

Die Rolle des Yes-assoziierten Proteins (YAP) im
proarrhythmischen zu Vorhofflimmern führenden strukturellen
Remodeling des diabetischen Herzens

von Nora Hesse

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

Die Rolle des Yes-assoziierten Proteins (YAP) im
proarrhythmischen zu Vorhofflimmern führenden strukturellen
Remodeling des diabetischen Herzens

von Nora Hesse

aus Gotha

München 2024

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 LMU Klinikums

Mentor: PD. Dr. med. Sebastian Clauß

Gedruckt mit 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: 10. Februar 2024

Für Almi

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINLEITUNG.....	1
II. LITERATURÜBERSICHT	3
1. Vorhofflimmern.....	3
1.1. Definition, Epidemiologie und Risikofaktoren	3
1.2. Klinische Manifestation von VHF	4
1.2.1. Klassifizierung von VHF	4
1.2.2. Symptomatik	5
1.3. Diagnostik	5
1.4. Therapiemöglichkeiten.....	5
1.4.1. SGLT2-Inhibitoren als Therapieansatz für VHF	7
1.5. Elektrophysiologie des Herzens	9
1.6. Pathophysiologie von Vorhofflimmern.....	12
1.6.1. Ektopie	13
1.6.2. Reentry	14
1.6.2.1. Strukturelles Remodeling.....	15
1.6.2.2. Fibrose	16
1.6.2.3. Faktoren welche die Differenzierung von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten begünstigen.....	20
2. Diabetes mellitus.....	25
2.1. Epidemiologie von Diabetes mellitus	25
2.2. Risikofaktoren für Diabetes mellitus.....	26
2.2.1. Genetik	26
2.2.2. Umwelteinflüsse.....	26
2.3. Klinik von Diabetes mellitus.....	27
2.4. Diagnostik von Diabetes mellitus	27
2.5. Therapie des Diabetes mellitus	28
2.5.1. SGLT-2 Inhibitoren als Therapieform für Diabetes mellitus.....	29
2.6. Pathophysiologie des Diabetes mellitus.....	29
2.6.1. Diabetes Typ 1	29
2.6.2. Diabetes Typ 2	30
3. Tiermodelle	31
3.1. Tiermodelle des VHF	31

3.1.1.	Genetische Veränderungen	31
3.1.2.	Induktion einer Herzhypertrophie	31
3.1.3.	Myokardischämie/Ischämische Kardiomyopathie	32
3.1.4.	Tachypacing	33
3.1.5.	Inflammation	34
3.2.	Tiermodelle des Diabetes mellitus	36
4.	Hypothese und Ziele.....	40
III.	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	41
1.	<i>In vivo</i>	41
1.1.	Verwendete Versuchstiere und entsprechende Tierhaltung	41
1.1.1.	Moorversuchsgut	41
1.1.2.	Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin	42
1.1.3.	Versuchsaufbau	43
1.2.	Materialien	45
1.2.1.	Geräte	45
1.2.2.	Verbrauchsmaterialien.....	45
1.2.3.	Instrumente.....	47
1.2.4.	Hilfsmittel.....	48
1.2.5.	Medikamente und Chemikalien	48
1.2.5.1.	Analgetika	48
1.2.5.2.	Antiarrhythmikum.....	48
1.2.5.3.	Antikoagulans.....	48
1.2.5.4.	Antidiabetika	48
1.2.5.5.	Infusionslösungen.....	49
1.2.5.6.	Narkotika	49
1.2.5.7.	Sonstige Medikamente und Chemikalien.....	49
1.3.	<i>In vivo</i> Methoden.....	50
1.3.1.	Narkoseeinleitung.....	50
1.3.2.	Intubation und Beatmung.....	50
1.3.3.	Narkoseaufrechterhaltung und perioperative Narkoseüberwachung	51
1.3.4.	Anlage der Schleusen	52
1.3.5.	Rechtsherzkatheteruntersuchung.....	54
1.3.6.	Messung der linksventrikulären Drücke (LVP und LVEDP)	54
1.3.7.	Elektrophysiologische Untersuchung.....	54

1.3.8.	Sinusknotenerholungszeit (SNRT).....	55
1.3.9.	Bestimmung des Wenckebach-Punkts (WP).....	55
1.3.10.	Refraktärzeiten (AVERP und AERP)	55
1.3.11.	Burststimulation	56
1.3.12.	Herzentnahme.....	56
2.	<i>In vitro</i>.....	57
2.1.	Materialien	57
2.1.1.	Geräte	57
2.1.2.	cDNA und qPCR.....	58
2.1.3.	Chemikalien	58
2.1.4.	Antikörper	60
2.1.4.1.	Primäre Antikörper.....	60
2.1.5.	Sonstiges.....	61
2.1.6.	Zubereitete Lösungen	61
2.1.6.1.	Wasch- Lösung.....	61
2.1.6.2.	Blocking- Lösung.....	62
2.1.6.3.	Elektrophoresegel.....	62
2.1.6.4.	Oligonukleotidprimer für RT-qPCR	62
2.1.6.5.	Software	63
2.2.	Methoden.....	63
2.2.1.	Histologie	63
2.2.1.1.	Masson-Goldner-Trichrom Färbung	63
2.2.1.2.	Immunfluoreszenzfärbung	66
2.2.1.3.	Mikroskopie	68
2.2.2.	Genexpressionsanalyse.....	69
2.2.2.1.	RNA-Isolation	69
2.2.2.2.	Synthese der cDNA	69
2.2.2.3.	Primertest	70
2.2.2.4.	Realtime qPCR.....	73
2.2.2.5.	Statistik.....	75
IV.	ERGEBNISSE.....	76
1.	Vergleichende Darstellung zwischen Wildtyp- und <i>INS</i>^{C94Y}-Schweinen ohne Therapie	76
1.1.	<i>In vivo</i> Ergebnisse von Wildtyp- und <i>INS</i> ^{C94Y} -Schweinen.....	76

1.1.1.	Hämodynamik	78
1.1.2.	Elektrokardiogramm (EKG).....	79
1.1.3.	Elektrophysiologische Untersuchung.....	81
1.2.	<i>Ex vivo</i> Ergebnisse des strukturellen Remodelings von Wildtyp- und <i>INS^{C94Y}</i> -Schweinen ohne Therapie.....	87
1.2.1.	Evaluation der interstitiellen Fibrose	87
1.2.2.	Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung.....	91
1.2.3.	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	96
2.	Vergleichende Darstellung zwischen <i>INS^{C94Y}</i>-Schweinen und <i>INS^{C94Y}</i>- Schweinen mit SGLT2-Inhibitor Therapie.....	102
2.1.	<i>In vivo</i> Ergebnisse von <i>INS^{C94Y}</i> -Schweinen und <i>INS^{C94Y}</i> -Schweinen mit SGLT2-Inhibitor-Therapie	102
2.1.1.	Hämodynamik	104
2.1.2.	Elektrokardiogramm (EKG).....	105
2.1.3.	Elektrophysiologische Untersuchung.....	107
2.2.	<i>Ex vivo</i> Ergebnisse des strukturellen Remodelings von <i>INS^{C94Y}</i> -Schweinen und <i>INS^{C94Y}</i> -Schweinen mit Dapagliflozin-Therapie.....	112
2.2.1.	Evaluation der interstitiellen Fibrose	112
2.2.2.	Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung.....	116
2.2.3.	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse	120
V.	DISKUSSION	127
1.	Wahl der Tierart	127
2.	Wahl des Tiermodells.....	129
3.	Diskussion der Ergebnisse	131
3.1.	Hämodynamik	131
3.2.	Elektrophysiologische Untersuchung.....	132
3.3.	Masson-Trichrom-Goldner Färbung	134
3.4.	Immunfluoreszenzfärbung von YAP	135
3.5.	Genexpressionsanalyse.....	137
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	143
VII.	SUMMARY.....	146
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	148

IX.	ANHANG	182
1.	Abbildungsverzeichnis	182
2.	Tabellenverzeichnis.....	187
3.	Danksagung	188

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α -SMA	Alpha-smooth muscle actin
A.	<i>Arteria</i>
Abb.	Abbildung
ABC	„AF Better Care“ oder Antikoagulation/Bessere Symptombehandlung/Kardiovaskuläre und Komorbiditätsoptimierung
ADA	Amerikanische Diabetes Gesellschaft (engl. American Diabetes Association)
AGEs	Fortgeschritten glykierte Endprodukte (engl. advanced glycation end-products)
AERP	Atriale effektive Refraktärperiode
AF	Vorhofflimmern (engl. atrial fibrillation)
Ang II	Angiotensin II
AREG	Amphiregulin
AVERP	Atriale ventrikuläre effektive Refraktärzeit
AV-Knoten	Atrioventrikularknoten
BL	Baseline
bpm	Schläge pro Minute (engl. beats per minute)
Bspw.	beispielsweise
Ca	Calcium
Cav	Spannungsgesteuerter Calciumkanal
CAVB	Chronischer AV-Block
cDNA	Komplementäre DNA
CCL2	C-C Motif Chemokin Ligand 2
CaL	Calciumkanal vom L-Typ
COL1A1	Kollagen Typ 1a1
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
DAD	Verzögerte Nachdepolarisation (engl. delayed afterdepolarization)
Dapa	Dapagliflozin
DM	Diabetes mellitus
DOACs	Direkte orale Antikoagulantien
EAD	Frühe Nachdepolarisation (engl. early afterdepolarization)
ECM	Extrazelluläre Matrix
EKG	Elektrokardiogramm
EPU	Elektrophysiologische Untersuchung
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESC	Europäische Gesellschaft für Kardiologie (engl. European Society of Cardiology)
FN1	Fibronektin

GAD	Glutamat-Decarboxylase
GLUT	Glukosetransporter
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HbA1c	Glykiertes Hämoglobin A1c
HCN	Hyperpolarisationsaktivierte zyklisch Nukleotid-abhängige Ionenkanäle (engl. hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IAA	Autoantikörper gegen Insulin (engl. autoantibodies targeted to insulin)
I _{Ca,L}	Depolarisierender Ca ²⁺ -Einstrom
I _f	Einwärts gerichteter Kationen-Einstrom (engl. funny channel)
IL-1β	Interleukin 1β
IL-6	Interleukin 6
INS ^{C94Y}	Mutation des porzinen <i>INS</i> -Gens
i.v.	intravenös
K	Kalium
KGW	Körpergewicht
K _{ir}	Einwärts-Gleichrichter Kaliumkanal (engl. inward rectifier potassium channel)
LAA	Linkes Herzohr (engl. left atrial appendenge)
LA	Linkes Atrium (left atrium)
LAD	Linke vordere absteigende Koronararterie (engl. left anterior descending artery)
LAFW	Freie Wand des linken Vorhofs (engl. left atrial free wall)
LVEDP	Linksventrikulärer Enddiastolischer Druck
LVP	Linksventrikulärer Druck
M.	<i>Musculus</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex)
MIDY	Durch Mutation des <i>INS</i> -Gens hervorgerufener permanenter neonataler Diabetes mellitus (engl. mutant <i>INS</i> -gene induced diabetes of youth)
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MMP2	Matrix-Metalloproteinase-2
MODY	„Erwachsenendiabetes“ der im Jungenalter auftritt (engl. maturity onset diabetes of the young)
ms	Millisekunden
N.	<i>Nervus</i>
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Nav	Spannungsgesteuerter Natrium-Kanal
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher

OGTT	Oraler Blutglukosetoleranztest
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (engl. quantitative polymerase chain reaction)
PNDM	Permanenter neonataler Diabetes mellitus
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (engl. real time polymerase chain reaction)
PV	Pulmonalvene
PVI	Pulmonalvenenisolation
RAA	Rechtes Herzohr (engl. right atrial appendage)
RAFW	Freie Wand des rechten Atriums (engl. right atrial free wall)
RV	Rechter Ventrikel
sec.	Sekunden
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
SGLT	Natrium/Glukose-Cotransporter (engl. sodium glucose transporter)
SNRT	Sinusknotenerholungszeit (engl. sinus node recovery time)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
TAC	Transversale Aortenverengung
TGF- β 1	Transformierender Wachstumsfaktor beta (engl. transforming growth factor- β)
u.U.	Unter Umständen
V.	<i>Vena</i>
v.a.	Vor allem
VERP	Ventrikuläre effektive Refraktärzeit
VHF	Vorhofflimmern
VTP	Ventrikuläres Tachypacing
WT	Wildtyp
YAP	Yes-assoziiertes Protein

I. EINLEITUNG

Vorhofflimmern (VHF) ist die Herzrhythmusstörung mit der höchsten Prävalenz in der klinischen Praxis und ist gekennzeichnet durch hohe Morbidität und Mortalität (Andrade et al., 2014). Über 6 Millionen Menschen in Europa leiden an den Auswirkungen der Erkrankung, welche ein hohes Risiko für Schlaganfälle, der Ausbildung von Demenz, sowie der Entwicklung von Herzinsuffizienz birgt und somit ein übergeordnetes Problem für das Gesundheitssystem darstellt (Camm et al., 2012).

Epidemiologische Studien konnten aufzeigen, dass eine Erkrankung an Diabetes mellitus einer der Hauptrisikofaktoren für die Manifestation von VHF darstellt (Kannel et al., 1998). Patienten mit Diabetes mellitus weisen ein 28-40% erhöhtes Risiko auf, VHF auszubilden (Huxley et al., 2011). Bis zum heutigen Tag sind die proarrhythmischen Mechanismen, welche zur Ausbildung von VHF bei Diabetespatienten führen unzureichend verstanden (Bohne et al., 2019). Zudem mangelt es an adäquaten therapeutischen Behandlungsmöglichkeiten (Polina et al., 2020). Verschiedene, teils noch unbekannte Trigger führen zur Aktivierung von Fibroblasten, zur Förderung profibrotischer Signalwege sowie inflammatorischer Prozesse (Nattel et al., 2020). Folge ist die Ausbildung von Fibrose, welches als Substrat für VHF wirkt (Schotten et al., 2016). Auch das Yes-assoziierte Protein (YAP) gilt als wichtiger Mediator profibrotischer Prozesse, welches durch eine Diabetes mellitus Erkrankung verstärkt exprimiert werden kann (Francisco et al., 2021, Hu et al., 2021).

Diese Arbeit untersucht die Rolle des Yes-assoziierten Proteins in proarrhythmischen strukturellen Remodelingprozessen im Diabetes mellitus. Da sich in Patienten mit VHF ein kardioprotektiver Effekt durch SGLT2-Hemmer zeigte, dessen Mechanismus unbekannt ist (Zheng et al., 2022), wurde in dieser Arbeit ebenfalls der Effekt von Dapagliflozin auf proarrhythmisches Remodeling untersucht. In diesem Zusammenhang wurden genetisch veränderte Schweine mit Diabetes mellitus *in vivo* untersucht und profibrotische Mechanismen auf histologischer und molekularbiologischer Ebene analysiert.

Nagermodelle konnten bereits wichtige Einblicke in die Pathophysiologie von Diabetes-induzierten profibrotischen Prozessen liefern, weisen jedoch

elektrophysiologische, anatomische und metabolische Limitationen in der Übertragbarkeit auf den Menschen, als auch in der Durchführung der Untersuchungsmethoden auf (Clauss et al., 2019). Aus diesem Grund wurde ein Schweinmodell verwendet, welches einen permanenten neonatalen Diabetes mellitus (PNDM) entwickelt. Hierbei handelt es sich um genetisch veränderte Tiere, bei welchen eine monogene Mutation die Fehlfaltung von Insulin verursacht. Die Akkumulation des fehlgefalteten (Pro-)Insulins in den pankreatischen β -Zellen führt zu Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) und anschließend zur Apoptose der insulinproduzierenden β -Zellen des Pankreas (Renner et al., 2013). Insgesamt wurden 45 Schweine verwendet und in folgende Gruppen unterteilt: Schweine mit Diabetes mellitus (INS^{C94Y}/DM , $n=18$), sowie ihre Wurfgeschwister ohne Diabetes mellitus (Wildtyp/WT, $n=17$). Eine dritte Gruppe Schweine mit Diabetes mellitus wurde mit Dapagliflozin ab einem Absatzalter von ca. 4 Wochen behandelt ($INS^{C94Y+Dapa}/DM+Dapa$, $n=10$). Zur Untersuchung der Prozesse des proarrhythmogenen Remodelings wurden die Tiere mittels 12-Kanal-EKG, Rechts- und Linksherzkatheteruntersuchung und invasiver Elektrophysiologischer Untersuchung (EPU) mit Induktionsmanövern durch Burststimulation *in vivo* charakterisiert. Anschließend wurden die Herzen entnommen und für histologische und molekularbiologische Methoden konserviert und verarbeitet. Die interstitielle Fibrose wurde mittels Masson-Goldner-Trichrom Färbung quantifiziert. Die quantitative Darstellung des Yes-assoziierten Proteins in Fibroblasten und Kardiomyozyten erfolgte durch Anfertigung einer Immunfluoreszenzfärbung. Eine Genexpressionsanalyse wurde mittels real-time RT-PCR durchgeführt. Hierbei erfolgte die Analyse der Expression von *YAP* selbst, sowie von profibrotischen und proinflammatorischen Mediatoren, als auch von Mediatoren der extrazellulären Matrix (ECM).

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Vorhofflimmern

1.1. Definition, Epidemiologie und Risikofaktoren

VHF ist gekennzeichnet durch unregelmäßige R-R Intervalle und dem Ausbleiben von sich wiederholenden, deutlichen P-Wellen im EKG mit unregelmäßiger Aktivierung der Atrien (Hindricks et al., 2021). Eine Dauer von ≥ 30 Sekunden, dokumentiert in einem 12-Kanal EKG, wird als VHF festgelegt (Steinberg et al., 2018).

Die Prävalenz von VHF variiert von 2-4 % in der adulten Gesamtbevölkerung bis zu 10-12% der über 80-jährigen (Staerk et al., 2017, Benjamin et al., 2019), wobei ein 2,3-facher Anstieg innerhalb des nächsten Jahrzehnts zu erwarten ist (Krijthe et al., 2013, Chugh et al., 2014). Weltweit stellt VHF die am häufigsten auftretende Herzrhythmusstörung im Menschen dar, welche eine fortschreitende Inzidenz im Alter aufweist (Staerk et al., 2017). Jüngsten Schätzungen zufolge beläuft sich die Zahl der Betroffenen auf ca. 33,5 Millionen weltweit (Morin et al., 2016). Erst kürzlich wurde in einer Studie die Prävalenz von VHF von einer in vier Individuen auf eine in drei Individuen europäischer Herkunft mit einem Altersindex von 55 Jahren korrigiert (Magnussen et al., 2017). Da VHF mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität einhergeht, bedeutet dies sowohl eine wesentliche Belastung für die Betroffenen selbst, als auch für die Gesellschaft und das Gesundheitswesen (Andrade et al., 2014).

Eine Vielzahl von primären (d.h. nicht veränderbaren) und sekundären Risikofaktoren begünstigt die Entstehung von VHF (Sagris et al., 2021). Der prominenteste primäre Risikofaktor stellt das Alter dar (Schnabel et al., 2015). Ein kontinuierlicher schrittweiser Anstieg im Auftreten von VHF kann mit fortschreitendem Alter beobachtet werden (Murphy et al., 2007, Guo et al., 2015, Rodriguez et al., 2015). Auch die Genetik bildet einen primären Risikofaktor. So erwiesen Populationsstudien ein 40% erhöhtes Risiko für VHF bei Nachkommen ersten Grades (Fox et al., 2004, Arnar et al., 2006). Auch das Geschlecht bildet einen primären Risikofaktor für VHF. Für Europa und Nordamerika wurde gezeigt, dass die Inzidenz in Männern höher war als in Frauen (Schnabel et al., 2015), was

sich global unabhängig in Ländern mit hohem oder niedrigem Einkommen bestätigte (Chugh et al., 2014). Zum anderen haben auch sekundäre und somit veränderbare Aspekte eine starke Auswirkung auf das Entstehen und Fortschreiten von VHF (Staerk et al., 2017). Begleiterkrankungen wie Herzinsuffizienz, Koronare Herzkrankheit, chronische Nephropathie, Übergewicht und obstruktive Schlafapnoe stehen im engen Zusammenhang mit dem Auftreten von VHF (Boriani et al., 2015, Cadby et al., 2015, Hobbelt et al., 2016, Lip et al., 2017, Aune et al., 2018, Nalliah et al., 2018). Hierzu zählt auch die Erkrankung an Diabetes mellitus, welche in bis zu 20% der Patienten mit VHF gegeben ist (Morin et al., 2016) und Studien zufolge ein Auftreten von VHF um das 1,4-1,6-fache erhöht (Dublin et al., 2010). Die möglichen Ursachen hierfür liegen einerseits in der Vulnerabilität der Diabetespatienten für Erkrankungen wie Bluthochdruck (Cairns, 2016), Koronare Herzkrankheit, Herzinsuffizienz (Pfister et al., 2013) und linksventrikuläre Hypertrophie (Mohan et al., 2021), welche ebenfalls in engem Zusammenhang mit der Genese des VHF stehen (Pallisgaard et al., 2016).

1.2. Klinische Manifestation von VHF

1.2.1. Klassifizierung von VHF

In vielen Patienten entwickelt sich VHF von kurzen, wenigen zu länger andauernden und häufigeren Episoden. Mit der Zeit manifestieren sich bei vielen Patienten anhaltende Formen von VHF. Basierend auf der Präsentation, Dauer und Beendigung der Episoden wird VHF entsprechend der Empfehlungen der *European Society of Cardiology* (ESC) in fünf Gruppen klassifiziert (Kirchhof et al., 2016):

- 1) Erstmalig diagnostiziertes VHF, unabhängig von der Dauer und Anwesenheit bzw. Schweregrad der Symptome
- 2) Paroxysmales VHF, welches innerhalb von bis zu maximal sieben Tagen spontan in den Sinusrhythmus konvertiert
- 3) Persistierendes VHF, welches länger als sieben Tage andauert und durch elektrische Kardioversion in den Sinusrhythmus konvertiert werden muss
- 4) Langanhaltend persistierendes VHF, welches länger als ein Jahr andauert
- 5) Permanentes VHF, welches sowohl vom Patienten als auch dem behandelnden Arzt akzeptiert wird. In diesem Fall wird von einer Rhythmuskontrolle abgesehen. Falls diese erfolgt, sollte diese Arrhythmieform als langanhaltendes persistierendes VHF reklassifiziert

werden.

1.2.2. Symptomatik

Menschen mit VHF können diese symptomatisch oder asymptomatisch erleben („stilles VHF“), wobei viele Patienten beide Manifestationsarten aufweisen (Kirchhof et al., 2009, Xiong et al., 2015). So beliefen sich die Zahlen in Studien bei 25-40% mit minimalen Symptomen, während 15-30% über eine schwere und beeinträchtigende Symptomatik klagten (Freeman et al., 2015). Das Auftreten von VHF kann für die Betroffenen eine signifikant verminderte Lebensqualität zur Folge haben. Sie erleben eine Vielzahl von Symptomen, welche Lethargie, Palpitationen, Dyspnoe, Brustschmerzen Schlafstörungen und psychologischem Stress umfassen (Dorian et al., 2000, Steg et al., 2012, Aliot et al., 2014).

1.3. Diagnostik

Als adäquates diagnostisches Mittel gelten eine 1-Kanal- oder 12-Kanal-EKG-Aufzeichnung. Als klinisch relevant gelten hierbei: Arrhythmieepisoden von ≥ 30 Sekunden mit unregelmäßigen R-R-Intervallen, sowie das Ausbleiben von P-Wellen. Eine ausführliche Anamnese der Patienten, sowie die Überprüfung der Nieren- und Schilddrüsenfunktion, eine Blutuntersuchung mit Überprüfung des Elektrolythaushalts, sowie einer transthorakalen Echokardiographie können bei Bedarf ebenfalls Teil des Diagnostikregimes darstellen, um Komorbiditäten abzuklären (Hindricks et al., 2021).

1.4. Therapiemöglichkeiten

Das Management von Vorhofflimmern ist vielseitig und richtet sich individuell nach dem Zustand des Patienten, der jeweiligen Klassifizierung der Episoden, seiner Vorerkrankungen, sowie seiner Symptomatik und dem damit verbundenen Leidensdruck. Im Grundprinzip wird nach dem sogenannten „ABC-Schema“ therapiert (*Atrial Fibrillation Better Care*). Dieses setzt sich zusammen aus den drei folgenden Punkten A) Antikoagulation/Schlaganfallprävention, B) Besseres Management der Symptome und C) Kardiovaskuläre und komorbide Optimierung. Da VHF das Schlaganfallrisiko um das Fünffache erhöhen kann, wird bei diesem Therapieansatz das Schlaganfallrisiko eines Patienten evaluiert und entsprechend therapiert. Ein wichtiges Hilfsmittel zur Evaluierung des Schlaganfallrisikos bilden verschiedene Scoring-Systeme, wie beispielsweise der CHA₂DS₂-VASC-Score, welcher Risikofaktoren wie Vorerkrankungen, Alter und Geschlecht in einem

Punktesystem zusammenfasst (Lip et al., 2010). Ein weltweit häufig verabreichtes Therapeutikum stellen Vitamin-K-Antagonisten dar. Sie vermindern das Schlaganfallrisiko um 64% (Hart et al., 2007), erhöhen jedoch das Blutungsrisiko. Aus klinischer Sicht erfordert der Einsatz einen hohen Aufwand, da durch Bluttests eine optimale Einstellung gewährleistet werden muss, um so das Blutungsrisiko zu reduzieren (De Caterina et al., 2013). Eine weitere Therapiemöglichkeit stellen daher direkte orale Antikoagulantien, sogenannte DOACs dar, welche ein besseres pharmakokinetisches Profil aufweisen. Sie reduzieren ebenfalls das Schlaganfallrisiko, weisen jedoch ein reduziertes Blutungsrisiko auf (Yao et al., 2017). Generell gilt es, die prophylaktische antikoagulatorische Wirkung und das Risiko zur Blutungsneigung abzuwägen, was sich oftmals als problematisch darstellen kann (Rutherford et al., 2018). Für Patienten mit erhöhtem Schlaganfall- und Blutungsrisiko, kann eine Vorhofohrklusion eine Alternative darstellen (Reddy et al., 2013).

Weitere Therapiestrategien umfassen die sog. Frequenz- und Rhythmuskontrolle (Camm et al., 2012). Eine Frequenzkontrolle wird durch Reduktion der AV-Überleitung erzeugt, was durch medikamentöse Präparate wie β -Blocker, Calciumkanal-Blocker oder Digitalispräparate erzielt werden kann (Morin et al., 2016). Eine nicht-medikamentöse Behandlungsform stellt bspw. die AV-Knotenablation dar, welche jedoch eine anschließende Implantation eines Herzschrittmachers erforderlich macht (Chatterjee et al., 2013). Sofern eine Rhythmuskontrolle Teil des jeweiligen Therapieregimes darstellt, kann auch diese mittels antiarrhythmischer Medikation erzielt werden (wie bspw. Amiodaron oder Flecainid). Die elektrische Kardioversion stellt eine nicht-medikamentöse Technik dar, den Sinusrhythmus wiederherzustellen (Hindricks et al., 2021). Eine wichtige invasive Form der Rhythmuskontrolle bildet die Katheterablation. Sie gilt der medikamentösen Therapie als übergeordnet und hat sich innerhalb der letzten Jahrzehnte kontinuierlich weiterentwickelt (Calkins et al., 2017). Pulmonalvenen stellen die häufigste anatomische Ursache für ektope atriale Reizauslösung dar und sind folglich ein Trigger für VHF (Haïssaguerre et al., 1998). Bei der Technik der Pulmonalvenenisolation (PVI) werden im linken Vorhof kleine Läsionen um das Antrum jeder Pulmonalvene erzeugt. Das hierbei verursachte Narbengewebe verhindert die Überleitung elektrischer Reize auf den Vorhof und somit die Bildung von VHF. Für diese Technik kann bspw. eine Radiofrequenzablation oder eine

Kryoablation angewendet werden (Morin et al., 2016). Der Erfolg der Ablation mittels PVI hat sich in den letzten Jahrzehnten durch die Anwendung von 3D-Mapping-Systemen, verschiedener Ablationskatheter und Energieträger deutlich gesteigert, so dass die Ablation derzeit als Goldstandard gilt. Jedoch ist ein Wiederauftreten von VHF durch Wiederverbindung und Reizweiterleitung von den PVs auf den Vorhof zu beobachten (Buist et al., 2021, Kistler et al., 2023).

Auch eine bestmögliche pharmakologische Behandlung durch antiarrhythmische Medikamente erzielt Studien zufolge nur eine Erfolgsrate von 50-60% im ersten Behandlungsjahr. Jedes antiarrhythmische Medikament hat eine palliative, jedoch keine kurative Wirkung. Eine damit verbundene langfristige Einnahme kann somit zu starken Nebenwirkungen führen. Trotz modernster Techniken der PVI-Ablation liegt die Rate des Wiederauftretens für VHF auch nach Ablation bei 40-50% innerhalb von 5 Jahren (Saguner et al., 2018). Alle derzeit verfügbaren Behandlungsmöglichkeiten haben somit vergleichsweise geringe langfristige Erfolgsraten (Park et al., 2019). Somit lässt sich zusammenfassen, dass die Erforschung weiterer Behandlungsansätze und der obliegenden Pathomechanismen in der Grundlagenforschung unverzichtbar ist. Um die komplexen Mechanismen des VHF und seiner derzeit angewandten Therapiemöglichkeiten darzustellen, kann somit auf die Anwendung eines Tiermodells nicht verzichtet werden.

1.4.1. SGLT2-Inhibitoren als Therapieansatz für VHF

SGLTs (Natrium-Glukose Cotransporter, engl.: *sodium glucose transporters*) befinden sich in der luminalen Membran des proximalen Tubulus der Niere. An dieser Stelle reabsorbieren sie bis zu 180 g Glukose aus dem Primärharn pro Tag, wodurch somit weniger als ein Gramm über den Urin ausgeschieden wird (Wright, 2021). 1933 wurde entdeckt, dass eine Gabe des natürlichen Glykosids Phlorizin eine vollständige Blockade der beiden SGLT-Transporter bewirkt (Chasis et al., 1933). Ein halbes Jahrhundert später zeigten Forschungen in diabetischen Ratten eine Senkung der Hyperglykämie und die Wiederherstellung ihrer Insulinsensitivität (Rossetti et al., 1987). Die Lokalisation der beiden SGLT-Transporter befindet sich bei SGLT-1 überwiegend im Dünndarm und nur zu sehr geringen Anteilen in der Nierenrinde, wohingegen sich der SGLT2-Transporter ausschließlich im Kortex der Niere befindet. Da der Einsatz von oralem Phlorizin zur Hemmung beider SGLT-Transporter führt und die Hemmung des SGLT1-Transporters Durchfallerkrankungen verursachen kann, erwies sich eine Therapie

durch orales Phlorizin als nicht adäquat. Resultat jahrelanger Entwicklung von oralen SGLT2-Inhibitoren brachten schließlich drei sehr affine SGLT2-Inhibitor-Präparate hervor: Dapagliflozin, Canagliflozin und Empagliflozin (Gliflozine).

SGLTs sind Natrium/Glukose-Cotransporter mit einer obligatorischen Bindung zwischen Natrium und Glukose. Das Verhältnis liegt bei den SGLT2 bei 1:1. Der SGLT2 gilt als essenzieller Rückresorptionsmechanismus von Glukose und Natrium aus dem Primärharn. Die Aufnahme von Glukose in das Epithel erfolgt durch den Gradienten des elektromechanischen Potentials von Na^+ . Im Anschluss diffundiert die Glukose in das Blut und gelangt durch GLUT2-Transporter in die basolaterale Membran. Na^+ , welches durch SGLTs in die Zellen gelangt, wird im Anschluss über Na^+/K^+ -Pumpen in die basolaterale Membran transportiert. In der Summe wird jeweils ein Na^+ für ein Glukosemolekül absorbiert. Ist dieser Transporter gehemmt, kommt es zu einer verminderten Rückresorption von Glukose und somit einer um ca. 50-60% verstärkten Sekretion von Glukose in den Urin. Dieser Mechanismus führt zu verminderten Plasmaglukose- und glykosylierten Hämoglobinniveaus in Patienten mit Diabetes mellitus. Ebenfalls führen sie zu Gewichtsreduktion und haben protektive Eigenschaften bei Nieren- und Herzinsuffizienz (Wright, 2021).

In einer Metaanalyse von 20 verschiedenen Studien mit einer Gesamtzahl von 63604 Patienten wurde die Wirkung von SGLT2-Inhibitoren in Bezug auf VHF untersucht. Die verwendeten Inhibitoren waren Dapagliflozin, Canagliflozin und Empagliflozin. Diesen Studien zufolge führte die Behandlung zu einer signifikanten Reduktion von VHF verglichen mit Kontrollgruppen (-18%) (Zheng et al., 2022). Experimentelle und klinische Studien haben bis zum heutigen Tag verschiedene Erklärungen für die kardioprotektiven Effekte von SGLT2-Inhibitoren erbracht. Beispielsweise führen sie durch die Verminderung der Blutglukose und des Körpergewichts zu einer Reduktion des Bluthochdrucks. (Ni et al., 2020). In Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 kann eine erhöhte Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers beobachtet werden, welche schließlich zu einer erhöhten Calciumkonzentration im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) führt. Dieser Mechanismus könnte jedoch ein erhöhtes Risiko für die Ausbildung von VHF durch mitochondriale Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers bedeuten (Lambert et al., 2015, Lytvyn et al., 2017). SGLT2-Inhibitoren unterdrücken außerdem den Austausch von Natrium und Wasserstoff, begünstigen die

Ausscheidung von Natrium und reduzieren kardiale intrazelluläre Natrium- und Calcium-Ionen. Diese Vorgänge vermindern myokardiale Hypertrophie und nachteilige Remodelingprozesse (Uthman et al., 2018, Verma et al., 2019). Darüber hinaus scheinen sie durch Reduktion von oxidativem Stress und der TGF- β -Produktion (*Transforming Growth Faktor β*) kardiale Fibrose zu mindern (Lee et al., 2017, Li et al., 2019). Des Weiteren kann die Ausbildung von epikardialen Fett zu lokalen Entzündungen führen und somit das Auftreten von VHF begünstigen. Hiermit zeigt sich ein weiterer Wirkmechanismus der SGLT2-Inhibitoren, da diese das Vorhandensein von epikardialen Fett reduzieren (Hatem et al., 2014). In einer Populationsstudie wurden rund 80000 Diabetespatienten mit SGLT2-Inhibitor-Therapie und DPP-4-Therapie miteinander verglichen. Hierbei konnte eine 17% Reduktion von neu auftretendem VHF durch SGLT2-Inhibitoren aufgezeigt werden (Chen et al., 2020). Trotz neuester Studien sind die lindernden Effekte von SGLT-2 Inhibitoren auf die Ausbildung und Manifestation von VHF noch unzureichend erforscht. Ihre bereits erwähnten lindernden Effekte auf oxidativen Stress und kardiale Fibrose machen sie zu einem vielversprechenden Kandidaten als mögliches Therapeutikum für VHF (Zheng et al., 2022). Studien in Nagern und Hunden konnten bereits erste Ergebnisse aufweisen (Li et al., 2019, Nishinarita et al., 2021, Tian et al., 2021, Sabe et al., 2023). Jedoch sind die genauen Mechanismen nicht ausreichend bekannt. Deshalb soll in dieser Arbeit der kardioprotektive Effekt von Dapagliflozin in einem VHF-Modell des diabetischen Schweins untersucht werden.

1.5. Elektrophysiologie des Herzens

Das elektrische Reizleitungssystem ist dafür geschaffen, eine angemessene Herzfrequenz und eine entsprechende Kontraktion in allen Herzregionen zu gewährleisten (Schram et al., 2002). Die Erregungsbildung erfolgt in sog. Schrittmacherzellen, die darauffolgende Weiterleitung gelangt über die Atrien zu den Ventrikeln. Der entstehende elektrische Impuls (das Aktionspotential (AP)) und die dadurch eingeleitete Kontraktion sind über die sog. elektromechanischen Kopplung eng miteinander verbunden. Die Entstehung des kardialen Aktionspotentials basiert auf der Aktivierung und Inaktivierung von Ionenkanälen. Sie leiten die depolarisierenden, nach innen gerichteten Na^+ und Ca^{2+} -Ströme, sowie die repolarisierenden, nach außen gerichteten K^+ -Ströme (Antzelevitch, 2000). Die hierbei entstehenden APs variieren physiologisch in den

unterschiedlichen Herzregionen (**Abb. 1**). Dies ist auf die Unterschiede in der Expression und Funktion der Ionenkanäle zurückzuführen (Nerbonne et al., 2003).

