittelte Induktion aufgrund des genetischen Hintergrundes: Ossabaw- und Chinesische Bama-Miniatur-Schweine sind beispielsweise eher dafür anfällig als Yucatan- oder Duroc-Schweine (NEEB et al., 2010; ZHANG et al., 2019).

Die Auswirkungen der Mutation des *INS*^{C94Y}-Gens ähneln stark den Auswirkungen bei Menschen mit Expression des mutierten *INS*^{C96Y}-Gens (PNDM): durch die Akkumulation von fehlgefaltetem (Pro)-Insulin im endoplasmatischen Retikulum wird durch den entstandenen ER-Stress die Apoptose in den Beta-Zellen ausgelöst und in der Folge eine veränderte Insulin-Sekretion mit Hypoinsulinämie, erhöhtem

Nüchternblutzucker, verringerter Beta-Zellmasse und reduziertem Körperwachstum hervorgerufen (LIU et al., 2015). Zudem zeigen die *INS^{C94Y}*-Tiere im Alter von 24 und 40 Monaten Diabetes-assoziierte morphologische Veränderungen der Retina und bereits während der ersten Lebenswochen Katarakte; ihre Lebern weisen zusätzlich verschiedenste Charakteristiken, die durch eine Diabeteserkrankung mit Insulin-Defizienz hervorgerufen werden, auf Multiomics Ebene auf (RENNER et al., 2013; KLEINWORT et al., 2017; BACKMAN et al., 2019). Die Nieren zeigten jedoch keine klassischen Anzeichen einer diabetischen Nephropathie wie Verlust von Nephronen oder interstitielle Fibrose (RENNER et al., 2013). Entsprechend konnten auch in dieser Arbeit bei den Diabetes-Schweinen erhöhte Nüchternblutzuckerwerte sowie ein signifikant reduziertes Körper- und Herzgewicht nachgewiesen werden; das Herzgewicht war dabei jedoch proportional zum Körpergewicht reduziert, was durch das unveränderte Verhältnis dieser beiden Parameter beim Vergleich der beiden Gruppen belegt werden konnte. Die in Wildtypen vergleichsweise hohen systolischen und diastolischen Blutdrücke könnten auch im Zusammenhang mit ihrem höheren Körpergewicht stehen (EVANS et al., 2017). Zu den spezifischen, mit diesem Phänotyp verbundenen kardiovaskulären Auswirkungen gibt es bislang nur eine Studie, in der bei *INS^{C94Y}*-Schweinen eine verminderte Kapillarisation des Herzmuskelgewebes, die zu einer Minderdurchblutung des Myokards führen kann, festgestellt werden konnte (HINKEL et al., 2017). Außerdem zeigte sich bei den genetisch veränderten Tieren im Alter fünf Monaten eine vermehrte Fibrose nach experimenteller Induktion einer Myokardischämie. Diese Veränderungen könnten Anzeichen einer diabetischen Kardiomyopathie, wie sie bei Diabetes-Patienten beschrieben wurde, sein: die Auswirkungen auf die mikrovaskulären Endothelzellen des Koronarsystems sowie auf Fibroblasten, Entzündungszellen und Kardiomyozyten haben strukturelles Remodeling mit Hypertrophie und interstitieller Fibrose zur Folge. Im Hinblick auf die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen seines Phänotyps lässt sich also sagen, dass sich das *INS^{C94Y}*-Schwein zur Untersuchung der Diabetes-assoziierten Erkrankungen – darunter auch Vorhofflimmern – als besonders passendes Modell anbietet.

3. Diskussion der Ergebnisse

3.1. Hämodynamik

Wie bereits berichtet, kann Diabetes mellitus zu strukturellen Veränderungen des Myokards führen. Dabei ist die diabetische Kardiomyopathie mit einer erhöhten Inzidenz für alle drei bekannten Formen der Herzinsuffizienz verbunden: Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF), mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF) sowie einem intermediären Typen, bei dem die Ejektionsfraktion zwischen der der HFpEF und der HFrEF liegt (LEHRKE & MARX, 2017). Bei der HFpEF kann auf eine subklinische Phase, bei der eine asymptomatische linksventrikuläre diastolische Dysfunktion vorliegt, im weiteren Krankheitsverlauf eine systolische Dysfunktion folgen (FILARDI et al., 2019). Dabei scheint die Pathophysiologie darin zu bestehen, dass der durch die strukturellen Umbauprozesse verkleinerte, versteifte linke Ventrikel eine reduzierte Füllung aufweist, was bei erhöhtem venösem Rückfluss zu einem rapiden Anstieg des Füllungsdrucks bei kaum vorhandener Steigerbarkeit des Schlagvolumens führt (MAEDER et al., 2010). Als Konsequenz daraus weisen Patienten Leistungsintoleranz und Belastungsdyspnoe auf. Zudem zeigen sich Einschränkungen der linksatrialen und rechtsventrikulären Funktion als Spätfolgen (MELENOVSKY et al., 2014; MELENOVSKY et al., 2015). Bei den *INS^{C94Y}*-Schweinen konnte jedoch keine Veränderung der Drücke im Herzen im Vergleich zu den Wildtypen festgestellt werden. Erklärung hierfür könnte das sehr junge Alter der Tiere (fünf bis sechs Monate) sein, weswegen sich die Herzen noch in einer diesbezüglich subklinischen Phase ähnlich der HFpEF befinden könnten und somit noch keine messbare Dysregulation der Drücke stattgefunden hat. Eine weitere Untersuchung in einem fortgeschrittenerem Alter der Tiere könnte weitere Daten liefern und eine endgültige Aussage darüber ermöglichen. Ebenso könnten echokardiographische Untersuchungen, die mangels apparativer Ausstattung im Rahmen dieser Arbeit nicht stattfinden konnten, eine diastolische Dysfunktion nachweisen und so einen tieferen Einblick erlauben.

3.2. 12-Kanal-EKG

Bei der Auswertung des 12-Kanal-EKGs konnte bei den Diabetes-Schweinen als einziger signifikanter Unterschied zu den Wildtypen eine verkürzte QRS-Dauer festgestellt werden. Dieser Parameter repräsentiert die Erregungsausbreitung im

Ventrikel und damit auch die Geschwindigkeit, mit der die Depolarisation erfolgt. Bedeutend für die Dauer des QRS-Komplexes sind die depolarisierenden Natrium- und Calcium-Kanäle. So führt die Blockierung des Natrium-Kanals zu einer verlangsamten Depolarisation und Erregungsausbreitung (Harmer et al., 2011). Falls die Verlangsamung der Erregungsleitung groß genug ist, kann dies als Verlängerung des QRS-Komplexes im EKG detektiert werden. Zudem konnten Zemzemi et al. in einer Simulations-Studie feststellen, dass eine Blockierung des $I_{Ca,L}$ zu einer Verbreiterung des QRS-Komplexes und einer geringgradigen Reduzierung der Geschwindigkeit der Erregungsausbreitung führen (ZEMZEMI et al., 2015). Außerdem scheint eine Runterregulation der Genexpression von Connexinen die Leitungsgeschwindigkeit in den Atrien zu reduzieren (WATANABE et al., 2012). Um herauszufinden, ob in diesem Diabetes-Modell Natrium- und/oder Calcium-Kanäle verändert exprimiert werden, und ob möglicherweise eine zusätzliche Regulation der Connexin-Expression zu dem beobachteten Effekt führen könnte, wurde die Expression im INS^{C94Y} -Schwein anhand von Real-Time qPCRs evaluiert.

3.3. EPU

Von entscheidender Bedeutung für die Etablierung des Modells war die Frage, ob sich durch den Diabetes mellitus ein Effekt bezüglich der Induzierbarkeit von Vorhofflimmern zeigen würde. Der Anteil der Diabetes-Schweine, bei denen eine Episode von mindestens 30 Sekunden ausgelöst werden konnte, lag bei 61,5 %, bei den Wildtypen nur bei 10 %, und war damit signifikant erhöht. Bei 30,8 % der DM-Schweine konnte persistierendes VHF ausgelöst werden, in der Kontrollgruppe nur bei 10 % der Tiere, was einen Trend darstellte, der jedoch noch kein Signifikanzniveau erreichte. Das INS^{C94Y} -Schwein konnte somit als adäquates Modell für paroxysmales Vorhofflimmern etabliert werden.

Ein großer Vorteil unseres Modells ist die Definition von Vorhofflimmern: irreguläre RR-Intervalle über mindestens 30 Sekunden. Bei zahlreichen anderen Studien dagegen wurden bereits Episoden, die für wenige Sekunden induziert werden konnten, als paroxysmales Vorhofflimmern gewertet (HAUGAN et al., 2004; GREISER et al., 2009; YU et al., 2010; SUZUKI et al., 2014). Durch unsere vergleichsweise strenge Definition konnten wir kurze und damit möglicherweise unspezifische Episoden ausschließen und somit einen signifikanten Phänotypen nachweisen. Darüber hinaus konnte bei den INS^{C94Y} -Schweinen vermehrt

anhaltendes Vorhofflimmern (> 30 Minuten) ausgelöst werden, das nur durch elektrische Kardioversion beendet werden konnte. Bei vielen anderen Tiermodellen, beispielsweise dem Ischämie-Modell des Schweines, zeigt sich hingegen kein anhaltendes Vorhofflimmern (CLAUSS et al., 2020). Die Untersuchung des persistierenden Vorhofflimmerns könnte neue Strategien für die Behandlung von Patienten, ähnlich des Schweine-Modells von Quintanilla et al., aufzeigen (QUINTANILLA et al., 2019). Es muss dennoch betont werden, dass bislang keine spontan einsetzenden Episoden von Vorhofflimmern in der *INS^{C94Y}*-Gruppe beobachtet werden konnten, da die technischen Möglichkeiten hierzu bislang fehlten. Hier könnte die Implantation von Event-Recordern, welche EKG-Aufzeichnungen über einen längeren Zeitraum erlauben würden, in einer zusätzlichen Kohorte für Aufklärung sorgen.

Bei der elektrophysiologischen Untersuchung war die atriale effektive Refraktärzeit für alle sechs Basiszykluslängen in den *INS^{C94Y}*-Tieren signifikant verkürzt. Aus verschiedenen Tiermodellen ist bekannt, dass eine Verkürzung der AERP zur Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern führen kann. Dies haben Wijffels et al. 1995 erstmals anhand eines Ziegen-Modells beschrieben und unter dem Konzept „atrial fibrillation begets atrial fibrillation“ zusammengefasst (WIJFFELS et al., 1995). Auch beim Menschen wurde dieser Mechanismus nachgewiesen. Daoud et al. konnten bereits nach wenigen Minuten des Pacing-induzierten Vorhofflimmerns eine signifikante AERP-Verkürzung bei Patienten feststellen (DAOUD et al., 1996). So spielt eine Veränderung der Refraktärzeit eine entscheidende Rolle in der Arrhythmogenese: trifft eine elektrische Erregung auf eine Zelle, die eigentlich noch refraktär sein sollte, aber durch Umbauprozesse des Gewebes bereits wieder erregbar ist, kann eine Art Kurzschlussverbindung entstehen und Reentry-Kreise ermöglicht werden.

Ein wichtiger Mechanismus, der zu einer Verkürzung der AERP führen kann, ist verändertes Calciumhandling (NATTEL & DOBREV, 2012). Das durch atriale Tachykardie ausgelöste Remodeling reduziert die Dauer des atrialen Aktionspotentials sowohl durch einen verringerten $I_{Ca,L}$ -Strom als auch durch eine Verstärkung der auswärts gerichteten Kalium-Ströme, insbesondere des I_{K1} . Dabei strömen Calciumionen mit jedem Aktionspotential in die Zelle, was zu einer Akkumulation von Calcium führt. Dies wiederum triggert eine Serie von Umstrukturierungen auf molekularer Ebene, die den Ca^{2+} -Einstrom reduzieren und die Anreicherung von Calcium in der Zelle stoppen. Ein wichtiger Mechanismus

hierbei ist die Bindung von Ca^{2+} an den Calcium-Kanal vom L-Typ, was eine Reduzierung des $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ -Stroms und der APD innerhalb von Minuten hervorruft. In der Folge wird jedoch die atriale Refraktärzeit so stark verkürzt, dass dadurch Reentry-Kreise und die Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern ermöglicht werden. Dieser Mechanismus könnte also eine Erklärung für die in unserem Modell beobachtete reduzierte atriale Refraktärzeit und erhöhte Anfälligkeit für Vorhofflimmern sein. Weitere Kenntnisse hierzu könnten Patch-Clamp-Untersuchungen des $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ liefern.

Im Weiteren wurde sich der Untersuchung der Mechanismen auf molekularbiologischer Ebene gewidmet, welche für den beobachteten Phänotypen ursächlich sein könnten.

3.4. Histologie

Als erste Stufe der Untersuchung des profibrotischen Remodelings wurde die interstitielle Fibrose anhand von Masson Goldner Trichrom und Sirius Red Färbungen evaluiert. Hier konnte in allen vier Herzregionen der Diabetes-Gruppe vermehrt Fibrose gefunden werden, lediglich im RV konnte bei beiden Färbungen kein Signifikanzniveau erreicht werden. Um dies auf Gen- und Protein-Ebene weiter zu analysieren, wurden Matrixproteine und profibrotische Mediatoren mit Hilfe von Real-Time qPCRs und Western Blots untersucht.