Damit eine Erregungsbildung erfolgen kann, müssen sich die Zellen des Myokards in einem Spannungsfeld von ca. -80mV , dem sog. Ruhemembranpotential befinden. Eine Besonderheit bilden hierbei die Schrittmacherzellen (engl. *pacemaker cells*). Sie besitzen besondere HCN-Kanäle (engl.: *hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide gated channels*), welche durch einwärtsgerichtete Kationenströme (I_f , *funny channels*) eine spontane Depolarisation auslösen können. Die elektrische Aktivität des Myokards wird in den soeben erwähnten Schrittmacherzellen des Sinusknotens initiiert und über die Atrien in den Atrioventrikularknoten (AV-Knoten) weitergeleitet. Nach einer kurzen Pause im AV-Knoten breitet sich die Erregung von den Purkinje-Fasern zum Apex des Herzens und somit zum Arbeitsmyokard der Ventrikel aus. In den Zellen der verschiedenen Herzregionen resultiert die Erregung in der Entwicklung des Aktionspotentials. Dieser schließt sich einer kurzen Entspannungsphase an, gefolgt von einer Refraktärperiode, bis der nächste Impuls erfolgt (**Abb. 1**).

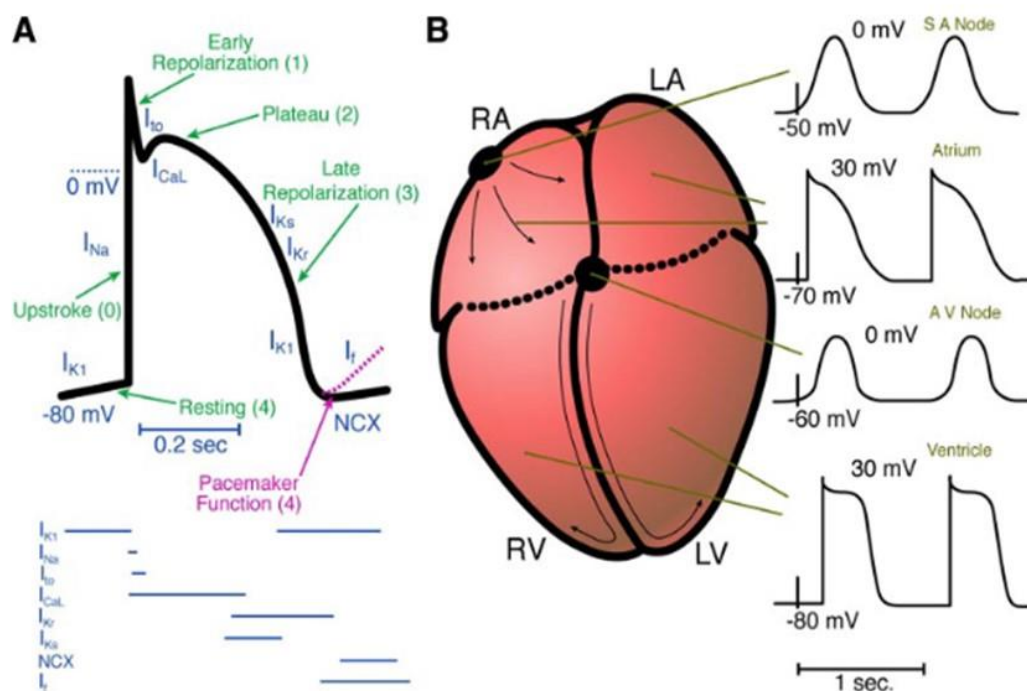


Abb. 1. Die kardiale elektrische Aktivität. A. Schematische Darstellung des Aktionspotentials B. links: Reizweiterleitung, Beginn des elektrischen Impulses im Sinusknoten (SA), Weiterleitung des Impulses zum AV-Knoten (AV) dieser ermöglicht die Reizübertragung von den Atrien in die Ventrikel, nach einer Ruhephase zur Füllung der Ventrikel bevor sie kontrahieren wird der Reiz über die Purkinje-Fasern weitergeleitet; rechts: Aktionspotentiale der Herzareale; Nattel et al., 2007.

Das Aktionspotential besteht aus verschiedenen Phasen:

Phase 0 des AP: In den Kardiomyozyten der Atrien und Ventrikel, sowie in den Purkinje-Fasern ist der Anstieg des Aktionspotential sehr rasch, was auf eine Aktivierung von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen (Nav-Kanäle) zurückzuführen ist (Fozzard, 2002). Durch diesen Vorgang gelangt Na^+ in das Zellinnere, wodurch sich der Spannungsgradient wieder in Richtung des Natriums verschiebt. In den Schrittmacherzellen des Sinus- und AV-Knotens ist diese Phase deutlich langsamer, da hier die Nav-Kanäle eine untergeordnete Rolle spielen.

Repolarisationsphase (Phase 1): Im Anschluss kommt es durch die Inaktivierung der Nav-Kanäle und der Aktivierung spannungsabhängiger K^+ -Kanäle (I_{to} , I_{f}) zur Repolarisation der Atrien und Ventrikel. Diese vorübergehende Repolarisierung (engl. notch), welcher in Purkinje- und Ventrikelzellen sehr prominent sein kann, beeinflusst die Höhe und Dauer des Plateaus des AP (Nerbonne et al., 2005).

Plateau-Phase (Phase 2): Hierbei kommt es zum Ca^{2+} -Einstrom durch Cav-Kanäle des L-Typs ($\text{I}_{\text{Ca,L}}$). Ebenfalls beginnt mit Einleitung der Repolarisation ein anfänglicher K^+ -Ausstrom (I_{Kr} , I_{Ks}) durch die nach innen gerichteten Rectifier-Kaliumkanäle. Der Einstrom von Ca^{2+} durch Cav-Kanäle des L-Typs ($\text{I}_{\text{Ca,L}}$) bildet den Haupttrigger für die Kontraktion und somit Systole des Myokards (Bers et al., 1999).

Repolarisationsphase (Phase 3): Die Repolarisation und somit die Beendigung des AP wird durch den K^+ -Ausstrom durch I_{Kr} und I_{Ks} und Reduktion des Ca^{2+} -Einstroms über $\text{I}_{\text{Ca,L}}$ gewährleistet. Hier erreicht die Membran wieder ihr Ruhemembranpotential (Phase 4) durch nach innen gerichtete Rectifier K^+ -Ströme (I_{K1}).

Im Gegensatz zu Nav und Cav scheint eine große Diversität unter den K^+ -Kanälen zu existieren, welche in den Atrien und Ventrikeln unterschiedlich exprimiert werden und somit in den Atrien eine besondere Rolle zu spielen scheinen (Nerbonne et al., 2005). Auch Clauss et al. bestätigen die übergeordnete Rolle der kardialen K^+ -Kanäle, welche einen Grund für die variable Morphologie des Aktionspotentials darstellen könnten (Clauss et al., 2019).

Veränderungen der Expression der Ionenkanäle, ihrer Zusammensetzung aus den verschiedenen Untereinheiten oder ihrer Aktivierungszustände können zu

Veränderungen des Aktionspotentials, der Refraktärperioden und/oder der Reizweiterleitung führen. Eine Prädisposition des Herzens für Herzrhythmusstörungen kann somit eine lebensbedrohliche Folge darstellen (Akar et al., 2000). Die dargestellten Auswirkungen der Veränderungen von Ionenkanälen auf das AP verdeutlichen die Bedeutung weiterer Forschung auf diesem Gebiet. Auch ist die Bedeutung der diversen K^+ -Kanäle in den verschiedenen Herzregionen und Spezies noch unklar. Da die elektrophysiologischen Eigenschaften des Schweineherzens große Übereinstimmungen mit dem Menschen aufweisen und sich das Aktionspotential in seiner Morphologie nicht wesentlich von der des Menschen unterscheidet (Clauss et al., 2019), erweist es sich als besonders adäquates Tiermodell für die Untersuchung elektrophysiologischer Fragestellungen.

1.6. Pathophysiologie von Vorhofflimmern

Die Pathophysiologie von VHF erweist sich als multifaktoriell und komplex (Nattel, 2002, Wakili et al., 2011). Elektrophysiologische Hauptmerkmale von VHF sind Ektopie und Reentry-Kreisläufe, welche als funktionelle Stellvertreter für Trigger und anfälliges Substrat gelten. Unterliegende Mechanismen hierfür sind Veränderungen in der Expression und Funktion von Ionenkanälen, veränderte Calciumhomöostase, verstärkte atriale Automatizität sowie Veränderungen der Gap Junctions. Auch Effekte, welche sich nachteilig auf die Atrien auswirken können, wie bspw. Dilatation, Fibrose oder Inflammation, bilden einen essenziellen Anteil. Diese Mechanismen werden als elektrisches und strukturelles Remodeling bezeichnet (**Abb. 2**).

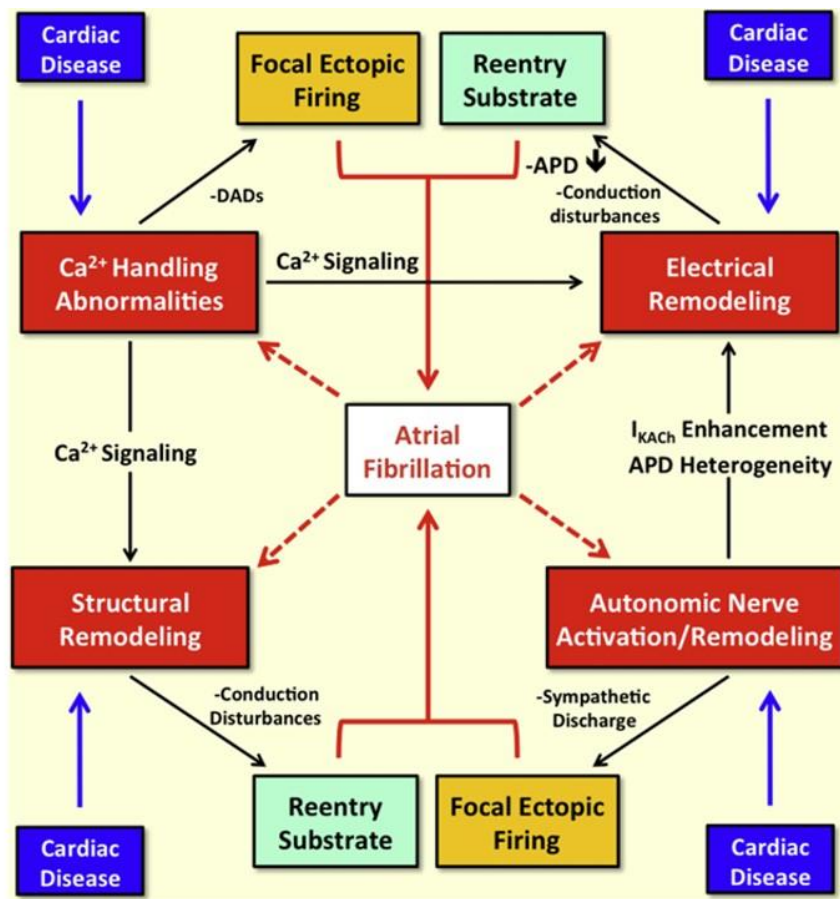


Abb. 2. Die Hauptkomponenten des atrialen Remodelings in Zusammenhang mit der Pathogenese des VHF; Nattel et al., 2014.

1.6.1. Ektopie

Die Hauptmechanismen für Ektopie sind zum einen verstärkte atriale Automatizität frühe (engl.: *Early afterdepolarization*, EADs) und verzögerte Nachdepolarisation (engl.: *Delayed afterdepolarization*, DADs). Wie bereits beschrieben erfolgen elektrische Impulse des Herzens unter physiologischen Bedingungen nach charakteristischen Spannungsveränderungen, gesteuert durch Ionenkanäle. Im gesunden Herzen ist der Sinusknoten verantwortlich für die Generierung des elektrischen Signals. Dennoch ist es möglich, dass Zellen außerhalb des Sinusknotens noch vor Eintreffen des physiologischen elektrischen Impulses das sog. Schwellenpotenzial erreichen, was zu einer ektopen Erregung und somit zu atrialer Tachykardie führen kann. Veränderungen der Calciumhomöostase können hierbei eine wichtige Rolle spielen, was bereits im Menschen und in Tiermodellen aufgezeigt wurde (Wakili et al., 2011). Verzögerte Nachdepolarisationen resultieren aus einem unphysiologischen Calciumausstrom aus dem SR. Physiologisch wird zelluläres Calcium durch die Ca²⁺-ATPase (SERCA) und Na⁺-Ca²⁺ Austauscher (NCX) während der Diastole entfernt, um eine ionische

Homöostase wiederherzustellen. Durch atriale Tachykardie akkumuliert Calcium in der Zelle aufgrund von gesteigertem $I_{Ca,L}$. Der Ca^{2+} -Überschuss führt bspw. zu einer Ca^{2+} -Übersteigerung des SR mit resultierender Dysfunktion des Ryanodin-Rezeptors, welcher den Ionenkanal für die Freisetzung von Calcium im SR darstellt. Diese Fehlregulation kann eine spontane Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR während der Diastole verursachen. Dies kann wiederum eine Aktivierung des NCX zur Folge haben, zu einem depolarisierenden Einwärtsstrom und folglich zu verzögerter Nachdepolarisation führen. Ein solcher Vorgang führt zu einer progressiven Depolarisation der Zelle und somit dem Zustand der Ektopie (Nattel et al., 2008, Clauss et al., 2015). Frühe Nachdepolarisationen treten auf, sofern die Dauer des Aktionspotentials stark verlängert ist, wie bspw. im Long-QT-Syndrom (Wakili et al., 2011, Voigt et al., 2012). In diesem Zusammenhang wird das Phänomen der heterogenen Repolarisation beschrieben. Im gesunden Myokard bewahrt eine homogen-organisierte Repolarisation das Herz vor dem Auftreten von Arrhythmien. Unter pathologischen Zuständen kann ein vulnerables Substrat aufgrund von Remodelingprozessen zu heterogenen elektrophysiologischen Leitungseigenschaften führen, die wiederum Arrhythmien verursachen können (Clauss et al., 2015) (**Abb. 2**).

1.6.2. Reentry

Die Voraussetzung für den Eintritt von Reentry-Kreisläufen (kreisende Erregungen) bilden im pathologisch veränderten Myokard einerseits eine verkürzte Refraktärzeit, eine Verlangsamung der Reizweiterleitung, als auch strukturelle Veränderungen wie bspw. atriale Fibrose. Diese Veränderungen stören die uniforme und homogene elektrische Leitung und bilden somit ein anatomisches Substrat für Reentry-Kreisläufe. Die physiologische Refraktärzeit der Kardiomyozyten verhindert den Eintritt von Reentry-Kreisläufen. Sofern die Refraktärzeit jedoch verkürzt ist, können Zellen zu einem früheren Zeitpunkt erregbar sein, was zu Ektopie und folglich zu Reentry führt. Auch eine herabgesetzte Leitungsgeschwindigkeit kann Reentry-Prozesse begünstigen, da hierdurch Zellen wieder erregbar sind, bevor der verlangsamte physiologische Impuls eintritt. Strukturelle Veränderungen des Atriums, wie bspw. Fibrose verlängern die Reizweiterleitung und bilden Hindernisse, welche die Ausbildung und Aufrechterhaltung von Reentry-Kreisläufen, und somit die Ausbildung von VHF nach der Hypothese des „AF begets AF“ begünstigen (Allessie et al., 2001b,

2001a, Clauss et al., 2015) (**Abb. 2**).

1.6.2.1. Strukturelles Remodeling

Wie bereits beschrieben stellt das strukturelle Remodeling einen wichtigen Faktor in der Ausbildung und Manifestation von VHF dar. Makroskopisch äußert es sich u.a. in einer Vergrößerung der Atrien und der Ausbildung von Fibrose. Beteiligt an diesem Prozess sind sowohl Kardiomyozyten, als auch andere Zellformen, welche bspw. eine wichtige Rolle in der Formation der Extrazellulären Matrix (ECM) einnehmen. (Anné et al., 2005, Nguyen et al., 2009, Chimenti et al., 2010, Schotten et al., 2011). Ihre zellulären Veränderungen äußern sich in Hypertrophie, dem Verlust von Sarkomeren, Änderungen in der Form der Mitochondrien und des SR, Akkumulation von Glykogen, sowie der veränderten Expression und Anordnung von Strukturproteinen (Frustaci et al., 1997, Röcken et al., 2002, Venteclef et al., 2015). Als ein Resultat des strukturellen Remodelings gilt die atriale Fibrose. Da an strukturellen Remodelingprozessen neben Kardiomyozyten auch ECM-regulierende Zellen beteiligt sind, kann es zu einem vermehrten Kollagen-Turnover kommen. Dieser begünstigt eine Akkumulation von Kollagen im Myokard, welche die strukturellen Eigenschaften der Vorhöfe verändern kann (Nattel, 2017). Auch Prozesse wie mechanischer Stress, die Aktivierung neurohormonaler Mechanismen, als auch Entzündungsprozesse tragen zu einem profibrotischen Geschehen bei (Sygitowicz et al., 2021). Dies kann ein großes Hindernis für die Interaktion der Muskelfasern bedeuten (Allessie et al., 2010), kann zu Störungen der Erregungsleitung führen und einen Auslöser für Reentry-Kreisläufe und VHF darstellen (Spach et al., 1994) (**Abb. 3**).

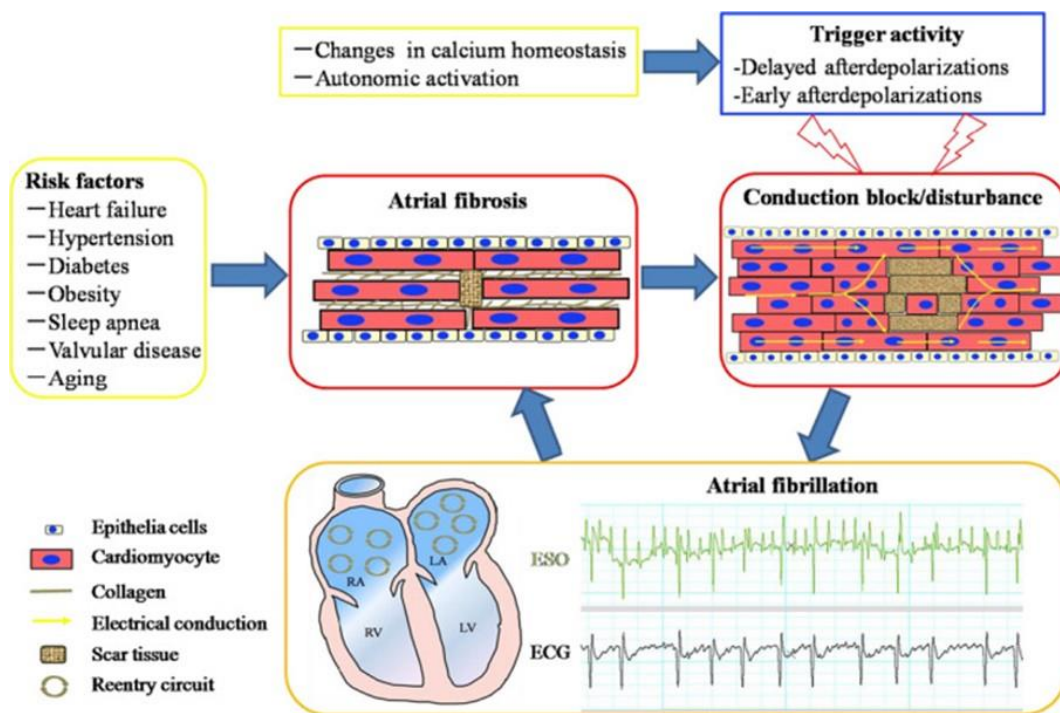


Abb. 3. Der Zusammenhang zwischen VHF und Fibrose. Ein sich bedingender Zyklus. Die Ausbildung und Aufrechterhaltung von VHF benötigt sowohl Trigger als auch Substrat. Strukturelles Remodeling v.a. atriale interstitielle Fibrose ist das arrhythmogene Hauptsubstrat. Die Ausbildung von VHF hält ebenfalls die Ausbildung von Fibrose aufrecht; Ma et al., 2021.

1.6.2.2. Fibrose

Der Begriff der kardialen Fibrose beschreibt eine erhöhte Ablagerung von Proteinen der ECM im Interstitium des Myokards. Der Prozess der Fibrose-Entstehung wird hauptsächlich bedingt durch die Aktivierung profibrotischer Signalwege, der Aktivierung kardialer Fibroblasten und der Synthese des fibrotischen Gewebes (Nattel et al., 2014). Fibrotische Prozesse können ebenfalls reparativer Natur sein und das Herzgewebe bspw. nach einer Verletzung ersetzen. Im Folgenden werden die Formen der Fibrose aufgeführt, wobei sich diese Arbeit mit der interstitiellen Fibrose befasst.

Fibrose kann in zwei verschiedene Formen eingeteilt werden, der reparativen Fibrose und der interstitiellen Fibrose:

- 1) Reporative Fibrose bezeichnet den Austausch von nekrotischen Myokardzellen durch fibrotisches Gewebe
- 2) Interstitielle Fibrose kann unterteilt werden in:
 - a. Reaktive Fibrose, welche Umbauprozesse der Extrazellulären Matrix im Interstitium oder perivaskulären Raum vornimmt, ohne einem Austausch von beschädigtem Gewebe

- b. Infiltrative interstitielle Fibrose, welche einen Austausch von Glykosphingolipiden oder nichtlöslichen Proteinen im interstitiellen Raum vornimmt, wie es bei der Amyloidose zu sehen ist

Beide Formen der Fibrose können nebeneinander koexistieren (Sagris et al., 2021).

1.6.2.2.1. Profibrotische Signalwege

Profibrotische Signalwege bilden ein komplexes interaktives Zusammenspiel verschiedener Signalwegsysteme (Weber et al., 2013, Travers et al., 2016). Die wichtigsten profibrotischen Rezeptoren bilden hierbei der *Connective tissue growth factor* (CTGF), Angiotensin II und der *Transforming growth factor β* (TGF- β). Die meisten Signalwege verursachen Fibrose durch die Phosphorylierung (Aktivierung) von Proteinkinasen. Hierdurch wird die Expression von ECM-Proteinen (bspw. Fibronektin und Prokollagen), Enzymen der Kollagensynthese und Signalmolekülen, welche positive Feedback-Mechanismen auf fibrotische Prozesse haben, verstärkt (Youn et al., 2013). Außerdem können sich profibrotische Signalwege untereinander begünstigen, wie bspw. CTGF durch den TGF- β -Signalweg hochreguliert wird (Chen et al., 2017). Auch aktivierte Fibroblasten synthetisieren ihrerseits CTGF, TGF- β und einige weitere profibrotische Mediatoren. Auch Zytokine, welche durch Entzündungsprozesse freigesetzt werden, gelten als sehr effektive Aktivatoren und sind an der Freisetzung profibrotischer Moleküle beteiligt, was ebenfalls für das Vorhandensein von mechanischen Stressstimuli gilt (Carver et al., 2013).

1.6.2.2.2. ECM-Proteine

Die Produktion des fibrösen Gewebes erfolgt nach einer komplexen Abfolge. Die Kollagensynthese beginnt mit der Synthese des Kollagen-Vorläufers Prokollagen im ER. Prokollagen ist zusammengesetzt aus einer Verkettung verschiedener molekularer Strukturen. Prokollagen wird von den Zellen in den extrazellulären Raum abgegeben, wobei das reife Kollagen durch enzymatische Abspaltungen entsteht. Reife Kollagen-Moleküle (welche zu 80-90% aus Kollagen Typ I bestehen) schließen sich spontan (engl. *self-assembly*) zu Ketten zusammen. Das Remodeling der ECM wird durch MMPs (Matrix-Metalloproteasen) und Inhibitoren von MMPs (TIMPs) reguliert. Fibronektin ist ein Protein, welches unter profibrotischen Stimuli schnell produziert wird. Da es die Fähigkeit besitzt, andere Moleküle wie Kollagen, Integrin, Proteoglykane und anderen ECM-Moleküle an

sich zu binden, und den Zusammenschluss von Kollagen Typ I und III vermittelt, gilt es als übergeordnetes Protein in der ECM-Zusammensetzung. Obwohl viele der ECM-Proteine bereits in Studien zu ventrikulären Verletzungen und entsprechenden Remodelingprozessen erforscht wurden (Halper et al., 2014), ist immer noch sehr wenig über ihre Rolle in atrialer Fibrose bekannt (Nattel, 2017). Somit erweist es sich als wichtiger Forschungsaspekt, ihre Expression und Funktion in den Atrien zu untersuchen.

1.6.2.2.3. Die Rolle der Fibroblasten und ihre Differenzierung zu Myofibroblasten

Verschiedene Zelltypen wie bspw. Kardiomyozyten, Endothelzellen, Perizyten, Makrophagen, Lymphozyten und Mastzellen sind an fibrotischen Prozessen beteiligt (Ma et al., 2021). Unter ihnen zeigt sich außerdem die Gruppe der Fibroblasten als einer der bedeutendsten Effektoren in der Ausbildung kardialer Fibrose (Jiang et al., 2021). Fibroblasten sind kleine spindelförmige Zellen mesenchymaler Herkunft mit einem ungefähren Anteil von 10-15% aller Herzwegszellen. Sie sind metabolisch aktive Zellen, da sie Synthese und Umbau der ECM regulieren und somit die architektonische Unversehrtheit des Herzwegszes bewahren (Sagris et al., 2021). Unter physiologischen Umständen sind Fibroblasten an der Funktionsfähigkeit des Myokards beteiligt. Durch die Anordnung eines dreidimensionalen Zellgerüsts wird einerseits die mechanische Funktionalität sichergestellt, als auch die Generierung eines erregbaren Substrates, welches zu einer kontinuierlichen und schnellen elektrischen Aktivierung befähigt sein muss (Spencer et al., 2017). Wenn Fibroblasten durch profibrotische Stimuli aktiviert werden, können sie zu einem sekretorischen Phänotyp, den sog. Myofibroblasten differenzieren, welche die Expression von ECM-Proteinen verstärken und somit die Ausbildung von Fibrose begünstigen (**Abb. 4**).

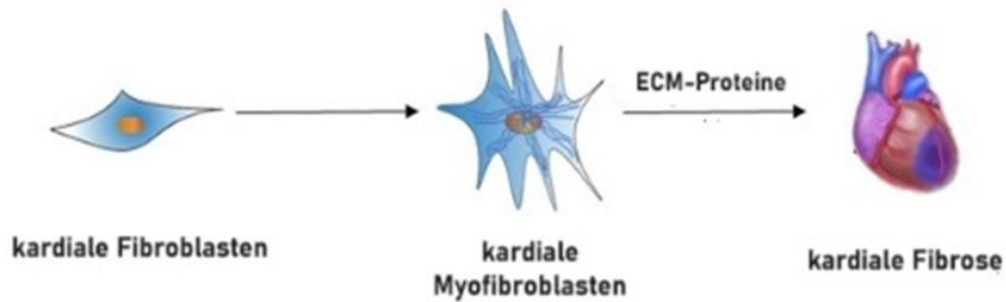


Abb. 4. Vom Fibroblasten zur Fibrose: Kardiale Fibroblasten differenzieren zu Myofibroblasten, welche eine Überproduktion der ECM-Proteine einleiten und zu Fibrose führen; modifiziert nach Jiang et al., 2021.

Neben einer gesteigerten Proliferation der Fibroblasten mit anschließender Differenzierung zu Myofibroblasten, kommt es ebenfalls zu einer verstärkten neurohormonalen Aktivierung und der Aktivierung verschiedener Signalkaskaden, welche gemeinsam eine ECM-Akkumulation begünstigen. Dieser Zusammenhang wurde bereits bei den profibrotischen Signalwegen, als auch bei den ECM-Proteinen angesprochen und verdeutlicht die komplexe Interaktion der verschiedenen profibrotischen Mechanismen miteinander. Auch Myofibroblasten sezernieren Zytokine wie bspw. TGF- β und TNF- α . Die Zytokinausschüttung wiederum stimuliert die fortwährende Differenzierung der Fibroblasten in neue Myofibroblasten, wodurch ein positiver Feedback-Mechanismus des fibrotischen Signalwegs und der damit verbundenen Akkumulation von ECM ausgelöst wird (Pellman et al., 2016).

Eine Begünstigung von Reentry-Kreisläufen wird ebenfalls durch die Ausschüttung der Zytokine stimuliert, da diese direkt mit den Kardiomyozyten in Verbindung treten und somit zu einer Verlangsamung der Reizweiterleitung führen können. Kardiale Fibroblasten produzieren außerdem verschiedene Ionenkanäle, wie bspw. spannungsabhängige K⁺-Kanäle, sowie nicht-selektive Kationenkanäle der *transient receptor potential* (TRP)-Familie, welche die Funktion der Fibroblasten kontrollieren. Diese können einen Ca²⁺-Eintritt hervorrufen, welcher die Differenzierung weiterer Fibroblasten zu Myofibroblasten mit anschließender Synthese von ECM-Proteinen fortschreiten lässt (Ma et al., 2021). Fibroblasten und Kardiomyozyten sind ebenfalls fähig miteinander elektrische Verbindungen (engl.: *electric junctions*) einzugehen. Der Grad der Interaktion, sowie seine Bedeutung hängt von der Anzahl der miteinander verbundenen Fibroblasten mit den Kardiomyozyten, dem Grad der Kopplung und der relativen Größe der Zellen zueinander ab. Sofern diese Kopplung stark genug ist, kann diese die Depolarisation

(Phase 4) verstärken und ektope Impulse verursachen (Yue et al., 2011).

1.6.2.3. Faktoren welche die Differenzierung von kardialen Fibroblasten zu Myofibroblasten begünstigen

Erwiesenermaßen gibt es verschiedene Faktoren, welche unabhängig die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten induzieren. Mechanischer Stress, Ischämie, Entzündung, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und hochfrequente elektrische Aktivität bilden hierbei die Haupttrigger (Yong et al., 2015) (**Abb. 5**). Die Differenzierung wird u.a. ebenfalls durch eine Vielzahl von Zytokinen, Chemokinen, neurohormonalen Faktoren und aktiven Peptiden getriggert (**Abb. 5**). Diese chemischen Signale beinhalten profibrotische (bspw. TGF- β) und proinflammatorische Zytokine (bspw. TNF- α , IL-1 β , IL-6), sowie Angiotensin II (Ang II) und Endothelin-1 (ET-1). Die genauen Mechanismen der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollständig bekannt, sie gilt jedoch als einer der Hauptkomponenten in der Entstehung kardialer Fibrose (Jiang et al., 2021).

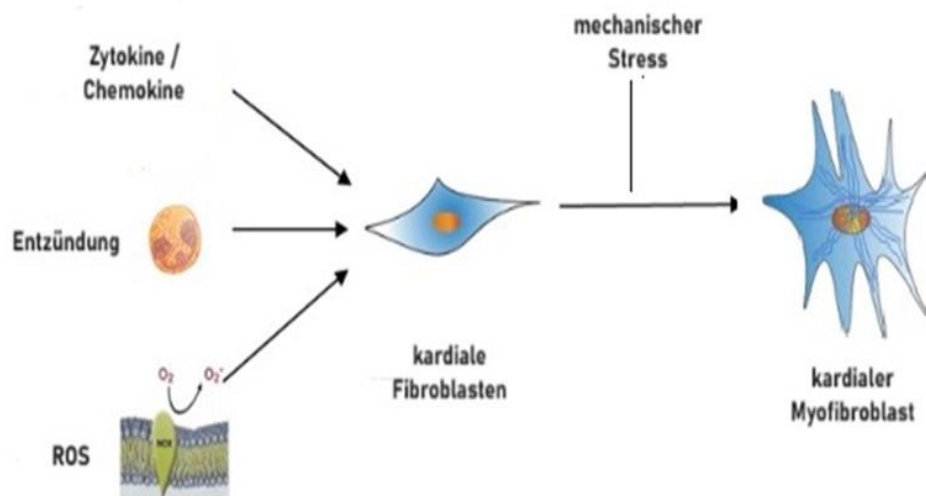


Abb. 5. Aktivierende Faktoren der Differenzierung vom Fibroblasten zu Myofibroblasten; modifiziert nach Jiang et al., 2021.

1.6.2.3.1. Das Yes-assoziierte Protein

Neuen Studien zufolge erweist sich auch das Yes-assoziierte Protein (YAP) als wichtiger Faktor im pathologischen ECM-Remodeling von Herzerkrankungen. Der Hippo-Signalweg, welcher die Lokalisation von YAP reguliert, ist essenziell an der Aktivierung kardialer Fibroblasten beteiligt. Im Gegensatz zu anderen Signalwegen führt seine Inaktivierung zur Aktivierung profibrotischer Mechanismen (**Abb. 6**).

Im physiologischen Zustand phosphoryliert der Hippo-Signalweg das YAP, was seinen Eintritt in den Nukleus verhindert und somit kardiale Fibroblasten in ihrem physiologischen Zustand erhält. Durch pathologische Veränderungen wie bspw. Diabetes mellitus, Veränderung der Zellmembranen oder inflammatorische Prozesse kann diese Signalkaskade gestört werden (Xiao et al., 2018, Xiao et al., 2019).

Der Hippo-Signalweg wurde zuerst in *Drosophila melanogaster* entdeckt und als ein bedeutender Mediator für Zellproliferation, Gewebe- und Organgröße identifiziert (Xu et al., 1995, Harvey et al., 2003). Der Signalweg beinhaltet die Hippokinase, welche ortholog im Säugetier als MST1/2 benannt wird. MST1/2 verbindet sich im aktivierten Zustand mit dem Salvador-Komplex, was eine Phosphorylierung und somit die Aktivierung der LATS 1/2-Kinase erlaubt. LATS 1/2 wiederum phosphoryliert im Anschluss die Transkriptions-Cofaktoren YAP und TAZ und verhindert so ihre Translokation in den Nukleus, was eine Interaktion mit der TEA-Familie (TEAD1-4) unterbindet. Die Inaktivierung der Kinasen MST1/2 oder LATS 1/2 erlaubt es YAP in seinem nicht-phosphorylierten Zustand zu verbleiben und somit eine Translokation in den Nukleus durchzuführen. Hier kann es mit den TEAD-Faktoren interagieren und die Expression von proliferativen Genen begünstigen (Liu et al., 2019). Auch Veränderungen der Zellform und/oder Zellstabilität kann YAP über Mechanotransduktion aktivieren. Dies stellt ein kritisches Phänomen in der Organogenese, Gewebshomöostase und Regeneration dar, da durch physikalischen Einsatz der ECM zellspezifische Genexpressionen aktiviert werden können (Panciera et al., 2017).

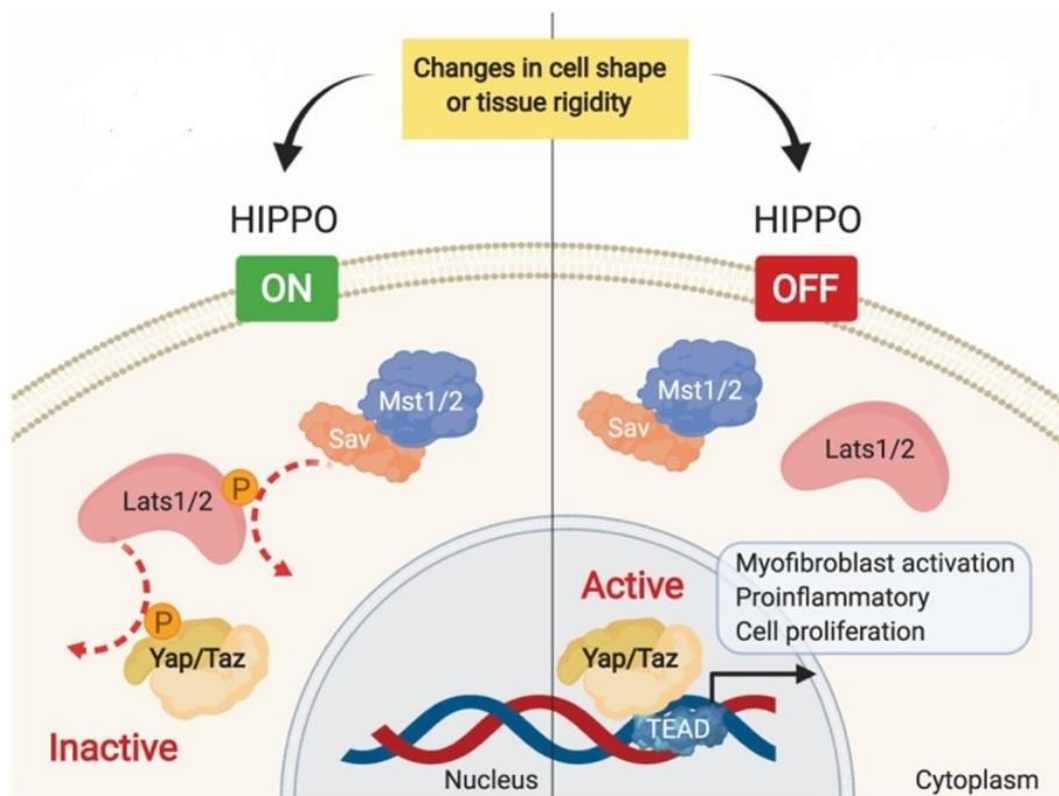


Abb. 6. Der Hippo-Signalweg. Links: der aktive Hippo-Signalweg unterbindet die Translokation von YAP in den Nukleus. **Rechts:** der inaktive Hippo-Signalweg führt zu einer Translokation von YAP in den Nukleus und ermöglicht einer Interaktion mit TEAD. Es kommt zur Regulation von Genen welche an der Bildung von Myofibroblasten, ECM-Proteinen und Entzündungssignalen beteiligt sind; modifiziert nach Johansen et al., 2019.

YAP fördert profibrotische Prozesse durch verschiedene Mechanismen. Es induziert einerseits die Differenzierung von kardialen Fibroblasten zu kardialen Myofibroblasten (Francisco et al., 2021, Landry et al., 2021). Dies kann bspw. durch Regulation von Interleukinen (IL-33) oder durch Interaktion mit dem MRTF-A (engl.: *myocardin-related transcription factor A*) verursacht werden (Francisco et al., 2020, Mia et al., 2021). Darüber hinaus interagiert das YAP mit anderen Signalwegen, wie bspw. TGF- β , was ebenfalls eine Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten induziert (Francisco et al., 2021, Landry et al., 2021). *In vitro*-Studien zeigten, dass eine Blockierung von YAP (bspw. durch Verteporfin) die durch TGF- β induzierte Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, sowie die ECM-Produktion (Kollagen und Fibronektin) aufhob (Mia et al., 2022a). Dies beschreibt, dass YAP ebenfalls die Produktion der ECM-Proteine verstärkt. In einem Mausmodell wurde aufgezeigt, dass eine Aktivierung von YAP durch Angiotensin II in kardialen Fibroblasten eine signifikante Steigerung der Expression von *Col1a1* (Kollagen), *Tgf- β 1*, *Ctgf* und *α -sma* bedingt.

In derselben Studie wurde gezeigt, dass ein Knockdown von *YAP* die Expression dieser Gene signifikant reduziert (Francisco et al., 2021). Eine Inhibition von *YAP* in kardialen Fibroblasten kann Myokardfibrose vermindern und zu einer Verbesserung der Herzfunktion beitragen, was auf eine reduzierte Expression von *Ctgf* und Fibronektin (*Fn1*) zurückzuführen sein könnte (Hu et al., 2021). Francisco et al. beschrieben ebenfalls, dass eine Überexpression von *YAP* mittels Adenovirus die Expression von proinflammatorischen Genen (bspw. *Ccl2*) und die Kollagenanreicherung steigerten (Francisco et al., 2021).

In Kardiomyozyten hingegen wurde in Mäusen und Schweinen beobachtet, dass eine verstärkte Expression des *YAP* kardioprotektive Effekte auf das Myokard aufzeigt. Eine Überexpression von *YAP* in Kardiomyozyten erwies in Myokardinfarktmodellen eine gesteigerte Proliferation der Kardiomyozyten, reduzierte Infarktgröße und eine Reduktion von Fibrose (Lin et al., 2014, Hara et al., 2018, Fernández-Ruiz, 2021).

Des Weiteren haben Forschungen ergeben, dass *YAP* ebenfalls eine bedeutende Rolle bei Diabetes mellitus spielen könnte. Im Herzen konnte in einem diabetischen Rattenmodell aufgezeigt werden, dass eine *YAP*-Hemmung die Proteinexpression von *FN1* und *CTGF* in kardialen Fibroblasten signifikant reduzierte. Auch eine Reduktion interstitieller Fibrose wurde durch Hemmung des *YAP* erzielt, wohingegen eine Aktivierung des *YAP* zu verstärkter Expression von *Col1a1*, *Col3a1* und *Pai-1* führte (Hu et al., 2021). In einem Rattenmodell der diabetischen Kardiomyopathie konnte festgestellt werden, dass eine Ausschaltung des *YAP* in Fibroblasten die Proteinexpression von *CTGF*, *FN1* und *SMAD3* signifikant verminderte (Yu et al., 2021). In der diabetischen Niere konnte eine verstärkte Expression des *Yap* und zwei seiner Zielgene, *Ctgf* und *Areg*, in Mäusen beobachtet werden (Chen et al., 2016).

Das *YAP* könnte aufgrund seiner entscheidenden Rolle in profibrotischen Prozessen des Herzens, sowie in profibrotischen Prozessen diabetischer Erkrankungen ein potenzielles therapeutisches Ziel darstellen. Bislang wurde der Zusammenhang von profibrotischen Mechanismen unter einem diabetischen Milieu nur in Nagermodellen dargestellt, was aufgrund von anatomischen, elektrophysiologischen und metabolischen Unterschieden zum Menschen translationale Limitationen aufweist. Ebenfalls fehlt es an Einblicken und Zusammenhängen zwischen profibrotischen und proarrhythmischen Effekten des

YAP, welche in dieser Arbeit untersucht werden sollten.

2. Diabetes mellitus

Der Begriff *Diabetes mellitus* ist zusammengesetzt aus dem griechischen Wort *diabetes* für durchfließen und dem lateinischen Wort *mellitus* für süß. Historisch betrachtet entdeckten bereits die Griechen und Ägypter die süße Natur des Urins während einer Diabetes mellitus Erkrankung, woraus sich die heutige Namensgebung entwickelte.

Diabetes mellitus ist eine metabolische Erkrankung, welche einen erhöhten Blutglukosespiegel zur Folge hat. Sie kann in verschiedenen Formen auftreten und unterscheidet sich in folgenden Ausprägungsformen:

- I. Diabetes mellitus Typ 1: autoimmune Erkrankung, welche im Verlauf zu einem absoluten Insulinmangel führt und somit insulinabhängig ist (5-10%).
- II. Diabetes mellitus Typ 2: unzureichende Insulinsekretion der pankreatischen Inselzellen, Insulinresistenz des Gewebes sowie ungenügende kompensatorische Sekretionsantwort (90-95%).
- III. Gestationsdiabetes/Schwangerschaftsdiabetes: Diabetes mellitus, welcher sich während einer Schwangerschaft ausbilden kann
- IV. Andere Arten von Diabetes mellitus: Hierzu zählen monogenetische Defekte der Betazellfunktion wie der im Jugendalter auftretende neonatale Diabetes (*Maturity onset diabetes of the young* (MODY)), oder der *Mutant Insuline-gene diabetes of youth* (MIDY), Diabetes mellitus hervorgerufen durch Endokrinopathien oder Erkrankungen des exokrinen Pankreas, Diabetes mellitus induziert durch Medikamente, chemische Substanzen oder Infektionen (~1%)(Association, 2018)

2.1. Epidemiologie von Diabetes mellitus

Die weltweite Prävalenz von Diabetes mellitus hat sich in den vergangenen Jahrzehnten drastisch erhöht (Ogurtsova et al., 2017). Global gilt sie als eine der wichtigsten und herausforderndsten Gesundheitsprobleme für die menschliche Population des heutigen Zeitalters. Der zu verzeichnende Anstieg in den meisten Teilen der Welt manifestiert sich parallel zur ökonomischen Entwicklung, welche zur Urbanisierung und der Adaption eines modernen Lebensstils führt (Blas et al., 2010). Die geschätzten Zahlen der an Diabetes mellitus erkrankten Menschen zwischen 20-79 Jahren beliefen sich im Jahr 2019 auf ca. 463 Millionen. Ein

Anstieg auf etwa 578 Millionen Betroffene wird für das Jahr 2030 erwartet (Banday et al., 2020). Im Jahr 2019 wurde die Prävalenz unter Männern und Frauen auf 9,6% und 9 % geschätzt (Saeedi et al., 2019). Nahezu 4,2 Millionen Menschen im Alter zwischen 20-99 Jahren starben im Jahr 2019 auf Grund von Diabetes mellitus und den mit der Erkrankung assoziierten Komplikationen (Banday et al., 2020).

In der Pressemitteilung des deutschen Gesundheitsberichts zum Weltdiabetestag wurde im November 2021 bestätigt, dass die aktuelle Zahl der Menschen mit dokumentiertem Typ-2 Diabetes in Deutschland auf 8,5 Millionen Menschen gestiegen sei.

2.2. Risikofaktoren für Diabetes mellitus

Neben dem genetischen Aspekt, welcher wie bereits erwähnt, sowohl in Patienten von T1DM und T2DM eine wichtige Rolle spielt, sind auch eine Vielzahl verschiedener Risikofaktoren für eine Ausprägung der Erkrankung beschrieben (Ceriello et al., 2021).

2.2.1. Genetik

Sowohl Diabetes Typ 1 als auch Diabetes Typ 2 sind polygenetische Erkrankungen, d.h. eine Vielzahl von Genveränderungen und -varianten tragen zur Erkrankung bei. In T1DM wird ein Erkrankungsrisiko aufgrund von Vererbung der Eltern auf die Kinder auf ca. 5% geschätzt. Das Risiko innerhalb des Lebens an Diabetes Typ 2 zu erkranken, sofern ein Elternteil betroffen ist, wird auf etwa 40% geschätzt. (Skyler et al., 2017). Gene und ihre Variationsformen innerhalb des *human major histocompatibility complex* (MHC), eingeschlossen dem Humanen Leukozyten Antigen (HLA), sind verantwortlich für etwa die Hälfte des genetischen Risikos für T1DM. Weitere Risikofaktoren wurden identifiziert als Veränderungen in den *INS*-, *CTLA4*-, *IL2RA*-, und *PTPN22*-Genen (Rich et al., 2018).

2.2.2. Umwelteinflüsse

Viele Umwelteinflüsse interagieren mit genetischen Faktoren, welche dadurch mit dem Auftreten und der Manifestation des autoimmunologischen Geschehens von T1DM in Verbindung gebracht werden können. Infektion (bspw. mit Enteroviren (Schneider et al., 2014)), oder ein verändertes enterales Mikrobiom stellen mögliche Ursachen einer Erkrankung mit T1DM dar (Giongo et al., 2011). Ernährungsbedingte Ursachen können auf eine verfrühte Aufnahme von Getreiden

oder Gluten zurückzuführen sein, da diese die Autoimmunität der β -Zellen beeinflussen können (Ziegler et al., 2003). Auch die Aufnahme von toxischen Stoffen (bspw. Nirtosamine) wird mit der Genese von T1DM in Verbindung gebracht (Skyler et al., 2017). Bei T2DM gelten v.a. Übergewicht und körperliche Inaktivität, Stress und Depression, als auch kardiovaskuläre Erkrankungen, Schlafapnoe und Hypertension als erhebliche Risikofaktoren (Asuzu et al., 2017, Skyler et al., 2017, ANONYMUS, 2022).

2.3. Klinik von Diabetes mellitus

Im T1DM gilt die Hypoglykämie als direkte Folge der Erkrankung. Äußern kann sich diese in Heißhunger, Kaltschweißigkeit, Zittern und Herzrasen, bis hin zu neuroglykopenischen Symptomen wie Konzentrationsschwäche, Kopfschmerzen und Müdigkeit. Sofern einer Hypoglykämie nicht entgegengewirkt wird, kann dies zu einem Glukosemangel im Gehirn führen, was zu Krampfanfällen, Bewusstlosigkeit und der Ausprägung eines ketoazidotischen Komas führen kann. Im T2DM äußert sich die Hyperglykämie durch Polyurie und Polydypsie, teilweise gesteigertem Appetit und verschwommener Sicht. Eine anhaltende Hyperglykämie kann zur Ausbildung des lebensbedrohlichen hyperosmolaren Komas führen. Im Verlauf von Jahren kommt es bei Patienten mit Diabetes mellitus zu einer progredienten Organschädigung. Diese kann sich bspw. in Mikro- und Makroangiopathien äußern, welche im Verlauf zur Ausbildung von Atherosklerose und folglich einer Minderdurchblutung der Organe führt. Die Schädigung der Organe kann sich vielseitig manifestieren, bspw. kommt es zu Nephropathien bis zu akutem Nierenversagen. Periphere Neuropathien, welche die Schmerzwahrnehmung vermindern, können das Verletzungsrisiko steigern. Dies kann das Risiko für Infektionen mit anschließender Gangrän- und/oder Nekroseentwicklung erhöhen und zu Amputationen führen. Ebenfalls begünstigt werden hierdurch Herz-Kreislauferkrankungen wie VHF, Schlaganfälle, Hypertension und Herzinfarkte (Association, 2013).

2.4. Diagnostik von Diabetes mellitus

Den Standards der American Diabetes Association (ADA) zufolge wird eine Diagnostik basierend auf einer Glukosebestimmung des Blutplasmas mittels verschiedener Tests empfohlen (Association, 2017):

- I. Bestimmung des Nüchternblutglukosespiegels, wobei der Patient ca.

- 8 Stunden ohne Nahrungsaufnahme verbracht haben sollte. Ein Wert von ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/l) und mehr gilt als positives Ergebnis
- II. Oraler Blutglukosetoleranztest (OGTT), hierbei werden 75g in Wasser gelöste Glukose oral aufgenommen und der Blutglukosewert 2 Stunden im Anschluss gemessen. Ein Wert von ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) gilt hierbei als positives Testergebnis
 - III. Bestimmung des glykierten Hämoglobins, dem sogenannten HbA1c-Wert. Dieser liegt bei gesunden Menschen unter einem Wert von 5,7%, bei Prädiabetikern zwischen 5,7-6,4% (39-48 mmol/mol) und bei Diabetes mellitus Erkrankten bei über 6,5% (≥ 48 mmol/mol)

2.5. Therapie des Diabetes mellitus

Aufgrund der unterschiedlichen Genese der Diabetestypen erfolgt auch die Behandlung auf unterschiedliche Weise. Bei Diabetes mellitus Typ 1 handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, bei der es zu einem absoluten Insulinmangel kommt. Somit besteht die Notwendigkeit einer lebenslangen Insulintherapie. Die Insulingabe kann sowohl auf einer intensivierten konventionellen Insulintherapie basieren, oder über ein Insulinpumpensystem erfolgen. Bei der konventionellen Insulintherapie erfolgt die Verabreichung mittels Insulinspritze in das Unterhautfettgewebe, welches im Regelfall aus einer Kombination von kurzwirkendem Insulin und langwirkenden Basalinsulin besteht. Diese Therapie ähnelt bei richtiger Anwendung der Insulinsekretion des Körpers und ermöglicht es dem Patienten, eine vergleichsweise flexible Lebensführung zu gestalten. Auch die Behandlung mittels Insulinpumpe ist eine verbreitete Therapieform, wodurch kleine Mengen an Kurzzeitinsulin in das Unterhautfettgewebe appliziert werden. Innovative Therapieansätze wie die Regulierung von Zytokinen und T-Zellen, die β -Zell-Antigen Vakzine, hormonelle Ansätze, sowie medikamentöse Behandlungen durch Metformin und SGLT2-Hemmer werden zunehmend in Betracht gezogen (Von Scholten et al., 2021). Bei T2DM besteht die Behandlung in einer Veränderung des Lebensstils durch gesunde Diät, ggf. verbunden mit Gewichtsreduktion, Stressreduktion und Bewegung. Auch eine medikamentöse Behandlung mittels oraler Antidiabetika, dem Mittel der Wahl Metformin, Glukagon-Rezeptor-Antagonisten, Sulfonylharnstoffen, SGLT2-Inhibitoren und/oder Insulin stellt eine zusätzliche Therapieform dar. Je nach Alter, Schweregrad, Vorerkrankungen und Lebensstil sollte anhand eines Stufenplans die

geeignete Therapie für den jeweiligen Patienten etabliert und diese gegebenenfalls bei Progression der Erkrankung angepasst werden (Chatterjee et al., 2017).

2.5.1. SGLT-2 Inhibitoren als Therapieform für Diabetes mellitus

SGLT-2 Inhibitoren erhöhen die Exkretion von Glukose über den Urin, indem sie den SGLT2-Transporter im proximalen Tubulus der Niere hemmen (Wilding, 2014). Einer Meta-Studie zufolge konnte ihre Effektivität anhand einer Reduktion des HbA1c um 0,7% bestätigt werden (Vasilakou et al., 2013). Durch einen Mechanismus von Glukosurie und Gewichtsreduktion durch Kalorienverlust von etwa 320 kcal/Tag über den Urin konnte eine deutliche Gewichtsreduktion erzielt werden (Nauck et al., 2011). Dieser Effekt wurde langfristig beobachtet (78 Wochen) und mit Placebo-Präparaten verglichen (Rosenstock et al., 2015). SGLT-2-Inhibitoren verursachen keine Hypoglykämie, vorausgesetzt sie werden nicht mit Insulin oder Sulfonylharnstoffen kombiniert. Die Hauptnebenwirkung bilden Infektionen des Urogenitaltrakts, welche häufiger bei Frauen auftreten (Tahrani et al., 2013).

2.6. Pathophysiologie des Diabetes mellitus

2.6.1. Diabetes Typ 1

T1DM ist eine chronisch endokrine Erkrankung, welche von einer autoimmunen Zerstörung insulinproduzierender Zellen des Pankreas ausgeht und zu einem absoluten Insulinmangel führt (Atkinson et al., 2014). Die Genese ist auf einen heterogenen Prozess zurückzuführen, welcher durch das Auftreten von Inselzell-spezifischen Antikörpern gegen Strukturen der β -Zellen entsteht. Die zwei häufigsten Autoantikörper, welche mit der fortwährenden Zerstörung der β -Zellen identifiziert werden sind gerichtet gegen Insulin (IAA) und Glutamat-Decarboxylase (GAD) (Sosenko, 2016). Das Auftreten der Symptomatik erfordert einen Untergang von 40-70% der β -Zellmasse. Jedoch variieren die Zahlen sehr stark zwischen Kindern und Erwachsenen (Bauer et al., 2021). Die Rate der β -Zellzerstörung ist sehr variabel und kann bei Kindern und Jugendlichen sehr schnell sein, bei Erwachsenen moderat. Adulte Patienten können Residuen an β -Zellen beibehalten, welche sie über Jahre vor kritischer klinischer Symptomatik bewahrt. Immun-medierter Diabetes mellitus manifestiert sich meist im Kindes- oder Jugendalter, kann jedoch auch zu jedem Zeitpunkt bei Adulten auftreten (Association, 2013).

2.6.2. Diabetes Typ 2

T2DM ist im Wesentlichen auf zwei pathologische Mechanismen zurückzuführen (Weyer et al., 1999). Die Insulinresistenz beschreibt eine reduzierte Antwort des peripheren Gewebes auf die physiologische Insulinkonzentration. Diese Resistenz wird im Anfangsstadium durch eine gesteigerte Insulinproduktion in den β -Zellen des Pankreas kompensiert. Durch die kompensatorische Produktion und Sekretion von Insulin kommt es in den β -Zellen des Pankreas zu einer Dysfunktion. Durch Störungen in der Inselzellorganisation wird eine optimale Zell zu Zell Kommunikation verhindert, was im Anschluss zur Produktionseinschränkung des Hormons führt (Christensen et al., 2019). Folge der fortwährenden Insulinresistenz und der eingeschränkten Insulinsekretion ist der sog. relative Insulinmangel, welcher zur Hyperglykämie und der Manifestation der Erkrankung führt (Galicia-Garcia et al., 2020). Defekte in der Synthese von Insulin selbst oder seinen Vorläufern, sowie Störungen der Sekretionsmechanismen können gleichermaßen in eine ungenügende Freisetzung von Insulin resultieren. So kann bspw. eine reduzierte Expression des GLUT2- Glukosetransporters herabregulierende Prozesse verändern (Hoang Do et al., 2015), während Fehlfaltungen des Proinsulins ebenfalls mit einer eingeschränkten Insulinproduktion in Verbindung gebracht werden können (Liu et al., 2018)

3. Tiermodelle

3.1. Tiermodelle des VHF

Bis zum heutigen Tag wurden verschiedene Tiermodelle zum Verständnis der Pathogenese des VHF etabliert. Diese verwenden verschiedene Tierarten und beruhen auf verschiedenen Induktionsmechanismen (**Abb. 7**). Hervorzuheben ist hierbei, dass kein alleiniges adäquates Tiermodell für die Untersuchung von VHF existiert. Somit ist es essenziell, sich aus ethischen und praktischen Gründen die anatomischen und elektrophysiologischen tierartspezifischen Unterschiede zu verdeutlichen, um das entsprechende geeignete Modell auszuwählen. Hierbei ist sowohl die Wahl der Tierart, die Art der Induktion, als auch die wissenschaftliche Fragestellung von großer Bedeutung (Clauss et al., 2019). Da das Auftreten von VHF im Tierreich sehr unüblich (oder nur schwer nachzuvollziehen ist) (Schüttler et al., 2020), werden verschiedene Modelle verwandt, um VHF auszulösen und somit Teilaspekte der Erkrankung deutlicher zu verstehen. Da viele Mechanismen des VHF unverstanden sind, Therapiestrategien große Limitationen aufweisen und ihre Prävalenz von Jahr zu Jahr steigt (Nattel et al., 2020), erweist sich die Anwendung von Tiermodellen als wichtiges Forschungsmittel.

3.1.1. Genetische Veränderungen

Die Generierung genetisch veränderter Tiere hat einen signifikanten Anteil am heutigen Verständnis der zellulären und molekularen Faktoren der Arrhythmogenese. Genetisch veränderte Nagermodelle konnten bereits wichtige Einblicke in die Pathogenese von VHF leisten. Beispiele hierfür sind das α -MyHC-FKBP12 Mausmodell, welches spontan VHF ausbildet (Frydrychowski et al., 2020), sowie Mäuse mit einem Knockout des *PITX2*-Gens, welche eine erhöhte Anfälligkeit für Pacing-induziertes VHF aufweisen (Zhang et al., 2019b). Im Großtiermodell wurde bspw. im Jahr 2016 ein transgenes Schafmodell entwickelt, bei welchem eine Überexpression von herzspezifischem *TGF- β 1* generiert wurde. In diesem Modell konnte eine wesentliche Ausbildung von Fibrose in den Atrien nachgewiesen werden (Polejaeva et al., 2016) (**Abb. 7**).

3.1.2. Induktion einer Herzhypertrophie

Ein weiteres Modell des VHF stellt die Induktion der Herzhypertrophie dar, welche meist durch eine transversale Aortenverengung (TAC), einen chronischen AV-Block oder durch AV-Shunt induziert wird. Bei der TAC erfolgt eine Aortenstenose

mittels Ligatur, welche eine linksventrikuläre Hypertrophie zur Folge hat (Marionneau et al., 2008). Dieser Mechanismus führt zu atrialem Remodeling mit anschließender atrialer Hypertrophie, Herzdilatation und Fibrose (De Jong et al., 2013). Mäuse können hierdurch eine gesteigerte Vulnerabilität für VHF und ventrikuläre Tachykardie aufweisen (Zhang et al., 2006). Bei Kaninchen wird dieses Modell oftmals mit einer Aortenklappeninsuffizienz kombiniert, was im Anschluss zu akutem Herzversagen führen kann (Pogwizd et al., 2001). Im Schwein wird die Hypertrophie des linken Ventrikels durch das Anbringen einer Manschette um die Aorta verursacht, was zu einer gesteigerten Ansammlung von ECM und erhöhter Versteifung des Herzmuskels führen kann (Gyöngyösi et al., 2017). Das Modell des chronischen AV-Blocks (CAVB) stellt ein weiteres Hypertrophiemodell dar, welches zuerst in Hunden durchgeführt wurde. CAVB wird durch Injektion von Formaldehyd in den AV-Knoten oder durch Ablation des proximalen His-Bündels induziert. Dies führt zu einem rasanten Abfall der Herzfrequenz und des Herzzeitvolumens, was eine Volumenbelastung zur Folge hat (Volders et al., 1998, Vos et al., 1998, Oros et al., 2008). In Schafen führt dieses Modell zu atrialer Dilatation und einer verzögerten Reizweiterleitung mit erhöhter Anfälligkeit für VHF durch Burst-Pacing (Neuberger et al., 2005). Ein weiteres Hypertrophiemodell entsteht durch Anbringung eines Shunts zwischen Aorta und dem linken Atrium. Diese Technik wird v.a. bei Mäusen, Ratten und Schafen durchgeführt und zeigt bereits nach 4 Wochen eine Dilatation des linken Atriums mit deutlicher Ausbildung von VHF (Scheuermann-Freestone et al., 2001, Remes et al., 2008, Benes et al., 2011) (**Abb. 7**).

3.1.3. Myokardischämie/Ischämische Kardiomyopathie

Als bedeutender Risikofaktor für VHF gilt die Myokardischämie, welche durch Etablierung verschiedene Modelle zur Erforschung von VHF genutzt wird. In Mäusen und Ratten kann eine ventrikuläre Ischämie durch Okklusion der linken Koronararterie (LAD) oder Kryoschädigung des Gewebes erfolgen, was in einer erhöhten Vulnerabilität für atriale und ventrikuläre Arrhythmien resultiert (Gehrmann et al., 2001, Boixel et al., 2003). In Hunden führt die Technik der LAD-Okklusion zu einer gesteigerten Anfälligkeit für VHF (Miyauchi et al., 2003). In Schweinen wurden verschiedene Ischämie Modelle etabliert, wobei die LAD am häufigsten Anwendung findet. Die Okklusion kann bspw. durch Implantation eines Ringes (Biondi-Zoccai et al., 2013), durch Stahlverschlüsse (Indik et al., 2010),

oder durch temporären Verschluss mittels Ballonkatheter durchgeführt werden (Niemann et al., 2010, Clauss et al., 2020). Durch Ligatur der rechten Koronararterie konnte in Hunden ein spezifisches atriales Ischämiemodell etabliert werden (Sinno et al., 2003) (**Abb. 7**).

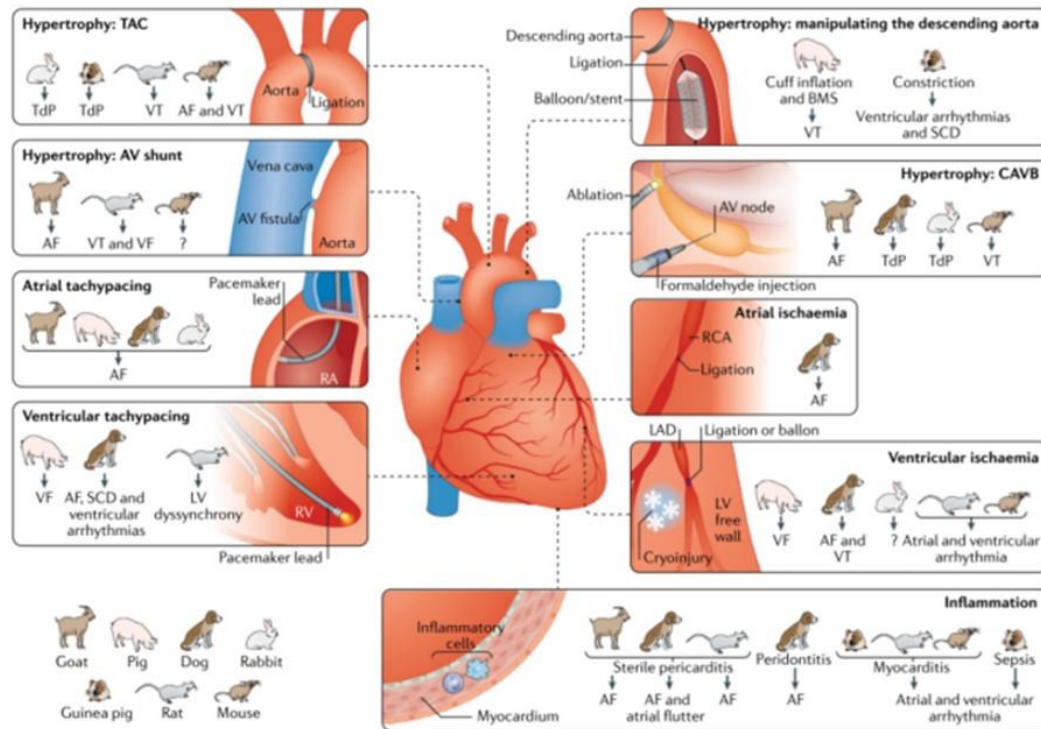


Abb. 7. Tiermodelle des VHF. Illustration der am häufigsten verwendeten Krankheitsmodelle in verschiedenen Spezies für bestimmte Trigger in Arrhythmien. Kardiale Hypertrophie, Ischämie, atriales- und ventrikuläres Tachypacing, sowie Inflammation. Die Form der Arrhythmie in der jeweiligen Spezies wird angezeigt. AF: Vorhofflimmern; AV: atrioventrikulär; BMS: bare-metal stent (dt.: Metallstent); CAVB: chronisch- atrioventrikulärer Block; LAD: linke aufsteigende Koronararterie; LV: linker Ventrikel; RA: rechtes Atrium; RCA: rechte Koronararterie; RV: rechter Ventrikel; SCD: sudden cardiac death (dt.: plötzlicher Herztod); TAC: transverse Aortenkonstriktion, VF: ventricular fibrillation (dt.: Kammerflimmern); VT: ventrikulärer Tachykardie; Clauss et al., 2019.

3.1.4. Tachypacing

Durch die 1995 publizierte Arbeit von Wijffles et al. ist bekannt, dass VHF sein eigenes Substrat bildet und sich somit selbst erhält (Wijffels et al., 1995). Dies führte zum Tiermodell des Tachpacings, wobei nach Ort des Stimulus zwischen atrialem und ventrikulärem Tachypacing unterschieden wird. Das atriale Tachypacing ist eine im Großtiermodell sehr gut etablierte Technik und findet optimale Anwendung bei Schweinen, Hunden und Schafen (Clauss et al., 2019). Schweine bspw. entwickeln bereits 1 bis 7 Tage nach Anwendung des Tachpacings VHF und weisen hierbei verlängerte atriale effektive Refraktärperioden (AERP) auf (Bauer et al., 2004, Lugenbiel et al., 2015). Histologisch zeigen sowohl Atrien als auch

Ventrikel Hypertrophie, Fibrose und Apoptose unter Ausbildung einer chronischen Herzinsuffizienz (Kazui et al., 2015). Da Schweine durch die Anwendung des atrialen Tachypacings zur Ausbildung chronischer Herzinsuffizienz neigen (aufgrund der guten AV-Knotenleitungseigenschaften wird die atriale Tachykardie schnell übergeleitet und führt auch zu einer ventrikulären Tachykardie mit nachfolgendem Risiko einer Tachykardiomyopathie), kann zusätzlich der bereits erwähnte CAVB durchgeführt werden. Schwarzl et al. zeigten das Auftreten von anhaltendem VHF mit verstärktem atrialen Remodeling (Schwarzl et al., 2016a). Auch in Hunden und Schafen gilt das atriale Tachypacing als adäquate Technik und konnte in vielen Studien zum Verständnis des strukturellen und elektrischen Remodelings unter Ausbildung von VHF beitragen (Morillo et al., 1995, Nattel et al., 2016, Takemoto et al., 2016). Da Hunde und Schweine in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften dem Menschen ähnlicher sind, zeigen sie verglichen mit Schafen eine bessere Übertragbarkeit der gewonnenen Daten und sind somit dem Schaf oftmals vorzuziehen (Clauss et al., 2019). Da es durch ventrikuläres Tachypacing, welches zur Untersuchung einer Herzinsuffizienz verwendet werden kann (Käab et al., 1996), ebenfalls zu atrialem Remodeling kommt, kann es dementsprechend auch als Modell für die Erforschung von VHF verwendet werden. Hierbei führt die Durchführung bspw. im Hund zu einer Ausbildung von Fibrose, Überdehnung des Myokards, Funktionseinschränkung, sowie Veränderungen von Ionenkanälen in den Atrien und Ventrikeln (Shinagawa et al., 2002) (**Abb. 7**).

3.1.5. Inflammation

Die Ausbildung von VHF kann durch inflammatorische Prozesse stark begünstigt werden, was zur Etablierung inflammatorischer Tiermodelle des VHF führte. Bei Hunden kann bspw. eine sterile Perikarditis induziert werden, was zu einer erhöhten Induzierbarkeit von VHF führt (Tselentakis et al., 2006). Auch durch Auslösung einer Parodontitis in Hunden wurde ein Zusammenhang zwischen chronischen oralen Entzündungen und VHF erwiesen (Yu et al., 2010). Die Myokarditis steht im engen Zusammenhang mit der Ausbildung von VHF und wird meist in verschiedenen Mausmodellen wie bspw. durch die Verabreichung von Myosin 6 (MYH6) Peptid zusammen mit Freund'schen Adjuvans dargestellt (Grabmaier et al., 2016). Auch die Verwendung von verschiedenen Viren wie dem Encephalomyokarditis-Virus kann bei Mäusen, aber auch bei Schweinen

durchgeführt werden (Gwathmey et al., 1992, Ohmae et al., 2005). Generell ist die Anwendung inflammatorischer Modelle für die Untersuchung der Arrhythmogenese selten, weshalb auch eine elektrophysiologische Charakterisierung in diesem Zusammenhang noch nicht detailliert ausgearbeitet wurde (Claus et al., 2019) (**Abb. 7**).

Unter der Vielzahl der etablierten Tiermodelle des VHF hat sich die Verwendung des Schweins als sehr vielversprechend gezeigt. Große Übereinstimmungen in Körpergewicht, Herzgewicht und elektrophysiologischen Eigenschaften, sowie einer ähnlichen Herzfrequenz erlauben eine weitgehend direkte Übertragbarkeit der generierten Ergebnisse in die Humanmedizin. Schweinemodelle haben sich als gut induzierbar erwiesen und finden somit ebenfalls Anwendung in der Erforschung neuer Therapieansätze. Die Induktion von VHF durch atriales Pacing hat sich hierbei als Methode der Wahl etabliert, da sie als zuverlässig und reproduzierbar gilt (Frydrychowski et al., 2020).

3.2. Tiermodelle des Diabetes mellitus

Populationsstudien haben gezeigt, dass zwischen der Erkrankung an Diabetes mellitus und der Ausbildung von VHF ein starker Zusammenhang besteht (Benjamin et al., 1994, Kannel et al., 1998). Die diabetes-spezifischen zellulären und molekularen Mechanismen, welche zu VHF führen, sind zum jetzigen Zeitpunkt nur sehr unzulänglich bekannt (Bohne et al., 2019). Tiermodelle des Diabetes mellitus sind auf Grund ihrer Genese und Ausprägung sehr variabel und in verschiedenen Spezies anwendbar. Übergeordnet lässt sich Diabetes mellitus durch 4 verschiedene Methoden induzieren: 1) dem chirurgischen Ansatz, bei welchem eine teil- bzw. vollständige Pankreatektomie durchgeführt wird, 2) die Applikation chemischer Substanzen mit toxischer Wirkung auf die β -Zellen, 3) die diätetische Intervention (oder Übergewicht), sowie 4) dem gentechnischen Ansatz (Abb. 8).

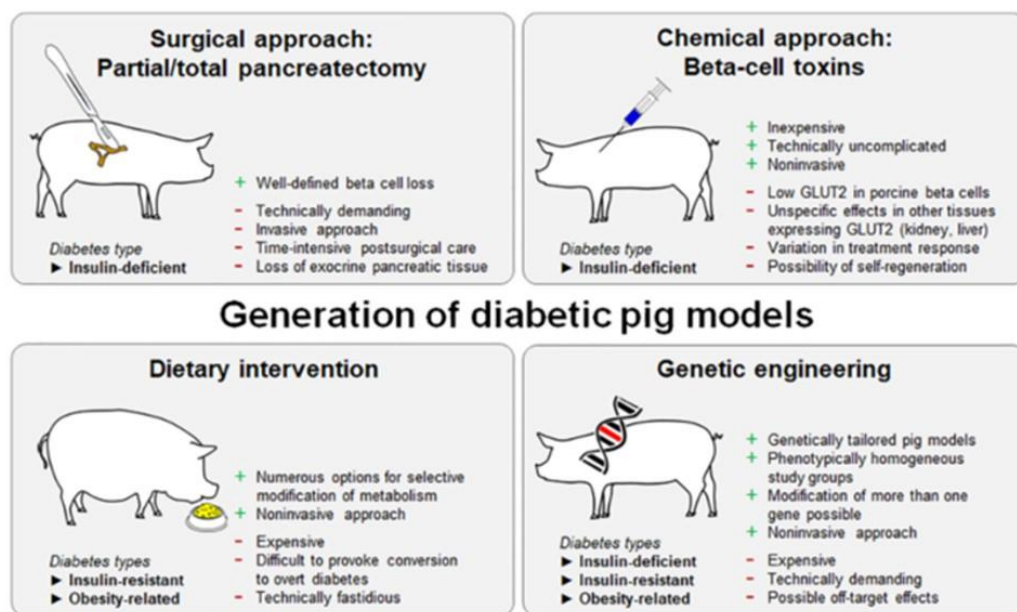


Abb. 8. Vor- und Nachteile derzeitiger Strategien für die Etablierung von diabetischen Schweinemodellen; Ahlqvist et al., 2018.