3.5. Genexpressionsanalyse

3.5.1. Expression von Genen der extrazellulären Matrix und profibrotischer Mediatoren

TGF- β 1 scheint eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Vorhofflimmern-assoziierten interstitiellen Fibrose zu spielen (LIN et al., 2015): die Hochregulation von *TGF- β 1* triggert eine Signalkaskade, durch welche *SMAD2/3* aktiviert werden und an *SMAD4* binden, wodurch der SMAD-Komplex gebildet wird. In der Folge wird dadurch der Transkriptionsfaktor *CTGF* hochreguliert, was wiederum zu einer gesteigerten Produktion von Proteinen der extrazellulären Matrix führt. Zudem bewirkt dies eine verstärkte Differenzierung kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten. Zwei dieser Regulatoren, nämlich *TGF- β 1* und *SMAD3*, waren in den Genexpressionsanalysen bei den Diabetes-Schweinen in allen vier untersuchten Herzregionen signifikant erhöht. Diesen Effekt konnten auch Lugenbiel et al. bei ihrem atrialen Tachypacing-Modell im Schwein nachweisen: 14 Tage nach Beginn

des Tachypacings war die Genexpression von *TGF-β1* und *SMAD3* signifikant hochreguliert (LUGENBIEL et al., 2017). Dasselbe konnte in dieser Studie auch für *CTGF* beobachtet werden. In unseren Analysen konnte zwar ein Trend zur Hochregulation von *CTGF*, jedoch kein signifikanter Unterschied gesehen werden, ein Effekt, der möglicherweise auf eine noch zu geringe n-Zahl zurückgeführt werden kann. Die Expression von Kollagen I und V wurde von Lugenbiel et al. anhand von Western-Blot-Analysen untersucht. Hierbei war die Expression dieser beiden Matrixproteine bei den Tachypacing-Tieren signifikant erhöht. In unserem Modell konnte bei der Analyse von Kollagen I und III auf Gen-Ebene keine veränderte Expression festgestellt werden. Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Arrhythmie-Trigger und die damit induzierten Remodeling-Prozesse sein. So unterscheidet sich beispielsweise das atriale Remodeling bei Tiermodellen des Myokardinfarkts deutlich von dem des ventrikulären Tachypacings (PANDIT & WORKMAN, 2016).

Da keine Dysregulation von Kollagen I und III nachgewiesen werden konnte, wurden weitere Matrixproteine untersucht. Das dabei untersuchte *EMILINI* war bei den Real-Time qPCRs der *INS^{C94Y}*-Schweine in allen vier Herzregionen signifikant hochreguliert. *EMILINI* gehört neben Fibronectin und Fibrillin zu den Glykoproteinen, die für die Bildung von extrazellulärer Matrix von großer Bedeutung sind (SINGH et al., 2010). Obwohl bekannt ist, dass *EMILINI* Zelladhäsive Eigenschaften besitzt und für die Ablagerung von Elastin-Fasern wichtig ist, ist über seinen Einfluss auf Kardiomyozyten bisher kaum etwas bekannt (COLOMBATTI et al., 2012).

Fibronectin (*FNI*) ist Bestandteil der extrazellulären Matrix zahlreicher verschiedener Gewebearten, dient als Verknüpfung zwischen den Zellen und dem interstitiellen Kollagen-Geflecht und beeinflusst unter anderem das Zellwachstum, die Zelladhäsion und die Wundheilung (CORBETT et al., 1998). In den Atrien von Patienten mit Vorhofflimmern konnten erhöhte Mengen an Fibronectin nachgewiesen werden, wobei eine Verbindung zu der beobachteten Proliferation von kardialen Fibroblasten vermutet wurde (RUCKER-MARTIN et al., 2002). In einer Studie, bei der Proben aus den Vorhöfen von Patienten mit Herzinsuffizienz, die teilweise an Vorhofflimmern erkrankt waren, analysiert wurden, konnte eine signifikante Hochregulierung der Protein-Expression von FN1 in der VHF-Gruppe gezeigt werden (MOLINA et al., 2018). Und auch bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten *INS^{C94Y}*-Schweinen konnte in allen vier Herzregionen eine

Hochregulation des *FNI* nachgewiesen werden, welche im LAA und RV Signifikanzniveau erreichte.

Fibrillin (*FBNI*), das den Hauptbestandteil der Microfibrillen ausmacht, formt zusammen mit Elastin die elastischen Fasern in Geweben. Molekulare Defekte des Fibrillins können zu Erkrankungen des kardiovaskulären Systems, wie dem Marfan-Syndrom, führen (LOEYS et al., 2004). Interessanterweise konnten Lin et al. in ihrem Schweine-Modell des atrialen Tachypacings, bei dem anhaltendes Vorhofflimmern induziert wurde, nicht nur eine signifikante Hochregulation von *FNI*, sondern auch von *FBNI* nachweisen (LIN et al., 2007). In unserem Schweine-Modell konnte durch die Genexpressionsanalysen nur im RV für *FBNI* eine Hochregulation in der *INS^{C94Y}*-Gruppe nachgewiesen werden. Damit scheint die interstitielle Fibrose in unserem Modell nicht auf Kollagenablagerungen, sondern auf einer Hochregulation von *EMILINI* und *FNI* zu beruhen.

3.5.2. Expression von Ionenkanälen

Für das *SCN5A*-Gen, das für die alpha-Untereinheit des Nav1.5-Kanal kodiert und dadurch an der schnellen Depolarisation des kardialen Aktionspotentials beteiligt ist, konnte bei den Real-Time qPCR-Analysen kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden. Somit scheint eine Regulation der Genexpression dieses Ionenkanals nicht für die Verkürzung der QRS-Dauer bei den Diabetes-Schweinen verantwortlich zu sein. Diese Beobachtung stimmt mit dem Ergebnis einer Studie, in der bei Ratten ein Typ 2 Diabetes mellitus induziert wurde, überein: auch hier konnte keine Regulation dieses Ionenkanals gezeigt werden (LI et al., 2016). Eine Limitation der Analyse der Genexpression von Ionenkanälen ist jedoch, dass sich hieraus nicht auch automatisch eine Aussage über deren Funktion, beziehungsweise den von ihnen erzeugten Ionenstrom tätigen lässt. So könnte eventuell durch den Diabetes mellitus die Funktion des Nav1.5-Kanals beeinflusst worden sein, beispielsweise durch veränderte Öffnungseigenschaften. Um dies zu klären, wäre eine Patch-Clamp-Untersuchung vonnöten.

Ebenso konnte bei den Genexpressionsanalysen von *KCND2*, *KCND3* und *KCNA4* keine signifikant veränderte Regulation festgestellt werden. Diese Kalium-Kanäle bilden die schnelle und langsame Komponente des transienten K⁺-Auswärtsstroms, der für die erste Repolarisationsphase (Phase 1) verantwortlich ist. Weitere Ergebnisse hierzu könnten Patch-Clamp-Untersuchungen liefern, bei denen die Ionenströme durch einzelne Ionenkanäle gemessen werden können. Diese Methode

stand jedoch zum Zeitpunkt der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung.

Die Analyse der Expression der mRNA von *CACNA1C*, das für die alpha-Untereinheit des L-Typ-Calciumkanals kodiert, konnte in allen vier Herzregionen eine Hochregulation dieses Gens belegen, die lediglich im RV nicht signifikant war. Bei verschiedenen Tiermodellen des Diabetes mellitus wurden hierzu teils widersprüchliche Ergebnisse erzielt. So konnte bei Kaninchen, bei denen durch Alloxan ein Insulin-abhängiger Diabetes ausgelöst wurde, mit Hilfe von Patch-Clamp-Untersuchungen eine erhöhte Dichte der Calcium-Kanäle vom L-Typ ($Ca_v1.2$) beobachtet werden (LIU et al., 2012). Zudem zeigten diese Tiere eine verlängerte APD. In einem Ratten-Modell des Typ-1-DM konnte hingegen nachgewiesen werden, dass sowohl auf Gen- als auch auf Protein-Ebene $Ca_v1.2$ in den Atrien signifikant reduziert war, während $Ca_v3.1$, ein weiterer Calcium-Kanal, signifikant hochreguliert war, was in der Summe zu einer Verlängerung der APD führte (PAN et al., 2016). In anderen Modellen des Vorhofflimmerns und im Gewebe von Patienten konnte eine Reduktion des Calcium-Stroms $I_{Ca,L}$ gezeigt werden (ZHAO et al., 2016). Diese Verminderung hatte ein verkürztes Aktionspotential und eine daraus resultierende Reduktion der Refraktärzeiten zur Folge.

In unserem Modell ist jedoch trotz der Hochregulation der Genexpression von *CACNA1C* eine verkürzte Refraktärzeit in den Diabetes-Tieren nachweisbar. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz dieser Ergebnisse ist die Komplexität des Diabetes-assoziierten Vorhofflimmerns und die Mannigfaltigkeit der beteiligten Ionenströme sowie die verschiedenen untersuchten Spezies und Modelle. Um den scheinbaren Widerspruch zwischen einer erhöhten Genexpression von *CACNA1C* und einer reduzierten AERP in Diabetes-Schweinen zu erklären, müssen Patch-Clamp-Untersuchungen erfolgen.

Zudem wurden weitere Kalium-Kanäle, die für die Dauer des Aktionspotentials und der Refraktärzeit von essenzieller Bedeutung sind, untersucht. Auch wenn die Genexpression des *KCNE2* in diesem Schweine-Modell nicht signifikant reguliert war, müssen weitere Untersuchungen (Patch-Clamp) erfolgen, um die Bedeutung des I_{Kf} für das elektrische Remodeling vollständig zu analysieren.

Chen et al. konnten in einer chinesischen Familie, bei der angeborenes, persistierendes Vorhofflimmern aufgetreten war, eine Gain-of-function-Punktmutation in dem *KCNQ1*-Gen, die auch Auswirkungen auf das *KCNE1*-Gen

hatte, nachweisen (CHEN et al., 2003). Sie vermuteten, dass dabei die verkürzte APD und reduzierte Refraktärzeit in atrialen Kardiomyozyten Grund für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern war. In dem hier untersuchten Diabetes-Schwein konnte ebenfalls nur in den Atrien der *INS^{C94Y}*-Gruppe eine signifikante Hochregulation des *KCNQ1* festgestellt werden. Interessanterweise wird *KCNQ1* auch in den Beta-Zellen im Pankreas des Menschen exprimiert (ROSENGREN et al., 2012). In einem Maus-Modell konnte dabei ein Regulationsmechanismus beobachtet werden: hier führte eine Hochregulation der Expression von *KCNQ1* zu einer beeinträchtigten Insulin-Sekretion nach Glukose-Stimulation (YAMAGATA et al., 2011). Ob ein solcher Mechanismus auch im *INS^{C94Y}*-Schwein vorhanden ist, und ob auch im Umkehrschluss eine reduzierte Insulin-Sekretion zu einer erhöhten Expression von *KCNQ1* führt, muss allerdings noch evaluiert werden. Ein mögliches Modell hierfür wäre beispielsweise die dauerhafte Insulin-Behandlung einer *INS^{C94Y}*-Gruppe mit anschließender Analyse der Genexpression.

Wie bereits beschrieben, werden Gain-of-function-Mutationen in Genen, die an der Bildung des I_{Ks} -Stroms beteiligt sind, mit einer Verkürzung der APD und der effektiven Refraktärzeit in Kardiomyozyten in Verbindung gebracht, wodurch ein proarrhythmogenes Substrat in den Atrien geschaffen werden kann. Olesen et al. konnten bei Patienten mit Vorhofflimmern zwei Gain-of-function-Mutationen des *KCNE1*-Gens feststellen, die mit einer verstärkten Wirkung des I_{Ks} in Verbindung stehen und für die vermehrte Suszeptibilität für Vorhofflimmern verantwortlich gemacht werden (OLESEN et al., 2012). Die *INS^{C94Y}*-Schweine zeigten eine Hochregulation von *KCNE1* und eine erhöhte Induzierbarkeit von Vorhofflimmern. Ob hier ein Zusammenhang besteht, muss jedoch weiter untersucht werden, da eine veränderte Expression nicht zwingend eine veränderte Funktion bedeutet, vielmehr aber eine veränderte Funktion durchaus bei unveränderter Genexpression vorliegen kann.

Von den drei Kalium-Kanälen Kir2.1, Kir2.2 und Kir2.3, die zusammen den I_{K1} -Strom bilden, scheint lediglich der Kir2.1 in dem untersuchten Schweine-Modell des Diabetes mellitus verändert exprimiert zu sein. Der einwärts gleichrichtende Kaliumstrom I_{K1} spielt eine besondere Rolle im elektrischen Remodeling: er ist für die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials sowie die Regulation der Repolarisation verantwortlich, sodass Abweichungen in der Funktion und Menge des Kanals zu bedeutsamen Veränderungen der atrialen Refraktärzeit führen

(NATTEL 2002). In diversen Studien konnte bereits die Bedeutung insbesondere des Kir2.1 für die Entstehung von Vorhofflimmern belegt werden (DOBREV et al., 2002; ZHANG et al., 2005). Eine Hochregulation dieses Kalium-Kanals reduziert die Aktionspotentialdauer und verkürzt die atriale effektive Refraktärzeit, was in der Folge die Stabilisation von kreisenden Erregungen ermöglicht (PANDIT et al., 2005). Auch in unserem Modell wurde eine vermehrte Expression von *KCNJ2* nachgewiesen. Dies könnte also eine mögliche Erklärung für die verkürzte AERP und das vermehrte Auftreten von persistierendem Vorhofflimmern in der elektrophysiologischen Untersuchung bei *INS^{C94Y}*-Schweinen sein, sofern mit einer vermehrten Genexpression auch ein vermehrter Kaliumstrom einhergeht, was zukünftig weiter untersucht werden muss.