Die chirurgische Methode der teilweisen oder vollständigen Pankreatektomie wird bei Schweinen, Hunden und Primaten durchgeführt, gilt jedoch als sehr invasiv und erfordert eine zusätzliche Behandlung mit Enzymen (Mellert et al., 1998, Fisher et al., 2001, He et al., 2011). Eine Alternative hierzu bildet die Applikation chemischer Substanzen wie Streptozotocin oder Alloxan, welche häufig in Nager- und Schweinemodellen angewendet wird. In verschiedenen Studien zeigten Streptozotocin-induzierte diabetische Ratten eine signifikante Fibroseausbildung in den Atrien (Kato et al., 2008, Watanabe et al., 2012, Li et al., 2016). Kato et al.

zeigten außerdem an durch Streptozotocin-induzierten diabetischen Ratten einen Effekt des strukturellen Remodelings in den Atrien durch die Aktivierung von sog. Advanced glycation end products und ihrem Rezeptor (AGE-RAGE) (Kato et al., 2008). Streptozotocin und Alloxan können sich jedoch neben der Zerstörung der pankreatischen β -Zellen auch toxisch auf andere Organe der Tiere auswirken (Dufrane et al., 2006, King, 2012). Eine Zerstörung der β -Zellen kann ebenfalls mittels Virusapplikation bspw. durch das Coxsackie B Virus induziert werden (Jaïdane et al., 2009). Darüber hinaus existiert eine Vielzahl an Modellen, welche mittels hochkalorischer Fütterung zu Insulinresistenzen führen (Winzell et al., 2004). Hierbei kann ebenfalls der Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Übergewicht betrachtet werden und findet große Anwendung in Nagetieren und Schweinen (Renner et al., 2016a). Die Ausbildung von Übergewicht kann ebenso durch genetische Veränderung erfolgen. Ein monogenes Modell hierfür stellt bspw. die Leptin-Maus dar (*Lep^{ob/ob}*-Maus), der das Sättigungsgefühl-beeinflussende Leptin fehlt und somit durch erhöhte Nahrungsaufnahme übergewichtig wird (Wang et al., 2014). Die Verwendung von genetisch veränderten Tieren gewinnt sowohl bei der Erforschung des Insulin-abhängigen als auch des Insulin-unabhängigen Diabetes mellitus zunehmend an Bedeutung. So wurde bspw. das GIPR^{dn}-Schwein entwickelt, welches einen dominant-negativen Glukose-abhängigen insulinotropen Peptid-Rezeptor in den β -Zellen exprimiert und dadurch eine Reduktion der Glukosetoleranz, Insulinsekretion und β -Zellproliferation aufweist (Renner et al., 2010). Durch genetische Veränderung des *INS*-Gens entstanden zwei wichtige Modelle des permanenten neonatalen Diabetes mellitus (PNDM): die *Ins2^{Akita}*-Maus und das *INS^{C94Y}*-Schwein, welche als Modelle für den *INS*-Gen-induzierten Diabetes der Jugend gelten (MIDY) (Liu et al., 2010). Beide Modelle weisen eine monogene Mutation auf, welche im Schwein im *INS*-Gen und in der Maus im *Ins2*-Gen auftritt (Yoshioka et al., 1997). Der pathologische Mechanismus ist in beiden Tiermodellen ähnlich wie die *INS^{C96Y}*-Mutation im Menschen. Diese verhindert eine Disulfidbrückenbindung zwischen den Ketten des Insulinmoleküls, was zur Komplexbildung führt und den Transport des physiologischen (Pro-) Insulins beeinträchtigt. Durch die Komplexbildung verbleibt fehlgefaltetes Insulin im ER der pankreatischen β -Zellen, verursacht ER Stress und führt schließlich zur Apoptose der β -Zellen (Yoshioka et al., 1997, Liu et al., 2010, Renner et al., 2013, Wolf et al., 2023). *Ins2^{Akita}*-Mäuse entwickeln einen progressiven Diabetes mellitus, gekennzeichnet durch Hyperglykämie,

Hypoinsulinämie, Polyurie und Polydipsie. Neugeborene *Ins2^{Akita}*-Mäuse verfügen über physiologisch ausgebildete Langerhans-Inselzellen mit unversehrten β -Zellen. Im Alter von 3-4 Wochen zeigt sich ein durch Apoptose-vermittelter Verlust der β -Zellmasse mit Manifestation einer insulinabhängigen Diabetes mellitus Erkrankung (Al-Awar et al., 2016). Zur Erforschung Diabetes-induzierter proarrhythmogener atrialer Herzerkrankungen erweist sich das *Ins2^{Akita}*-Mausmodell als wichtiges Mittel und konnte bereits erste wichtige Erkenntnisse liefern. In der Arbeit von Polina et al. wurde gezeigt, dass Akita-Mäuse eine signifikante Vulnerabilität für VHF aufweisen, was auf eine Verlängerung der P-Wellendauer und eine verlangsamte atriale Reizweiterleitung zurückzuführen war. Ebenfalls konnte eine veränderte Morphologie des Aktionspotentials beobachtet werden. Unter Insulintherapie zeigte sich eine signifikante Milderung der genannten Parameter (Polina et al., 2020). Die Arbeit von Krishnaswamy et al. zeigte auf struktureller Ebene, dass Akita-Mäuse im rechten und linken Atrium eine verstärkte Ausbildung von Fibrose aufwiesen, was auf eine verstärkte Expression von Kollagen Typ 1 und 3 zurückzuführen war. Ein Effekt, der ebenfalls durch Insulintherapie deutlich reduziert werden konnte (Krishnaswamy et al., 2015). Das bereits erwähnte *INS^{C94Y}*-Schwein, welches 2013 von Renner et al. generiert wurde (Renner et al., 2013), ist ebenfalls eine heterozygote monogenetische Veränderung, welche wie im Menschen im *INS*-Gen auftritt. Diese Tiere sind bereits kurz nach ihrer Geburt hyperglykämisch. Im Alter von 4,5 Monaten zeigen die *INS^{C94Y}*-Schweine ein um 41% verringertes Körpergewicht, eine 72% verringerte β -Zellmasse, sowie einen um 61% niedrigeren Nüchterninsulinspiegel (Renner et al., 2013). *INS^{C94Y}*-Schweine weisen einen stabilen diabetischen Phänotyp auf und sind somit chemisch, oder chirurgisch induzierten Modellen überlegen (Mellert et al., 1998, Dufrane et al., 2006, He et al., 2011). Bislang gibt es für das Modell des *INS^{C94Y}*-Schweins noch keine Ergebnisse zu Diabetes-induziertem VHF. In der Arbeit von Hinkel et al. wurde jedoch gezeigt, dass die Ausbildung von Fibrose im linken Ventrikel der *INS^{C94Y}*-Schweine verglichen mit den Kontrolltieren, signifikant erhöht war. Dieses Ergebnis liefert somit erste Erkenntnisse, kann jedoch keine valide Aussage über die Fibrose in den Atrien liefern (Hinkel et al., 2017).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl das *Ins2^{Akita}*-Mausmodell als auch das *INS^{C94Y}*-Schweinmodell aufgrund des stabilen Phänotyps große Vorteile gegenüber anderen Tiermodellen aufweisen. Da das Schwein deutliche

metabolische Übereinstimmung mit dem Menschen hinsichtlich seiner Nüchternblutglukosewerte (70- 115 mg/dl), der Verteilung der exokrinen Zellen im Pankreas, dem Anteil und der Proliferationsrate der β -Zellen aufweist (Wolf et al., 2014, Renner et al., 2016a), in Kombination mit den bereits erwähnten anatomischen und kardiologischen Vorteilen, ist es aus translationaler Sicht dem Mausmodell überlegen. Somit ist es als sehr gut geeignetes Tiermodell zur Erforschung von diabetes-induziertem strukturellen Remodeling bei VHF zu betrachten.

4. Hypothese und Ziele

Vorhofflimmern (VHF) ist die Herzrhythmusstörung mit der höchsten Prävalenz und steht im Zusammenhang mit hoher Morbidität und Mortalität (Andrade et al., 2014). Eine Erkrankung an Diabetes mellitus erhöht das Risiko für die Ausbildung und Progression von VHF (Benjamin et al., 1994). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bis zum heutigen Tag noch nicht ausreichend verstanden, wobei dem strukturellen Remodeling der Atrien eine bedeutende Rolle zugesprochen wird (Bohne et al., 2019). Eine hieraus resultierende atriale Fibrose begünstigt eine unregelmäßig-heterogene elektrische Leitung, führt zur Herabsetzung der Reizleitungsgeschwindigkeit und bildet somit ein wichtiges Substrat für VHF (Schotten et al., 2016). Das Yes-assoziierte Protein gilt als Mediator für profibrotische Prozesse durch die Aktivierung kardialer Fibroblasten mit anschließender Differenzierung zu Myofibroblasten (Francisco et al., 2021). Neue Studien legen nahe, dass eine Therapie von Patienten mit Diabetes mellitus mit SGLT2-Hemmern kardiale Fibrose, u.a. durch verminderte Fibroblasten-Aktivierung möglicherweise reduzieren kann (Tian et al., 2021).

Für die vorliegende Arbeit wurde daher darauf aufbauend die Hypothese formuliert, dass YAP einen essenziellen Mediator für strukturelle atriale Remodelingprozesse und eine erhöhte Anfälligkeit für VHF bei Diabetes mellitus darstellt, was durch eine Therapie mittels SGLT2-Hemmer (Dapagliflozin) beeinflusst werden kann.

Um die Hypothese zu prüfen, wurde die Anfälligkeit für Vorhofflimmern, das strukturelle Remodeling sowie die Expression von YAP und YAP-assoziierten Genen in diabetischen Schweinen (*INS*^{C94Y}) mit/ohne Dapagliflozin-Therapie untersucht.

III. TIERE, MATERIAL UND METHODEN

1. *In vivo*

1.1. Verwendete Versuchstiere und entsprechende Tierhaltung

1.1.1. Moorversuchsgut

Sowohl die Zucht als auch die Aufzucht der Tiere erfolgte am Moorversuchsgut des Lehrstuhls für Molekulare Tierzucht und Biotechnologie der Ludwig-Maximilians-Universität München/Oberschleißheim. Die hierfür verwendeten, teilweise genetisch veränderten Tiere stellen ein Tiermodell für den humanen permanenten neonatalen Diabetes mellitus (PNDM) dar. Dieser beruht auf Mutationen im humanen Insulin-(*INS*-)Gen, welcher sich meist im neonatalen Stadium manifestiert und somit auch als mutanter *INS*-Gen induzierter Diabetes der Jugend (mutant *INS*-gene induced diabetes of youth (MIDY)) bezeichnet wird (Liu et al., 2010). Eine dieser Mutationen betrifft die Position 96 des humanen Proinsulins, wodurch eine der beiden Disulfidbrücke zwischen der A- und B-Kette des reifen Insulinmoleküls getrennt wird und es zur Anreicherung von fehlgefaltetem Insulin im ER kommt. Dies resultiert in Stressreaktionen im ER, welche dann die Apoptose der β -Zellen im Pankreas triggern (Liu et al., 2010). Im Schweinemodell wurde ebenfalls mit dem *INS*-Gen gearbeitet, wobei das porcine C-Peptid um 2 Aminosäuren kürzer ist als das humane (Renner et al., 2013). Hierfür wurde ein *INS*^{C94Y}-Expressionsvektor verwendet, in welchen eine Neomycin-Selektionskassette, regulatorische Elemente und das porcine *INS*-Gen eingebaut wurde. Diese genetische Veränderung weist einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin auf, welcher einen Aminosäureaustausch von Cystein nach Tyrosin an der Position 94 zur Folge hat. Dieser Vektor wurde daraufhin in primäre, fetale Fibroblasten männlicher Schweine transferiert. Der Zellkerntransfer fand in stabilen Zellklonen statt, welche dann in scheinträchtige Empfängertiere übertragen wurden, um genetisch veränderte Gründertiere zu erzeugen. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR-Analyse, in welcher die Genveränderung mit dem Transgen entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimern detektiert wurde (Forward: CAG CTG TGC TCG ACG TTG TC, Reverse: GAG TCA ACT AGT CCT CAG AAG AAA G). Ebenfalls wurde die Neomycin-Kassette mittels Southern-Blot-Methode

nachgewiesen (Renner et al., 2013). Am Moorversuchsgut erhielten die *INS*^{C94Y}-Tiere eine Kombinationstherapie aus Langzeitinsulin (Lantus®) und Kurzzeitinsulin (NovoRapid®). Das Blutglukoselevel der Tiere wurde ein- bis zweimal täglich mittels Glucometer ermittelt. Die in diesem Versuch aufgeführte Kontrollgruppe wurde durch die Wurfgeschwister der genetisch veränderten Tiere dargestellt. Durch Genotypisierung wurden diese als Wildtyp ermittelt. Sie zeigten keine genetische Veränderung des *INS*-Gens und keinen diabetischen Phänotyp.

1.1.2. Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin

Im Alter von fünf bis sechs Monaten erfolgte der Transport der Tiere an das Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin am Campus Großhadern. Hier verbrachten die Schweine aus tierschutzrechtlichen Gründen vor dem Versuch eine Mindestdauer von 3 Tagen, um eine angemessene Akklimatisierung zu gewährleisten. Die Stallungen der Versuchstierhaltung im Walter-Brendel-Zentrum entsprechen den Vorschriften der S1 Gentechnik-Sicherheitsvoraussetzung von 1990. Die Tiere wurden täglich in Augenschein genommen und ihr Gesundheitszustand nach entsprechendem Score Sheet evaluiert. Sie hatten sowohl Zugang zu den Innenboxen mit einer Größe von ca. 1,5x2 m, sowie zu den anliegenden Außenausläufen, welche sich auf einer Größe von 4x4 m erstrecken. Die Liegeflächen der Innenboxen sind mit explizit dafür vorgesehenen, rutschfesten Fliesen ausgekleidet, wobei die Böden der Tageslichtaußenausläufe aus Beton bestehen. Die Tiere wurden einmal täglich gefüttert und die Trinkwasserzufuhr wurde über Nippeltränken in den Innenboxen gewährleistet. Zum Enrichment wurden die Innenboxen nach täglicher Säuberung mit Stroh und Heu versehen. Ebenfalls erhielten die Tiere Heu im Außenbereich, Tierbälle und Gummireifen, sowie Wasserbäder zur Beschäftigung. Zusätzlich wurden den Tieren Obst- und Gemüseprodukte angeboten. Zu Wasser bestand zu jeder Zeit freier Zugang. Das Fütterungsregime wurde nach Genehmigung der Änderungsanzeige vom 22.11.2022 an das Schema des Moorversuchsgutes angeglichen, in welchem die Tiere restriktiv dem Alter entsprechend nach einem Fütterungsplan gefüttert wurden. Einige der Tiere, welche in dieser Arbeit inkludiert wurden, erhielten noch die entsprechende Fütterung ad libitum. Ebenfalls entsprechend des genehmigten Tierversuchsantrages wurde der Blutzuckerspiegel einiger dieser Tiere mittels Acarbose zwischen 200-300 mg/dl eingestellt. Hierfür wurde durch eine Lanzettpunktion am Ohr ein Blutstropfen gewonnen und zur Blutglukosemessung

verwendet. Sofern dieser Wert über 300 mg/dl lag, erhielten die Tiere zweimal täglich 50 mg Glucobay® oral in Form von Tabletten. Um das hiermit erforderliche Ohrstechen der Tiere zur optimalen Einstellung zu vermindern, wurde mit der Änderungsanzeige die Behandlung umgestellt. Somit erfolgte eine Insulintherapie ab einem Nüchternblutglukosewert von >300 mg/dl mit 2 Einheiten Lantus®, welche gegebenenfalls bei Bedarf erhöht werden konnte bis der Blutglukosewert 200-300mg/dl betrug. Sofern sich der Blutglukosewert 5 Stunden nach Futteraufnahme weiterhin bei >300 mg/dl befand, wurde zusätzlich mit NovoRapid® behandelt. Ein Blutzuckerspiegel zwischen 200-300 mg/dl wurde angestrebt, um das Behandlungsbild eines nicht adäquat eingestellten Diabetes mellitus nachzubilden.

1.1.3. Versuchsaufbau

Im Tierversuchsantrag ROB-55.2-2532.Vet_02-18-69, zuzüglich der Änderungsanzeige vom 22. November 2022, wurden alle durchgeführten Eingriffe durch die Regierung von Oberbayern genehmigt. In diesem Versuch wurde aus diversen Gründen das Schwein als adäquate Tierart gewählt. Hauptsächlich handelt es sich um Hybridtiere, welche Kreuzungen aus der Deutschen Landrasse, dem Edelschwein und Pietrainschweinen darstellen. Es wurden sowohl weibliche als auch männliche Tiere im Alter von ca. fünf bis sechs Monaten nach ihrem jeweiligen Genotyp und gegebener Therapie in eine der drei entsprechenden Gruppen eingeteilt: 1) Kontrolltiere (Wildtypen), 2) Diabetes-(*INS*^{C94Y}) Tiere ohne Therapie und 3) Diabetes-(*INS*^{C94Y}) Tiere mit Dapagliflozin-Therapie. Die Tiere mit zusätzlicher Dapagliflozin-Therapie stellten eine Gruppe aus 10 Tieren mit diabetischem Genotyp dar, welche ab dem Absatzalter eine orale Therapie mit Dapagliflozin, einem in der Humanmedizin zugelassenen Antidiabetikum, erhielten. Aus diesen drei Gruppen ergab sich eine Gesamttierzahl von 45 Tieren, welche sich aus 17 Kontrolltieren, 18 Diabetesschweinen ohne Therapie und 10 Diabetesschweinen mit Therapie zusammensetzte. Bei allen Tieren erfolgte ein Eingriff, welcher ebenfalls den Endversuch darstellte. Die Versuche erfolgten in totaler intravenöser Intubationsnarkose (Propofol +Fentanyl). Bei allen Eingriffen erfolgte die invasive Bestimmung hämodynamischer Basisparameter mittels Rechtsherz- und Linksherzkatheteruntersuchung, eine invasive elektrophysiologische Untersuchung mit Bestimmung der atrialen und atrioventrikulären Leitungseigenschaften, sowie die Induktion von

Vorhofarrhythmien mittels Burststimulation im rechten Atrium. Im Anschluss erfolgte die schmerzfreie Euthanasie mittels Thorakotomie und Herzentnahme nach vorheriger Ausblutung. Für histologische und molekularbiologische Untersuchungen wurde Gewebe entnommen, entsprechend prozessiert und asserviert.

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, Chicago, Illinois, 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, Colorado USA
RAPIDLab® 1200 Blutgasmessgerät, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen
SC 9000XL Patientenmonitor, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen
Universal Heart Stimulator UHS 20, Biotronik, Berlin

1.2.2. Verbrauchsmaterialien

Blue Sensor® VL-00S EKG-Elektroden, Ambu GmbH, Bad Nauheim
Cryovial sterile 2 ml, Simport Scientific, Bernard-Pilon, Kanada
Ethibond Excel Sutupak 6 x 45 cm Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
Flexi-Kit arteriell Einmaldruckwandler, Merit Medical GmbH, Eschborn
Foliodrape® Protect Lochtücher selbstklebend, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland

0,014“Führungsdraht Road Runner Extra Support, Cook Denmark Holding ApS, Bjæverskov, Dänemark
6-F Super Torque Plus pigtail diagnostic catheter, Cordis Corporation, Miami, Florida, USA
Gaze NobagazeR Kompressen, Noba Verbandmittel Danz GmbH u. Co. KG, Wetter
Intrafix Primeline, 150 cm, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Introcan Safety 3 22G, 25 x 0,9 mm, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
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
Klebefpflaster LeucoplastR, hospital BSN medical GmbH, Hamburg
Nessy Omega Elektrode, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen
Multipolarer Diagnostikkatheter, BIOTRONIK SE & Co. KG, Berlin
Perfusorleitung, 1,0 x 2,0 mm, PE, 150 cm, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Perfusorspritze 50 ml, transparent, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, III. Tiere, Material und Methoden 30 Melsungen
Rüsch Super SafetyClear Endotrachealtubus 4.5-7.0 mm, Wolfram Droh GmbH Mainz
Spatelektrode, gerade, 2,3 x 19 mm, Länge 45 mm, Erbe Elektromedizin GmbH, Tübingen
Spritze steril Luer 20 ml Discardit BD, Heidelberg

Spritze steril Luer 10 ml Discardit BD, Heidelberg
Spritze steril Luer 5 ml Discardit BD, Heidelberg
Sterican Kanülen 0,90 x 40 mm, 20 G x 1 ½ “, Gr. 1, B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG, Melsungen
Swan-Ganz Katheter 7-F, Edwards Lifesciences LLC, Irvine, California, USA
Vicryl CTX Plus 70 cm Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt

1.2.3. Instrumente

Anatomische Pinzette, straight serrated, 14,5 cm, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Chirurgische Pinzette, 2x3 teeth, 14,5 cm Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Chirurgische Schere, straight, sharp/blunt, 16,5 cm, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Cushing Nerv- und Gefäßshäkchen, 90° gewinkelt, 19 cm, stumpf, Aesculap AG, Tuttlingen,
Irisschere, straight, sharp/sharp, 10,5 cm, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Kelly Klemme, curved, serrated, 14 cm, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Mathieu Nadelhalter, with lock, 14 cm, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Micro-Mosquito, curved, serrated, 12 cm, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Morse Sternumspreizer mit konvexen Halteblättern für totale Sternotomie, Fehling Instruments GmbH & Co. KG, Karlstein
Rosenschere P68, Fiskars, Espoo, Finnland
Sektionsmesser für Gehirn, 45 cm, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Weitlaner Wundspreizer 3x4 Zähne, stumpf, Aesculap Ag, Tuttlingen,
Wertheim Schere, gebogen, stumpf/stumpf, 23 cm, Fehling Instruments GmbH & Co. KG, Karlstein

1.2.4. Hilfsmittel

Ambu® Silikon-Beatmungsbeutel, Ambu GmbH, Bad Nauheim
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
Stethoskop Littmann Master Classic II, 3M Deutschland GmbH, Neuss

1.2.5. Medikamente und Chemikalien**1.2.5.1. Analgetika**

Fentadon® 50 µg/ml, Injektionslösung, Dechra Veterinary Products Deutschland GmbH, Aulendorf
Rimadyl® 100 mg, Kautabletten für Hunde, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Rimadyl® 50 mg/ml Injektionslösung für Rinder, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin

1.2.5.2. Antiarrhythmikum

Amiodaron-HCl, Amp. 150 mg/3 ml, Hikma Pharma GmbH, Gräfelfing
--

1.2.5.3. Antikoagulans

Heparin-Na Durchstechflasche, 25.000 IE / 5ml, Ratiopharm GmbH, Landsham
--

1.2.5.4. Antidiabetika

Forxiga® Dapagliflozin 10 mg, AstraZeneca GmbH, Cambridge, UK
Glucobay®, 50 mg Tabletten (Acarbose); Bayer Vital GmbH, Leverkusen

Lantus® SoloStar®100 Einheiten/ml, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt/Main
NovoRapid®FlexPen®100 Einheiten/ml, Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz

1.2.5.5. Infusionslösungen

Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, Fresenius freeflex, 1000 ml, Bad Homburg v.d.H.
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, B. Braun Ecoflac, 500 ml, Melsungen
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%, Fresenius Frekaflasche, 50 ml, Bad Homburg v.d.H.

1.2.5.6. Narkotika

Ketaset® 100 mg/ml, Injektionslösung, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin
Midazolam Amp. 15 mg / 3 ml, Ratiopharm GmbH, Landsham
Propofol 2% (20 mg/ml) MCT Fresenius, Emulsion zur Infusion, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.
Stresnil® 40mg/ml, Injektionslösung für Schweine, Elanco Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H.

1.2.5.7. Sonstige Medikamente und Chemikalien

Atropinsulfat Amp. 0,5 mg / 1 ml, B. Braun Melsungen AG,
Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Kaliumchloridlösung 7,45% Amp. 20 ml, B. Braun AG, Melsungen
Magnesiumsulfat 50% Amp. 5 g / 10 ml, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg
Ultraschallgel Sonosid, Asid Bonz GmbH, Herrenberg

1.3. *In vivo* Methoden

1.3.1. Narkoseeinleitung

Die Tiere wurden 1-3 Tage vor dem Eingriff gewogen und in der Nacht vor dem Eingriff nüchtern gehalten. Freier Zugang zu Wasser war zu jederzeit gewährleistet. Am Morgen der Operation wurden sie für eine möglichst kurze Zeit von ihren Gruppenmitgliedern getrennt in einer Innenbox mit Stroh aufgestellt. Hier fand die möglichst stressfreie Einleitung durch eine Kombinationsnarkose aus Ketamin (20 mg/kg KGW), Azaperon (2 mg/kg KGW) und Atropinsulfat (0,05 mg/kg KGW) statt. Diese wurde mittels Kanüle und einer Heidelberger Verlängerung in die Nackenmuskulatur hinter dem Ohr verabreicht und mittels Nachspülen von Kochsalzlösung vollständig appliziert. Durch die Verwendung der Verlängerung wurde erreicht, dass das Tier sich weiterhin wie gewohnt bewegen konnte und auch beim Nachspülen von einer zusätzlichen Punktion abgesehen werden konnte. Außerdem konnten somit zusätzliche Fixierungen oder Berührungen vermieden werden, welche der Beruhigung der Tiere entgegenwirken. Dies gewährleitete eine möglichst stressfreie Narkoseeinleitung der Tiere, welche nach einer Ruhezeit von ca. 5 Minuten bereits ausreichend sediert waren. Sofern dies der Fall war, wurde ein periphervenöser Zugang in die *Vena auricularis lateralis* gelegt. Nach erfolgreicher Lageprüfung wurde die Narkose mittels Applikation von Midazolam (0,5mg/kg i.v.) vertieft.

1.3.2. Intubation und Beatmung

Durch die Kombinationsnarkose aus den oben benannten Präparaten wurde eine ausreichende Spontanatmung gewährleistet, was eine zügige Überführung der Tiere unter ständiger Beobachtung in den Operationsraum ermöglichte. Hier wurden die Tiere für die endotracheale Intubation in Bauchlage überführt und ein Tubus der passenden Größe in die Trachea eingeführt. Um diese Einführung zu ermöglichen, erhielten die Tiere einen Bolus Propofol (0,5-1mg /kg KGW), um einen möglichen Schluckreflex zu vermeiden und somit eine ausreichende Relaxation herbeizuführen. Für die Intubation wurde das Maul durch eine Assistenz am Ober- und Unterkiefer mittels Gazetüchern eröffnet und die Zunge durch die zu intubierende Person ebenfalls mit Hilfe eines Gazetuchs erfasst und vorsichtig nach lateral positioniert. Durch die Nutzung eines geeigneten Laryngoskops wurde der Zungengrund mit leichtem Druck nach ventral gedrückt und somit die Stimmritze

dargestellt. Falls diese durch die Epiglottis verdeckt war, konnte diese durch den Einsatz eines Hilfsmittels, wie zum Beispiel einem Yankauer Saugansatz, vorsichtig vom weichen Gaumen befreit und mit dem Laryngoskop vorsichtig nach ventral positioniert werden. Nach ausreichender Inspektion der Stimmritzengröße erfolgte die Wahl des passenden Tubus je nach Größe des Tieres (4,5-7,0 mm). Dieser wurde anschließend unter adäquater Einsicht und unter geringem Druck zwischen die *Ligamenta vocalia* in die Trachea vorgeschoben. Sofern hier ein anhaltender Widerstand zu spüren war, wurde erneut ein Bolus Propofol verabreicht. Nach erfolgreicher Positionierung des Endotrachealtubus wurde dieser mit Hilfe einer 20 ml Spritze mit Luft geblockt. Im Anschluss erfolgte die Auskultation des gesamten Thorax mit Hilfe eines Stethoskops. Die Beatmung wurde manuell mit einem Beatmungsbeutel durchgeführt, um auskultatorisch eine Ventilation der Lungenflügel feststellen zu können. Falls diese Prüfung positiv verlief, wurde der Tubus durch ein Gazetuch am Oberkiefer des Tieres fixiert. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage auf den Operationstisch positioniert und druckkontrolliert beatmet. Als Richtwerte für die initiale Beatmung galten ein Beatmungsdruck von 20-25 mbar, ein PEEP von 5 mbar, sowie eine Atemfrequenz von 16/min., um ein Atemzugvolumen von 8-12 ml/kg KGW zu gewährleisten. Während des Eingriffs wurden regelmäßig Blutgasanalysen durchgeführt, um die Parameter und deren adäquate Einstellung für das jeweilige Tier zu sichern. Hierbei galten folgende Werte als Richtlinien: pH: 7,40-7,53; pCO₂: 35-44 mmHg; HCO₃⁻: 22-33 mmol/l; pO₂: 73-92 mmHg; SpO₂ > 95 % (Hannon et al., 1990).

1.3.3. Narkoseaufrechterhaltung und perioperative Narkoseüberwachung

Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch eine Allgemeinanästhesie mit Propofol (0,5 mg/kg KGW/min. i.v.), welche mittels Perfusor kontinuierlich appliziert wurde. Die Analgesie wurde mittels Fentanyl (0,05-0,1 mg/kg i.v.) abgedeckt, welche entweder im Abstand von 30 Minuten als Bolus oder ebenfalls mit Hilfe eines Perfusors kontinuierlich verabreicht wurde. Die Aufrechterhaltung des Hydratationsstatus erfolgte über ein Infusionssystem mit physiologischer Kochsalzlösung. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurden der Lidreflex und der Afterzehenreflex überprüft. Auch die kontinuierliche Überwachung der Herzfrequenz gab Ausschluss über die adäquate Narkosetiefe. Im Anschluss wurden die Tiere an den Gliedmaßen rasiert, um eine ausreichende Leitfähigkeit der EKG-Elektroden zu gewährleisten. Zuweilen war es nötig, eine kleine Menge

Ultraschallgel unter die Elektroden auf die trockene Haut aufzutragen. Die EKG-Elektroden wurden positioniert und an das Überwachungssystem angeschlossen. Die Vorderbeine der Tiere wurden vorsichtig nach kaudo-ventral ausgebunden und zum Schutz vor Austrocknung der Augen wurde Bepanthen Augen- und Nasensalbe auf die Hornhaut der Tiere aufgetragen. Die Kreislaufstabilität wurde mittels Elektrokardiogramms, Blutdruckmessung, Pulsoxymetrie und einer Rektalsonde zur Überprüfung der Thermometrie überwacht. Einem etwaigen Absinken der Körpertemperatur wurde durch körperwarmer Infusionslösungen gegengesteuert. Die Pulsoxymetrie wurde an der Schwanzspitze oder der Zunge vorsichtig angebracht. Die Überwachung des arteriellen Blutdrucks konnte über invasive Messungen nach Anlage der arteriellen Schleuse mit Hilfe eines Druckwandlersystems, welches auf Höhe des Herzens positioniert wurde, gewährleistet werden. Hierfür wurde der Nullabgleich gegen den atmosphärischen Druck ausgerichtet. Im Anschluss erfolgte die Überprüfung des Infusionssystems auf einen luftleeren Zustand, um einer Luftembolie im arteriellen Blutkreislauf vorzubeugen. Für die Aufzeichnung des 12-Kanal-EKGs wurden 10 Elektroden angebracht. Vier davon an den Gliedmaßen, sowie sechs im Bereich des Brustkorbs (V1-V6). Die Anbringung der Elektroden erfolgte nach folgendem Schema: Elektrode V 1: parasternal rechts auf Höhe des vierten Intercostalraums, Elektrode V 2: parasternal links auf Höhe des vierten Intercostalraums, Elektrode V 4: bildet den Schnittpunkt aus der linken Medioclavikularlinie und dem fünften Intercostalraum, V3: zwischen V2 und V4, Elektrode V5: an der vorderen Axillarlinie links auf Höhe des fünften Intercostalraums und schließlich Elektrode V6: an der mittleren Axillarlinie links auf Höhe des fünften Intercostalraums.

1.3.4. Anlage der Schleusen

Bevor die Schleusen angelegt wurden, wurde sichergestellt, dass die Fentanylverabreichung mittels Perfusor bereits für mindestens 5 Minuten gewährleistet war. Zur Überprüfung der Schmerzausschaltung wurde zusätzlich der Zwischenzehenreflex mit einer Klemme überprüft. Sofern dieser positiv war, wurde eine erneute Wartezeit von 5 Minuten eingeräumt und der Reflex erneut überprüft. Erst wenn dieser negativ war, wurde mit dem Eingriff begonnen. Außerdem wurde vor Benutzung aller Schleusen und Katheter überprüft, ob diese bereits mit heparinisierter physiologischer Kochsalzlösung luftleer gespült worden waren und dies gegebenenfalls nachgeholt (5000 IE unfraktioniertes Heparin in 500 ml 0,9%

Kochsalzlösung). Um die korrekte Lokalisation für die Schnittstelle zu detektieren, wurde der *Musculus sternocleidomastoideus* palpiert und die Region großzügig gesäubert, sowie mit Alkohol desinfiziert. Im Anschluss wurde die Hautinzision von ca. 4-5 cm Länge in der Medianen des Muskelfaserverlaufs horizontal mittels elektrischen Kauters gesetzt. Um zuerst die *Vena jugularis externa* frei zu präparieren, erwies es sich als hilfreich, den Muskel in Richtung medial zu schieben und sich stumpf mit Hilfe einer Klemme oder den Fingern bis zur Einsicht des Gefäßes vorzuarbeiten, bis sie von der sie umgebenden Faszie befreit war. Das Gewebe wurde vorsichtig seziert bis eine Einsicht auf die Adventitia der Vene gegeben war und das Gefäß kranial mit einem chirurgischen Faden ligiert werden konnte. Distal wurde das Gefäß ebenfalls mit einem Faden umschlungen und von einer Assistenz unter leichtem Ziehen angehoben, um einen möglichen Blutfluss zu unterbinden. Mit Hilfe einer Irisschere wurde dann eine 2-3 mm große Inzision gesetzt und mittels Führungsdraht die intravasale Einbringung überprüft. Sofern diese widerstandlos verlief, wurde die venöse Katheterschleuse (9F) unter leichtem Druck durch die Inzision in das Gefäß eingeführt. Die Einführhilfe, sowie der Führungsdraht wurden entfernt, der chirurgische Faden festgezogen und an der Schleusenhalterung fixiert. Im Anschluss wurde die intravaskuläre Lage der Schleuse mittels Aspiration überprüft und mit 0,9% NaCl nachgespült.

Zur Einführung der arteriellen Schleuse wurde der *Musculus sternocleidomastoideus* nach lateral verschoben, um das Pulsieren der *Arteria carotis interna* mit den Fingern palpieren zu können. In der Medianen wurde die Arterie vorsichtig stumpf freipräpariert mit besonderer Relevanz, den *Nervus vagus* nicht zu verletzen. Hierbei konnte ein Wundspreizer zum Einsatz kommen, um die tief liegende Arterie besser zu präparieren. Die arterielle Schleusenlegung (8F) erfolgte analog zu der venösen. Hier wurde ebenfalls die intravaskuläre Lage mittels Aspiration überprüft und nach erfolgter Blutprobe für die Blutgasmessung erfolgte eine Spülung mittels 0,9% NaCl-Lösung. Erst nach erfolgreicher Installation beider Schleusen erfolgte die prophylaktische Gabe von 5.000 IE unfractioniertem Heparin zur Vorbeugung von Thrombenbildung, welches stündlich erneut appliziert wurde. Die Blutgasanalyse ermöglichte die Kontrolle der Beatmungsparameter mit möglicher Anpassung in Folge. Des Weiteren wurde die Konzentration des Kaliumgehalts im Blut überprüft, um einer möglichen Elektrolytentgleisung mit resultierender Arrhythmie vorzubeugen. Bei Werten

unter 3,7 mmol/l wurden 40 mmol/l K^+ über die Infusionslösung substituiert und eine erneute Blutgasanalyse im Zeitraum von 20-30 min. zur Überwachung wiederholt.

1.3.5. Rechtsherzkatheteruntersuchung

Um die Druckbestimmung des Lungenkreislaufs zu ermöglichen, wurde ein Swan-Ganz-Katheter über die venöse Schleuse in einen Endast der Pulmonalarterie eingeschwenkt. Um dies ohne Komplikationen durchzuführen, wurde der Ballon, welcher an der Katheterspitze positioniert ist, aufgeblasen, was ein passives Einschwemmen des Katheters mit dem Blutfluss begünstigt. Die korrekte Lage in der *Arteria pulmonalis* wurde mittels Röntgenkontrolle überprüft. Im insufflierten Zustand wurde der sogenannte pulmonalarterielle Verschlussdruck gemessen (PCWP), welcher einer indirekten, linksatrialen Druckmessung entspricht. Dies lässt sich dadurch erklären, dass vom linken Vorhof bis zum Druckabnehmer des Katheters in der Pulmonalarterie eine stehende Flüssigkeitssäule entsteht, sofern die Mitralklappe geöffnet ist. Im Anschluss wurde die Luft im Ballon durch eine sich am Katheter befindliche Spritze abgezogen, was die Bestimmung des pulmonalarteriellen Drucks (PA) ermöglichte. Sofern diese Messung erfolgte, wurde der Katheter vorsichtig und unter Überwachung der Druckkurven zuerst in den rechten Ventrikel (RV) und darauffolgend in den rechten Vorhof (RA) zurückgezogen, wobei die Messungen der Drücke über die Druckkurven am Monitor erfasst wurden.

1.3.6. Messung der linksventrikulären Drücke (LVP und LVEDP)

Für die Messungen der linksventrikulären Drucke wurde in der Nähe des Sinusknotens im hohen rechten Atrium ein Stimulationskatheter platziert. Des Weiteren wurde ein Pigtailkatheter an das invasive Druckmesssystem angeschlossen und über die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt. Nach erfolgtem Nullabgleich und Spülen des Systems wurden die linksventrikulären Drücke sowohl im Ruhezustand (d.h. bei nicht stimulierter Herzfrequenz, ‚baseline‘) und unter elektrischer Stimulation bei 130/min. gemessen. Hierbei wurden jeweils die Werte des linksventrikulären systolischen Drucks (LVP), als auch die Werte des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) ermittelt.

1.3.7. Elektrophysiologische Untersuchung

Für die Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchung wurde der bereits

im hohen rechten Atrium platzierte Stimulationskatheter an seiner Position belassen. Auch das bereits angeschlossene 12-Kanal-EKG wurde zur Bestimmung der intrinsischen Zykluslänge weiterverwandt. Diese entspricht dem PP-Intervall, welcher die Zeit zwischen zwei atrialen Signalen darstellt. Um die Reizschwelle zu bestimmen, stimulierte man um ca. 20 bpm schneller als die Ruheherzfrequenz und reduzierte die Stimulationsspannung von Impuls zu Impuls. Dies wurde so lange fortgeführt bis im EKG keine Depolarisation (d.h. induzierte P-Welle) mehr erkenntlich war. Auf dieser Basis folgten diverse Stimulationstests, welche im Folgenden beschrieben werden. Alle folgenden Untersuchungen wurden bei doppelter Reizschwelle ausgeführt.

1.3.8. Sinusknotenerholungszeit (SNRT)

Die Sinusknotenerholungszeit definiert sich als jenes Intervall, welches zwischen der letzten Vorhoferregung (induziert durch einen Stimulus) und der ersten, durch den Sinusknoten autonom induzierten Depolarisation liegt. Um diese zu ermitteln, wurde jeweils eine Stimulation von 30 Sekunden mit der Basiszykluslänge von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms und 300 ms durchgeführt. Für jede Basiszykluslänge wurde eine zweifache Messung durchgeführt und der jeweilige Mittelwert bestimmt. Gemessen wurde die Dauer zwischen der letzten stimulationsinduzierten P-Welle und der ersten vom Sinusknoten induzierten Vorhofdepolarisation.

1.3.9. Bestimmung des Wenckebach-Punkts (WP)

Als Wenckebach-Punkt wird die Stimulations-Zykluslänge bezeichnet, bei welcher erstmalig keine 1:1 AV-Überleitung erfolgt. Dies wird durch den Ausfall des Kammerkomplexes während der Stimulation ersichtlich. Um diesen zu bestimmen, wurde mit einer kontinuierlich schneller werdenden Stimulationsfrequenz stimuliert.

1.3.10. Refraktärzeiten (AVERP und AERP)

Die atrioventrikuläre Refraktärzeit (AVERP) ist das längste Intervall zweier Impulse, bei welchem der zweite Impuls den Ventrikel nicht mehr erregt. Die Bestimmung der effektiven Refraktärzeit des AV-Knotens ergibt sich durch die Ankopplung eines verfrühten Extrastimulus an eine atrial stimulierte, festgelegte Sequenz, welche aus sieben Basisschlägen bei entsprechend unterschiedlichen Basiszykluslängen besteht (500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms und 300 ms). Das Ausbleiben des QRS-Komplexes nach dem letzten atrialen Stimulus ist somit das

Erkennungsmerkmal der effektiven Refraktärzeit des AV-Knotens. Somit entspricht die Zykluslänge des letzten vorzeitigen Stimulus, welcher noch eine Erregung auslösen konnte, der effektiven Refraktärperiode. Die effektive atriale Refraktärzeit (AERP) entspricht hingegen dem längsten Intervall zweier Impulse, bei welchem der Zweite den Vorhof nicht mehr stimuliert.

1.3.11. Burststimulation

In der Burststimulation wurde mittels 6-sekündiger Stimuli von 1200 bpm versucht, eine Arrhythmie auszulösen. Diese Impulse erfolgten rapide aufeinander folgend mittels Stimulationskatheter im hohen rechten Atrium. Die Stimulation erfolgte zehn Mal bei zweifacher Reizschwelle und zehn Mal bei vierfacher Reizschwelle. Als Erholungsintervall zwischen den Stimulationen galt eine Periode von 30 Sekunden. Sofern die Auslösung von Vorhofflimmern erfolgreich stattgefunden hatte, wurde diese bis zu 30 Minuten beobachtet, um eine eventuelle spontane Konversion in den Sinusrhythmus zu ermöglichen. Falls diese nicht erfolgte, wurde das, als persistierendes Vorhofflimmern interpretierte Geschehen, mittels externen Defibrillators in den Sinusrhythmus kardiovertiert (200 Joule, synchronisiert).

1.3.12. Herzentnahme

Nach abgeschlossener Untersuchung der Tiere erfolgte eine zusätzliche Bolusgabe Fentanyl (0,05-0,1 mg/kg i.v.) mit einer darauffolgenden Wartezeit von mindestens 10 Minuten. Vor der Thorakotomie wurde der Zwischenzehenreflex mit einer Klemme überprüft und erst sofern dieser ausblieb, erfolgte die Thorakothomie. Nachdem das Herz vom Perikard freigelegt wurde, wurde das Tier durch die Durchtrennung der *Vena cava caudalis* sofort entblutet. Nach der Herzentnahme wurden Gewebeproben aus sechs verschiedenen Herzregionen entnommen und für anschließende histologische und molekularbiologische Untersuchungen asserviert. Die Asservierung erfolgte in Histosetten, welche für ca. 24 h in 4% Formalinlösung gelagert wurden, bis sie anschließend in 70% Ethanol bei Raumtemperatur umgelagert wurden. Ebenfalls wurde für die Anfertigung von Kryostatschnitten das Gewebe mit wasserlöslichen Einbettmedium in Kryoeinbettformen auf Trockeneis gelagert, bis diese bei -80 °C asserviert wurden. Für molekularbiologische Untersuchung wurde das Gewebe in Kryoröhrchen gegeben und in Flüssigstickstoff versenkt, bis diese ebenfalls bei -80 °C asserviert wurden.

2. *In vitro*

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

AccuJet Pipette Brand, Wertheim
C1000 Touch Thermal Cycler, Bio-Rad, München
COP 30 Cooling Plate, Medite GmbH, Burgdorf
CryoCube F740hi, -80°C-Gefrierschrank, Eppendorf Deutschland GmbH, Hamburg
CryoStar™ NX70 Kryostat, Thermo-Fisher, München
Cryovial sterile 2ml, Simport, Bernard-Pilon, Quebec, Canada
Digitales Forschungsmikroskop DM6 B, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Eismaschine Ziegra, Isernhagen
FX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad, München
Gelrunner Power Pac 3000, Bio-Rad, München
Gelviewer GelDoc 2000, Bio-Rad, München
Kühlschrank KT1530, Liebherr-International Deutschland GmbH, Ulm
Magnetrührer IKAMAG-REO, IKA Labortechnik, Staufen
Mikrotom Microm HM 340E, Microm International GmbH, Neuss
Milli-Q Lab Water Advantage 10, Merck Chemicals, Darmstadt
Mini Rocker-Shaker PMR-30, Grant Instruments Ltd, Cambridge, UK
MiniSpin plus, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
NanoDrop™ 2000 Photometer, Thermo Fisher Scientific, München
Paraffin-Streckbad 1052 GFL, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
pH-Meter pH538, Sigma-Aldrich Corp., Burlington, Vermont, USA

Präzisionswaage EWJ, Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommen
Shandon Citadel 1000 Tissue Processor, Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA
Sterilbank Hera Safe, Heraeus Instruments, Hanau
Tissue-Tek TEC 5 Embedding Console, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Vortexgenie 2, Scientific industries, New York, USA
Waage Pioneer PA114C Ohaus, Pine Brook, Parsippany, New Jersey, USA
Zentrifuge 5430R, Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

2.1.2. cDNA und qPCR

10 mM dNTP Mix, PCR grade, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
iTaq Universal SYBR® Green Supermix, Applied Biosystems, Darmstadt
Random Hexamers, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RNaseOUT™ Ribonuclease Inhibitor, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SuperScript IV Reverse Transcriptase, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.3. Chemikalien

Biozym LE Agarose, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Borsäure ≥99,8%, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin (A2153), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
Chloroform ≥99%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt

DAPI, Hoechst 33342, Trihydrochloride (H3570), Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Carlsbad, California, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D1408), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Emprove® essential 2-Propanol 1L, Merck Millipore, Darmstadt
Ethanol absolut, vergällt, 5 Liter, CLN Chemikalien und Laborbedarf GmbH, Langenbach
Ethanol 96%, vergällt, CLN Chemikalien und Laborbedarf GmbH, Langenbach
Ethanol 70%, vergällt, CLN Chemikalien und Laborbedarf GmbH, Langenbach
Fluorescence Mounting Medium (S3023), Dako North America, Inc., USA
Formaldehyd-Lösung 4% neutralgepuffert, Mikrocoss GmbH, Garching
GeneRuler 50 bp DANN Ladder, Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Goldner Lösung I, 500 ml, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Goldner Lösung II, 500 ml, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Goldner Lösung III, 500 ml, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxylinlösung A nach Weigert, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxylinlösung B nach Weigert, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Normal Goat Serum (S26), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
Pertex, Medite GmbH, Burgdorf
RNAse-free water 50 ml, Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande
Sodium citrate tribasic dihydrate (C8532), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
Sybr®Safe DNA gel stain, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

TRIS Pufferan® ≥99,9%, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Tri-Sodium citrate dihydrate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
Triton-X100 (T8787), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
TRIzol™ Reagenz, Invitrogen™, Thermo Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA
TWEEN 20(P2287), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt
Xylol p.A., 2,5 Liter, Glasflasche, CLN Chemikalien und Laborbedarf GmbH, Langenbach

2.1.4. Antikörper

2.1.4.1. Primäre Antikörper

Anti-α-Actinin Antibody (A7811), Sigma-Aldrich, Darmstadt
Anti-active YAP1 antibody [EPR19812] (ab205270), Cambridge, UK
Vimentin polyclonal Antibody, (PA1-10003), Invitrogen™, Thermo Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA

2.1.4.1.1. Sekundäre Antikörper

Anti-mouse IgG (H+L), F(ab') ₂ Fragment (Alexa Fluor® 488 Conjugate) (4408S), Cell Signalling Technology Europe B.V., Danvers, Massachusetts, USA
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 647, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific GmbH, Waltham, Massachusetts, USA
Goat anti-Chicken IgY (H+L) Cross- Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor™ Plus 555(A32932) Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific GmbH, Walham, Massachusetts, USA

2.1.5. Sonstiges

Xylol p.A., 2,5 Liter, Glasflasche, CLN Chemikalien und Laborbedarf GmbH, Langenbach
Färbekasten ROTILABO, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Färbekammer StainTray, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Gelkammer Bio-Rad, München
London Pinzette, angled, serrated, 16 cm, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
Mikrotom Einmalklingen C35, PFM medical AG, Köln
Objektträgerhalter ROTILABO, Carl Roth GmbH + Co. KG, KarlsruheDeutschland
Objektträger Super Frost Plus, 75 x 25 mm, Wagner & Munz GmbH, Deutschland
Pinzel Rotmader Gr. 4, Wagner & Munz GmbH, München
Pipetten Eppendorf Research Plus, verschiedene Volumina, Eppendorf Deutschland GmbH, Hamburg
Pipettenspitzen epT.I.P.S., verschiedene Volumina, Eppendorf Deutschland GmbH, Hamburg
Präparatemappen mit Klappdeckel für 24 OT, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Super PAP Pen Liquid Blocker, Science Services, München

2.1.6. Zubereitete Lösungen**2.1.6.1. Wasch- Lösung**

1 x PBS	1000 ml
Tween 20	1 ml
BSA	5 g

2.1.6.2. Blocking- Lösung

Waschpuffer (s.o.)	4,5 ml
100% Goat Serum	0,5 ml

2.1.6.3. Elektrophoresegel

Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer (1x)	100 ml
Agarose	3 g
Sybr®Safe DNA gel stain	10 µl

2.1.6.4. Oligonukleotidprimer für RT-qPCR

ACTB Forward Primer	TCTGGCACCACACCTTCT
ACTB Reverse Primer	TGATCTGGGTCATCTTCTCAC
YAP Forward Primer	AACACTGGAGCAGGATGGCG
YAP Reverse Primer	CTGGGGTTCGAGGGACACTG
AREG Pig, PrimePCR SYBRGreen® Assay Bio-Rad (Assay ID: qSscCID0012065)	
TGFβ-1 Forward Primer	CTGGAAAGCGGCAACCAAAT
TGFβ-1 Reverse Primer	GCTCTGCCCCGAGAGAGCAATA
SMAD-3 Forward Primer	CCGATCGTGAAACGCCTGCT
SMAD-3 Reverse Primer	ACTCTTGACCGCCTTCTCGC
COL1A1 Forward Primer	ACCTCAAGATGTGCCACTCC
COL1A1 Reverse Primer	CCTGTCTCCATGTTGCAGAA
FN-1 Forward Primer	TTCATGTCATCCCGTGGGCA
FN-1 Reverse Primer	GACCCGTCAAGGTGGCACTA
MMP2 Forward Primer	CTTTGATGGCAAGGACGGGC

MMP2 Reverse Primer	TCACACGCACCACTTGTCTCT
CCN2 Forward Primer	GTCAGGCCTTGTGAAGCTGA
CCN2 Reverse Primer	GCCCGGTATGTCTTCACACT
PAI-1 Forward Primer	TGCTGTGTGTGAGCAGTGGA
PAI-1 Reverse Primer	TGGTCTGCATGCCGTAACCT
MIF Forward Primer	CGCAGAACCGTTCCTACAGC
MIF Reverse Primer	CAGGCCGAGAGCAAAGGAGT
CCL2 Forward Primer	TTCTGCACCCAGGTCCTTGC
CCL2 Reverse Primer	CAGATCTCCTTGCCCGCGAT

2.1.6.5. Software

EndNote 20.0.1, Clarivate Analytics Deutschland GmbH
Fiji ImageJ-win64, Wayne Rasband and contributors, nat. Institutes of Health, USA
GraphPad Prism Version 9.2.0.322, GraphPad Software Inc. La Jolla, USA
Micorsoft Office Professional Plus 2019, Redmond, Wahingston, USA
SlideViewer 2.60 3D Histech, l ltd; Budapest, Ungarn
QuPath 0.3.2., The Queen's University of Belfast, Northern Ireland & The University of Edinburgh

2.2. Methoden

2.2.1. Histologie

2.2.1.1. Masson-Goldner-Trichrom Färbung

Wie zuvor beschrieben erfolgte nach der Herzentnahme die Probenentnahme, sowie ihre Prozessierung und Asservierung aus sechs verschiedenen Herzregionen, dem linken und rechten Atrium, dem linken und rechten Herzohr und dem linken und

rechten Ventrikel. Jene Proben wurden zur Weiterverarbeitung und Aufbereitung in Histosetten gegeben und vorerst für 24 h in 4% Formalinlösung bei Raumtemperatur fixiert, bis sie daraufhin in 70% Ethanol asserviert wurden. Mit Hilfe eines Karussell-Gewebe-Einbett-Automaten erfolgte die Entwässerung der Gewebeproben, welche durch eine aufsteigende Alkoholreihe, sowie der Durchmischung mit Xylol durchgeführt wurde. Um das Gewebe für die Weiterverarbeitung in Blöcke spannen zu können, wurden die Gewebeproben in Paraffin gegossen, anschließend gekühlt und trocken gelagert. Für die Verarbeitung der Paraffinblöcke zu histologischen Schnitten, wurden diese zuerst auf einer Kühlplatte gekühlt und daraufhin in das Mikrotom eingespannt, wo sie bei 4,5 µm Dicke geschnitten wurden. Diese Schnitte wurden vorsichtig auf die Oberfläche eines ca. 35-40 °C warmen Wasserbades gebettet, auf gläserne Objektträger übertragen und anschließend getrocknet. Als geeignete Methode für die Quantifizierung der interstitiellen Fibrose wurde die Färbung nach Masson-Goldner-Trichrom gewählt und die entsprechenden sechs Herzregionen nach diesem Schema histologisch verarbeitet. Hierfür wurden jeweils zwölf Objektträger in einer Objektträgerhalterung fixiert und die benötigten Chemikalien in dafür vorgesehene Färbekammern gefüllt. Der erste Schritt der Entparaffinierung wurde folgendermaßen durchgeführt:

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

Im Anschluss erfolgte die Masson-Goldner-Trichrom-Färbung nach dem folgenden angefertigten Protokoll:

1. Eisenhämatoxylin	3 Minuten
---------------------	-----------

2. Bläuen in Leitungswasser	15 Minuten
3. Goldner Lösung I	9 Minuten
4. Waschen in 1% Essigsäure	30 Sekunden
5. Goldner Lösung II	4 Minuten
6. Waschen in 1% Essigsäure	30 Sekunden
7. Goldner Lösung III	4 Minuten
Waschen in 1% Essigsäure	3 Minuten

Der erste Schritt stellte eine dreiminütige Färbung in Weigerts Eisenhämatoxylin (1:1 Gemisch aus der jeweiligen Lösung A & B). Daraufhin wurden die Objektträger 15 Minuten mit Leitungswasser bewässert. Es folgte die neunminütige Färbung mit Goldner-Lösung 1 (Ponceau-Säurefuchsin) mit einem anschließenden Waschschrift in einprozentiger Essigsäure für ca. 30 Sekunden. Im Anschluss wurden die Objektträger für ca. 4 Minuten in der Goldner Lösung II (Phosphorwolframsäure-Orange G) inkubiert, woraufhin ebenfalls ein 30-sekündiger Waschschrift mit einprozentiger Essigsäure folgte. Im letzten Schritt wurden die Proben in die Goldner-Lösung II (Lichtgrün SF) übertragen und nach 4 Minuten Inkubation für 3 Minuten auf einem Mini Rocker Shaker in einprozentiger Essigsäure gewaschen. Nach Beendigung der Färbungsreihe wurden die histologischen Schnitte durch folgende Rückreihe dehydriert:

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

Zur Fertigstellung der histologischen Präparate wurden die Proben aus den Probenhaltern genommen, mit einem Mounting Medium und einem Deckglas versehen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.1.2. Immunfluoreszenzfärbung

Ebenfalls wurden bei der Herzentnahme ca. 1,5 cm große Gewebestücke in Einbetttschälchen verbracht und mit Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound bedeckt, um Gefrierschäden vorzubeugen. Im Anschluss wurden diese auf Trockeneis gelagert und in einem -80°C-Gefrierschrank asserviert. Diese Proben wurden für die Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe eines Kryostats bei ca. -18°C in ca. 12 µm dünne Scheiben geschnitten, vorsichtig auf gläserne Objektträger übertragen und in einer Dunkelfärbekammer gelagert. Hier wurden die Gewebeschnitte mit einem Liquid-Blocker-Pen kreisrund umzogen und anschließend mit einer vierprozentigen Formaldehydlösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Daraufhin wurden die Gewebeschnitte insgesamt zwei Mal mit der angefertigten Waschlösung für jeweils 5 Minuten mit Hilfe eines Mini Rocker Shakers gewaschen. Für die Permeabilisierung der Schnitte wurde ein Gemisch aus Triton X-100 0,5 % und 1x PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung) für 10 Minuten auf die Objektträger aufgetragen und im Anschluss dreimal erneut mit 1x PBS gewaschen.

1. Wasch-Lösung	5 Minuten
2. Wasch-Lösung	5 Minuten
3. Triton X-100 in 1x PBS	10 Minuten
4. Waschen in 1x PBS	10 Minuten
5. Waschen in 1x PBS	5 Minuten
6. Waschen in 1x PBS	5 Minuten

Im Anschluss wurden die Gewebeschnitte mit der Block-Lösung für eine Stunde geblockt, wobei ein Ziegenserum verwendet wurde. Daraufhin wurde die noch vorhandene Flüssigkeit vorsichtig abgeklopft und eine entsprechende Konzentration aus Blocking-Lösung und den primären Antikörpern für Anti-α-

Actinin (1:200), Anti-Yap-1: (1:200) und Vimentin (1:300) verwendet. Hierbei wurden ca. 50 µl pro Gewebeschnitt aufgetragen, wobei gegebenenfalls noch einmal der Rand mit dem Liquid-Blocker-Pen umkreist wurde. Die Inkubation der primären Antikörper erfolgte über Nacht bei ca. 4°C. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger dreimal mit der Wasch-Lösung gewaschen und die angefallene überschüssige Flüssigkeit durch vorsichtiges Abklopfen auf ein saugstarkes Tuch entfernt. Im Anschluss wurden die sekundären Antikörper Goat anti-mouse Alexa fluor 488 (1:300), Goat anti-rabbit Alexa Fluor 647 (1:300) und Goat anti-chicken Alexa fluor 555 (1:500) auf die Objektträger aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Da diese Durchführung eine lichtarme Umgebung erfordert, wurde die Inkubation in einer lichtundurchlässigen Färbekammer vollzogen. Um eine Schädigung der Färbungen zu vermeiden, wurde deshalb ab diesem Zeitpunkt eine lichtarme Arbeit vollzogen. Um die Zellkerne darzustellen, erfolgte die Anfärbung mittels DAPI (1:1000). Daraufhin wurde erneut ein dreimaliger Waschschrift vollzogen, bevor die somit entstandenen Objektträger mit einem Tropfen Fluorescence Mounting Medium beträufelt und mit einem Deckglas versiegelt wurden. Die Lagerung erfolgte in Dunkelheit bei ca. 4°C.

1. Blocking-Lösung	60 Minuten
2. Auftragen der primären Antikörper	über Nacht
3. Wasch-Lösung 1	5 Minuten
4. Waschpuffer-Lösung 2	5 Minuten
5: Wasch-Lösung 3	5 Minuten
6. Auftragen der sekundären Antikörper	60 Minuten
7. Auftragen von DAPI	10 Minuten
8. Wasch-Lösung 1	5 Minuten
9. Wasch-Lösung 2	5 Minuten
10. Wasch-Lösung 3	5 Minuten

2.2.1.3. Mikroskopie

Die Bildgewinnung beider Färbungen erfolgte durch das Leica DM6 B Mikroskop. Für die Auswertung der Masson-Trichrom-Färbungen erfolgte eine Übersichtsaufnahme in 5-facher Vergrößerung, sowie die Gewinnung von jeweils 10 repräsentativen und nicht-überlappenden Gesichtsfeldern in 40-facher Vergrößerung pro Region (LV, LAFW, LAA, RV, RAFW, RAA) und Tier mit anschließender digitaler Speicherung. Die Auswertung der entstandenen Brightfield-Bilder erfolgte verblindet mittels QuPath 0.3.2.-Software. Die Fibroseareale wurden für den Messvorgang markiert und als relativer Anteil an der Gesamtpixelzahl des jeweiligen Bildes prozentual angegeben. Gefäße, perivaskuläres Gewebe und Risse im Gewebe wurden von der Gesamtpixelzahl abgezogen und somit nicht bewertet. Die entstandenen Werte wurden in einer Excel-Tabelle zusammengefasst und im Anschluss die jeweiligen Mittelwerte mit der Standardabweichung berechnet. Für die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbung wurden 5 repräsentative Gesichtsfelder pro Region (LV, LAFW, RV, RAFW) und Tier bei ebenfalls 40-facher Vergrößerung generiert und digital gespeichert. Im Anschluss wurde die Gesamtzahl aller vorhandenen Zellkerne, welche durch DAPI angefärbt wurden, mittels QuPath-Software gezählt. Nachdem die Bilder mit der Fiji ImageJ-win64- Software zusammengefügt und bearbeitet wurden, erfolgte die Differenzierung jener Zellkerne, welche weder als Fibroblasten noch als Kardiomyozyten gewertet werden konnten. Diese wurden von der Gesamtzellkernzahl abgezogen. Im Anschluss erfolgte die Auszählung aller Fibroblastenzellkerne, welche von der Gesamtzellkernzahl abgezogen wurden und somit die Anzahl der Kardiomyozytenzellkerne ergab. Daraufhin wurden alle Zellkerne gezählt, welche eine rote Anfärbung im Zellkern aufwiesen und somit als intranukleäres YAP gewertet wurden. Hierbei wurde differenziert, ob es sich um Fibroblasten- oder Kardiomyozytenzellkerne handelte. In einer tabellarischen Excel-Darstellung wurde die Anzahl der YAP-positiven Zellkerne des entsprechenden Zelltyps mit der Anzahl der Gesamtzellkernzahl des jeweiligen Zelltyps in ein Verhältnis gebracht und prozentual dargestellt. Ein Mittelwert, sowie die Standardabweichung der entstandenen Bilder wurde hiermit errechnet.

2.2.2. Genexpressionsanalyse

2.2.2.1. RNA-Isolation

Bei der Herzentnahme wurde für die Weiterverarbeitung der Proben sowohl aus den Ventrikeln, als auch aus den Atrien Gewebe in Kryotubes verbracht und in Stickstoff schockgefroren. Diese Proben wurden bei -80°C asserviert und in diesem Fall für die Isolation der RNA verwendet. Hierfür wurde das gefrorene Gewebe fest mit Alufolie umschlossen und wiederholt in Flüssigstickstoff getaucht. Um ein ca. 50-100 mg schweres Gewebestück zu erhalten, diente ein Hammer zur Zerkleinerung. Dieses gefrorene Probenstück wurde vorsichtig grobpulvrig zerschlagen und im Anschluss in ein Reaktionsgefäß mit einem Milliliter Trizol gegeben. Im Anschluss wurde es leicht geschwenkt und inkubiert für ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur. Diesem Schritt folgte die Zugabe von 0,2 ml Chloroform, wodurch sich das Gemisch unter leichtem Schwenken zu einer homogenen Flüssigkeit von rosa Farbe entwickelte und erneut für 3 Minuten inkubiert wurde. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei $12.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Die entstandene flüssige Phase der jeweiligen Probe wurde in ein neues Probengefäß pipettiert und 0,5 ml Isopropanol hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde das Reaktionsgemisch erneut bei $12.000 \times g$ für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in 1 ml 75%-Ethanol resuspendiert. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei $7.500 \times g$ für 5 Minuten bei 4°C . Nachdem der Überstand entnommen wurde, trocknete das RNA-Pellet für fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur. Im letzten Schritt wurde das entstandene RNA-Pellet mit 50 μl RNase-freiem Wasser resuspendiert und für ca. 15 Minuten bei 56°C inkubiert. Mittels NanoDrop™ wurde das Verhältnis der optischen Dichte 260/280 nm photometrisch bestimmt, wobei ein Qualitätsrichtwert von $> 1,6$ galt. Die isolierte RNA wurde auf 100 ng/ μl verdünnt und die Proben bei -80°C asserviert.

2.2.2.2. Synthese der cDNA

Um aus der zuvor gewonnenen RNA die entsprechende cDNA zu synthetisieren, wurde das SuperScript IV Reverse Transcriptase Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 20 μl und wurde folgendermaßen pipettiert:

50 µl Random Hexamers	1 µl
10nM dNTP Mix	1 µl
DNase-freies Wasser	1 µl
RNA-Template (50 ng/ µl)	10 µl

Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde der Ansatz vermischt und kurz zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Gemisch für fünf Minuten bei 65°C erhitzt und darauffolgend eine Minute lang auf Eis inkubiert. Vor der Nutzung des 5 x SSIV Puffers wurde dieser kurz zentrifugiert und mit folgenden Reagenzien in einem neuen Probengefäß zusammengefügt:

5 x SSIV Puffer	4 µl
100 mM DTT	1 µl
Recombinant RNase Inhibitor	1 µl
SuperScript™ IV Reverse Transcriptase	1 µl

Das Probengefäß wurde im Anschluss erneut zentrifugiert und dem RNA-Ansatz beigefügt. Die Transkription im Thermocycler wurde nach einem vorgeschriebenen Programm durchgeführt. Hierbei wurde die Probe für 10 Minuten bei 23°C, danach für 10 Minuten bei 55°C und zuletzt bei 80°C inkubiert. Die Lagerung der entstandenen cDNA erfolgte bei -80°C.

2.2.2.3. Primertest

Die ausgewählten Primer wurden unter Nutzung des Primer-BLAST Onlinetools designiert (Ye et al., 2012). Zur Testung erfolgte zuerst eine Temperaturgradienten-PCR mit SYBRGreen®. Für jedes Primerpaar wurde folgender Mastermix zubereitet:

	1 x
iTaq Universal SYBRGreen® Supermix	5 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl

Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l
RNase-freies Wasser	2 μ l
cDNA-Template (50 ng/ μ l)	1 μ l/Well
Gesamt	10 μ l

Zur Anfertigung des Mastermixes wurden zunächst die benötigten Komponenten auf Eis gelagert und langsam aufgetaut, wobei die Weiterverarbeitung unter stetiger Kühlung stattfand. Der Mastermix jedes Primerpaares wurde mit einer Test-cDNA jeweils vertikal in eine Spalte der 96-Well Platte pipettiert, mit Ausnahme der ersten Zeile, welche die NoTemplate-Kontrolle darstellte. Die Platte wurde mit Folie versiegelt und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden am Thermocycler von Bio-Rad in folgendem Programm verarbeitet:

- | | | | |
|---------------------------|------------|-----------|-------------|
| 1. Polymerasenaktivierung | • 95 °C | | } 40 Zyklen |
| 2. DNA- Denaturierung | • 95 °C | • 2 Min. | |
| 3. Gradient | • 55-65°C | • 15 Sek. | |
| 4. Schmelzkurvenanalyse | • 65-95 °C | • 1 Min. | |
- Erhöhung der Temperatur um 0,5 für fünf Sekunden pro Schritt

Vor Anfertigung des Gels, wurde die Platte erneut zentrifugiert und die Proben in den Wells mit jeweils 2 μ l 6x Loading Dye vermischt. Im Anschluss wurde ein PCR-DNA-Ladder hergestellt, durch dessen Auftragen die Fragmentlängen der PCR-Produkte bestimmt werden konnten.

	1 x
Ladder 50 bp	2 μ l
6x Loading Dye	3 μ l
DNase-freies Wasser	1 μ l

Der DNA-Ladder wurde zusammen mit den Produkten aus den Wells auf das Agarosegel aufgetragen und für 60 Minuten bei 120 V aufgetrennt. Das durchgelaufene Gel wurde im Anschluss unter UV-Licht positioniert und fotografiert. Somit konnte die Bandenhöhe mit der zu erwartenden Amplikonlänge

des Primerpaares verglichen werden. Auch die Gestalt der Banden wurde zur Qualitätssicherung berücksichtigt und Paare mit Doppelbanden aus der Auswahl ausgeschlossen. Im Anschluss wurde für die gewählten Primerpaare anhand der Schmelzkurve die optimale Annealing-Temperatur identifiziert. Zur weiteren Überprüfung der Primerpaare wurde eine cDNA-Standard-Verdünnungsreihe in acht Stufen mit jeweils einer aus LV, LAFW, RV oder RAFEW isolierten cDNA NA vorbereitet.

Standard 1	25 ng/μl
Standard 2	12,5 ng/μl
Standard 3	6,25 ng/μl
Standard 4	3,12 ng/μl
Standard 5	1,56 ng/μl
Standard 6	0,78 ng/μl
Standard 7	0,38 ng/μl
Standard 8	0,16 ng/μl

Anschließend wurde die qPCR in einer 96-Well-Platte in Triplikaten nach dem folgenden Ansatz pipettiert:

	1 x
iTaq Universal SYBRGreen® Supermix	5 μl
Forward Primer (10 μM)	1 μl
Reverse Primer (10 μM)	1 μl
RNase-freies Wasser	2 μl
cDNA Template (50 ng/μl)	1μl/Well
Gesamt	10μl

Nach Fertigstellung wurde die Platte mit einer Folie versiegelt und zentrifugiert. Das Programm des Thermocycler wurde wie folgt eingestellt:

- | | | | | |
|---------------------------|------------|-----------|-------------|--|
| 1. Polymerasenaktivierung | • 95 °C | | | |
| 2. DNA- Denaturierung | • 95 °C | • 2 Min. | } 40 Zyklen | |
| 3. Annealing | • 59-64°C | • 15 Sek. | | |
| 4. Schmelzkurvenanalyse | • 65-95 °C | • 1 Min. | | |

Erhöhung der Temperatur um 0,5 für fünf Sekunden pro Schritt

Anhand der Temperaturgradienten wurde die geeignete Annealing-Temperatur der Primerpaare eingestellt. Bei einer optimalen qPCR-Reaktion ist in der Schmelzkurve nur ein deutlicher Peak ersichtlich. Durch dieses Merkmal ließen sich spezifische PCR-Produkte von anderen Produkten wie zum Beispiel Primer-Dimeren unterscheiden, welche für gewöhnlich einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen. Für unspezifische Amplifikationen können die Schmelzpunkte hingegen unter- oder oberhalb des Peaks liegen. Eine sich aus der Standardreihe ergebende Effizienz von 90-115%, einem Bestimmtheitsmaß von >90%, sowie eine positive Analyse der Schmelzkurve und einem passenden Fragment in der Elektrophorese wurde als hinreichender Beweis für die Funktionalität eines Primerpaares gewertet.

2.2.2.4. Realtime qPCR

Die quantitative Realtime-PCR der Zielgene erfolgte ebenfalls mittels SYBRGreen® von Bio-Rad. SYBRGreen® ist ein Cyanidfarbstoff, welcher an doppelsträngige DNA bindet. Bei Komplexbildung emittiert er ein grünes Licht von 521 nm Wellenlänge. Nach jedem Zyklus der PCR wird die Emission des grünen Lichts direkt proportional zur synthetisierten Menge der DNA gesteigert und gemessen. Der Mastermix von Bio-Rad beinhaltet ebenfalls eine Taq-Polymerase mit 5'→3'-Polymeraseaktivität, sowie alle erforderlichen Puffer, Stabilisatoren und qPCR geeignete dNTPs. Unter sterilen Bedingungen wurden Triplikate in eine 96-Well-Platte pipettiert, was folgendermaßen für die qPCR durchgeführt wurde:

	1 x	100x
iTaq Universal SYBRGreen® Supermix	5 µl	500 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl	100 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl	100 µl
RNase-freies Wasser	2 µl	200 µl

cDNA Template (50 ng/μl)	1μl/Well	100 μl
Gesamt	10μl	

Nach Fertigstellung wurde die Platte versiegelt und kurz zentrifugiert. Das Programm des Real-Time Thermocyclers wurde wie folgt eingestellt:

- | | | | |
|---------------------------|------------|-----------|-------------|
| 1. Polymerasenaktivierung | • 95 °C | | } 40 Zyklen |
| 2. DNA- Denaturierung | • 95 °C | • 2 Min. | |
| 3. Annealing/Plate Read | • Ideal°C | • 15 Sek. | |
| 4. Schmelzkurvenanalyse | • 65-95 °C | • 1 Min. | |
- Erhöhung der Temperatur um 0,5 für fünf Sekunden pro Schritt

Die Ergebnisse der NoTemplate-Kontrollen waren für die untersuchten Proben und das Housekeeping-Gen negativ. Die relative Quantifizierung mittels $\Delta\Delta Ct$ -Methode wurde als Quantifizierungsmethode verwendet. Hierbei wird die Expression der Zielgene mit der Expression eines nicht regulierten Housekeeping-Gens normalisiert (Rasmussen, 2001). Somit entsteht ein Bezug aus der Genexpression des Zielgens auf ein ubiquitär und homogen exprimiertes Gen. In dieser Arbeit wurde die Expression der Zielgene auf die Expression von Beta-Aktin (ACTB) angewandt. Dieses kodiert für eines der 6 Aktinformen und gilt als etabliertes Housekeeping-Gen (Nygard et al., 2007). Für die Berechnung der Expressionsunterschiede wurde für jede Probe der Ct-Wert (Cycle Threshold) von ACTB vom Ct-Wert des Zielgens abgezogen ($\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ ACTB}$). Daraufhin wurde der ΔCt -Wert aus der Kontrollgruppe vom ΔCt -Wert aus der Diabetesgruppe (INS^{C94Y}) bzw. der ΔCt -Wert aus der Diabetesgruppe (INS^{C94Y}) vom ΔCt -Wert aus der Diabetesgruppe mit Dapagliflozin-Therapie ($INS^{C94Y+Dapa}$) subtrahiert ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ } INS^{C94Y} - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$; bzw. $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ } INS^{C94Y+Dapa} - \Delta Ct \text{ } INS^{C94Y}$). Der relative Expressionsunterschied (Ratio) einer Probe zwischen der Diabetesgruppe und der Kontrolle, bzw. zwischen der Diabetesgruppe ohne und mit Therapie, normalisiert zum Housekeeping-Gen, bezogen auf eine Standardprobe, woraus sich die arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ergibt (Livak et al., 2001).

Zur Qualitätssicherung sollte beachtet werden, dass der Cq Standard Deviation-Wert der Triplikate bei $\leq 0,5$ liegt.