3.5.3. Expression von Connexinen

Folgende vier Connexine wurden mit Hilfe von Real-Time qPCRs evaluiert: Connexin-37, -40, -43 und -45. Connexin-37, für das *GJA4* kodiert, wird nicht nur in endothelialen und endokardialen Zellen und in Teilen des Kammermyokards gefunden, sondern auch in Monozyten/Makrophagen sowie Thrombozyten. Connexin-40 bildet zusammen mit Connexin-43 den Hauptbestandteil der Gap Junctions in den atrialen Kardiomyozyten. Es wird vom *GJA5*-Gen kodiert und zusätzlich in Zellen des ventrikulären Leitungssystems vermehrt exprimiert (KANAGARATNAM et al., 2002). Connexin-43 (*GJA1*) ist das im Herzen am häufigsten vorkommende Connexin; es lässt sich im Vorhof- und Kammermyokard, den Tawara-Schenkeln und den Purkinje-Fasern finden (GIOVANNONE et al., 2012). Daneben wurde die Expression von *GJC1* analysiert, das für Connexin-45 kodiert und vor allem in Sinus- und AV-Knotenzellen gefunden werden kann (SOMMER, 2010).

Derouette et al. konnten zeigen, dass ein Polymorphismus im *GJA4*-Gen zu einem veränderten Leitvermögen und einer reduzierten Durchlässigkeit des Connexin-37 führt (DEROUELTE et al., 2009). Zudem wurden hierdurch die Monozyten-Adhäsion und Thrombozyten-Aggregation beeinflusst. Für die Entstehung von Vorhofflimmern scheint dies insofern von Bedeutung zu sein, als dass eine Veränderung der Monozyten-Adhäsion und Thrombozyten-Aggregation zur Induktion proinflammatorischer Prozesse führt; Inflammation und die damit verbundene Antwort des Immunsystems wiederum erhöhen das Risiko von Vorhofflimmern (HU et al., 2015). In unserem Diabetes-Modell konnte zwar keine

signifikante Expressionsänderung des *GJA4*-Gens gefunden werden, dennoch konnte ein Trend zu einer Herunterregulation in den beiden Atrien der *INS^{C94Y}*-Schweine gezeigt werden. In Anbetracht der oben beschriebenen Studien könnte dies hinweisend auf einen proarrhythmogenen Mechanismus sein, der zur erhöhten Induzierbarkeit von Vorhofflimmern bei diesen Tieren führen könnte.

Bei *GJA5*, das für das Connexin-40 kodiert und zusammen mit dem Connexin-43 (kodiert von *GJA1*) den Hauptbestandteil der Gap Junctions in den atrialen Kardiomyozyten ausmacht sowie in Zellen des ventrikulären Leitungssystems hoch exprimiert ist (KANAGARATNAM et al., 2002), war die Genexpression in allen Regionen der Herzen der Diabetes-Schweine hochreguliert und konnte nur im linken Ventrikel keine statistische Signifikanz erreichen. Passend hierzu konnte in einer Studie mit Diabetes-Patienten, bei der Western-Blot-Analysen an Proben aus dem RAA durchgeführt wurden, eine erhöhte Expression von Connexin-40 beobachtet werden (DALEAU et al., 2010). In derselben Studie konnte keine signifikante Regulation von Connexin-43 gezeigt werden; bei den in dieser Arbeit untersuchten Diabetes-Schweinen war *GJA1* jedoch in allen Herzregionen signifikant hochreguliert. Zahlreiche Studien zeigen Diskrepanzen bezüglich der Expression von Connexin-43 und der Anfälligkeit für Vorhofflimmern auf (JENNINGS & DONAHUE, 2013). Mutationen im *GJA1*-Gen bei familiär auftretendem Vorhofflimmern scheinen durch eine reduzierte Expression von Connexin-43 zur Entstehung dieser Arrhythmie beizutragen (THIBODEAU et al., 2010). Rucker-Martin et al. konnten keine veränderte Expression, sondern eine relative Zunahme der Anzahl von unphosphoryliertem und/oder lateralisiertem Connexin-43 beobachten (RUCKER-MARTIN et al., 2006). Um zu evaluieren, ob eine Lateralisierung auch bei den *INS^{C94Y}*-Schweinen nachgewiesen werden kann, wurde im Anschluss an die Real-Time-qPCR-Analysen eine Immunfluoreszenzfärbung mit Connexin-43 Antikörpern durchgeführt.

Bei der Analyse der Expression von *GJCI*, das für Cx45 kodiert und vor allem in Sinus- und AV-Knotenzellen gefunden werden kann (SOMMER, 2010), deutete sich eine Erhöhung in der Diabetes-Gruppe an, die aber nur im LAA und RV eine statistische Signifikanz erreichte. Zur Rolle von Connexin-45 beim Diabetes-vermittelten Vorhofflimmern sind bisher wenige Studien vorhanden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Missense-Mutationen im *GJA5* mit der Entstehung von Vorhofflimmern verbunden sein können (GOLLOB et al., 2006). Ob es sich bei der im *INS^{C94Y}*-Schwein beobachteten Hochregulation von *GJA5* um einen Diabetes-

assozierten Pathomechanismus handelt, oder ob endogene Prozesse der Gegenregulation zu einer erhöhten Expression führen, bleibt somit offen.

3.6. Western Blots

Um die veränderte Genexpression der profibrotischen Mediatoren TGF- β 1, SMAD3 und CTGF auf Protein-Ebene zu bestätigen, wurden zusätzlich Western Blots durchgeführt. Da SMAD3 im Kontext der profibrotischen Signalkaskade phosphoryliert und damit aktiviert wird, wurde zudem die Expression von phosphoryliertem SMAD3 untersucht.

Die Ergebnisse der Genexpression konnten auf Proteinebene bestätigt werden, alle drei Proteine waren in den vier Herzregionen in der Diabetes-Gruppe hochreguliert; nur für TGF- β 1 und CTGF konnte jeweils im RV kein Signifikanzniveau erreicht werden. Darüber hinaus konnte auch eine vermehrte Protein-Expression von phosphoryliertem SMAD3 bei den Diabetes-Schweinen beobachtet werden. Dieses entsteht durch die Phosphorylierung von inaktivem SMAD3 und bildet als nun aktivierte Form zusammen mit SMAD4 den SMAD-Komplex, welcher wiederum nach Translokation in den Zellkern die Transkription von CTGF initiiert (LUGENBIEL et al., 2017). Insgesamt ließ sich somit die Eignung des *INS^{C94Y}*-Schweines als Modell für strukturelles Remodeling bekräftigen.

3.7. Immunfluoreszenzfärbung von Connexin-43

Zuletzt wurden durch Immunfluoreszenzfärbung die Expression und räumliche Anordnung von Cx43 bei DM- sowie WT-Schweinen beurteilt. Diese konnte jedoch keine eindeutige Regulation von Connexin-43 bei den Diabetes-Tieren darstellen. Lediglich im RV konnte eine signifikante Erhöhung nachgewiesen werden, die im LAA nur ein Trend blieb, was jedoch auch an der relativ niedrigen n-Zahl liegen könnte. Somit müsste die Connexin-Färbung bei weiteren Tieren durchgeführt werden, um dies endgültig verifizieren zu können. Eine Lateralisierung konnte nicht beobachtet werden; dies sollte aber unter Verwendung eines sensitiveren Mikroskops, etwa eines Konfokalmikroskops, überprüft werden, da dadurch eine genauere Lokalisierung der Connexine erlaubt wird.

4. Relevanz und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das *INS^{C94Y}*-Schwein vermehrt Vorhofflimmern entwickelt und zahlreiche Parameter des strukturellen und

elektrischen Remodelings nachgewiesen werden konnten, sich dieses Modell damit als ein geeignetes Großtiermodell des Diabetes-assoziierten Vorhofflimmerns erwiesen hat.

Die bereits ausführlich besprochenen Ähnlichkeiten des porzinen Modellorganismus mit dem humanen Organismus begründen die große Bedeutung von Untersuchungen spezifischer Fragestellungen in diesem Modell; die vorliegende Arbeit konnte hierzu einen wichtigen Beitrag leisten. Dennoch muss beachtet werden, dass bei der Vielzahl an unterschiedlichen Einflüssen (z.B. unterschiedliche Expression von Ionenkanälen) auch Kompensationsmechanismen vorliegen könnten, die nicht direkt durch den Diabetes mellitus verursacht werden, andererseits könnten einzelne Effekte eventuell dadurch aber kaschiert werden. Außerdem konnten keine Patch-Clamp-Messungen durchgeführt werden, sodass derzeit keine Aussagen hinsichtlich der Funktion, d.h. der Ionenströme, sondern lediglich der Expression der entsprechenden Ionenkanäle möglich sind. Dies ist insofern von besonderer Bedeutung, da eine veränderte Expression nicht zwingend eine veränderte Funktion bedeutet, vielmehr aber eine veränderte Funktion durchaus bei unveränderter Genexpression vorliegen kann.

Einen wichtigen Faktor für die bei den Diabetes-Schweinen erhöhte Induzierbarkeit von Vorhofflimmern stellt die verkürzte atriale effektive Refraktärzeit dar. Dies konnte in zahlreichen Studien an Humanpatienten, aber auch in Tiermodellen belegt werden (DAOUD et al., 1996; WIJFFELS et al., 1995). In unserem Modell könnte hierfür die Hochregulation von *KCNQ1* und *KCNJ2* verantwortlich sein, sofern eine erhöhte Expression der von ihnen kodierten Kalium-Kanäle zu einer verstärkten Wirkung des I_{Ks} - und I_{K1} -Stroms führt, was wiederum zu einer verkürzten APD und AERP führen könnte (CHEN et al., 2003; OLESEN et al., 2012; NATTEL 2002). Eine Messung der Aktionspotentialdauer war leider mit den uns zur Verfügung stehenden Mitteln noch nicht möglich, sollte aber in einer weiteren Kohorte nachgeholt werden. Auch wenn die in den *INS^{C94Y}*-Schweinen nachgewiesene Hochregulation von Regulatoren der profibrotischen Signalkaskade durch den Nachweis erhöhter interstitieller Fibrose belegt werden konnte und somit strukturelles Remodeling dargelegt wurde, können in der Literatur teils widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Veränderung der AERP hierzu gefunden werden. So konnten Liu et al. in ihrem Ratten-Modell der Myokardischämie eine vermehrte interstitielle Fibrose verbunden mit einer verlängerten AERP beobachten (LIU et al., 2019). Dennoch muss im Rahmen des

Diabetes-assoziierten Vorhofflimmerns ein weiterer wichtiger Faktor beachtet werden: die Auswirkungen des Diabetes mellitus auf das autonome Nervensystem. Studien bei Patienten mit Diabetes mellitus konnten einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung des Sympathikus, der Verkürzung der Refraktärzeit und dem erhöhten Risiko für VHF belegen (HANEFELD et al., 2016; GU et al., 2017). Um die Bedeutung dieses Effekts auch im *INS^{C94Y}*-Schwein nachzuweisen, wäre beispielsweise ein Interventionsmodell sinnvoll, bei dem die Diabetes-Tiere eine konsequente Insulin-Behandlung erhalten. Zudem könnte der Einfluss des profibrotischen Remodelings durch Kombination mit einem Modell des Myokardinfarkts weiter evaluiert werden. Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits in Landrasse-Schweinen ein dafür geeignetes Modell etablieren (CLAUSS et al., 2020).

Unsere Ergebnisse sind bislang deskriptiver Natur und erlauben keine endgültigen Aussagen hinsichtlich der Kausalität spezifischer Diabetes-vermittelter Dysregulationen. Da die unterschiedlichen Faktoren des proarrhythmogenen atrialen Remodelings ein komplexes Netzwerk bilden und Expressionsänderungen eines damit verbundenen Gens sich auf die Regulation vieler anderer Gene auswirken können, ist es derzeit methodisch nicht möglich, dieses Zusammenspiel in einem einzelnen Tiermodell zu erfassen. Auch wenn das *INS^{C94Y}*-Schwein zahlreiche der bereits beschriebenen Effekte widerspiegelt und auch ganz neue Ansätze zur Untersuchung bietet, hat auch dieses Modell Limitationen und liefert keine vollständige Erklärung der äußerst komplexen Erkrankung Vorhofflimmern. Nichtsdestotrotz liefert diese Arbeit einen interessanten Einblick in mögliche neue Mechanismen des proarrhythmogenen Remodelings. Dies könnte möglicherweise in Zukunft neue Wege für die Therapie des Diabetes-assoziierten Vorhofflimmerns aufzeigen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Bei Vorhofflimmern handelt es sich um die häufigste Herzrhythmusstörung des Menschen; die genauen proarrhythmogenen Mechanismen, die zu Vorhofflimmern führen, sind bislang jedoch unzureichend bekannt, zudem sind die zur Verfügung stehenden pharmakologischen und nicht-pharmakologischen Behandlungsmöglichkeiten unbefriedigend. Ein Risikofaktor für das Auftreten von Vorhofflimmern ist Diabetes mellitus (DM). Um die Komplexität der Elektrophysiologie und der Arrhythmogenese auf dem Boden einer Diabeteserkrankung zu verstehen, und um künftig innovative therapeutische Optionen entwickeln zu können, bedarf es der möglichst kliniknahen Abbildung von Erkrankungen in Tiermodellen. Eine hierfür besonders geeignete Spezies stellt das Hausschwein (*Sus scrofa domestica*) dar.