2.2.2.5. Statistik

Für die grafische Präsentation wurde der Mittelwert $\pm$ Standardfehler (SEM) verwendet. Die Standardabweichung der Stichprobe wird hierfür durch die Wurzel der Stichprobengröße n geteilt. Die Berechnung erfolgte durch GraphPad Prism Version 8.0.1 und Microsoft Excel. Zum Vergleich zweier unpaarer Gruppen wurde der Mann-Whitney-Test und für den Vergleich zweier kategorialer Variablen der Chi-Square-Test angewandt. Die Korrelationsanalyse basierte auf Bestimmung des Bravais-Pearson'schen Korrelationskoeffizienten. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant bezeichnet (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$; **** $< 0,0001$).

IV. ERGEBNISSE

1. Vergleichende Darstellung zwischen Wildtyp- und *INS*^{C94Y}-Schweinen ohne Therapie

1.1. *In vivo* Ergebnisse von Wildtyp- und *INS*^{C94Y}-Schweinen

Zur Charakterisierung von Wildtyp (WT)- und Diabetesschweinen (DM oder C94Y) wurden fünf verschiedene klinische Parameter erhoben. Diese dienten der Darstellung des Nüchternblutglukosespiegels, des Kaliumspiegels, des Körpergewichts, des Herzgewichts und des Herz-Körpergewichtverhältnisses.

Bei jedem Tier wurde zu Beginn des Eingriffs der Nüchternblutglukosespiegel gemessen, welcher bei den Wildtyptieren einen Durchschnittswert von $105,3 \pm 12,78$ mg/dl ergab. Dieser war bei den Diabetes-Tieren mit $352,9 \pm 81,18$ mg/dl signifikant erhöht (**** $p < 0,0001$; **Abb. 9A**).

Ebenfalls wurde der Kaliumspiegel im arteriellen Blut erhoben, welcher sich zwischen Wildtyptieren ($3,61 \pm 0,31$ mmol/l) und den Diabetes-Tieren ($3,75 \pm 0,30$ mmol/l) nicht signifikant unterschied (**Abb. 9B**).

Alle Tiere wurden im Zeitraum von 1-3 Tagen vor dem Eingriff gewogen, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypschweinen ($82,37 \pm 14,23$ kg) und den leichteren Diabetesschweinen ($56,74 \pm 10,02$ kg) zu erkennen war (**** $p < 0,0001$; **Abb. 9C**).

Nach schmerzfreier Euthanasie wurden die Herzen der Tiere entnommen und gewogen. Hierbei ließ sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Wildtypen ($291,2 \pm 56,39$ g) und Diabetikern ($204,5 \pm 49,63$ g) feststellen (**** $p < 0,0001$; **Abb. 9D**). In diesem Zusammenhang wurde auch das Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht bestimmt, welches keinen signifikanten Unterschied aufwies (WT: $3,56 \pm 0,48$ und C94Y: $3,60 \pm 0,48$; $p = 0,8770$; **Abb. 9E**).

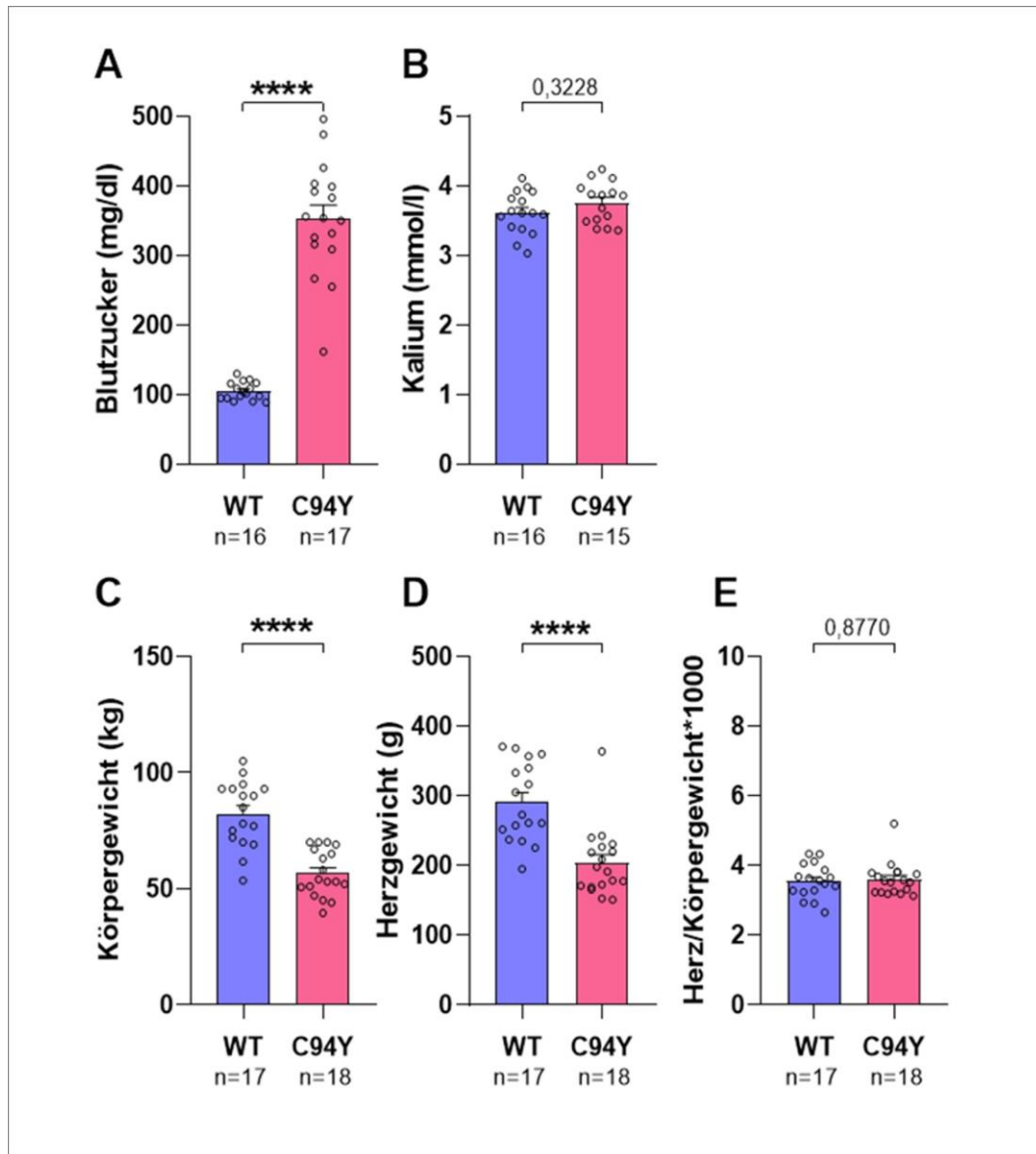


Abb. 9. Vergleich von Blutglukose (A), Kaliumspiegel im Blut (B), Körpergewicht (C), sowie Herzgewicht (D) und dem Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht (E) in Wildtyp (WT)- und Diabetesschweinen (C94Y); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

1.1.1. Hämodynamik

Der Blutdruck wurde in beiden Gruppen invasiv gemessen. Sowohl die systolischen (WT: $99,25 \pm 11,60$ mmHg; C94Y: $87,22 \pm 10,06$ mmHg; $**p=0,0029$; **Abb. 10A**), als auch die diastolischen Werte (WT: $53,44 \pm 8,63$ mmHg; C94Y: $46,11 \pm 9,78$ mmHg; $*p=0,0124$; **Abb. 10 B**) zeigten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

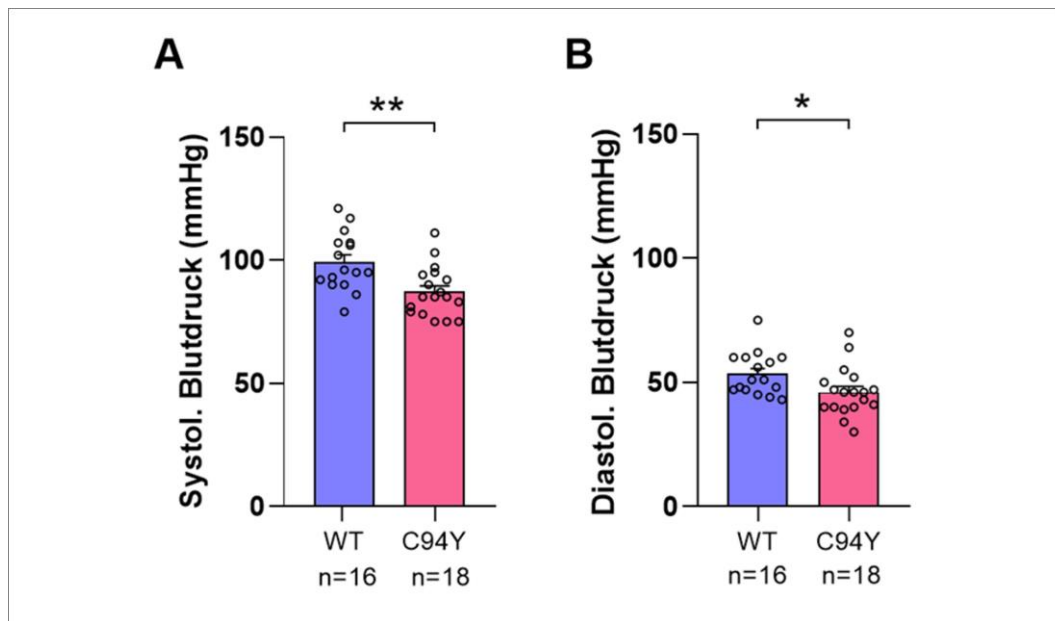


Abb. 10. Systolische ((A) systol. BD) und diastolische ((B) diastol. BD) Blutdruckmessung in Wildtyp (WT) - und Diabetesschweinen (C94Y); $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

Im Anschluss wurde eine Links- und Rechtsherzkatheterisierung durchgeführt. Die Untersuchung des linken Herzens erfolgte sowohl in Ruhe (baseline; BL), als auch während der Schrittmacherstimulation (130/min.). Diese Stimulation dient der adäquaten Vergleichbarkeit unabhängig von der intrinsischen Herzfrequenz eines jeden Tieres. Die Messungen des linksventrikulären Drucks (**LVP BL** WT: $110,3 \pm 16,87$ mmHg im Vergleich zu C94Y: $97,72 \pm 11,79$ mmHg, $*p=0,0179$ und **LVP 130** WT: $130,2 \pm 14,46$ mmHg im Vergleich zu C94Y: $114,4 \pm 15,20$ mmHg, $**p=0,007$; **Abb. 11**) zeigten signifikante Unterschiede. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck, welcher Auskunft über die Vordehnung des Ventrikels liefert, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtypen und Diabetikern (**LVEDP BL** WT: $10,69 \pm 1,6$ mmHg im Vergleich zu C94Y: $12,83 \pm 4,68$ mmHg, $p=0,3916$ und **LVEDP 130** WT: $15,62 \pm 4,09$ mmHg im Vergleich zu C94Y: $15,5 \pm 4,69$ mmHg, $p=0,9764$; **Abb. 11**). Bei den Messungen des rechten Herzens konnte beim rechtsatrialen Druck (**RAP** WT: $10,77 \pm 2,09$ mmHg versus C94Y: $11,06 \pm 2,98$ mmHg, $p=0,8815$) kein signifikanter Unterschied

dargestellt werden. Dieser zeigte sich jedoch bei der Messung des rechtsventrikulären Drucks (**RVP** WT: $27,54 \pm 3,55$ mmHg im Vergleich zu C94Y: $24,39 \pm 4,39$ mmHg, $*p=0,0488$; **Abb. 11**). Bei den Messungen des pulmonalarteriellen Drucks (**PAP** WT: $23,23 \pm 2,49$ mmHg; versus C94Y: $22,17 \pm 3,18$ mmHg, $p=0,3047$; **Abb. 11**) sowie des Lungenkapillarenverschlussdrucks (**PCWP** WT: $15,77 \pm 2,2$ mmHg; versus C94Y: $15,83 \pm 4,29$ mmHg, $p=0,9772$; **Abb. 11**), als auch dem Aortendruck (**AoP** WT: $87,31 \pm 8,73$ mmHg; versus C94Y: $83,07 \pm 14,98$ mmHg, $p=0,1973$; **Abb. 11**) waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen.

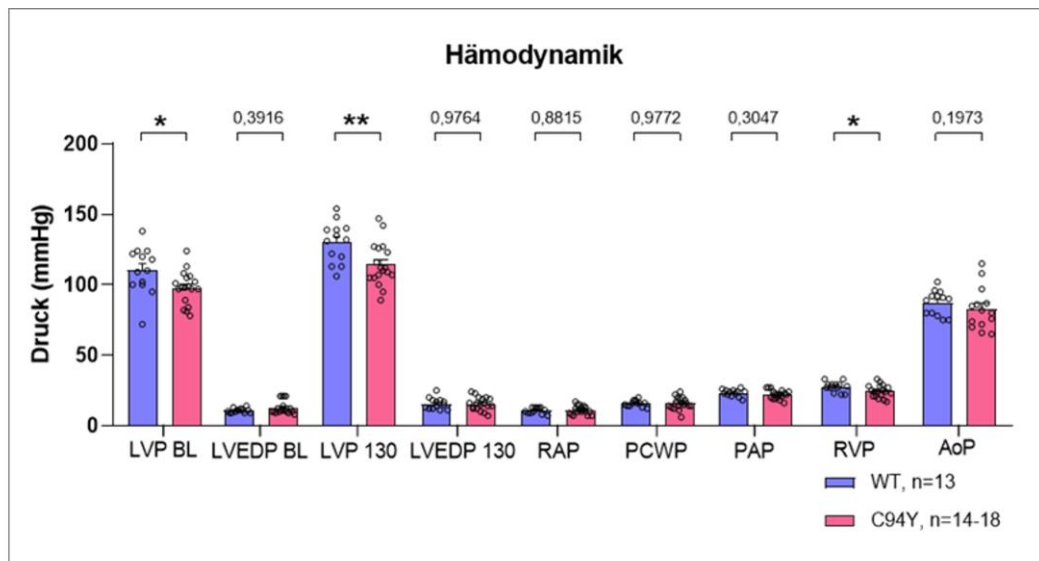


Abb. 11. Hämodynamische Messungen des linken und rechten Herzens in Wildtyp (WT)- und Diabetesschweinen (C94Y); $*p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

1.1.2. Elektrokardiogramm (EKG)

Mittels eines 12-Kanal-EKGs wurde die durchschnittliche Herzfrequenz bestimmt, welche sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschied. Sie betrug in der Wildtypgruppe $80,65 \pm 29,32$ bpm und in der Gruppe der Diabetestiere $70,78 \pm 14,96$ bpm ($p=0,5622$; **Abb. 12**).

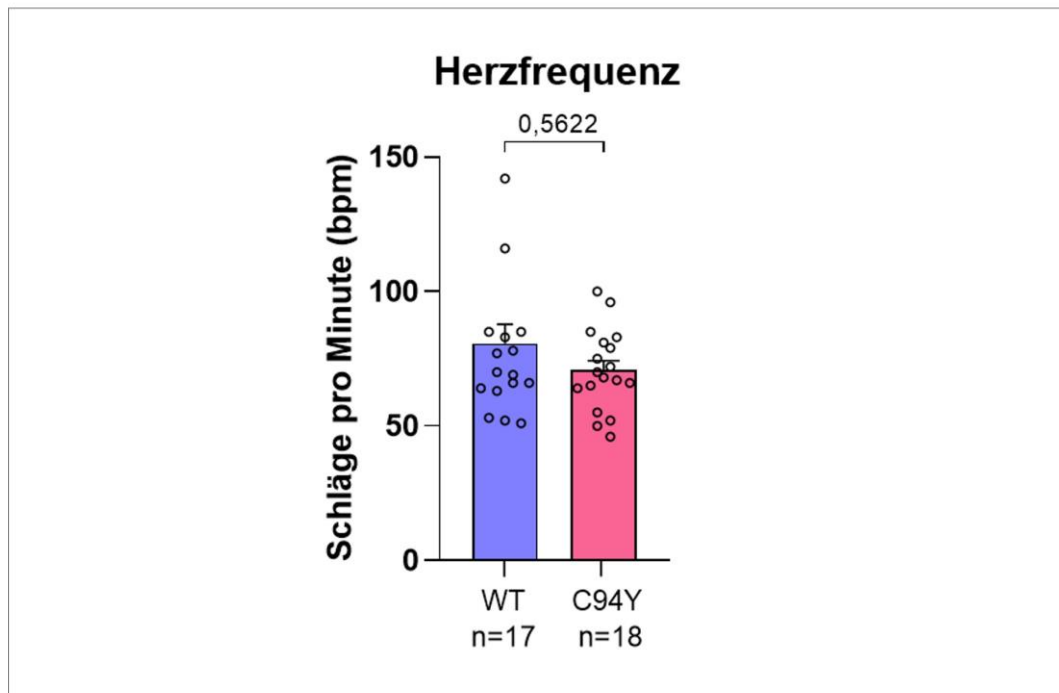


Abb. 12. Messung der Herzfrequenz mittels 12-Kanal-EKG in Wildtyp (WT)- und Diabetesschweinen (C94Y); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

Darüber hinaus zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den gemessenen EKG-Parametern P-Wellendauer, PR-Intervall, QT- sowie frequenzkorrigierte QT (QTc)-Zeit (**Abb. 13**) Allerdings zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der QRS-Dauer, die bei Diabetesschweinen verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant kürzer war (**** $p < 0,0001$; **Abb. 13**).

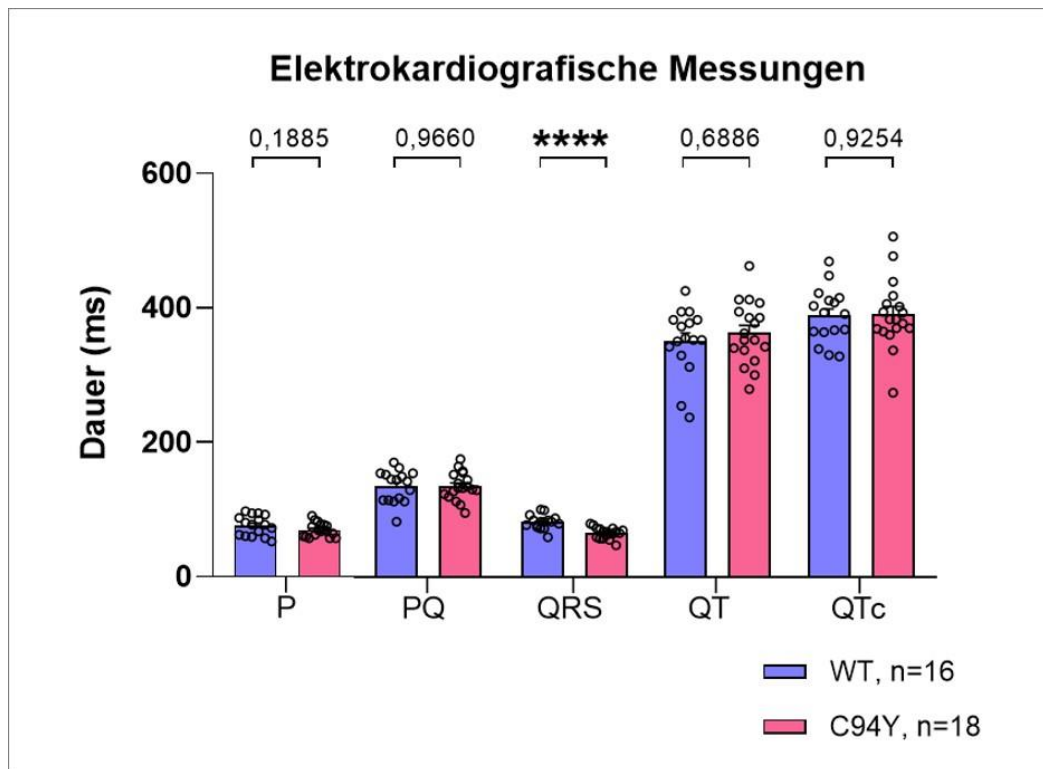


Abb. 13. Elektrokardiografische Messungen mittels 12-Kanal-EKG in Wildtyp (WT)- und Diabetesschweinen (C94Y); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

1.1.3. Elektrophysiologische Untersuchung

Als weiteres Mittel der Charakterisierung diente die elektrophysiologische Untersuchung, wobei zu Beginn die Sinusknotenerholungszeit (engl.: *sinus node recovery time*, SNRT) ermittelt wurde. Die 30-sekündige Stimulation des Vorhofs erfolgte jeweils zweifach bei einer Basiszykluslänge von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms und 300 ms. Hierbei wurde die Dauer zwischen letztem Stimulus und erster intrinsischer P-Welle gemessen. Keine der untersuchten Basiszykluslängen wies signifikante Unterschiede zwischen der Wildtyp- und der Diabetesgruppe auf (**Abb. 14**).

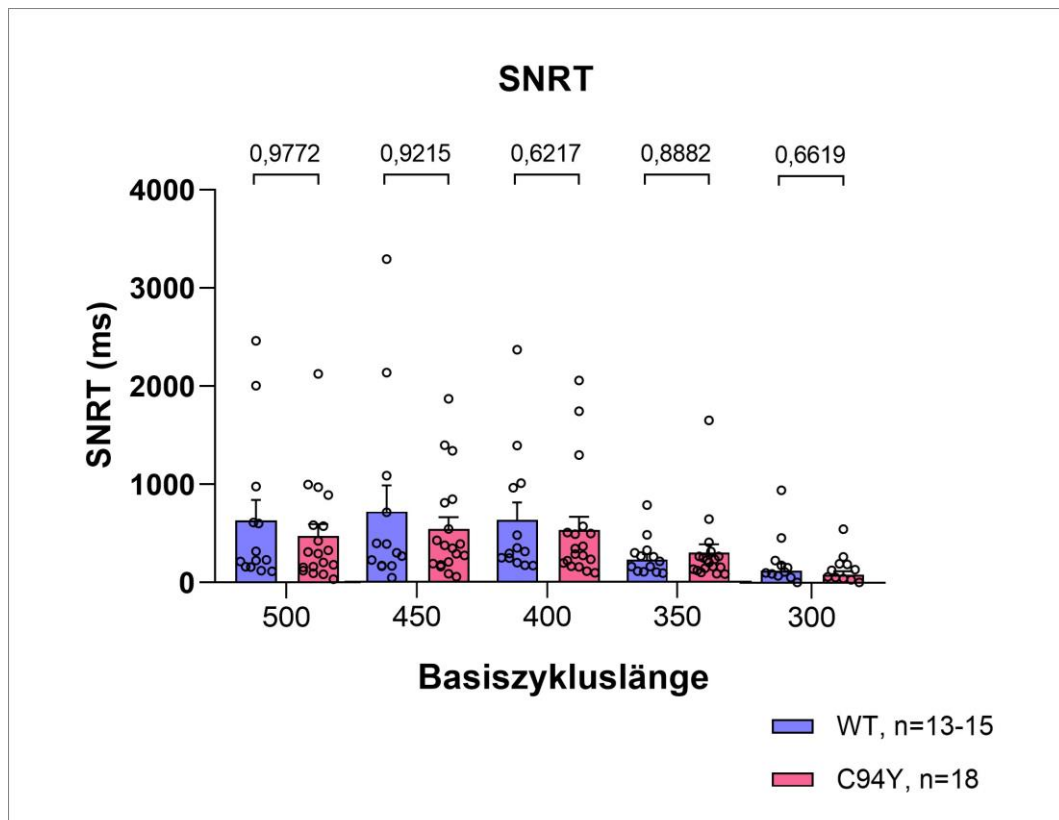


Abb. 14. Messung der Sinusknotenerholungszeit (SNRT). Messung bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms und 300 ms in Wildtyp (WT)- und Diabetesschweinen (C94Y), jeweils Mann-Whitney Test.

Des Weiteren wurde der Wenckebachpunkt bestimmt, welcher ein Parameter für die AV-Knotenleitung darstellt (**Abb. 15A**). Durch Stimulation immer kürzer werdender Zykluslängen zeigt sich zunächst der Wenckebachpunkt als diejenige Zykluslänge, bei der die 1:1-AV-Überleitung nicht mehr aufrechterhalten werden kann, bis sich schließlich eine stabile 2:1 Überleitung einstellt (**Abb. 15B**). In beiden Untersuchungen wurden keine signifikanten Unterschiede deutlich.

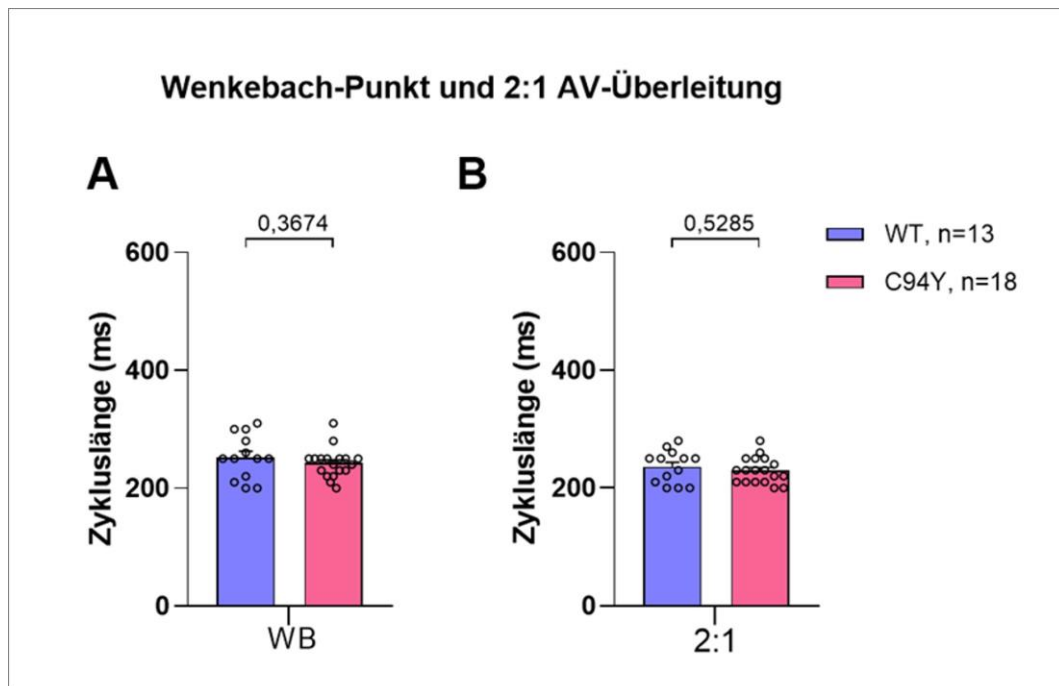


Abb. 15. Wenkebach-Punkt (A) und 2:1 Überleitung (B) in Wildtypschweinen (WT) versus Diabetesschweinen (C94Y), jeweils Mann-Whitney-Test.

Im Anschluss wurde die atrioventrikuläre effektive Refraktärperiode (AVERP) untersucht. Sie gilt als das längste Kopplungsintervall zwischen Basis- und Extrastimulus, bei dem keine Kammererregung mehr gegeben ist, obwohl eine Stimulation des Vorhofes stattfindet (d.h. die Überleitung über den AV-Knoten bleibt aus). Alle Messungen wurden bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms und 300 ms durchgeführt. In beiden Gruppen wurde bei keiner der Basiszykluslängen ein signifikanter Unterschied ersichtlich (**Abb. 16**). Die sogenannte atriale effektive Refraktärperiode (AERP) stellt das längste Kopplungsintervall dar, welches bei Vorhofstimulation keine Vorhoferregung mehr bedingt. Die Durchführung erfolgte nach dem entsprechenden Protokoll der AVERP und zeigte bei allen Basiszykluslängen, außer 500 ms, signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. (450 ms: $p=0,0088$; 400 ms: $p=0,0077$; 350 ms: $p=0,0184$; 300 ms: $p=0,0364$; **Abb. 17**).

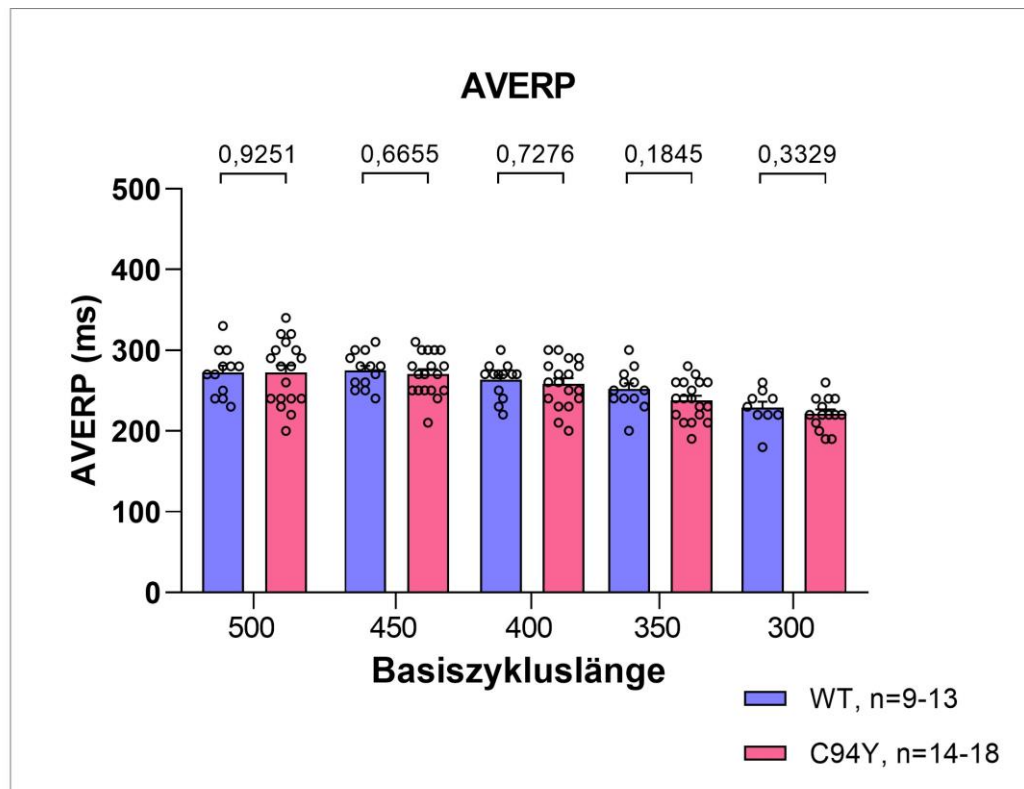


Abb. 16. Atrioventrikuläre effektive Refraktärperiode (AVERP) in Wildtypschweinen (WT) und Diabetesschweinen (C94Y) bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms und 300 ms, jeweils Mann-Whitney-Test.

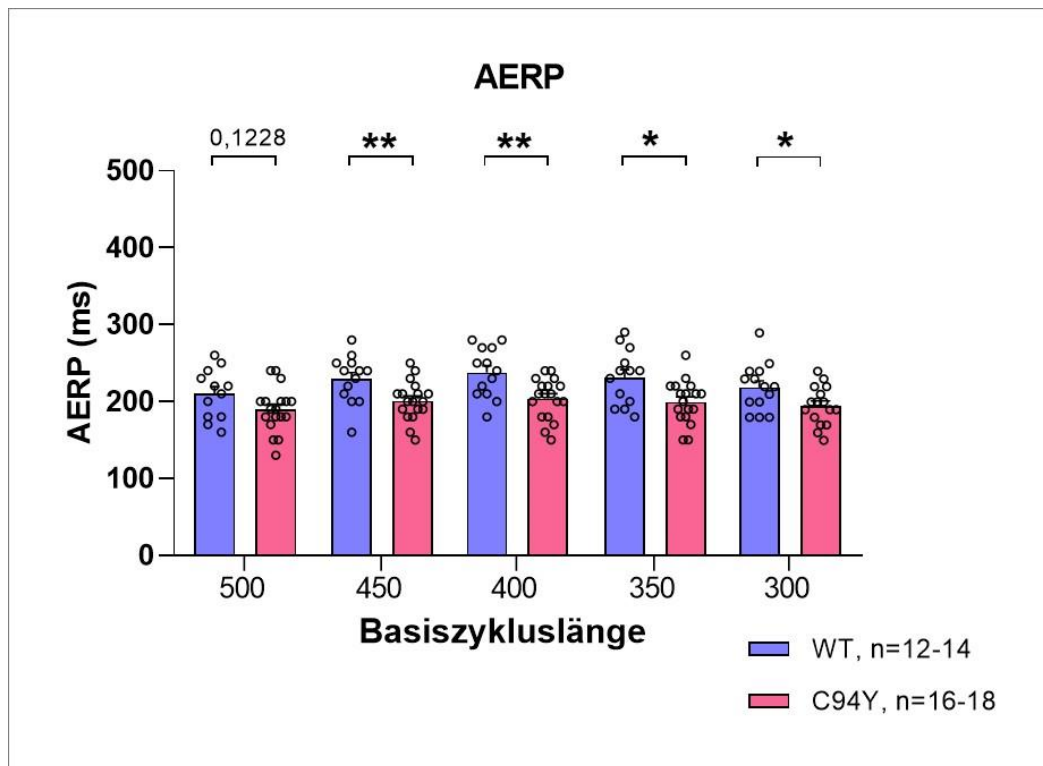


Abb. 17. Atriale effektive Refraktärperiode (AERP) in Wildtypen (WT) und Diabetesschweinen (C94Y) bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms und 300 ms, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; jeweils Mann-Whitney-Test.**

Im letzten Teil des *in vivo*-Versuchs wurde die Anfälligkeit für Vorhofarrhythmien evaluiert. Durch Burststimulationen kam es bei einigen Tieren zu Vorhofflimmern (VHF), welches als Vorhofarrhythmie mit atrialer Tachykardie und unregelmäßigen RR-Intervallen und einer Dauer von mindestens 10 Sekunden definiert wurde. Sofern sich persistierendes Vorhofflimmern von über 30 Minuten zeigte, wurde dieses durch elektrische Kardioversion in den Sinusrhythmus überführt. Die Vulnerabilität der Diabetestiere war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht (**Abb. 18A und B**). Der prozentuale Anteil der Tiere, bei denen mindestens eine Arrhythmieepisode ausgelöst werden konnte, lag bei den C94Y-Schweinen bei 56,25%, hingegen kam es nur bei 15,38% der Wildtyptiere zu Vorhofflimmern (* $p=0,0173$, **Abb. 18A**). Bei den Diabetesschweinen ließ sich ebenfalls eine erhöhte Rate erfolgreicher Stimulationen pro Schwein verzeichnen (** $p=0,0027$, **Abb. 18B**). Außerdem war eine deutlich längere mittlere Episodendauer (**Abb. 18C**) zu erkennen, was sich ebenfalls in der längeren Gesamtdauer aller VHF-Episoden ((kumulative VHF-Last) bestätigte (**Abb. 18D**).

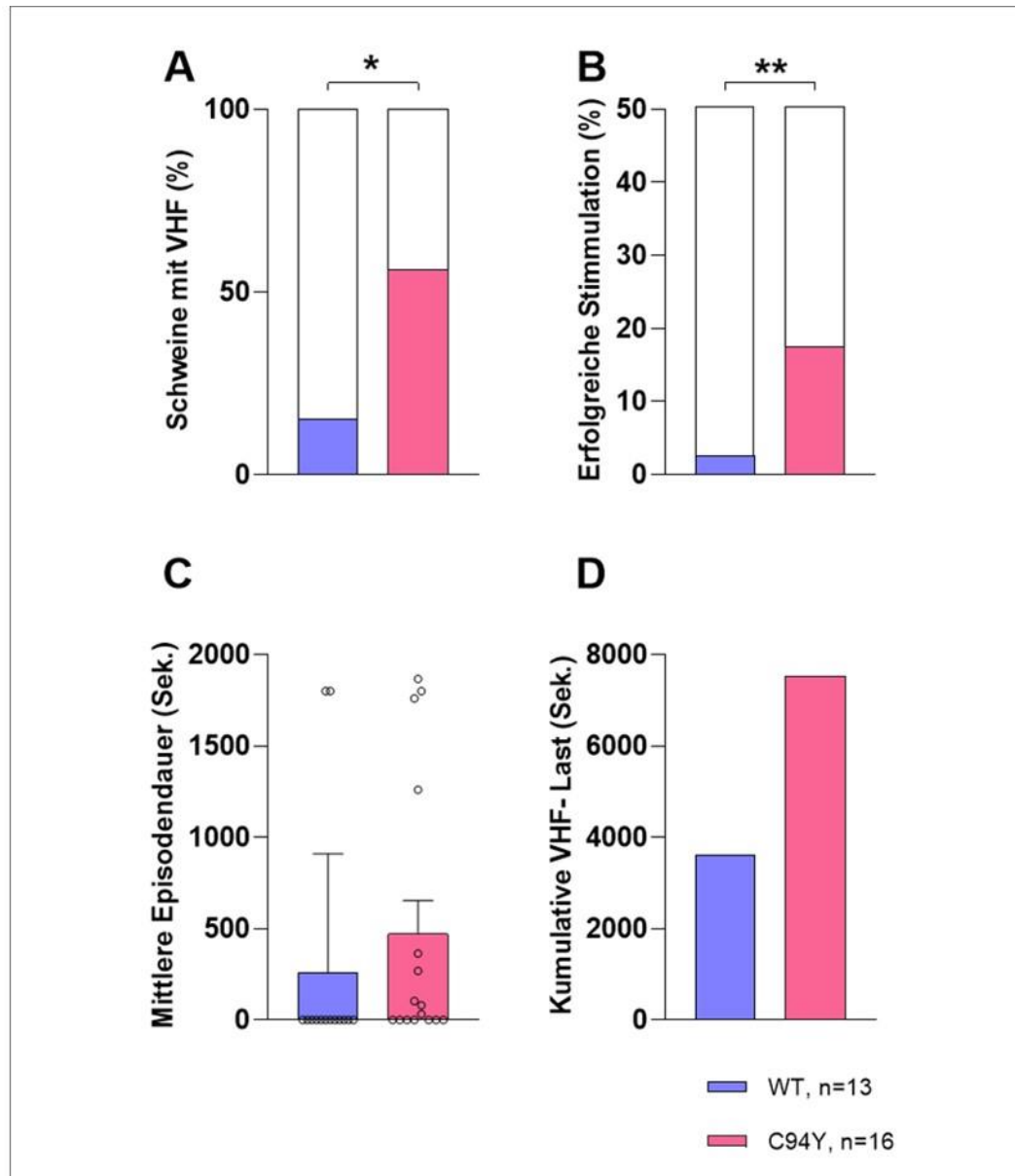


Abb. 18. Induzierbarkeit von Vorhofflimmern. **A.** prozentuale Anzahl der Schweine mit mindestens einer VHF-Episode; **B.** Prozentsatz erfolgreicher Stimulationen; **C.** Mittlere Episodendauer in Sekunden; **D.** Kumulative VHF-Last in Sekunden, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, A und B jeweils Chi-Square Test.

1.2. *Ex vivo* Ergebnisse des strukturellen Remodelings von Wildtyp- und *INS^{C94Y}*-Schweinen ohne Therapie

1.2.1. Evaluation der interstitiellen Fibrose

Mit Hilfe der Masson-Goldner-Trichrom-Färbung erfolgte die Quantifizierung der interstitiellen Fibrose des Herzgewebes. Untersucht wurden drei Regionen der linken Herzhälfte, das linke Atrium (LAFW), das linke Herzohr (LAA) und der linke Ventrikel (LV), sowie die gleichen Regionen der rechten Herzhälfte, das rechte Atrium (RAFW), das rechte Herzohr (RAA) und der rechte Ventrikel (RV). Im linken Herzen zeigten sich deutlich signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und Diabetestieren in allen drei Herzregionen (**Abb. 19A-C**). Im rechten Herzen ergaben sich signifikante Unterschiede im rechten Atrium und im rechten Ventrikel (**Abb. 20A und C**). In allen sechs Regionen zeigten Diabetesschweine mehr Fibrose als die Wildtypschweine [**Fibrose LAFW** WT: $1,968 \pm 0,81$ % versus C94Y: $3,74 \pm 2,27$ %, $**p=0,0024$ (**Abb. 19A**); **Fibrose LAA** WT: $2,15 \pm 1,08$ % versus C94Y: $3,24 \pm 1,01$ %, $**p=0,0061$ (**Abb. 19B**); **Fibrose LV** WT: $0,81 \pm 0,48$ % versus C94Y: $2,19 \pm 1,79$ %, $****p<0,0001$ (**Abb. 19C**); **Fibrose RAFW** WT: $1,77 \pm 1,55$ % versus C94Y: $4,58 \pm 3,01$ %, $***p=0,0001$ (**Abb. 20A**); **Fibrose RAA** WT: $1,83 \pm 0,85$ % versus C94Y: $2,69 \pm 1,56$ %, $p=0,1467$ (**Abb. 20B**); **Fibrose RV** WT: $0,97 \pm 0,69$ % versus C94Y: $2,08 \pm 1,43$ %, $***p=0,0001$ (**Abb. 20C**)].

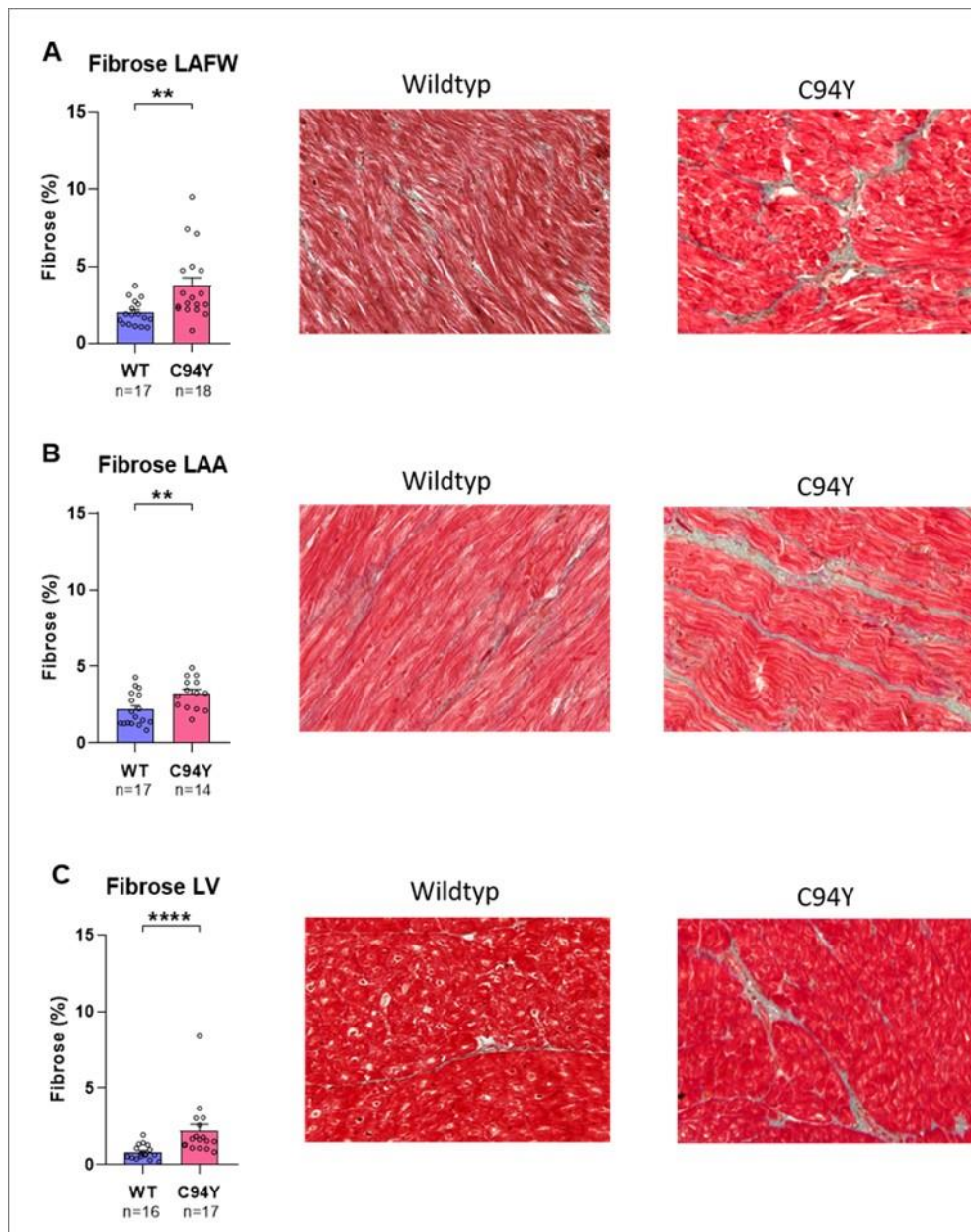


Abb. 19. Quantifizierung der interstitiellen Fibrose mittels Masson-Trichrom-Goldner Färbung des linken Herzens. A. Fibrose im linken Atrium, B. Fibrose im linken Herzohr; C. Fibrose im linken Ventrikel , $p < 0,05$, $p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test**

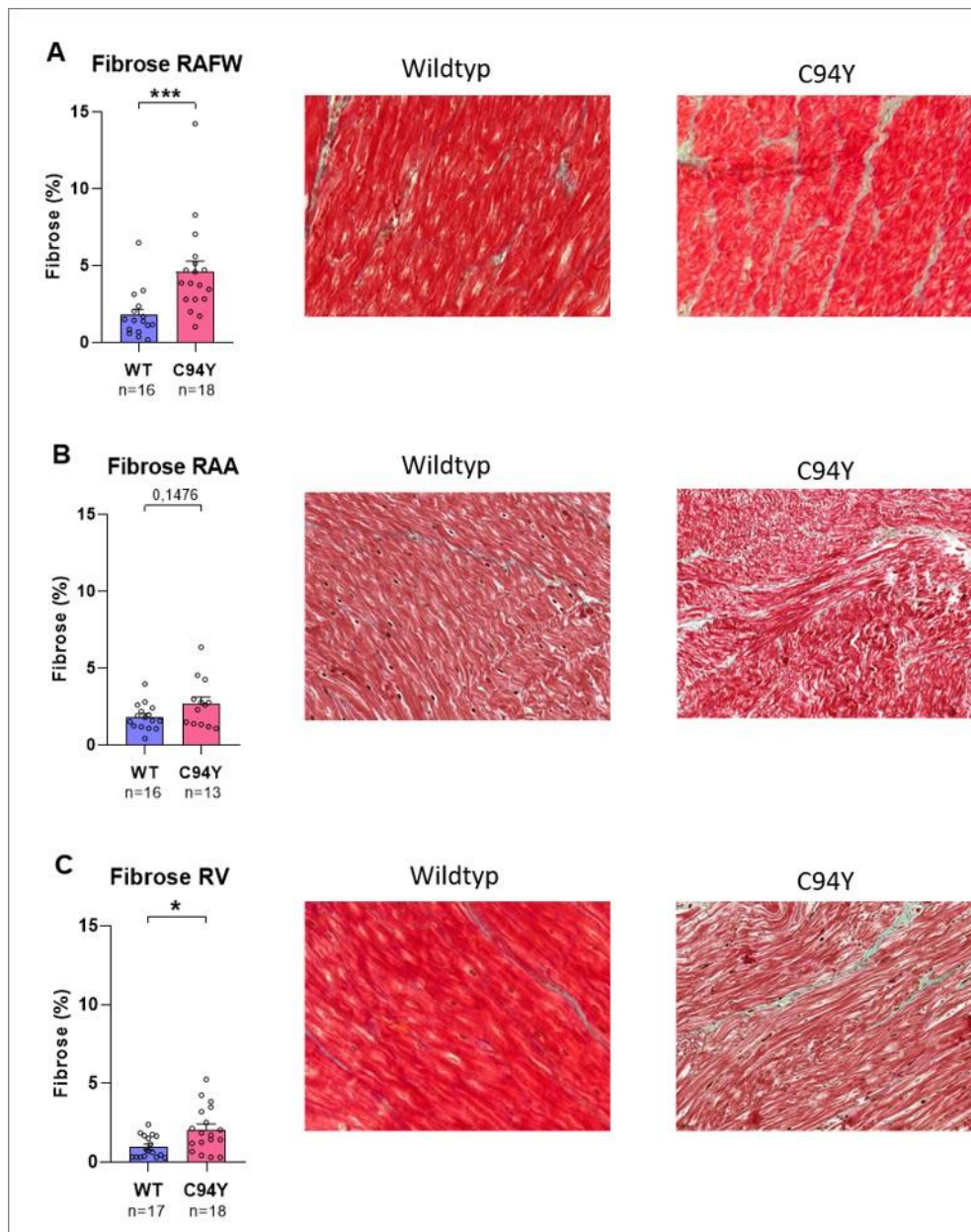


Abb. 20. Quantifizierung der interstitiellen Fibrose mittels Masson-Trichrom-Goldner Färbung des rechten Herzens. A. Fibrose im rechten Atrium, B. Fibrose im rechten Herzohr; C. Fibrose im rechten Ventrikel , $p < 0,05$, $p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test**

Mit den in der Masson-Trichrom-Färbung erhobenen Daten wurde daraufhin eine Korrelationsanalyse zwischen dem Ausmaß an Fibrose und dem Blutglukosewert des jeweiligen Tieres erstellt, um einen eventuellen Zusammenhang beider Parameter zu veranschaulichen. Dies wurde für beide Gruppen in einer Darstellung abgebildet. In den Regionen der linken Herzhälfte zeigten sich signifikante Korrelationen (**LAFW** $r = 0,5417$, $**p = 0,0011$ (**Abb. 21A**); **LAA** $r = 0,4534$, $*p = 0,00135$ (**Abb. 21B**); **LV** $r = 0,4355$, $*p = 0,0143$ (**Abb. 21C**)). In den Regionen des rechten Herzens zeigte sich eine signifikante Korrelation im rechten Atrium

(RAFW $r=0,4640$, $**p=0,0075$ (Abb. 21C); RAA $r=0,2332$, $p=0,2417$ (Abb. 21B); RV $r=0,3183$, $p=0,0710$ (Abb. 21C)).

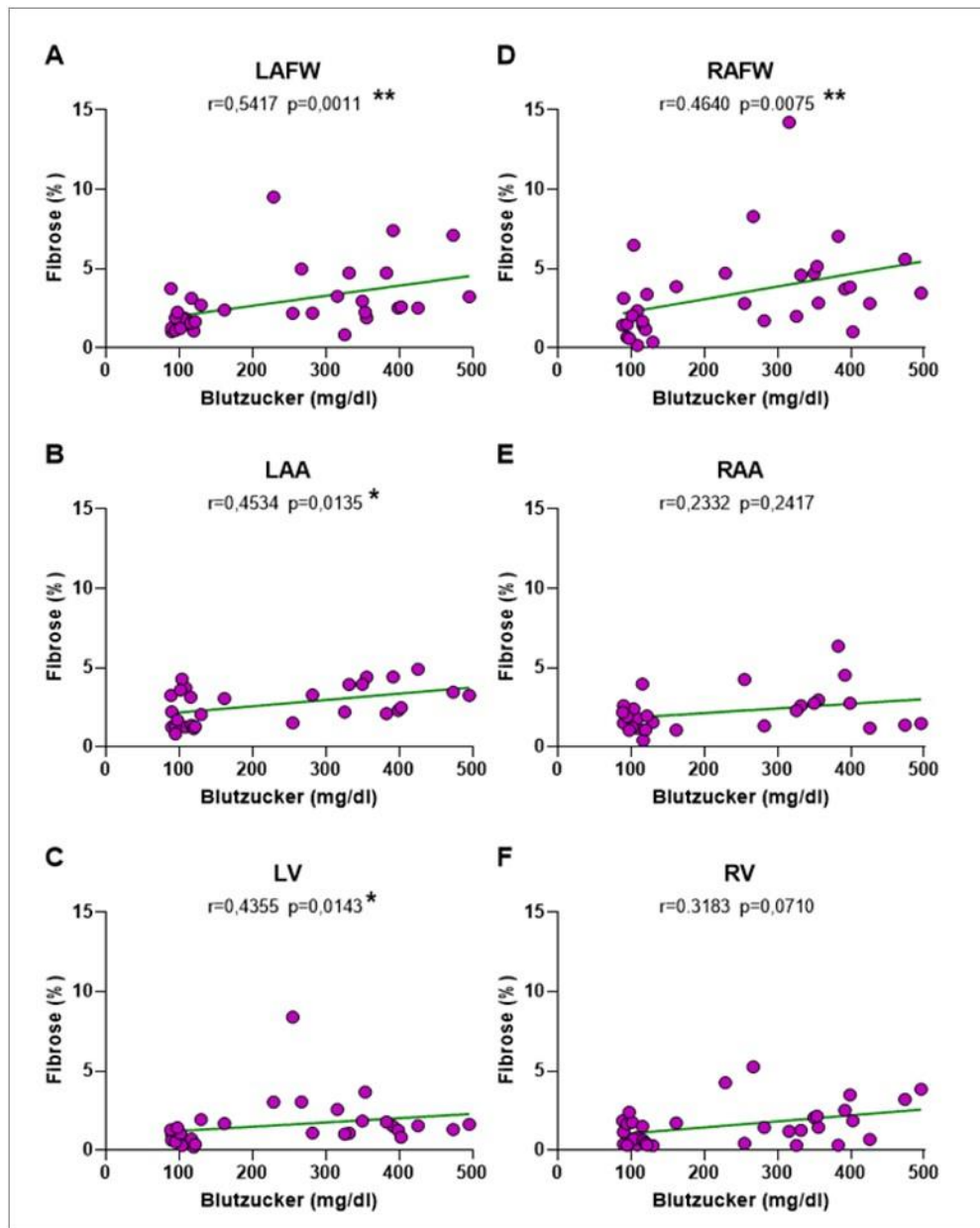


Abb. 21. Korrelationsanalyse zwischen interstitieller Fibrose und Blutglukosewerten. A. linkes Atrium, B. linkes Herzohr, C. linker Ventrikel, D. rechtes Atrium, E. rechtes Herzohr, F. rechter Ventrikel, $p<0,05$, $**p<0,01$, $***p<0,001$, $****p<0,0001$.

1.2.2. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung

In der Immunfluoreszenz wurde eine Vierfach-Färbung angefertigt: Mittels Alpha-Actinin wurden die Herzmuskelzellen (Farbe: grau) und mittels Vimentin die Fibroblasten (Farbe: grün) dargestellt. Zusätzlich sollte untersucht werden, wie viele YAP-positive Zellkerne (Farbe: rot) sich in der jeweiligen Zellart befinden, was mittels YAP- und Hoechst-Färbung (DAPI, Farbe: blau) für die Zellkerne dargestellt werden konnte. Untersucht wurden YAP-positive Fibroblastennuklei sowie YAP-positive Kardiomyozytenuklei. Hierbei zeigten sich bei der Untersuchung der Yap-positiven Fibroblasten in allen untersuchten Herzregionen signifikante Unterschiede zwischen den Wildtypen und den Diabetikern [**YAP-positive Fibroblasten LAFW** WT: $2,02 \pm 2,61$ % versus C94Y: $7,88 \pm 3,52$ %, $*p=0,0152$ (**Abb. 22A**); **YAP-positive Fibroblasten LV** WT: $3,23 \pm 3,55$ % versus C94Y: $14,50 \pm 5,64$ %, $**p=0,0087$ (**Abb. 22B**); **YAP-positive Fibroblasten RAFW** WT: $4,28 \pm 6,27$ % versus C94Y: $8,42 \pm 4,96$ %, $*p=0,0455$ (**Abb. 22C**) **YAP-positive Fibroblasten RV** WT: $8,16 \pm 4,44$ % versus C94Y: $17,76 \pm 7,66$ %, $*p=0,0260$ (**Abb. 22D**)].

Die YAP-positiven Kardiomyozyten waren hingegen nur im Bereich des linken Ventrikels signifikant [**YAP-positive Kardiomyozyten LV** WT: $18,33 \pm 5,61$ % versus C94Y: $34,34 \pm 5,81$ %, $**p=0,0043$ (**Abb. 23A**); **YAP-positive Kardiomyozyten LAFW** WT: $29,00 \pm 5,37$ % versus C94Y: $27,71 \pm 5,55$ %, $p=0,5887$ (**Abb. 23B**); **YAP-positive Kardiomyozyten RV** WT: $20,64 \pm 9,16$ % versus C94Y: $31,04 \pm 5,39$ %, $p=0,0649$ (**Abb. 23C**); **YAP-positive Kardiomyozyten RAFW** WT: $17,40 \pm 9,93$ % versus C94Y: $25,22 \pm 9,76$ %, $p=0,1797$ (**Abb. 23D**)].

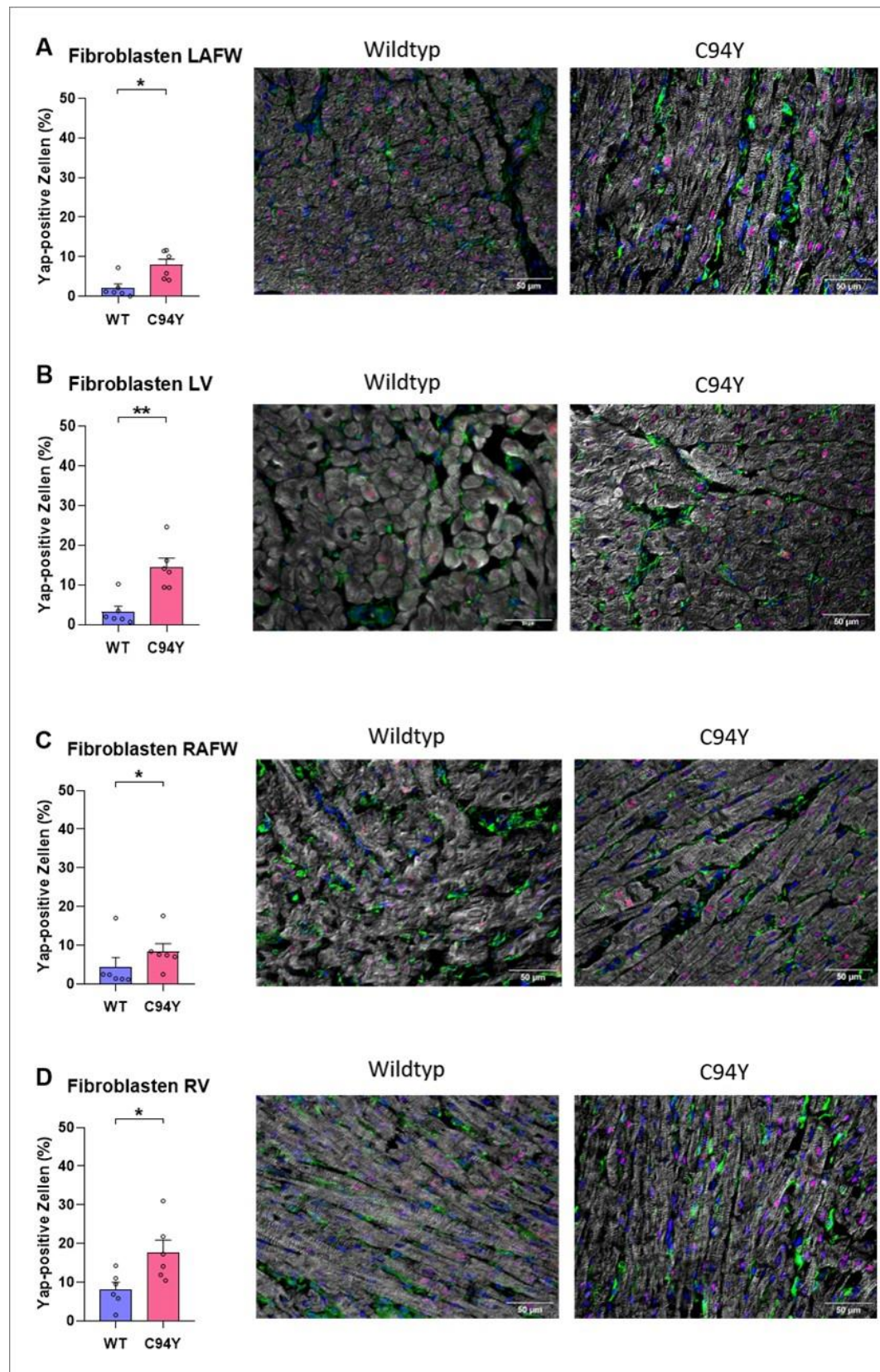


Abb. 22. Quantifizierung der YAP-positiven Fibroblasten mittels Immunfluoreszenzfärbung. A. YAP-positive Fibroblasten im linken Atrium; B. YAP- positive Fibroblasten im linken Ventrikel; C. YAP-positive Fibroblasten im rechten Atrium; D. YAP-positive Fibroblasten im rechten Ventrikel, Grau: Kardiomyozyten, Grün: Fibroblasten, Rot: YAP, Blau: Nuklei, jeweils n=5-6, *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, jeweils Mann-Whitney-Test.

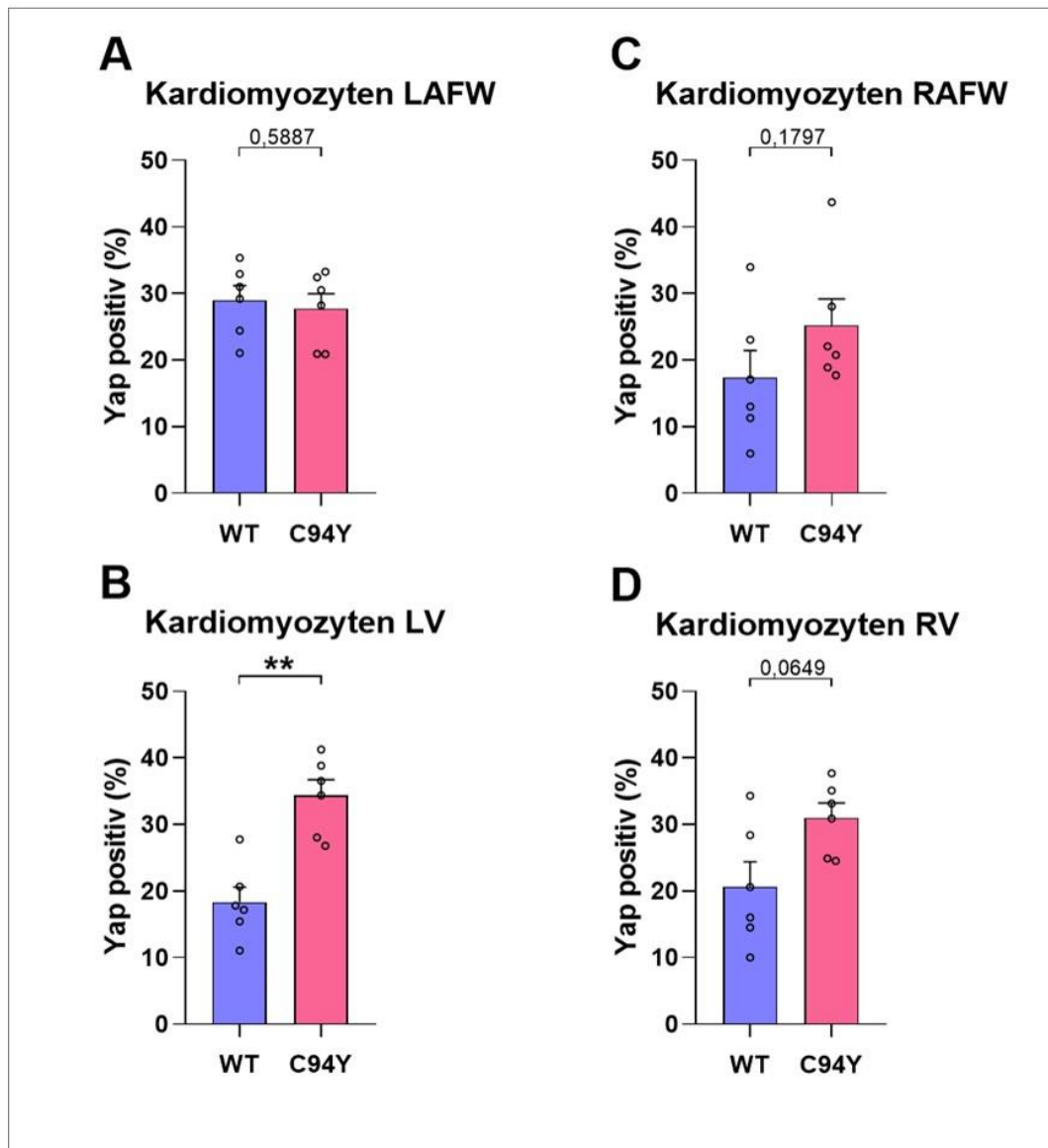


Abb. 23. A-D. Quantifizierung der YAP-positiven Kardiomyozyten. A. YAP-positive Kardiomyozyten im linken Atrium; B. YAP-positive Kardiomyozyten im linken Ventrikel; C. YAP-positive Kardiomyozyten im linken Atrium; D. YAP-positive Kardiomyozyten im rechten Ventrikel, jeweils $n = 5-6$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Blutglukosewert und dem Anteil YAP-positiver Zellen zu veranschaulichen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Dargestellt wurde diese Analyse für beide Gruppen in einem Graphen für die jeweilige Herzregion. In allen Regionen waren signifikante Korrelationen zwischen YAP-positiven Fibroblasten und Blutglukosekonzentration zu verzeichnen [LAFW $r=0,5954$ * $p=0,0444$ (Abb. 24A); LV $r=0,7811$, ** $p=0,0039$ (Abb. 24B); RAFW $r=0,6070$, * $p=0,0395$ (Abb. 24C); RV $r=0,6200$, * $p=0,0350$ (Abb. 24D)].

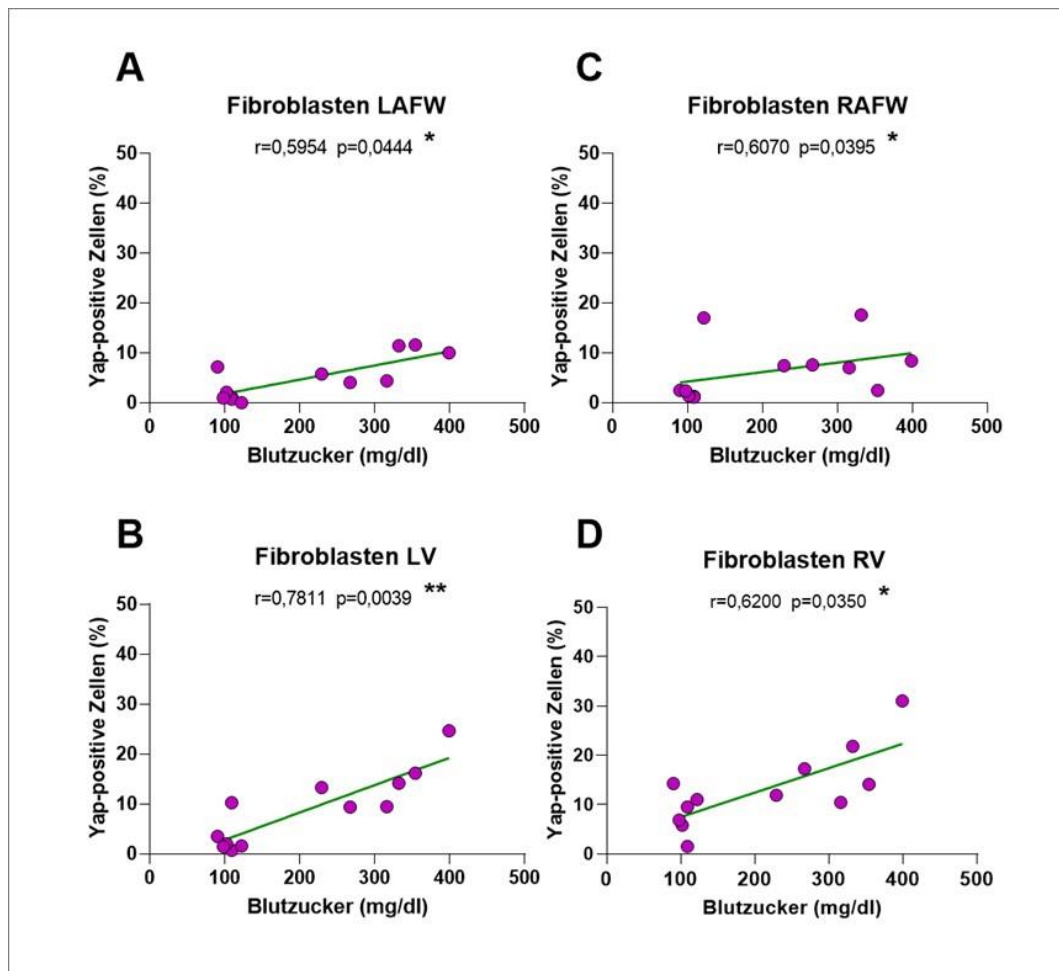


Abb. 24. Korrelationsanalyse zwischen YAP-positiven Fibroblasten und Blutglukosewerten.
A. linkes Atrium, **B.** linker Ventrikel, **C.** rechtes Atrium, **D.** rechter Ventrikel, $n=10-12$, * $p<0,05$,
 ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

Im linken und rechten Ventrikel zeigte sich zudem eine Korrelation zwischen der Anzahl YAP-positiver Kardiomyozyten und dem Blutglukosewert, in den Vorhöfen war hingegen keine Korrelation zu beobachten [LAFW $r=-0,08056$ $p=0,8045$ (Abb. 25A); LV $r=0,6900$, * $p=0,0157$ (Abb. 25B); RAFW $r=0,4588$, $p=0,1350$ (Abb. 25C); RV $r=0,6515$, * $p=0,0248$ (Abb. 25D)].

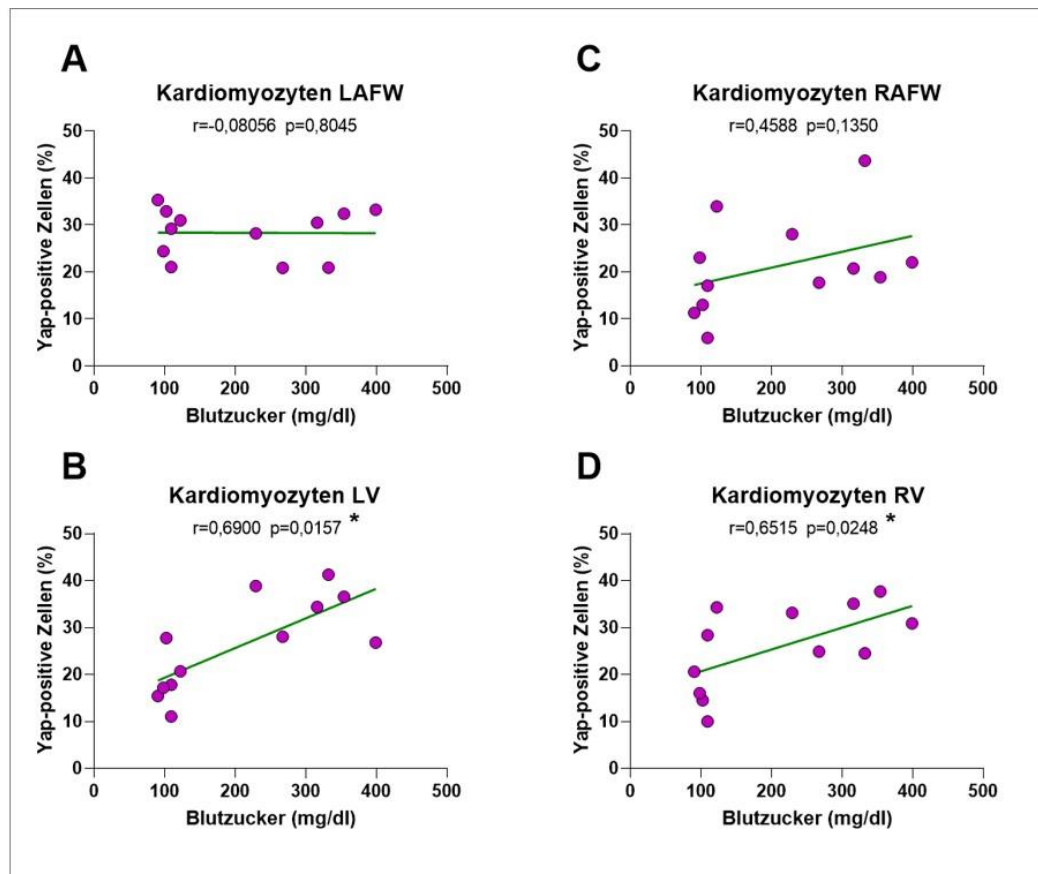


Abb. 25. Korrelationsanalyse zwischen YAP-positiven Kardiomyozyten und Blutglukosewerten.
A. linkes Atrium, **B.** linker Ventrikel, **C.** rechtes Atrium, **D.** rechter Ventrikel, $n=10-12$, * $p<0,05$,
 ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$.

1.2.3. Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Zur weiteren Analyse des strukturellen Remodelings wurde eine real-Time RT-PCR von *YAP* und ausgewählten *YAP*-Zielgenen durchgeführt. Bei diesen Genen handelt es sich um Gene, welche durch das aktivierte (sich im Nukleus befindende) *YAP*-Protein reguliert werden können.

Bei der Expression des *YAP-1* wurde im linken als auch im rechten Vorhof eine signifikante Expressionssteigerung in der Diabetesgruppe beobachtet [***YAP1* LAFW** WT versus C94Y, $**p=0,0052$ (**Abb. 26A**); ***YAP1* RAFW** WT versus C94Y, $*p=0,0232$ (**Abb. 26C**)].