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand eines Schweine-Modells, das einen permanenten neonatalen Diabetes mellitus (PNDM) entwickelt, in verschiedenen *in vivo* Untersuchungen sowie molekularbiologischen und histologischen Untersuchungen mögliche Mechanismen, die für die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern im Rahmen einer Diabeteserkrankung verantwortlich gemacht werden, erforscht. Dafür wurden insgesamt 33 Schweine verwendet und in folgende Gruppen unterteilt: Schweine mit Diabetes mellitus (*INS^{C94Y}/DM*, n=15) sowie Geschwistertiere ohne Diabetes mellitus (Wildtyp/WT, n=18) als Kontrollen. Bei der *INS^{C94Y}*-Gruppe handelte es sich um genetisch veränderte Schweine, bei denen ein Aminosäureaustausch von Cystein nach Tyrosin (C94Y) in einer Insulin-Fehlfaltung, und letztlich der Apoptose der insulinproduzierenden Beta-Zellen im Pankreas und einem stabilen diabetischen Phänotyp resultierte.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass genetisch veränderte Diabetes-Schweine eine erhöhte Anfälligkeit für Vorhofflimmern haben: es ließen sich durch Burststimulation signifikant mehr Episoden von paroxysmalem Vorhofflimmern in diesen Schweinen als in Wildtypen induzieren. Außerdem konnte vermehrt persistierendes Vorhofflimmern ausgelöst werden. Elektrophysiologische Veränderungen wie eine verkürzte atriale effektive Refraktärperiode könnten hierfür unter anderem ursächlich sein. Um die zugrundeliegenden Pathomechanismen weiter zu erforschen, wurde strukturelles und elektrisches

Remodeling anhand von Histologie, Real-Time qPCR und Western Blot evaluiert. Dabei konnte in *INS^{C94Y}*-Schweinen durch Masson Trichrom und Sirius Red Färbung signifikant mehr interstitielle Fibrose gefunden werden. Auf Gen- und Protein-Ebene wurden sodann die dabei involvierten profibrotischen Signalmoleküle und Matrixproteine untersucht. Hier schienen vor allem *TGF- β 1*, (phosphoryliertes) *SMAD3*, *CTGF*, *EMILIN1*, *FBN1* und *FNI* beteiligt zu sein, da diese bei den Diabetes-Schweinen hochreguliert wurden.

Um das elektrische Remodeling weiter zu evaluieren, wurde die Genexpression verschiedener, für die Bildung des kardialen Aktionspotentials bedeutsamer Ionenkanäle sowie im Herzen exprimierter Connexine analysiert. Dabei konnte eine Hochregulation von *KCNQ1* und *KCNJ2* gefunden werden. Dies stellt einen möglichen Pathomechanismus dar, sofern eine erhöhte Expression der von ihnen kodierten Kalium-Kanäle zu einer verstärkten Wirkung des I_{Ks} - und I_{K1} -Stroms führt, was wiederum zu einer verkürzten Aktionspotentialdauer und AERP führen könnte. Die genauen Zusammenhänge und Pathomechanismen des Diabetes-assoziierten proarrhythmogenen Remodelings müssen jedoch noch weiter erforscht werden. Insbesondere wären hierbei Patch-Clamp-Untersuchungen der Ionenkanäle nützlich, um eine potenzielle Veränderung der Ionenströme messen zu können.

Obwohl dieses Modell keine vollständige Erklärung der äußerst komplexen Erkrankung Vorhofflimmern liefern kann, gibt diese Arbeit einen interessanten Einblick in mögliche neue Mechanismen des proarrhythmogenen Remodelings. Dies könnte eventuell in Zukunft neue Wege für die Therapie des Diabetes-assoziierten Vorhofflimmerns aufzeigen.

VII. SUMMARY

Evaluation of proarrhythmic remodeling in diabetes mellitus leading to Atrial Fibrillation

Atrial fibrillation is the most common arrhythmia. The underlying pathophysiology of arrhythmias is complex and remains incompletely understood, which explains why mostly only symptomatic therapy is available. Many epidemiological studies have established diabetes mellitus as an independent risk factor for the development of atrial fibrillation. In order to study diabetes associated arrhythmias and develop future therapeutic options, application of animal disease models is mandatory. Here, one of the most favorable species is the domestic pig (*sus scrofa domestica*).

To study different *in vivo* mechanisms as well as molecular biological and histological changes in diabetes associated atrial fibrillation, a genetically modified pig model of permanent neonatal diabetes mellitus (PNDM) was used in this work. These studies were conducted in a total of 33 pigs, of which 15 displayed a stable diabetic phenotype that was induced by a Cys→Tyr exchange at amino acid position 94 (C94Y) in the insulin (INS) gene and led to apoptosis of pancreatic beta-cells.

We could show that *INS^{C94Y}* transgenic pigs were more prone to develop paroxysmal and permanent episodes of atrial fibrillation after burst pacing compared to their wildtype littermates. Shortening of AERP may be one of the underlying pathophysiological mechanisms. Furthermore, we were able to find an increased amount of interstitial fibrosis in the hearts of diabetic pigs using Masson Trichrome and Sirius Red staining. Real-Time qPCR and Western Blot analysis proofed an upregulation of *TGF-β1*, (phosphorylated) *SMAD3*, *CTGF*, *EMILIN1*, *FBNI* and *FNI* in *INS^{C94Y}* transgenic pigs.

To investigate electrical remodeling further, we studied the regulation of gene expression in different ion channels of the cardiac action potential as well as connexins-37, -40, -43 and -45. An upregulation of *KCNQ1* and *KCNJ2* might be one factor responsible of AERP shortening. Nevertheless, these findings need to be investigated in more detail, for example by measuring I_{Ks} and I_{K1} currents using

patch-clamp analysis.

In summary, the *INS^{C94Y}* transgenic pig may help finding new pathways of proarrhythmic remodeling associated with diabetes mellitus and even lead to new therapeutic approaches.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Ajjola OA, Yagishita D, Patel KJ, Vaseghi M, Zhou W, Yamakawa K, So E, Lux RL, Mahajan A, Shivkumar K. Focal myocardial infarction induces global remodeling of cardiac sympathetic innervation: neural remodeling in a spatial context. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013 Oct 1; 305(7):H1031-40.

Allessie M, Ausma J, Schotten U. Electrical, contractile and structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2002; 54:230–246.

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: 1453-68.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2014; 37: S81-S90.

American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care* 2018; 41: S13-s27.

Anderson EJ, Kypson AP, Rodriguez E, Anderson CA, Lehr EJ, Neuffer PD. Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: 1891-8.

Anselmino M, Matta M, Castagno D, Giustetto C, Gaita F. Catheter ablation of atrial fibrillation in chronic heart failure: state-of-the-art and future perspectives. *Europace* 2016; 18: 638-47.

Arias-Mutis OJ, Marrachelli VG, Ruiz-Sauri A, Alberola A, Morales JM, Such-Miquel L, Monleon D, Chorro FJ, Such L, Zarzoso M. Development and characterization of an experimental model of diet-induced metabolic syndrome in rabbit. *PLoS One* 2017; 12: e0178315.

Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 2001; 358: 221-9.

Ausma J, van der Velden HM, Lenders MH, van Ankeren EP, Jongasma HJ, Ramaekers FC, Borgers M, Allessie MA. Reverse structural and gap-junctional remodeling after prolonged atrial fibrillation in the goat. *Circulation*. 2003; 107:2051–2058.

Ausma J, Wijffels M, Thoné F, Wouters L, Allessie M, Borgers M. Structural changes of atrial myocardium due to sustained atrial fibrillation in the goat. *Circulation*. 1997; 96:3157–3163.

Backman M, Flenkenthaler F, Blutke A, Dahlhoff M, Landstrom E, Renner S, Philippou-Massier J, Krebs S, Rathkolb B, Prehn C, Grzybek M, Coskun U, Rothe M, Adamski J, de Angelis MH, Wanke R, Frohlich T, Arnold GJ, Blum H, Wolf E. Multiomics insights into functional alterations of the liver in insulindeficient diabetes mellitus. *Mol Metab* 2019; 26:30–44.

Benichou T, Pereira B, Mermillod M, Tauveron I, Pfabigan D, Maqdasy S, Dutheil F. Heart rate variability in type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2018; 13: e0195166.

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: 840-4.

Benson VS, Vanleeuwen JA, Taylor J, Somers GS, McKinney PA, Van Til L. Type 1 diabetes mellitus and components in drinking water and diet: a population-based, case-control study in Prince Edward Island, Canada. *J Am Coll Nutr* 2010; 29: 612-24.

Bodansky HJ, Grant PJ, Dean BM, McNally J, Bottazzo GF, Hambling MH, Wales JK. Islet-cell antibodies and insulin autoantibodies in association with common viral infections. *Lancet* 1986; 2: 1351-3.

Bohne LJ, Johnson D, Rose RA, Wilton SB, Gillis AM. The Association Between Diabetes Mellitus and Atrial Fibrillation: Clinical and Mechanistic Insights. *Frontiers in Physiology* 2019; 10

Bommer C, Heesemann E, Sagalova V, Manne-Goehler J, Atun R, Barnighausen T, Vollmer S. The global economic burden of diabetes in adults aged 20-79 years: a cost-of-illness study. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2017; 5: 423-30.

Borch-Johnsen K, Joner G, Mandrup-Poulsen T, Christy M, Zachau-Christiansen B, Kastrup K, Nerup J. Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus. A hypothesis. *Lancet* 1984; 2: 1083-6.

Brenner HH, Burkart V, Rothe H, Kolb H. Oxygen radical production is increased in macrophages from diabetes prone BB rats. *Autoimmunity* 1993; 15: 93-8.

Burstein B, Comtois P, Michael G, Nishida K, Villeneuve L, Yeh YH, Nattel S. Changes in connexin expression and the atrial fibrillation substrate in congestive heart failure. *Circ Res.* 2009; 105:1213–1222.

Burstein B, Nattel S. Atrial fibrosis: mechanisms and clinical relevance in atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 51:802–809.

Burstein B, Qi XY, Yeh YH, Calderone A, Nattel S. Atrial cardiomyocyte tachycardia alters cardiac fibroblast function: a novel consideration in atrial remodeling. *Cardiovasc Res.* 2007; 76:442–452.

Butalia S, Kaplan GG, Khokhar B, Rabi DM. Environmental Risk Factors and Type 1 Diabetes: Past, Present, and Future. *Can J Diabetes* 2016; 40: 586-93.

Calkins H, Reynolds MR, Spector P, Sondhi M, Xu Y, Martin A, Williams CJ, Sledge I. Treatment of atrial fibrillation with antiarrhythmic drugs or radiofrequency ablation: two systematic literature reviews and meta-analyses. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2009; 2: 349-61.

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 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: 1360-420.

Cannon A, Handelsman Y, Heile M, Shannon M. Burden of Illness in Type 2 Diabetes Mellitus. *J Manag Care Spec Pharm* 2018; 24: S5-s13.

Cantor AB, Krischer JP, Cuthbertson DD, Schatz DA, Riley WJ, Malone J, Schwartz S, Quattrin T, Maclaren NK. Age and family relationship accentuate the risk of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in relatives of patients with IDDM. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3739-43.

Chang CM, Wu TJ, Zhou S, Doshi RN, Lee MH, Ohara T, Fishbein MC, Karagueuzian HS, Chen PS, Chen LS. Nerve sprouting and sympathetic hyperinnervation in a canine model of atrial fibrillation produced by prolonged right atrial pacing. *Circulation*. 2001 Jan 2; 103(1):22-5.

Chen PS, Chen LS, Fishbein MC, Lin SF, Nattel S. Role of the autonomic nervous system in atrial fibrillation: pathophysiology and therapy. *Circ Res*. 2014;114(9):1500-1515.

Chen YH, Xu SJ, Bendahhou S, Wang XL, Wang Y, Xu WY, Jin HW, Sun H, Su XY, Zhuang QN, Yang YQ, Li YB, Liu Y, Xu HJ, Li XF, Ma N, Mou CP, Chen Z, Barhanin J, Huang W. KCNQ1 gain-of-function mutation in familial atrial fibrillation. *Science*. 2003 Jan 10;299(5604):251-4.

Chmiel R, Beyerlein A, Knopff A, Hummel S, Ziegler AG, Winkler C. Early infant feeding and risk of developing islet autoimmunity and type 1 diabetes. *Acta Diabetol* 2015; 52: 621-4.

Clauss S, Bleyer C, Schüttler D, Tomsits P, Renner S, Klymiuk N, Wakili R, Massberg S, Wolf E, Kaab S. Animal models of arrhythmia: classic electrophysiology to genetically modified large animals. *Nat Rev Cardiol* 2019; 16: 457-75.

Clauss S, Schüttler D, Bleyer C, Vlcek J, Shakarami M, Tomsits P, Schneider S, Maderspacher F, Chataut K, Trebo A, Wang C, Kleeberger J, Xia R, Baloch E, Hildebrand B, Massberg S, Wakili R, Käab S. Characterization of a porcine model of atrial arrhythmogenicity in the context of ischaemic heart failure. *PLoS One*. 2020 May 4;15(5):e0232374.

Clauss S, Sinner MF, Kaab S, Wakili R. The Role of MicroRNAs in Antiarrhythmic Therapy for Atrial Fibrillation. *Arrhythm Electrophysiol Rev* 2015; 4: 146-55.

Colombatti A, Spessotto P, Doliana R, Mongiat M, Bressan GM, Esposito G. The EMILIN/multimerin family. *Frontiers Immunol*. 2012; 2:93.

Cooper GS, Gilbert KM, Greidinger EL, James JA, Pfau JC, Reinlib L, Richardson BC, Rose NR. Recent advances and opportunities in research on lupus: environmental influences and mechanisms of disease. *Environ Health Perspect* 2008; 116: 695-702.

Cooper JD, Howson JM, Smyth D, Walker NM, Stevens H, Yang JH, She JX, Eisenbarth GS, Rewers M, Todd JA, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nerup J, Nierras C, Pociot F, Rich SS. Confirmation of novel type 1 diabetes risk loci in families. *Diabetologia* 2012; 55: 996-1000.

Corbett SA, Schwarzbauer JE. Fibronectin-fibrin cross-linking: a regulator of cell behavior. *Trends Cardiovasc Med* 1998;8:357–362.

Cullmann M, Hilding A, Ostenson CG. Alcohol consumption and risk of pre-diabetes and type 2 diabetes development in a Swedish population. *Diabet Med* 2012; 29: 441-52.

Daleau P, Comeau G, Fournier D, Patoine D, Mathieu P, Poirier P. Higher expression of connexin 40 in human atrial tissue of patients with type 2 diabetes who have undergone a coronary artery bypass graft surgery. *Health* 2010; Vol.2 No.3. Daoud EG, Bogun F, Goyal R, Harvey M, Man KC, Strickberger SA, Morady F. Effect of atrial fibrillation on atrial refractoriness in humans. *Circulation* 1996; 94:1600-1606.

Derouette JP, Desplantez T, Wong CW, Roth I, Kwak BR, Weingart R. Functional differences between human Cx37 polymorphic hemichannels. *J Mol Cell Cardiol.* 2009; 46(4):499-507.

DiFrancesco D. A Brief History of Pacemaking. *Front Physiol.* 2020; 10:1599.

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.

Doyle JF, Ho KM. Benefits and risks of long-term amiodarone therapy for persistent atrial fibrillation: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc* 2009; 84: 234-42.

Drew BJ, Califf RM, Funk M, Kaufman ES, Krucoff MW, Laks MM, Macfarlane PW, Sommargren C, Swiryn S, MD, Van Hare GF. Practice Standards for Electrocardiographic Monitoring in Hospital Settings. *Circulation.* 2004;110:2721–2746.

Dufrane D, van Steenberghe M, Guiot Y, Goebbels RM, Saliez A, Gianello P. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity. *Transplantation* 2006; 81:36–45.

Elvan A, Wylie K, Zipes DP. Pacing-induced chronic atrial fibrillation impairs sinus node function in dogs - Electrophysiological remodeling. *Circulation.* 1996; 94:2953–2960.

Enan E, Matsumura F. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced

changes in glucose transporting activity in guinea pigs, mice, and rats in vivo and in vitro. *J Biochem Toxicol* 1994; 9: 97-106.

Evans JM, Wang S, Greb C, Kostas V, Knapp CF, Zhang Q, Roemmele ES, Stenger MB, Randall DC. Body Size Predicts Cardiac and Vascular Resistance Effects on Men's and Women's Blood Pressure. *Front Physiol.* 2017 Aug 9;8:561.

Fabiato A, Fabiato F. Calcium and cardiac excitation-secretion coupling. *Annu Rev Physiol* 41: 473–484, 1979.

Fareh S, Villemaire C, Nattel S. Importance of refractoriness heterogeneity in the enhanced vulnerability to atrial fibrillation induction caused by tachycardia-induced atrial remodeling. *Circulation.* 1998; 98:2202–2209.

Fiaschi T, Magherini F, Gamberi T, Lucchese G, Faggian G, Modesti A, Modesti PA. Hyperglycemia and angiotensin II cooperate to enhance collagen I deposition by cardiac fibroblasts through a ROS-STAT3-dependent mechanism. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1843: 2603-10.

Filardi T, Ghinassi B, Di Baldassarre A, Tanzilli G, Morano S, Lenzi A, Basili S, Crescioli C. Cardiomyopathy associated with diabetes: the central role of the cardiomyocyte. *Int J Mol Sci* 2019; 20: E3299.

Firouzi M, Ramanna H, Kok B, Jongsma HJ, Koeleman BP, Doevendans PA, Groenewegen WA, Hauer RN. Association of human connexin40 gene polymorphisms with atrial vulnerability as a risk factor for idiopathic atrial fibrillation. *Circ Res.* 2004 Aug 20; 95(4):e29-33.

Ford ES, Li C, Sattar N. Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence. *Diabetes Care* 2008; 31: 1898-904.

Fozzard HA. Cardiac sodium and calcium channels: a history of excitatory currents. *Cardiovasc Res* 55: 1–8, 2002.

Fu H, Li G, Liu C, Li J, Wang X, Cheng L, Liu T. Probuocol prevents atrial remodeling by inhibiting oxidative stress and TNF-alpha/NF-kappaB/TGF-beta signal transduction pathway in alloxan-induced diabetic rabbits. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2015; 26: 211-22.

Fukui A, Takahashi N, Nakada C, Masaki T, Kume O, Shinohara T, Teshima Y, Hara M, Saikawa T. Role of leptin signaling in the pathogenesis of angiotensin II-mediated atrial fibrosis and fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013; 6: 402-9.

Fukui A, Ikebe-Ebata Y, Kondo H, Saito S, Aoki K, Fukunaga N, Shinohara T, Masaki T, Teshima Y, Takahashi N. Hyperleptinemia Exacerbates High-Fat Diet-Mediated Atrial Fibrosis and Fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2017; 28: 702-10.

Funda DP, Kaas A, Bock T, Tlaskalova-Hogenova H, Buschard K. Gluten-free diet prevents diabetes in NOD mice. *Diabetes Metab Res Rev* 1999; 15: 323-7.

Fuster V, Ryden LE, Cannom DS, Crijns HJ, Curtis AB, Ellenbogen KA, Halperin JL, Le Heuzey JY, Kay GN, Lowe JE, Olsson SB, Prystowsky EN, Tamargo JL, Wann S, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Adams CD, Anderson JL, Antman EM, Halperin JL, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm AJ, Dean V, Deckers JW, Despres C, Dickstein K, Lekakis J, McGregor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo JL, Zamorano JL. ACC/AHA/ESC 2006 Guidelines for the Management of Patients with Atrial Fibrillation: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2001 Guidelines for the Management of Patients With Atrial Fibrillation): developed in collaboration with the European Heart Rhythm Association and the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2006; 114: e257-354.

Gasparini M, Galimberti P. AV junction ablation in heart failure patients with atrial

fibrillation treated with cardiac resynchronization therapy: the picture is now clear!
J Am Coll Cardiol 2012; 59: 727-9.

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.

Gaulton KJ, Ferreira T, Lee Y, Raimondo A, Magi R, Reschen ME, Mahajan A, Locke A, Rayner NW, Robertson N, Scott RA, Prokopenko I, Scott LJ, Green T, Sparso T, Thuillier D, Yengo L, Grallert H, Wahl S, Franberg M, Strawbridge RJ, Kestler H, Chheda H, Eisele L, Gustafsson S, Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Qi L, Karssen LC, van Leeuwen EM, Willems SM, Li M, Chen H, Fuchsberger C, Kwan P, Ma C, Linderman M, Lu Y, Thomsen SK, Rundle JK, Beer NL, van de Bunt M, Chalisey A, Kang HM, Voight BF, Abecasis GR, Almgren P, Baldassarre D, Balkau B, Benediktsson R, Blüher M, Boeing H, Bonnycastle LL, Bottinger EP, Burt NP, Carey J, Charpentier G, Chines PS, Cornelis MC, Couper DJ, Crenshaw AT, van Dam RM, Doney AS, Dorkhan M, Edkins S, Eriksson JG, Esko T, Eury E, Fadista J, Flannick J, Fontanillas P, Fox C, Franks PW, Gertow K, Gieger C, Gigante B, Gottesman O, Grant GB, Grarup N, Groves CJ, Hassinen M, Have CT, Herder C, Holmen OL, Hreidarsson AB, Humphries SE, Hunter DJ, Jackson AU, Jonsson A, Jorgensen ME, Jorgensen T, Kao WH, Kerrison ND, Kinnunen L, Klopp N, Kong A, Kovacs P, Kraft P, Kravic J, Langford C, Leander K, Liang L, Lichtner P, Lindgren CM, Lindholm E, Linneberg A, Liu CT, Lobbens S, Luan J, Lyssenko V, Mannisto S, McLeod O, Meyer J, Mihailov E, Mirza G, Muhleisen TW, Muller-Nurasyid M, Navarro C, Nothen MM, Oskolkov NN, Owen KR, Palli D, Pechlivanis S, Peltonen L, Perry JR, Platou CG, Roden M, Ruderfer D, Rybin D, van der Schouw YT, Sennblad B, Sigurdsson G, Stancakova A, Steinbach G, Storm P, Strauch K, Stringham HM, Sun Q, Thorand B, Tikkanen E, Tonjes A, Trakalo J, Tremoli E, Tuomi T, Wennauer R, Wiltshire S, Wood AR, Zeggini E, Dunham I, Birney E, Pasquali L, Ferrer J, Loos RJ, Dupuis J, Florez JC, Boerwinkle E, Pankow JS, van Duijn C, Sijbrands E, Meigs JB, Hu FB, Thorsteinsdottir U, Stefansson K, Lakka TA, Rauramaa R, Stumvoll M, Pedersen NL, Lind L, Keinanen-Kiukkaanniemi SM, Korpi-Hyovalti E, Saaristo TE, Saltevo J, Kuusisto J, Laakso M, Metspalu A, Erbel R, Jocke KH, Moebus S, Ripatti S, Salomaa V,

Ingelsson E, Boehm BO, Bergman RN, Collins FS, Mohlke KL, Koistinen H, Tuomilehto J, Hveem K, Njolstad I, Deloukas P, Donnelly PJ, Frayling TM, Hattersley AT, de Faire U, Hamsten A, Illig T, Peters A, Cauchi S, Sladek R, Froguel P, Hansen T, Pedersen O, Morris AD, Palmer CN, Kathiresan S, Melander O, Nilsson PM, Groop LC, Barroso I, Langenberg C, Wareham NJ, O'Callaghan CA, Gloyn AL, Altshuler D, Boehnke M, Teslovich TM, McCarthy MI, Morris AP. Genetic fine mapping and genomic annotation defines causal mechanisms at type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat Genet* 2015; 47: 1415-25.

Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Novelo LL, Casella G, Drew JC, Ilonen J, Knip M, Hyoty H, Veijola R, Simell T, Simell O, Neu J, Wasserfall CH, Schatz D, Atkinson MA, Triplett EW. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *Isme j* 2011; 5: 82-91.

Giovannone S, Remo BF, Fishman GI. Channeling Diversity: Gap Junction Expression in the Heart. *Heart Rhythm*. 2012 Jul; 9(7): 1159–1162.

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 Dec; 6(12):1802-9.

Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong XQ, Shao Q, Liu X, Veinot JP, Tang AS, Stewart AF, Tesson F, Klein GJ, Yee R, Skanes AC, Guiraudon GM, Ebihara L, Bai D. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2006; 354(25):2677-88.

Greiser M, Neuberger HR, Harks E, El-Armouche A, Boknik P, de Haan S, Verheyen F, Verheule S, Schmitz W, Ravens U, et al. Distinct contractile and molecular differences between two goat models of atrial dysfunction: AV block-induced atrial dilatation and atrial fibrillation. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46:385–394.

Gu J, Fan YQ, Zhang JF, Wang CQ. Impact of long-term glycemic variability on

development of atrial fibrillation in type 2 diabetic patients. *Anatol J Cardiol* 2017; 18: 410-6.

Gupta S, Figueredo VM. Tachycardia mediated cardiomyopathy: pathophysiology, mechanisms, clinical features and management. *Int J Cardiol* 2014; 172: 40-6.

Haak T, Gözl S, Fritsche A, Füchtenbusch M, Siegmund T, Schnellbacher E, Klein HH, Uebel T, Droßel D. Therapie des Typ-1-Diabetes. *Diabetologie* 2019; 14 (Suppl 2): S142–S152.

Haefliger, Jacques-Antoine & Polikar, Ralf & Schnyder, Guido & Burdet, Magali & Sutter, Esther & Pexieder, Tomas & Nicod, Pascal & Meda, Paolo. (2000). Connexin37 in normal and pathological development of mouse heart and great arteries. *Developmental Dynamics*. 218. 331 - 344.

Haemers P, Hamdi H, Guedj K, Suffee N, Farahmand P, Popovic N, Claus P, LePrince P, Nicoletti A, Jalife J, Wolke C, Lendeckel U, Jais P, Willems R, Hatem SN. Atrial fibrillation is associated with the fibrotic remodelling of adipose tissue in the subepicardium of human and sheep atria. *Eur Heart J* 2017; 38: 53-61.

Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, Luderitz B, Willecke K. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in Connexin40-deficient mice analyzed by transesophageal stimulation. *Circulation* 1999; 99: 1508-15.

Hanefeld M, Frier BM, Pistrosch F. Hypoglycemia and Cardiovascular Risk: Is There a Major Link? *Diabetes Care* 2016; 39 Suppl 2: S205-9.

Hannon JP, Bossone CA, Wade CE. Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Laboratory animal science* 1990; 40(3):293-8.

Harmer AR, Valentin JP, Pollard CE. On the relationship between block of the cardiac Na⁺ channel and drug-induced prolongation of the QRS complex. *Br J Pharmacol*. 2011;164(2):260-273.

Hathout EH, Beeson WL, Nahab F, Rabadi A, Thomas W, Mace JW. Role of exposure to air pollutants in the development of type 1 diabetes before and after 5 yr of age. *Pediatr Diabetes* 2002; 3: 184-8.

Haugan K, Lam HR, Knudsen CB, Petersen JS. Atrial fibrillation in rats induced by rapid transesophageal atrial pacing during brief episodes of asphyxia: a new in vivo model. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004; 44:125–135.

Hayami N, Sekiguchi A, Iwasaki YK, Murakawa Y, Yamashita T. No Additional Effect of DPP-4 Inhibitor on Preventing Atrial Fibrosis in Streptozotocin-Induced Diabetic Rat as Compared With Sulfonylurea. *Int Heart J* 2016; 57: 336-40.

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. *Eur Heart J* 2006; 27: 949-53.

Heijman J, Voigt N, Nattel S, Dobrev D. Cellular and molecular electrophysiology of atrial fibrillation initiation, maintenance, and progression. *Circ Res.* 2014; 114:1483–1499.

Helmke K, Otten A, Willems WR, Brockhaus R, Mueller-Eckhardt G, Stief T, Bertrams J, Wolf H, Federlin K. Islet cell antibodies and the development of diabetes mellitus in relation to mumps infection and mumps vaccination. *Diabetologia* 1986; 29: 30-3.

Hinkel R, Howe A, Renner S, Ng J, Lee S, Klett K, Kaczmarek V, Moretti A, Laugwitz KL, Skroblin P, Mayr M, Milting H, Dendorfer A, Reichart B, Wolf E, Kupatt C. Diabetes Mellitus-Induced Microvascular Destabilization in the Myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2017; 69: 131-43.

Hohl M, Lau DH, Muller A, Elliott AD, Linz B, Mahajan R, Hendriks JML, Bohm M, Schotten U, Sanders P, Linz D. Concomitant Obesity and Metabolic Syndrome Add to the Atrial Arrhythmogenic Phenotype in Male Hypertensive Rats. *J Am Heart Assoc* 2017; 6

Hsueh W, Abel ED, Breslow JL, Maeda N, Davis RC, Fisher EA, Dansky H, McClain DA, McIndoe R, Wassef MK, Rabadan-Diehl C, Goldberg IJ. Recipes for creating animal models of diabetic cardiovascular disease. *Circ Res* 2007; 100: 1415-27.

Hu FB, van Dam RM, Liu S. Diet and risk of Type II diabetes: the role of types of fat and carbohydrate. *Diabetologia* 2001; 44: 805-17.

Hu YF, Chen YJ, Lin YJ, Chen SA. Inflammation and the pathogenesis of atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol*. 2015; 12(4):230-43.

Huang W, Connor E, Rosa TD, Muir A, Schatz D, Silverstein J, Crockett S, She JX, Maclaren NK. Although DR3-DQB1*0201 may be associated with multiple component diseases of the autoimmune polyglandular syndromes, the human leukocyte antigen DR4-DQB1*0302 haplotype is implicated only in beta-cell autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2559-63.

Hutchinson KR, Lord CK, West TA, Stewart JA, Jr. Cardiac fibroblast-dependent extracellular matrix accumulation is associated with diastolic stiffness in type 2 diabetes. *PLoS One* 2013; 8: e72080.

Israel CW, Gronefeld G, Ehrlich JR, Li YG, Hohnloser SH. Long-term risk of recurrent atrial fibrillation as documented by an implantable monitoring device: implications for optimal patient care. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 47-52.

Jayachandran JV, Sih HJ, Winkle W, Zipes DP, Hutchins GD, Olgin JE. Atrial fibrillation produced by prolonged rapid atrial pacing is associated with heterogeneous changes in atrial sympathetic innervation. *Circulation*. 2000 Mar 14; 101(10):1185-91.

Jennings MM, Donahue JK. Connexin Remodeling Contributes to Atrial Fibrillation. *J Atr Fibrillation*. 2013 Aug 31;6(2):839.

Kanagaratnam P, Rothery S, Patel P, Severs NJ, Peters NS. Relative expression of immunolocalized connexin 40 and 43 correlates with human atrial conduction properties. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39: 116–23.

Karmazyn M, Purdham DM, Rajapurohitam V, Zeidan A. Signalling mechanisms underlying the metabolic and other effects of adipokines on the heart. *Cardiovasc Res* 2008; 79: 279-86.

Kato T, Yamashita T, Sekiguchi A, Tsuneda T, Sagara K, Takamura M, Kaneko S, Aizawa T, Fu LT. AGEs-RAGE system mediates atrial structural remodeling in the diabetic rat. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2008; 19: 415-20.

Kawashima T. The autonomic nervous system of the human heart with special reference to its origin, course, and peripheral distribution. *Anat Embryol (Berl)*. 2005 Jul; 209(6):425-38.

Kerr CR, Boone J, Connolly SJ, Dorian P, Green M, Klein G, Newman D, Sheldon R, Talajic M. The Canadian Registry of Atrial Fibrillation: a noninterventional follow-up of patients after the first diagnosis of atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 1998; 82: 82n-5n.

Kim KB, Rodefeld MD, Schuessler RB, Cox JL, Boineau JP. Relationship between local atrial fibrillation interval and refractory period in the isolated canine atrium. *Circulation*. 1996 Dec 1; 94(11):2961-7.

King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* 2012; 166: 877-94.

Kirchhof P, Marijon E, Fabritz L, et al.. Overexpression of cAMP-response element modulator causes abnormal growth and development of the atrial myocardium resulting in a substrate for sustained atrial fibrillation in mice. *Int J Cardiol*. 2013; 166:366–374.

Kleinwort KJH, Amann B, Hauck SM, Hirmer S, Blutke A, Renner S, Uhl PB,

Lutterberg K, Sekundo W, Wolf E, Deeg CA (2017). Retinopathy with central oedema in an INS (C94Y) transgenic pig model of long-term diabetes. *Diabetologia* 2017; 60:1541–1549.

Krishnaswamy PS, Egom EE, Moghtadaei M, Jansen HJ, Azer J, Bogachev O, Mackasey M, Robbins C, Rose RA. Altered parasympathetic nervous system regulation of the sinoatrial node in Akita diabetic mice. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 82: 125-35.

Lafuente-Lafuente C, Mahe I, Extramiana F. Management of atrial fibrillation. *Bmj* 2009; 339: b5216.

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_f) channel mRNA in human atrial tissue: correlation with left atrial filling pressure and atrial fibrillation. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999; 10: 947-53.

Lamberts RR, Lingam SJ, Wang HY, Bollen IA, Hughes G, Galvin IF, Bunton RW, Bahn A, Katare R, Baldi JC, Williams MJ, Saxena P, Coffey S, Jones PP. Impaired relaxation despite upregulated calcium-handling protein atrial myocardium from type 2 diabetic patients with preserved ejection fraction. *Cardiovasc Diabetol* 2014; 13: 72.

Landgraf R, Aberle J, Birkenfeld AL, Gallwitz B, Kellerer M, Klein H, Müller-Wieland D, Nauck MA, Reuter HM, Siegel E. Therapie des Typ-2-Diabetes. *Diabetologie* 2019; 14 (Suppl 2): S167–S187.

Längin M, Mayr T, Reichart B, Michel S, Buchholz S, Guethoff S, Dashkevich A, Baehr A, Egerer S, Bauer A, Mihalj M, Panelli A, Issl L, Ying J, Fresch AK, Buttgereit I, Mokolke M, Radan J, Werner F, Lutzmann I, Steen S, Sjöberg T, Paskevicius A, Qiuming L, Sfriso R, Rieben R, Dahlhoff M, Kessler B, Kemter E, Kurome M, Zakhartchenko V, Klett K, Hinkel R, Kupatt C, Falkenau A, Reu S, Ellgass R, Herzog R, Binder U, Wich G, Skerra A, Ayares D, Kind A, Schönmann U, Kaup FJ, Hagl C, Wolf E, Klymiuk N, Brenner P, Abicht JM. Consistent success

in life-supporting porcine cardiac xenotransplantation. *Nature*. 2018 Dec;564(7736):430-433.

Lehrke M, Marx N. Diabetes mellitus and heart failure. *Am J Med* 2017; 130:S40–S50.

Lelovas PP, Kostomitsopoulos NG, Xanthos TT. A comparative anatomic and physiologic overview of the porcine heart. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2014; 53: 432-8.

Leroux AA, Detilleux J, Sandersen CF, Borde L, Houben RM, Al Haidar A, Art T, Amory H. Prevalence and risk factors for cardiac diseases in a hospital-based population of 3,434 horses (1994-2011). *J Vet Intern Med*. 2013;27:1563–1570.

Li B, Pan Y, Li X. Type 2 Diabetes Induces Prolonged P-wave Duration without Left Atrial Enlargement. *J Korean Med Sci* 2016; 31: 525-34.

Li, GR et al. Calcium- activated transient outward chloride current and phase 1 repolarization of swine ventricular action potential. *Cardiovasc. Res*. 2003; 58, 89–98.

Lin CS, Lai LP, Lin JL, Sun YL, Hsu CW, Chen CL, Mao SJ, Huang SK. Increased expression of extracellular matrix proteins in rapid atrial pacing-induced atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2007 Jul;4(7):938-49.

Lin X, Wu N, Shi Y, Wang S, Tan K, Shen Y, Dai H, Zhong J. Association between transforming growth factor β 1 and atrial fibrillation in essential hypertensive patients. *Clinical and Experimental Hypertension* 2015; 37:1, 82-87.

Linz D, Hohl M, Dhein S, Ruf S, Reil JC, Kabiri M, Wohlfart P, Verheule S, Bohm M, Sadowski T, Schotten U. Cathepsin A mediates susceptibility to atrial tachyarrhythmia and impairment of atrial emptying function in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Res* 2016; 110: 371-80.

Liu C, Fu H, Li J, Yang W, Cheng L, Liu T, Li G. Hyperglycemia aggravates atrial interstitial fibrosis, ionic remodeling and vulnerability to atrial fibrillation in diabetic rabbits. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2012; 12: 543-50.

Liu C, Liu R, Fu H, Li J, Wang X, Cheng L, Korantzopoulos P, Tse G, Li G, Liu T. Pioglitazone attenuates atrial remodeling and vulnerability to atrial fibrillation in alloxan-induced diabetic rabbits. *Cardiovasc Ther.* 2017; 35.

Liu M, Li W, Wang H, Yin L, Ye B, Tang Y, Huang C. CTRP9 Ameliorates Atrial Inflammation, Fibrosis, and Vulnerability to Atrial Fibrillation in Post-Myocardial Infarction Rats. *J Am Heart Assoc.* 2019 Nov 5;8(21):e013133.

Liu M, Sun J, Cui J, Chen W, Guo H, Barbetti F, Arvan P. INSgene mutations: from genetics and beta cell biology to clinical disease. *Mol Asp Med.* 2015;42:3–18.

Livak KJ, Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-408.

Loeys B, De Backer J, Van Acker P, Wettinck K, Pals G, Nuytinck L, Coucke P, De Paepe A. Comprehensive molecular screening of the FBN1 gene favors locus homogeneity of classical Marfan syndrome. *Hum Mutat* 2004; 24:140 –146.

Lopez-Izquierdo A, Pereira RO, Wende AR, Punske BB, Abel ED, Tristani-Firouzi M. The absence of insulin signaling in the heart induces changes in potassium channel expression and ventricular repolarization. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 306: H747-54.

Lugenbiel P, Wenz F, Govorov K, Syren P, Katus HA, Thomas D. Atrial myofibroblast activation and connective tissue formation in a porcine model of atrial fibrillation and reduced left ventricular function. *Life Sci* 2017; 181:1-8.

Luo X, Pan Z, Shan H, Xiao J, Sun X, Wang N, Lin H, Xiao L, Maguy A, Qi XY, Li Y, Gao X, Dong D, Zhang Y, Bai Y, Ai J, Sun L, Lu H, Luo XY, Wang Z, Lu

Y, Yang B, Nattel S. MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier potassium current changes in atrial fibrillation. *J Clin Invest*. 2013 May; 123(5):1939-51.

Maeder MT, et al. Hemodynamic basis of exercise limitation in patients with heart failure and normal ejection fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56(11):855–63.

Mahajan R, Lau DH, Brooks AG, Shipp NJ, Manavis J, Wood JP, Finnie JW, Samuel CS, Royce SG, Twomey DJ, Thanigaimani S, Kalman JM, Sanders P. Electrophysiological, Electroanatomical, and Structural Remodeling of the Atria as Consequences of Sustained Obesity. *J Am Coll Cardiol* 2015; 66: 1-11.

Manson JE, Ajani UA, Liu S, Nathan DM, Hennekens CH. A prospective study of cigarette smoking and the incidence of diabetes mellitus among US male physicians. *Am J Med* 2000; 109: 538-42.

McCarthy MI. Genomics, type 2 diabetes, and obesity. *N Engl J Med* 2010; 363: 2339-50.

McCall FC, Telukuntla KS, Karantalis V, Suncion VY, Heldman AW, Mushtaq M, Williams AR, Hare JM. Myocardial infarction and intramyocardial injection models in swine. *Nat Protoc*. 2012; 7(8): 1479–1496.

Melenovsky V, Hwang SJ, Redfield MM, Zakeri R, Lin G, Borlaug BA. Left Atrial Remodeling and Function in Advanced Heart Failure With Preserved or Reduced Ejection Fraction. *Circ Heart Fail*. 2015. Epub 2015/01/17.

Melenovsky V, Hwang SJ, Lin G, Redfield MM, Borlaug BA. Right heart dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J*. 2014; 35(48):3452–62.

Michels A, Zhang L, Khadra A, Kushner JA, Redondo MJ, Pietropaolo M. Prediction and prevention of type 1 diabetes: update on success of prediction and struggles at prevention. *Pediatr Diabetes* 2015; 16: 465-84.

Miragoli M, Salvarani N, Rohr S. Myofibroblasts induce ectopic activity in cardiac tissue. *Circ Res.* 2007; 101:755–758.

Molina CE, Abu-Taha IH, Wang Q, Roselló-Díez E, Kamler M, Nattel S, Ravens U, Wehrens XHT, Hove-Madsen L, Heijman J, Dobrev D. Profibrotic, Electrical, and Calcium-Handling Remodeling of the Atria in Heart Failure Patients With and Without Atrial Fibrillation. *Front Physiol.* 2018 Oct 9;9:1383.

Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing: Structural, functional and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation.* 1995; 91:1588–1595.

Mow T, Arlock P, Laursen M, Ganderup N. Major ion currents except I_{to} are present in the ventricle of the Göttingen minipig heart. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 58, 165 (2008).

Nagy E, Jermendy AL, Merkely B, Maurovich-Horvat P. Clinical importance of epicardial adipose tissue. *Arch Med Sci* 2017; 13: 864-74.

Nattel S, Dobrev D. The multidimensional role of calcium in atrial fibrillation pathophysiology: mechanistic insights and therapeutic opportunities. *Eur Heart J.* 2012 Aug;33(15):1870-7.

Nattel S. Newer developments in the management of atrial fibrillation. *Am Heart J* 1995; 130: 1094-106.

Nattel S. New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature* 2002; 415: 219-26.

Nattel S, Burstein B, Dobrev D. Atrial remodeling and atrial fibrillation: mechanisms and implications. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2008; 1: 62-73.

Neeb ZP, Edwards JM, Alloosh M, Long X, Mokolke EA, Sturek M. Metabolic syndrome and coronary artery disease in Ossabaw compared with Yucatan swine.

Comp Med. 2010; 60:300–315.

Nerbonne JM, Kass RS. Molecular Physiology of Cardiac Repolarization. *Physiological Reviews*. 2005; 85:4, 1205-1253.

Nerbonne JM, Guo W. Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13: 406–409, 2002.

Noble JA, Valdes AM, Varney MD, Carlson JA, Moonsamy P, Fear AL, Lane JA, Lavant E, Rappner R, Louey A, Concannon P, Mychaleckyj JC, Erlich HA. HLA class I and genetic susceptibility to type 1 diabetes: results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Diabetes* 2010; 59: 2972-9.

Nygren A, Olson ML, Chen KY, Emmett T, Kargacin G, Shimoni Y. Propagation of the cardiac impulse in the diabetic rat heart: reduced conduction reserve. *J Physiol* 2007; 580: 543-60.

Olesen MS, Bentzen BH, Nielsen JB, Steffensen AB, David JP, Jabbari J, Jensen HK, Haunsø S, Svendsen JH, Schmitt N. Mutations in the potassium channel subunit KCNE1 are associated with early-onset familial atrial fibrillation. *BMC Med Genet*. 2012 Apr 3;13:24.

Olgin JE, Sih HJ, Hanish S, Jayachandran JV, Wu J, Zheng QH, Winkle W, Mulholland GK, Zipes DP, Hutchins G. Heterogeneous atrial denervation creates substrate for sustained atrial fibrillation. *Circulation*. 1998 Dec 8; 98(23):2608-14.

Ozcan C, Jahangir A, Friedman PA, Munger TM, Packer DL, Hodge DO, Hayes DL, Gersh BJ, Hammill SC, Shen WK. Significant effects of atrioventricular node ablation and pacemaker implantation on left ventricular function and long-term survival in patients with atrial fibrillation and left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol* 2003; 92: 33-7.

Page RL, Wilkinson WE, Clair WK, McCarthy EA, Pritchett EL. Asymptomatic

arrhythmias in patients with symptomatic paroxysmal atrial fibrillation and paroxysmal supraventricular tachycardia. *Circulation* 1994; 89: 224-7.

Pak CY, Eun HM, McArthur RG, Yoon JW. Association of cytomegalovirus infection with autoimmune type 1 diabetes. *Lancet* 1988; 2: 1-4.

Palicka V. Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Ejifcc* 2002; 13: 140-4.

Pan Y, Li B, Wang J, Li X. Rosuvastatin Alleviates Type 2 Diabetic Atrial Structural and Calcium Channel Remodeling. *J Cardiovasc Pharmacol* 2016; 67: 57-67.

Panasevich MR, Meers GM, Linden MA, Booth FW, Perfield JW 2nd, Fritsche KL, Wankhade UD, Chintapalli SV, Shankar K, Ibdah JA, Rector RS. High-fat, high-fructose, high-cholesterol feeding causes severe NASH and cecal microbiota dysbiosis in juvenile Ossabaw swine. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2018; 314:E78–e92.

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.

Pandit SV, Workman AJ. Atrial Electrophysiological Remodeling and Fibrillation in Heart Failure. *Clin Med Insights Cardiol.* 2016; 10(Suppl 1):41-46.

Patterson E, Po SS, Scherlag BJ, Lazzara R. Triggered firing in pulmonary veins initiated by in vitro autonomic nerve stimulation. *Heart Rhythm.* 2005; 2:624–631.

Pellman J, Sheikh F. Atrial fibrillation: mechanisms, therapeutics, and future directions. *Compr Physiol.* 2015;5(2):649-665.

Petersmann A, Müller-Wieland D, Müller UA, Landgraf R, Nauck M, Freckmann G, Heinemann L, Schleicher E. Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. *Diabetologie* 2019; 14 (Suppl 2): S111–S118.

Pinti MV, Fink GK, Hathaway QA, Durr AJ, Kunovac A, Hollander JM. Mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus: an organ-based analysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019; 316: E268-e85.

Qi XY, Yeh YH, Xiao L, Burstein B, Maguy A, Chartier D, Villeneuve LR, Brundel BJ, Dobrev D, Nattel S. Cellular signaling underlying atrial tachycardia remodeling of L-type calcium current. *Circ Res.* 2008 Oct 10; 103(8):845-54.

Quintanilla JG, Alfonso-Almazán JM, Pérez-Castellano N, Pandit SV, Jalife J, Pérez-Villacastín J, Filgueiras-Rama D. Instantaneous amplitude and frequency modulations detect the footprint of rotational activity and reveal stable driver regions as targets for persistent atrial fibrillation ablation. *Circ Res.* 2019;125:609–627.

Rajan S, Eames SC, Park SY, Labno C, Bell GI, Prince VE, Philipson LH. In vitro processing and secretion of mutant insulin proteins that cause permanent neonatal diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010;298(3):E403-E410.

Rasmussen, R. Quantification on the LightCycler. In: Meuer, S, Wittwer, C, and Nakagawara, K, eds. *Rapid Cycle Realtime PCR, Methods and Applications.* Springer Press 2001, Heidelberg; ISBN 3-540-66736-9, 21-34.

Renner S, Blutke A, Clauss S, Deeg C, Kemter E, Merkus D, Wanke R, Wolf E. Porcine models for studying complications and organ crosstalk in diabetes mellitus. *Cell Tissue Res* 380, 341–378 (2020).

Renner S, Braun-Reichhart C, Blutke A, Herbach N, Emrich D, Streckel E, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Bahr A, Klymiuk N, Krebs S, Puk O, Nagashima H, Graw J, Blum H, Wanke R, Wolf E. Permanent neonatal diabetes in INS(C94Y) transgenic pigs. *Diabetes* 2013; 62: 1505-11.

Renner S, Dobenecker B, Blutke A, Zols S, Wanke R, Ritzmann M, Wolf E. Comparative aspects of rodent and nonrodent animal models for mechanistic and translational diabetes research. *Theriogenology* 2016; 86:406–421.

Renner S, Martins AS, Streckel E, Braun-Reichhart C, Backman M, Prehn C, Klymiuk N, Bahr A, Blutke A, Landbrecht-Schessl C, Wunsch A, Kessler B, Kurome M, Hinrichs A, Koopmans SJ, Krebs S, Kemter E, Rathkolb B, Nagashima H, Blum H, Ritzmann M, Wanke R, Aigner B, Adamski J, Hrabe de Angelis M, Wolf E. Mild maternal hyperglycemia in INS (C93S) transgenic pigs causes impaired glucose tolerance and metabolic alterations in neonatal offspring. *Dis Model Mech* 2019; 12(8):dmm.039156.

Rizzo MR, Sasso FC, Marfella R, Siniscalchi M, Paolisso P, Carbonara O, Capoluongo MC, Lascar N, Pace C, Sardu C, Passavanti B, Barbieri M, Mauro C, Paolisso G. Autonomic dysfunction is associated with brief episodes of atrial fibrillation in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 2015; 29: 88-92.

Rosengren AH, Braun M, Mahdi T, Andersson SA, Travers ME, Shigeto M, Zhang E, Almgren P, Ladenvall C, Axelsson AS, Edlund A, Pedersen MG, Jonsson A, Ramracheya R, Tang Y, Walker JN, Barrett A, Johnson PR, Lyssenko V, McCarthy MI, Groop L, Salehi A, Gloyn AL, Renström E, Rorsman P, Eliasson L. Reduced insulin exocytosis in human pancreatic β -cells with gene variants linked to type 2 diabetes. *Diabetes*. 2012 Jul; 61(7):1726-33.

Rother KI. Diabetes treatment--bridging the divide. *N Engl J Med* 2007; 356: 1499-501.

Rucker-Martin C, Milliez P, Tan S, Decrouy X, Recouvreur M, Vranckx R, Delcayre C, Renaud JF, Dunia I, Segretain D, Hatem SN. Chronic hemodynamic overload of the atria is an important factor for gap junction remodeling in human and rat hearts. *Cardiovasc Res*. 2006 Oct 1; 72(1):69-79.

Rucker-Martin C, Pecker F, Godreau D, Hatem SN. Dedifferentiation of atrial myocytes during atrial fibrillation: role of fibroblast proliferation in vitro.

Cardiovasc Res 2002;55:38–52.

Russo I, Frangogiannis NG. Diabetes-associated cardiac fibrosis: Cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 90: 84-93.

Rutter MK, Parise H, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Meigs JB, Nesto RW, Wilson PW, Vasan RS. Impact of glucose intolerance and insulin resistance on cardiac structure and function: sex-related differences in the Framingham Heart Study. *Circulation* 2003; 107: 448-54.

Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K, Shaw JE, Bright D, Williams R. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9(th) edition. *Diabetes Res Clin Pract* 2019; 157: 107843.

Schmidt C, Reitzle L, Dress J, Rommel A, Ziese T, Heidemann C. [Prevalence and incidence of documented diabetes based on health claims data-reference analysis for diabetes surveillance in Germany]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2020; 63: 93-102.

Schneider DA, von Herrath MG. Potential viral pathogenic mechanism in human type 1 diabetes. *Diabetologia* 2014; 57: 2009-18.

Schotten U, Duytschaever M, Ausma J, Eijsbouts S, Neuberger HR, Allessie M. Electrical and contractile remodeling during the first days of atrial fibrillation go hand in hand. *Circulation*. 2003 Mar 18; 107(10):1433-9.

Schotten U, Greiser M, Benke D, Buerkel K, Ehrenteidt B, Stellbrink C, Vazquez-Jimenez JF, Schoendube F, Hanrath P, Allessie M. Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort. *Cardiovasc Res*. 2002; 53:192–201.

Schuettler D, Bapat A, Käab S, Lee K, Tomsits P, Clauss S, Hucker W. Animal Models of Atrial Fibrillation. *Circulation Research*. 2020; 127: 91-110.

Sedgwick B, Riches K, Bageghni SA, O'Regan DJ, Porter KE, Turner NA. Investigating inherent functional differences between human cardiac fibroblasts cultured from nondiabetic and Type 2 diabetic donors. *Cardiovasc Pathol* 2014; 23: 204-10.

Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000; 343: 230-8.

Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbitt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006; 355: 1318-30.

Shen MJ, Choi EK, Tan AY, Han S, Shinohara T, Maruyama M, Chen LS, Shen C, Hwang C, Lin SF, Chen PS. Patterns of baseline autonomic nerve activity and the development of pacing-induced sustained atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2011 Apr; 8(4):583-9.

Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010; 26:397–419.

Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 2007; 445: 881-5.

Sommer RJ. 6.04 - Cardiac Physiology and Pharmacology. Comprehensive Toxicology (Second Edition). Elsevier 2010; 6: 51-67.

Sood S, Chelu MG, van Oort RJ, Skapura D, Santonastasi M, Dobrev D, Wehrens XH. Intracellular calcium leak due to FKBP12.6 deficiency in mice facilitates the inducibility of atrial fibrillation. *Heart Rhythm*. 2008; 5:1047–1054.

Sorop O, van de Wouw J, Chandler S, Ohanyan V, Tune JD, Chilian WM, Merkus D, Bender SB, Duncker DJ. Experimental animal models of coronary microvascular dysfunction. *Cardiovasc Res* 2020; 116: 756-70.

Spach MS, Heidlage JF, Barr RC, Dolber PC. Cell size and communication: role in structural and electrical development and remodeling of the heart. *Heart Rhythm*. 2004; 1:500–515.

Sumitomo N, Sakurada H, Taniguchi K, Matsumura M, Abe O, Miyashita M, Kanamaru H, Karasawa K, Ayusawa M, Fukamizu S, Nagaoka I, Horie M, Harada K, Hiraoka M. Association of atrial arrhythmia and sinus node dysfunction in patients with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ J*. 2007; 71:1606–1609.

Suzuki K, Matsumoto A, Nishida H, Reien Y, Maruyama H, Nakaya H. Termination of aconitine-induced atrial fibrillation by the K_{ACh}-channel blocker tertiapin: underlying electrophysiological mechanism. *J Pharmacol Sci*. 2014;125:406–414.

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.

Thayer KA, Heindel JJ, Bucher JR, Gallo MA. Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 779-89.

Thews G, Vaupel P. Herzfunktion. In: Vegetative Physiologie. Springer-Lehrbuch 2005. Springer, Berlin, Heidelberg.

Thibodeau IL, Xu J, Li Q, Liu G, Lam K, Veinot JP, Birnie DH, Jones DL, Krahn AD, Lemery R, Nicholson BJ, Gollob MH. Paradigm of genetic mosaicism and lone atrial fibrillation: physiological characterization of a connexin 43-deletion mutant identified from atrial tissue. *Circulation*. 2010 Jul 20; 122(3):236-44.

Toso E, Peyracchia M, Matta M, D'Ascenzo F, Gaita F, Kornej J, Hindricks G, Jared Bunch T, Saliba W. Incidence of thromboembolic events following atrial fibrillation catheter ablation and rate control strategies according to the kind of oral anticoagulation: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol* 2018; 270: 172-9.

Van der Velden HM, Ausma J, Rook MB, Hellemons AJ, van Veen TA, Allesie MA, Jongsma HJ. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat. *Cardiovasc Res*. 2000 Jun; 46(3):476-86.

Van Gelder IC, Hagens VE, Bosker HA, Kingma JH, Kamp O, Kingma T, Said SA, Darmanata JI, Timmermans AJ, Tijssen JG, Crijns HJ. A comparison of rate control and rhythm control in patients with recurrent persistent atrial fibrillation. *N Engl J Med* 2002; 347: 1834-40.

Vaseghi M, Lux RL, Mahajan A, Shivkumar K. Sympathetic stimulation increases dispersion of repolarization in humans with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 May 1; 302(9):H1838-4.

Voigt N, Friedrich A, Bock M, Wettwer E, Christ T, Knaut M, Strasser RH, Ravens U, Dobrev D. Differential phosphorylation-dependent regulation of constitutively active and muscarinic receptor-activated IK,ACh channels in patients with chronic atrial fibrillation. *Cardiovasc Res*. 2007 Jun 1; 74(3):426-37.

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

Ca²⁺ leak and increased Na⁺-Ca²⁺ exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2012; 125: 2059-70.

Voigt N, Maguy A, Yeh YH, Qi X, Ravens U, Dobrev D, Nattel S. Changes in I_K, ACh single-channel activity with atrial tachycardia remodelling in canine atrial cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2008 Jan; 77(1):35-43.

Wakili R, Voigt N, Kaab S, Dobrev D, Nattel S. Recent advances in the molecular pathophysiology of atrial fibrillation. *J Clin Invest* 2011; 121: 2955-68.

Wang A, Green JB, Halperin JL, Piccini JP, Sr. Atrial Fibrillation and Diabetes Mellitus: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol* 2019; 74: 1107-15.

Washam JB, Stevens SR, Lokhnygina Y, Halperin JL, Breithardt G, Singer DE, Mahaffey KW, Hankey GJ, Berkowitz SD, Nessel CC, Fox KA, Califf RM, Piccini JP, Patel MR. Digoxin use in patients with atrial fibrillation and adverse cardiovascular outcomes: a retrospective analysis of the Rivaroxaban Once Daily Oral Direct Factor Xa Inhibition Compared with Vitamin K Antagonism for Prevention of Stroke and Embolism Trial in Atrial Fibrillation (ROCKET AF). *Lancet* 2015; 385: 2363-70.

Watanabe M, Yokoshiki H, Mitsuyama H, Mizukami K, Ono T, Tsutsui H. Conduction and refractory disorders in the diabetic atrium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012; 303: H86-95.

Wettwer E, Christ T, Dobrev D, Ravens U. Kardiale zelluläre Elektrophysiologie. *Herzschrittmachertherapie und Elektrophysiologie* 2003; 14: 50-60.

Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation.* 1995;92(7):1954-1968.

Wolf E, Braun-Reichhart C, Streckel E, Renner S. Genetically engineered pig models for diabetes research. *Transgenic research*. 2014 Feb; 23(1):27-38.

Wolf E, Kemter E, Klymiuk N, Reichart B. Genetically modified pigs as donors of cells, tissues, and organs for xenotransplantation. *Anim Front*. 2019 Jun 25;9(3):13-20.

Wong CW, Christen T, Roth I, Chadjichristos CE, Derouette JP, Foglia BF, Chanson M, Goodenough DA, Kwak BR. Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nat Med*. 2006 Aug; 12(8):950-4.

Wu Y, Ding Y, Tanaka Y, Zhang W. Risk factors contributing to type 2 diabetes and recent advances in the treatment and prevention. *Int J Med Sci* 2014; 11: 1185-200.

Yamagata K, Senokuchi T, Lu M, Takemoto M, Fazlul Karim M, Go C, Sato Y, Hatta M, Yoshizawa T, Araki E, Miyazaki J, Song WJ. Voltage-gated K⁺ channel KCNQ1 regulates insulin secretion in MIN6 β -cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Apr 15; 407(3):620-5.

Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 2012; 13: 134.

Yeh YH, Kuo CT, Chan TH, Chang GJ, Qi XY, Tsai F, Nattel S, Chen WJ. Transforming growth factor- β and oxidative stress mediate tachycardia-induced cellular remodelling in cultured atrial-derived myocytes. *Cardiovasc Res*. 2011; 91:62–70.

Yeung WC, Rawlinson WD, Craig ME. Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *Bmj* 2011; 342: d35.

Yi F, Ling TY, Lu T, Wang XL, Li J, Claycomb WC, Shen WK, Lee HC. Down-regulation of the small conductance calcium-activated potassium channels in diabetic mouse atria. *J Biol Chem* 2015; 290: 7016-26.

Yu G, Yu Y, Li YN, Shu R. Effect of periodontitis on susceptibility to atrial fibrillation in an animal model. *J Electrocardiol.* 2010;43:359–366.

Yue L, Feng J, Gaspo R, Li GR, Wang Z, Nattel S. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation. *Circ Res.* 1997 Oct; 81(4):512-25.

Zarzoso M, Mironov S, Guerrero-Serna G, Willis BC, Pandit SV. Ventricular remodelling in rabbits with sustained high-fat diet. *Acta Physiol (Oxf)* 2014; 211: 36-47.

Zemzemi N, Rodriguez B. Effects of L-type calcium channel and human ether-a-go-go related gene blockers on the electrical activity of the human heart: a simulation study. *Europace.* 2015;17(2):326-333.

Zhabyeyev P, Hiess F, Wang R, Liu Y, Wayne Chen SR, Oudit GY. S4153R is a gain-of-function mutation in the cardiac Ca²⁺ release channel ryanodine receptor associated with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia and paroxysmal atrial fibrillation. *Can J Cardiol.* 2013; 29:993–99.

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.

Zhang L, Huang Y, Wang M, Guo Y, Liang J, Yang X, Qi W, Wu Y, Si J, Zhu S, Li Z, Li R, Shi C, Wang S, Zhang Q, Tang Z, Wang L, Li K, Fei JF, Lan G. Development and genome sequencing of a laboratory-inbred miniature pig facilitates study of human diabetic disease. *iScience.* 2019; 19:162–176.

Zhang W, Ma X, Zhong M, Zheng Z, Li L, Wang Z, Zhang Y. Role of the calpain system in pulmonary vein connexin remodeling in dogs with atrial fibrillation. *Cardiology*. 2009; 112(1):22-30.

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.

Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001; 414: 782-7.

Ziolo MT, Mohler PJ. Defining the role of oxidative stress in atrial fibrillation and diabetes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2015; 26: 223-5.

Zlochiver S, Muñoz V, Vikstrom KL, Taffet SM, Berenfeld O, Jalife J. Electrotonic myofibroblast-to-myocyte coupling increases propensity to reentrant arrhythmias in two-dimensional cardiac monolayers. *Biophys J*. 2008; 95:4469–4480.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Elektrische Aktivität im Herzen.....	17
Abbildung 2: Darstellung charakteristischer kardialer Aktionspotentiale beim Menschen, aufgezeichnet in ventrikulären (links) und atrialen (rechts) Kardiomyozyten, mit den jeweils beteiligten Ionenströmen.....	19
Abbildung 3: Das atriale (A) und ventrikuläre (B) Aktionspotential beim Menschen und beim Schwein, gemessen in isolierten Kardiomyozyten.....	20
Abbildung 4: Darstellung verschiedener Mechanismen des strukturellen, elektrischen und autonomen Remodelings, die im Zusammenhang mit der Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern stehen.....	22
Abbildung 5: Reduzierte Beta-Zellmasse bei 4,5 Monate alten INS^{C94Y} -Schweinen, dargestellt durch immunhistochemische Färbungen.....	31
Abbildung 6: Zunahme des Körpergewichts bei INS^{C94Y} -Schweinen (rote Kreise; n=9) und Wildtypen (blaue Kreise; n=7) bis zum Alter von 4,5 Monaten....	32
Abbildung 7: Überblick über das profibrotische Remodeling durch Veränderung der Proteinexpression (A) oder der Zellmenge (B) im Rahmen von VHF.....	34
Abbildung 8: Zelluläre Mechanismen, durch die Diabetes mellitus die Entstehung und Aufrechterhaltung von Vorhofflimmern triggert.....	36
Abbildung 9: Skizzierung der Anatomie des Halses des Schweines mit Zugang zur V. jugularis externa und A. carotis interna.....	48
Abbildung 10: Bestimmung der atrialen effektiven Refraktärperiode (AERP) in einem INS^{C94Y} -Schwein bei einer Basiszykluslänge von 450 ms mittels Extrastimulus	50
Abbildung 11: Repräsentative Aufzeichnungen (Registriereschwindigkeit 50	

<i>mm/s) einer EPU bei einem WT (A)- und einem DM (B)-Schwein</i>	51
<i>Abbildung 12: Vergleich von Körper- (A), Herz- (B) und Herz-/Körpergewicht (C), Nüchternblutzuckerkonzentrationen (D), Kaliumspiegeln (E) sowie der systolischen und diastolischen Blutdrücke (BD) (F) bei WT (n=18) und DM (n=15)</i>	77-78
<i>Abbildung 13: Häodynamische Messungen im linken und im rechten Herzen von WT- und DM-Schweinen</i>	80
<i>Abbildung 14: Messung der Herzfrequenz mittels 12-Kanal-EKG bei Wildtypen (WT) und Diabetes-Schweinen (DM) vor der elektrophysiologischen Untersuchung</i>	81
<i>Abbildung 15: Elektrokardiografische Messungen in den Herzen von WT- und DM-Schweinen</i>	81
<i>Abbildung 16: Messung des Wenckebach-Punkts bei in WT- und DM-Schweinen</i>	82
<i>Abbildung 17: Messung der Sinusknotenerholungszeit (SNRT) von WT- und DM-Schweinen</i>	83
<i>Abbildung 18: Messung der AERP in den Herzen von WT- und DM-Schweinen</i>	83
<i>Abbildung 19: Messung der AVERP in den Herzen von WT- und DM-Schweinen</i>	84
<i>Abbildung 20: Messung der VERP in den Herzen von WT- und DM-Schweinen</i>	85
<i>Abbildung 21: Darstellung des prozentualen Anteils der WT- und DM-Schweine, bei denen durch Stimulationsmanöver Vorhofflimmern (>30 sec.), sowie derjenigen Schweine, bei denen persistierendes Vorhofflimmern (>30 min.) ausgelöst werden konnte</i>	86
<i>Abbildung 22: Analyse der profibrotischen Gene auf mRNA-Ebene</i>	88
<i>Abbildung 23. Analyse der Genexpression der Ionenkanäle auf mRNA-Ebene</i>	91-92
<i>Abbildung 24. Analyse der Genexpression der Connexine 37 (GJA4), 40</i>	

<i>(GJA5), 43 (GJA1) und 45 (GJC1) auf mRNA-Ebene</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 25: Analyse der Proteinexpression von TGF-β1 mit Hilfe von Western Blots im LAA (A), LV (B), RAA (C) und RV (D) bei WT- und DM-Schweinen</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 26: Analyse der Proteinexpression von SMAD3 mit Hilfe von Western Blots im LAA (A), LV (B), RAA (C) und RV (D) bei WT- und DM-Schweinen</i>	<i>96</i>
<i>Abbildung 27: Analyse der Proteinexpression von phosphoryliertem SMAD3 (p-SMAD3) mit Hilfe von Western Blots im LAA (A), LV (B), RAA (C) und RV (D) bei WT- und DM-Schweinen</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 28: Analyse der Proteinexpression von CTGF mit Hilfe von Western Blots im LAA (A), LV (B), RAA (C) und RV (D) bei WT- und DM-Schweinen</i>	<i>98</i>
<i>Abbildung 29. Histologie: Quantifizierung der Fibrose mittels Masson Goldner Trichrom (A-D) und Sirius Red (E-H) Färbung im LAA, LV, RAA und RV bei WT- (n=7) und DM- (n=7) Schweinen</i>	<i>100-101</i>
<i>Abbildung 30: Immunfluoreszenzfärbung (IF) bei DM- (A) und WT- (B) Schweinen mit Cx43- (grün) und Desmin- (rot) Antikörpern sowie einer Zellkernfärbung mittels DAPI (blau)</i>	<i>102-103</i>

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Ionenkanäle, die auch im porcinen Herzen exprimiert werden und durch Genexpressionsanalysen untersucht wurden72

Tabelle 2. Connexine, die auch im porcinen Herzen exprimiert werden und durch Genexpressionsanalysen untersucht wurden72

3. Danksagung

An erster Stelle möchte ich den Herren Prof. Dr. med. Stefan Käab und Dr. med. Sebastian Clauß für die Möglichkeit der Anfertigung der hier vorliegenden Arbeit in einer tollen Arbeitsgruppe und für die Überlassung dieser interessanten Themenstellung meinen großen Dank aussprechen. Ein besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. med. Clauß für seine Unterstützung bei der Entstehung dieser Dissertation.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf für die Übernahme des Dissertationsvorhabens, die Durchsicht der Arbeit und deren Einreichung an der tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München. Außerdem möchte ich mich herzlich dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte, an diesem spannenden Tiermodell zu arbeiten.

Zudem möchte ich mich vielmals bei Bianca Hildebrand für die Einführung in die Laborarbeit bedanken. Durch ihre intensive Betreuung und ihre Geduld, aber auch durch die vielen netten Gespräche, habe ich einen besonderen Blick auf Planung, Präzision und Ordnung sowie die Freude an der Laborarbeit gewonnen.

Natürlich danke ich auch meiner lieben Kollegin Julia Vlcek sowie Herrn Dr. med. Dominik Schüttler für die tolle Zeit im Schweine-OP, und die Hilfe bei der Gewinnung der Daten für diese Arbeit.

Zum Gelingen der Dissertation trug außerdem die tolle Arbeitsatmosphäre im Walter-Brendel-Zentrum bei. Hier möchte ich vor allem die Mitarbeiter der AG Massberg/Schulz und AG Reichart erwähnen, die mir stets hilfsbereit und freundschaftlich begegnet sind. Vielen Dank euch allen!

Zuletzt geht ein großer Dank an meine wundervolle Familie und lieben Freunde, die durch die gesamte Studien- und Promotionszeit an meiner Seite standen und mir den Rücken gestärkt haben. Besonders danke ich meinen Eltern Ursula und Jürgen, meinen beiden Schwestern Stefanie und Franziska sowie meinem Lebensgefährten Stefan: ihr habt immer an mich geglaubt und konntet mich auch in schweren Phasen stets mit euren lieben Worten motivieren. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.