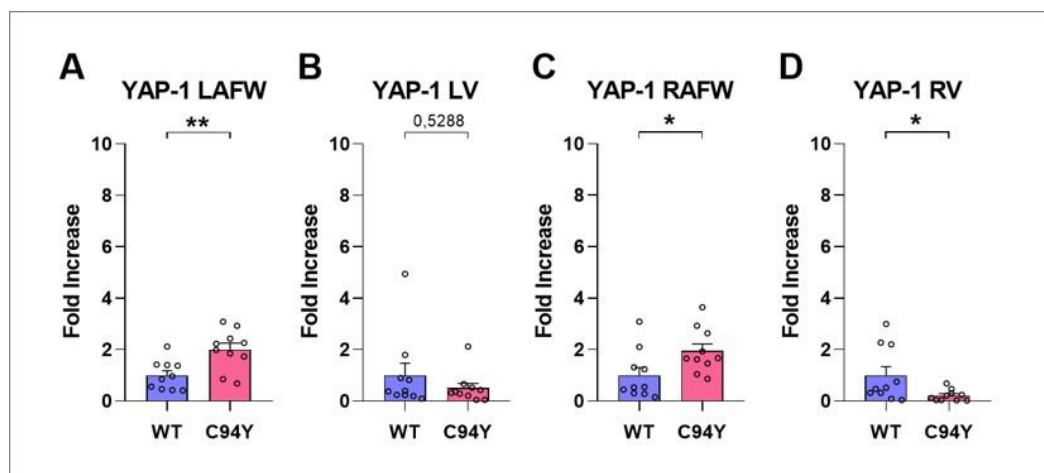


Abb. 26. Genexpressionsanalyse Yes-assoziierten Proteins (*YAP-1*). A. linkes Atrium, B. linker Ventrikel, C. rechtes Atrium, D. rechter Ventrikel. Jeweils $n = 9-10$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$, $****p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

Amphiregulin (*AREG*) ist Teil vieler physiologischer Prozesse und ist beteiligt an Zellproliferation, Apoptose und der Migration verschiedener Zelltypen, wie den Fibroblasten. In der Genexpressionsanalyse wurde eine erhöhte Expression in der Diabetesgruppe im Bereich beider Vorhöfe ersichtlich [***AREG* LAFW** Wildtyp versus C94Y, $*p=0,0185$ (**Abb. 27A**), ***AREG* RAFW** Wildtyp versus C94Y, $*p=0,0315$ (**Abb. 27.C**)].

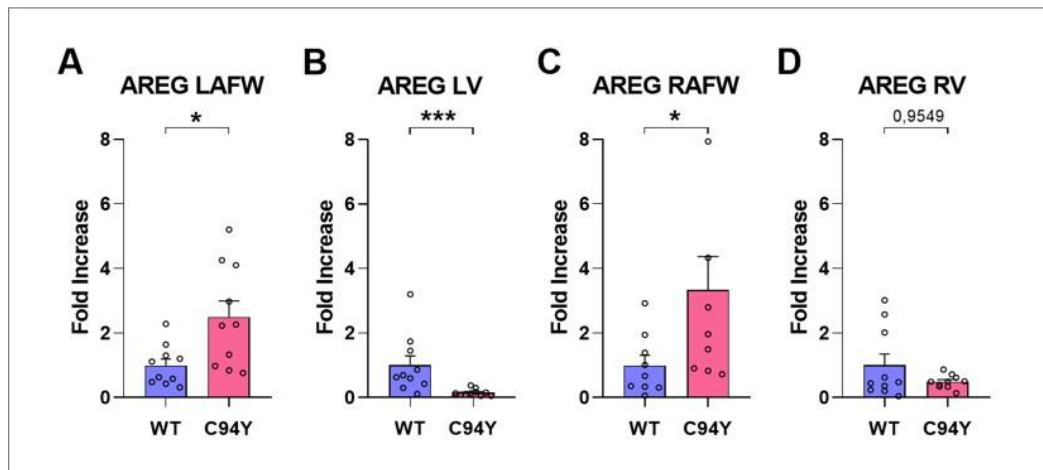


Abb. 27. Genexpressionsanalyse Amphiregulin (AREG). A. linkes Atrium, B. linker Ventrikel, C. rechtes Atrium, D. rechter Ventrikel. Jeweils n = 9-10., *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, jeweils Mann-Whitney-Test.

Im Anschluss erfolgte die Untersuchung des TGF- β -Signalwegs. *TGF- β 1* zeigte eine erhöhte Expression in der Diabetesgruppe im Bereich des linken Atriums, sowie im linken Ventrikel. Im Bereich des rechten Atriums ließ sich eine Tendenz zur Expressionssteigerung der Diabetiker erkennen [*TGF- β 1 LAFW* WT versus C94Y, **p=0,0029 (Abb. 28A), *TGF- β 1 LV* WT versus C94Y, *p=0,0232 (Abb. 28B), *TGF- β 1 RAFW* WT versus C94Y, *p=0,1230 (Abb. 28C)].

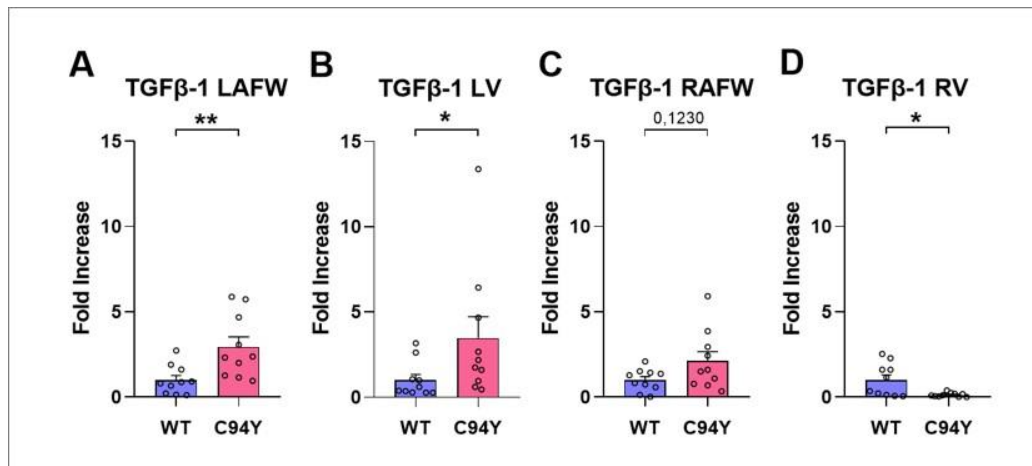


Abb. 28. Genexpressionsanalyse Transforming Growth Factor beta (TGF- β 1). A. linkes Atrium, B. linker Ventrikel, C. rechtes Atrium, D. rechter Ventrikel. Jeweils n = 9-10., *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, jeweils Mann-Whitney-Test.

Zudem zeigte sich auch bei *SMAD3* eine signifikant erhöhte Expression in der Diabetesgruppe im Bereich des rechten Vorhofs, des linken Ventrikels und des linken Vorhofs [*SMAD3 LAFW* WT versus C94Y, *p=0,0433 (Abb. 29A)]. Die Expression von *COL1A1* zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Wildtypgruppe und der Diabetesgruppe im Bereich des rechten Ventrikels.

[*COL1A1* RV WT versus C94Y, * $p=0,0288$ (Abb. 29H)].

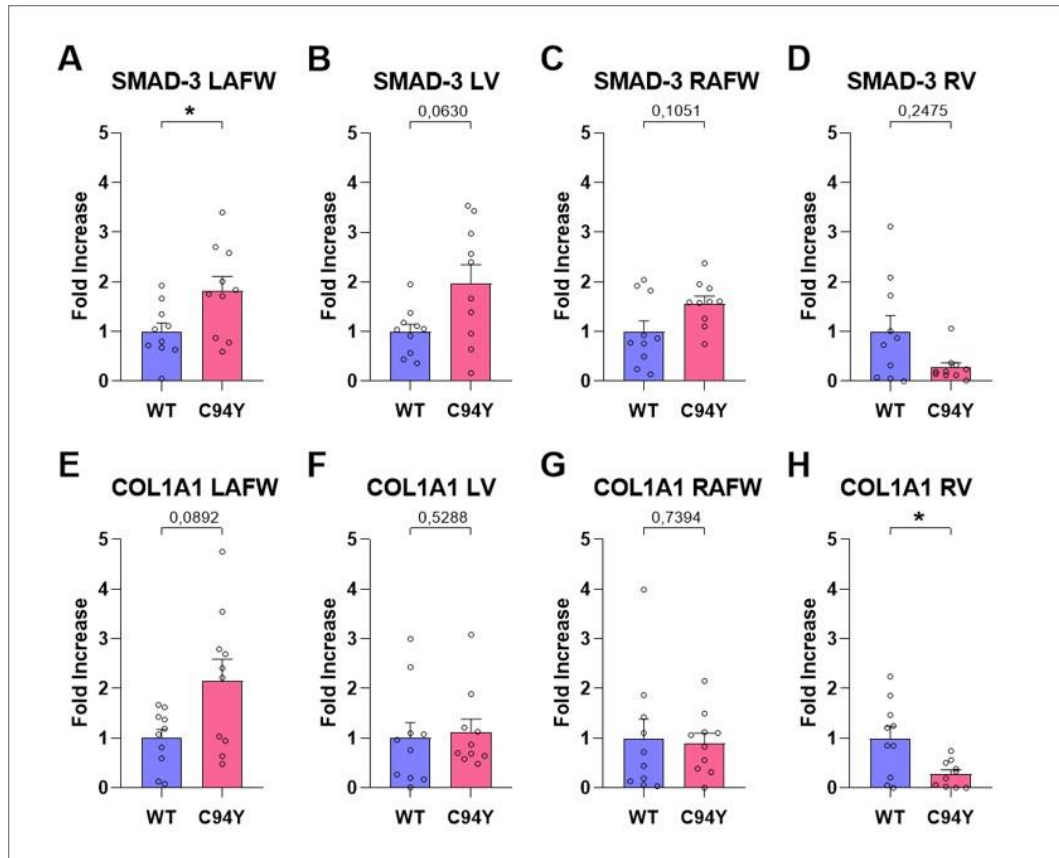


Abb. 29. Genexpressionsanalyse *SMAD3* und *COL1A1*. A. *SMAD3*: linkes Atrium, B. *SMAD3*: linker Ventrikel, C. *SMAD3*: rechtes Atrium, D. *SMAD3*: rechter Ventrikel; E. *COL1A1*: linkes Atrium, F. *COL1A1*: linker Ventrikel, G. *COL1A1*: rechtes Atrium, H. *COL1A1*: rechter Ventrikel. Jeweils $n=9-10$, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

Das ECM-Protein *FN1* zeigte eine signifikante Reduktion der Diabetesgruppe im Bereich des linken Ventrikels und des linken Atriums [*FN1* LV WT versus C94Y, * $p=0,02775$ (Abb. 30B), *FN1* RAFW WT versus C94Y, * $p=0,0147$ (Abb. 30C)]. Die Expression der Matrix-Metalloproteinase (*MMP2*) zeigte eine signifikante Reduktion der Diabetesgruppe im Bereich des rechten Ventrikels [*MMP2* RV WT versus C94Y, * $p=0,0015$ (Abb. 30. H)].

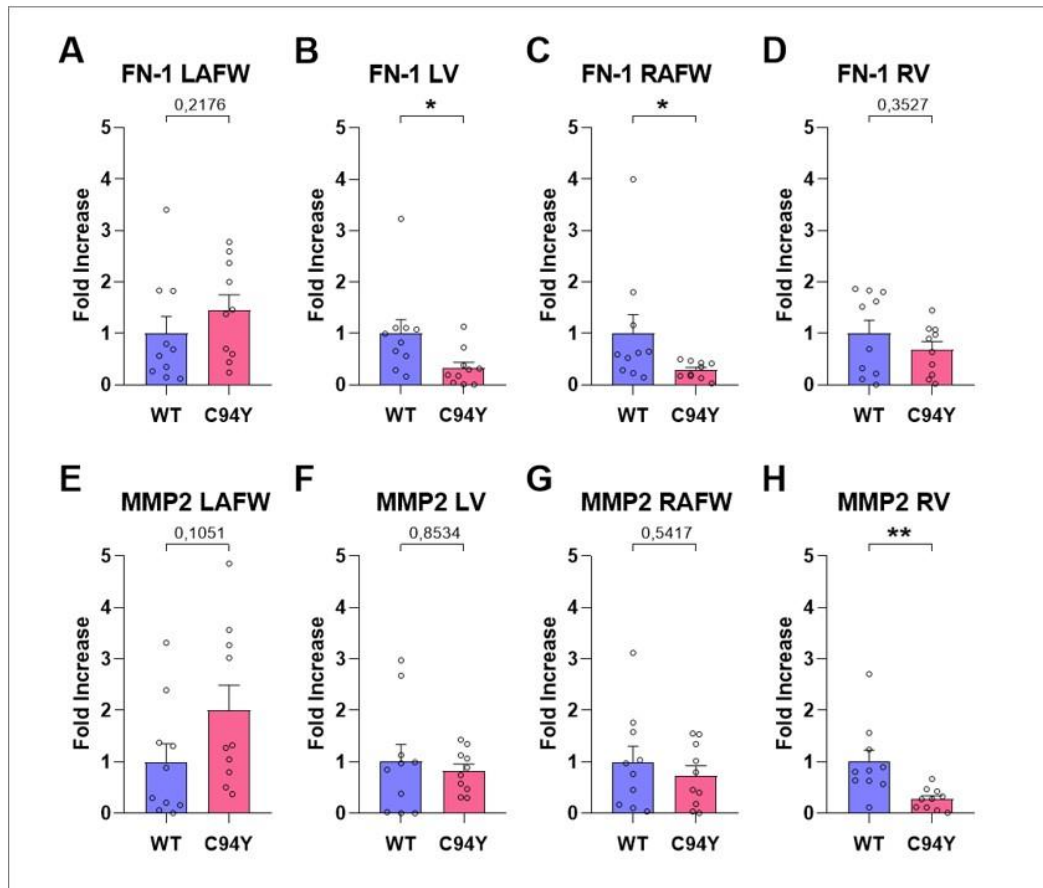


Abb. 30. Genexpressionsanalyse *FN1* und *MMP2*. A. *FN1*: linkes Atrium, B. *FN1*: linker Ventrikel, C. *FN1*: rechtes Atrium, D. *FN1*: rechter Ventrikel; E. *MMP2*: linkes Atrium, F. *MMP2*: linker Ventrikel, G. *MMP2*: rechtes Atrium, H. *MMP2*: rechter Ventrikel. Jeweils $n = 9-10$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

Der *Connective Tissue Growth Factor* (*CTGF* oder *CCN2* im Schwein) stellt ein weiteres ECM-assoziiertes Protein dar. Dieses wies eine signifikant erhöhte Expression der Diabetesgruppe im Bereich des rechten Vorhofs auf [*CTGF RAFW* WT versus C94Y, * $p = 0,0433$ (Abb. 31C)]. Ein ähnlicher Unterschied zwischen den Gruppen zeigte sich bei der Genexpressionsanalyse von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (*PAI-1*), ein Protein der Fibrinolysehemmung. Hier waren die Werte der Diabetestiere im Bereich des linken Atriums signifikant erhöht [*PAI-1 LAFW* WT versus C94Y, * $p = 0,0232$ (Abb. 31E)].

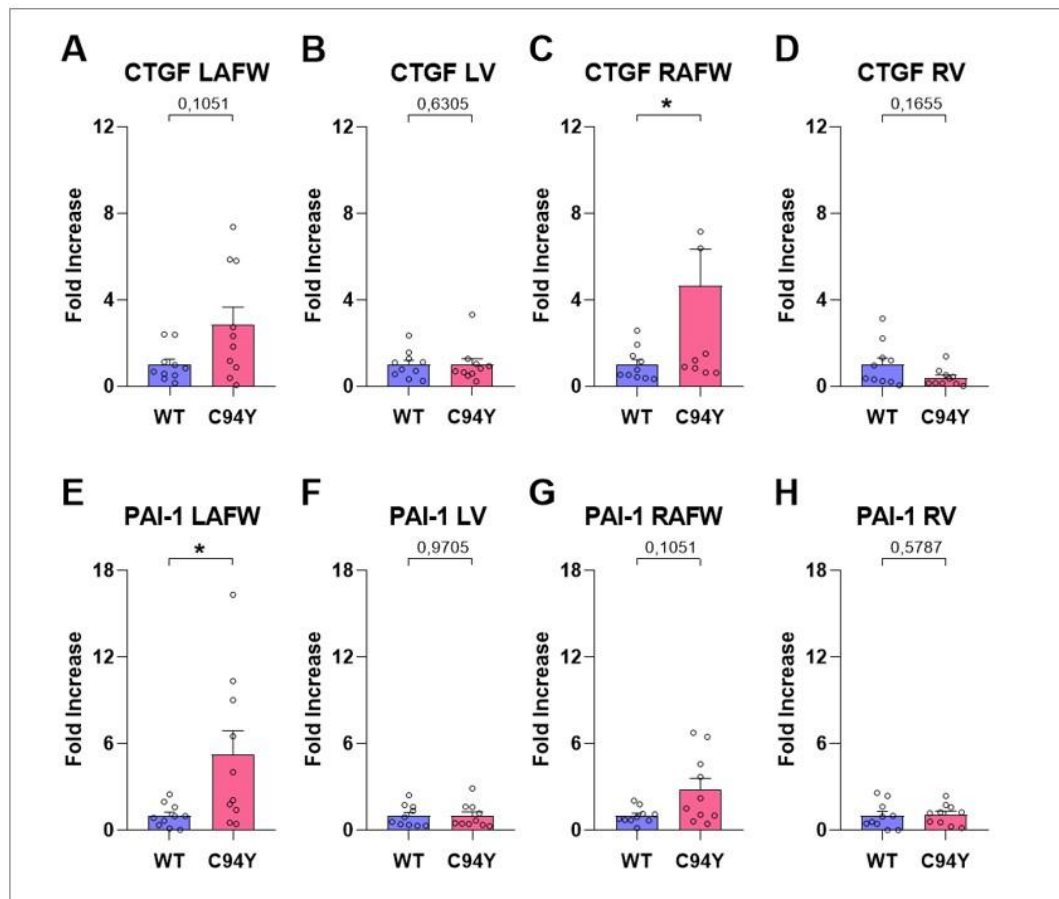


Abb. 31. Genexpressionsanalyse CTGF und PAI-1. A. CTGF: linkes Atrium, B. CTGF: linker Ventrikel, C. CTGF: rechtes Atrium, D. CTGF: rechter Ventrikel, E. PAI-1: linkes Atrium, F. PAI-1: linker Ventrikel, G. PAI-1: rechtes Atrium, H. PAI-1: rechter Ventrikel. Jeweils n =9-10., *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, jeweils Mann-Whitney-Test.

Im Bereich der proinflammatorischen Gene zeigte der *Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)*, ein Zytokin, welches in Patienten mit Vorhofflimmern erhöht ist und durch Aktivierung des TGF- β -Signalwegs kardiale Fibrose begünstigt, eine signifikant erhöhte Expression auf Seiten der Diabetiker im Bereich des linken Vorhofs und eine signifikant reduzierte Expression auf Seiten der Diabetiker im Bereich des rechten Vorhofs [*MIF LAFW* WT versus C94Y, **p=0,0052 (Abb. 32A), *MIF RAFW* WT versus C94Y, ****p<0,0001 (Abb. 32C)]. Das proinflammatorische Zytokin *CCL2*, welches von Fibroblasten sezerniert wird, zeigte kongruent zu den Ergebnissen des MIF-Gens ebenfalls eine verstärkte Expression auf Seiten der Diabetiker. Eine signifikant erhöhte Regulation in der Diabetesgruppe zeigte sich im linken Atrium. Eine reduzierte Expression von *CCL2* auf Seiten der Diabetestiere wurde im rechten Vorhof beobachtet [*CCL2 LAFW* WT versus C94Y, *p<0,05 (Abb. 32E), *CCL2 RAFW* WT versus C94Y, ****p<0,0001 (Abb. 32G)].

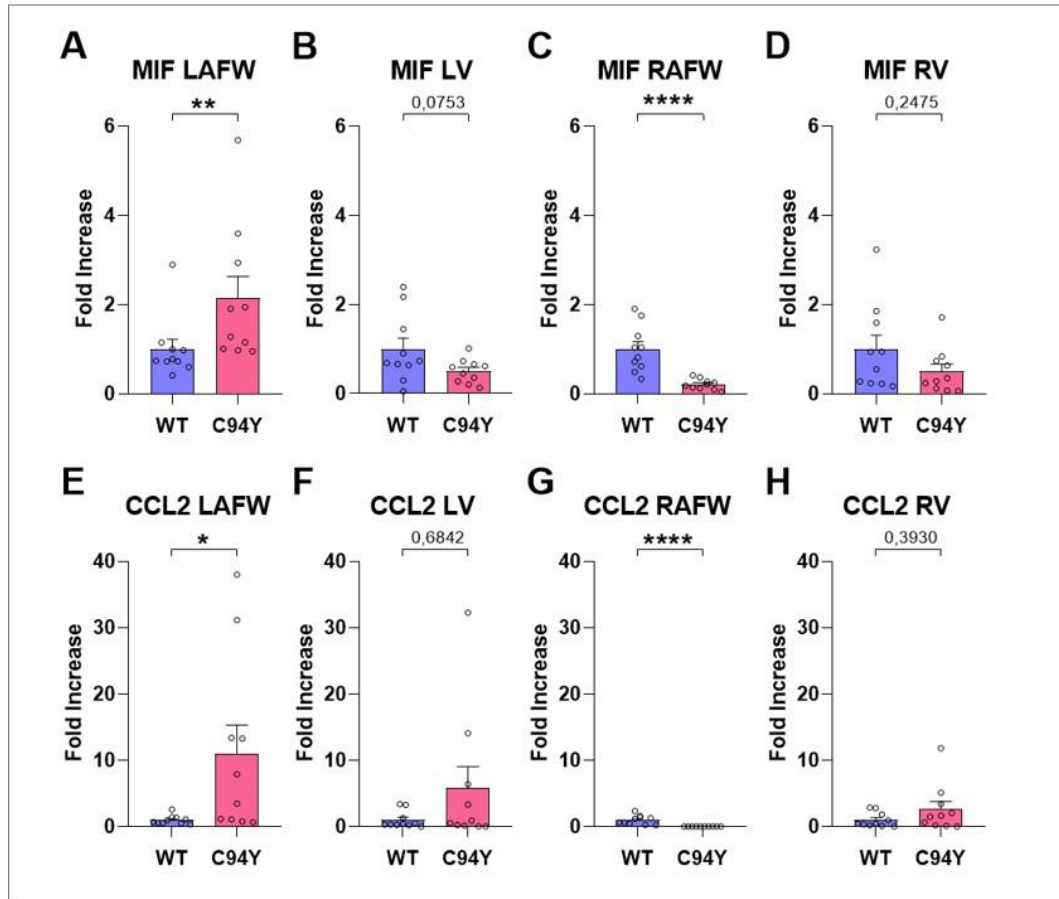


Abb. 32. Genexpressionsanalyse *MIF* und *CCL2*. A. *MIF*: linkes Atrium, B. *MIF*: linker Ventrikel, C. *MIF*: rechtes Atrium, D. *MIF*: rechter Ventrikel; E. *CCL2*: linkes Atrium, F. *CCL2*: linker Ventrikel, G. *CCL2*: rechtes Atrium, H. *CCL2*: rechter Ventrikel. Jeweils n =9-10., *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, jeweils Mann-Whitney-Test.

2. Vergleichende Darstellung zwischen INS^{C94Y} -Schweinen und INS^{C94Y} -Schweinen mit SGLT2-Inhibitor Therapie

2.1. *In vivo* Ergebnisse von INS^{C94Y} -Schweinen und INS^{C94Y} -Schweinen mit SGLT2-Inhibitor-Therapie

In diesem Teil wurden alle erhobenen *in vivo* Ergebnisse der Diabetesgruppe (C94Y) aus Abschnitt IV. 1. mit Tieren derselben genetischen Veränderung nach erfolgter viermonatiger oraler Therapie mit dem SGLT2-Inhibitor Dapagliflozin verglichen (Gruppe gekennzeichnet durch „+Dapa“).

Bei jedem Tier wurde zu Beginn des Eingriffs der Nüchternblutglukosespiegel gemessen. Im Vergleich mit den C94Y-Tieren ($352,9 \pm 81,18$ mg/dl) war dieser in der Gruppe der C94Y-Tiere mit Dapagliflozin-Behandlung signifikant reduziert ($242,0 \pm 67,74$ mg/dl (** $p < 0,001$; **Abb. 33A**).

Der Kaliumspiegel im arteriellen Blut zeigte keine signifikanten Unterschiede (C94Y-Tiere $3,75 \pm 0,30$ mmol/l und C94Y+Dapa-Tiere $3,76 \pm 0,38$ mmol/l; **Abb. 33B**).

Alle Tiere wurden im Zeitraum von 1-3 Tagen vor dem Eingriff gewogen, wobei ein signifikanter Unterschied zwischen den C94Y-Tieren ($56,74 \pm 10,02$ kg) und den leichteren C94Y+Dapa Tieren ($35,85 \pm 5,38$ kg) zu erkennen war (**** $p < 0,0001$; **Abb. 33C**).

Kongruent zum Körpergewicht zeigten sich auch beim Herzgewicht signifikant niedrigere Werte bei den Diabetikern mit Dapagliflozin-Therapie ($150,8 \pm 32,39$ g) im Vergleich mit den Diabetikern ohne Therapie ($204,5 \pm 49,63$ g (** $p < 0,001$; **Abb. 33D**). Allerdings war das Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht signifikant höher bei den Tieren mit Therapie (C94Y: $3,6 \pm 0,48$ und C94Y+Dapa: $4,21 \pm 0,6$; * $p = 0,05$, (**Abb. 33. E**)).

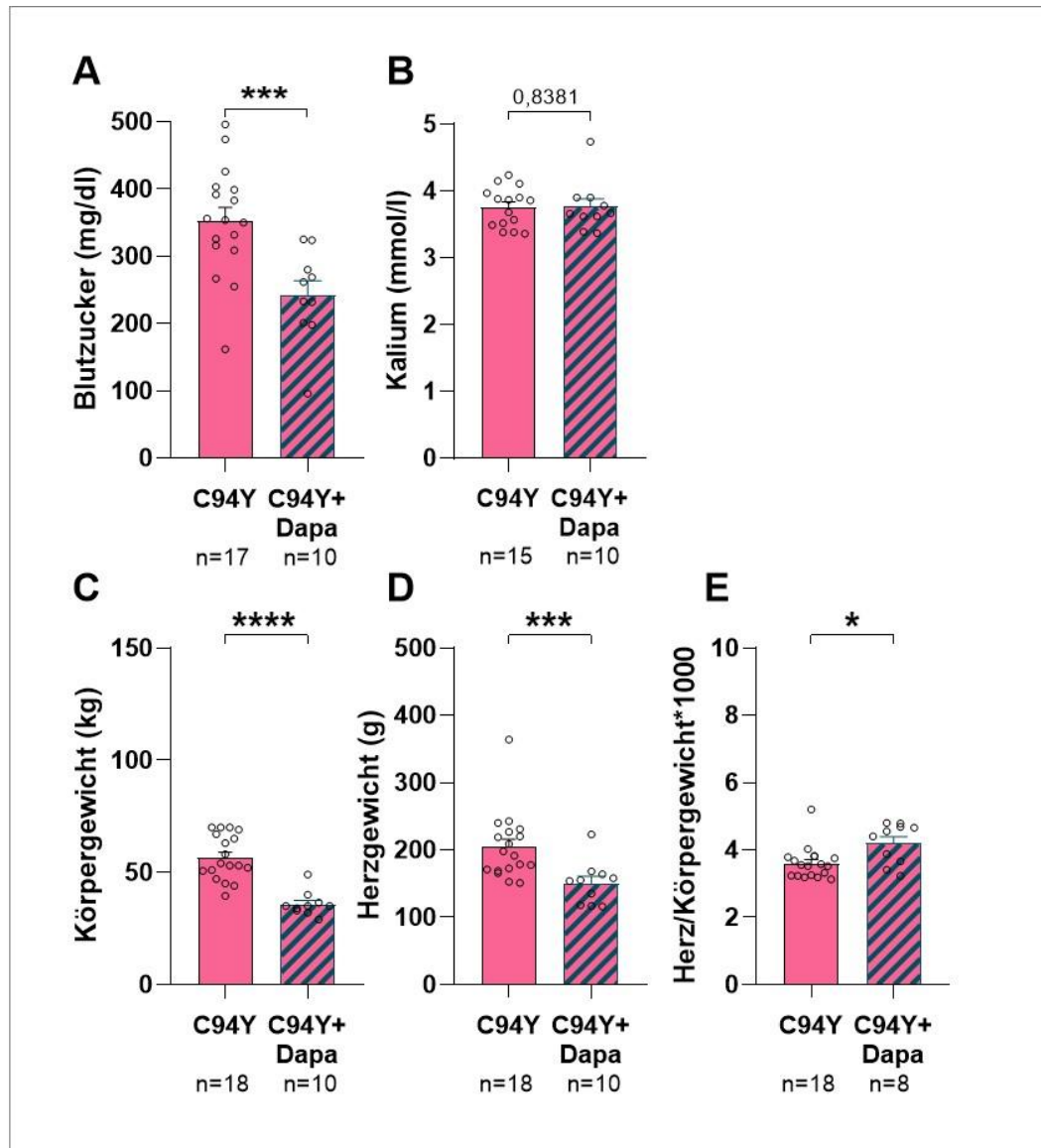


Abb. 33. Darstellender Vergleich von Blutzucker (A), Kaliumspiegel im Blut (B), Körpergewicht (C), sowie Herzgewicht (D) und dem Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht (E) in Diabetes- und Diabetesschweinen mit Dapagliflozin-Therapie; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

2.1.1. Hämodynamik

Der systolische Blutdruck (C94Y: $87,22 \pm 10,06$ mmHg versus C94Y+Dapa: $79,90 \pm 13,01$ mmHg; $p=0,2579$; **Abb. 34A**) und der diastolische Blutdruck (C94Y: $46,11 \pm 9,78$ mmHg; C94Y+Dapa: $41,00 \pm 6,78$ mmHg; $p=0,1226$; **Abb. 34B**) waren in beiden miteinander zu vergleichenden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

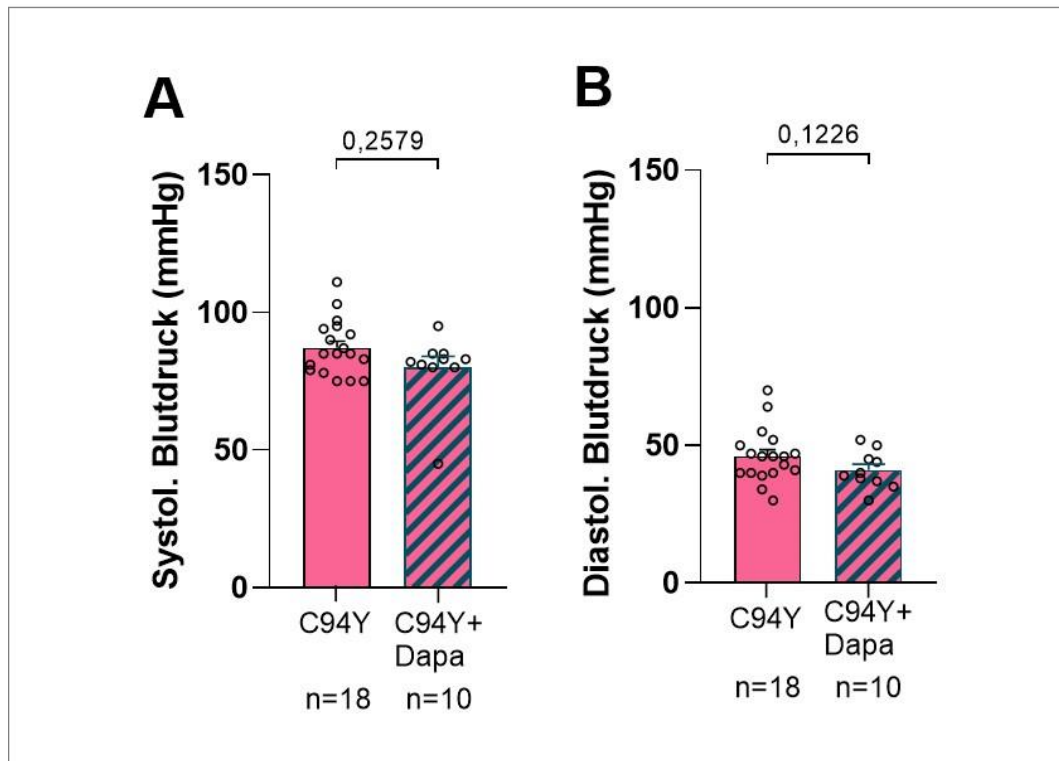


Abb. 34. A. Systolische (systol. BD) und B. diastolische (diastol. BD) Blutdruckmessung in Diabetesschweinen und Diabetesschweinen mit Dapagliflozin-Therapie; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, * $p<0,001$, **** $p<0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.**

Die Messungen des linksventrikulären Drucks [**LVP BL** C94Y: $97,72 \pm 11,79$ mmHg im Vergleich zu C94Y+Dapa: $96,89 \pm 15,85$ mmHg, $p=0,8995$ und **LVP 130** C94Y: $114,40 \pm 15,20$ mmHg im Vergleich zu C94Y+Dapa: $115,30 \pm 18,52$ mmHg, $p=0,3952$ (**Abb.35**)] zeigten keine signifikanten Unterschiede. Auch die Messungen des linksventrikulären enddiastolischen Drucks wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen Diabetikern und Diabetikern mit Therapie auf [**LVEDP BL** C94Y: $12,83 \pm 4,68$ mmHg im Vergleich zu C94Y+Dapa: $11,00 \pm 1,12$ mmHg, $p=0,8899$ und **LVEDP 130** C94Y: $15,50 \pm 4,69$ mmHg im Vergleich zu C94Y+Dapa: $14,22 \pm 4,58$ mmHg, $p=0,5678$ (**Abb. 35**)].

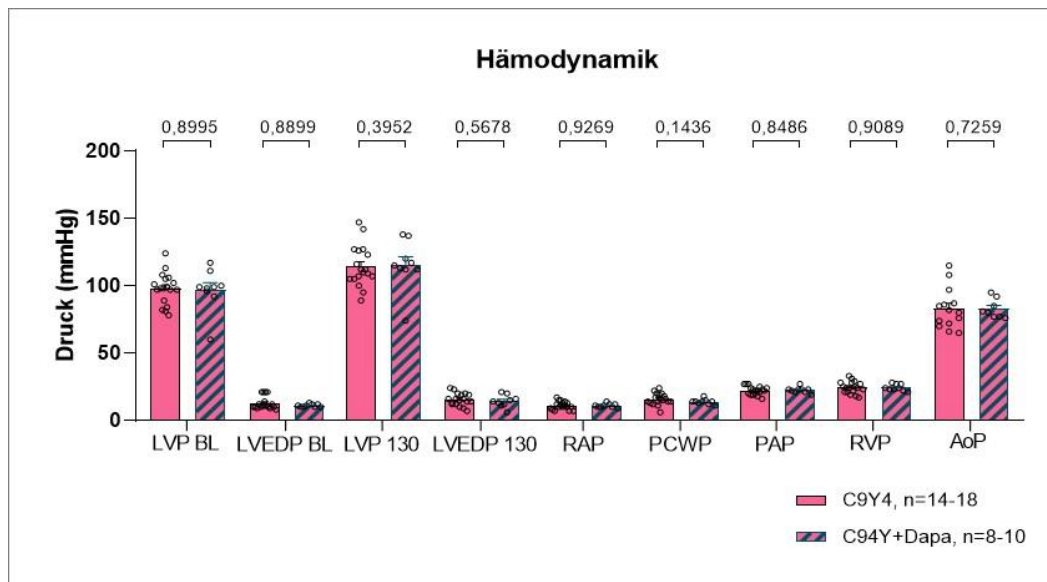


Abb. 35. Hämodynamische Messungen des linken und rechten Herzens in Diabetesschweinen und Diabetesschweinen mit Dapagliflozin-Therapie; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

Die Druckmessungen des rechten Herzens zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Diabetestieren und Diabetestieren mit Dapagliflozin-Therapie [**RAP** C94Y: $11,06 \pm 2,98$ mmHg versus C94Y+Dapa: $11,00 \pm 1,50$ mmHg, $p = 0,9269$; **RVP** C94Y: $24,39 \pm 4,39$ mmHg versus C94Y+Dapa: $24,33 \pm 2,45$ mmHg, $p = 0,9089$ (**Abb. 35**)], ebenso wenig wie die Messungen des pulmonalarteriellen Drucks [**PAP** C94Y: $22,17 \pm 3,16$ mmHg; versus C94Y+Dapa: $22,44 \pm 2,18$ mmHg, $p = 0,8486$ (**Abb. 35**)]. Auch der Lungenkapillarenverschlussdruck [**PCWP** C94Y: $15,83 \pm 4,29$ mmHg; versus C94Y+Dapa: $13,89 \pm 1,97$ mmHg, $p = 0,1436$; (**Abb. 35**)] und der Aortendruck [**AoP** C94Y: $83,07 \pm 14,98$ mmHg; versus C94Y+Dapa: $82,88 \pm 2,55$ mmHg, $p = 0,7259$ (**Abb. 35**)] ließen keine signifikanten Unterschiede verzeichnen.

2.1.2. Elektrokardiogramm (EKG)

Die durchschnittliche Herzfrequenz wurde mittels 12-Kanal-EKG bestimmt, unterschied sich jedoch nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen (C94Y: $70,78 \pm 14,96$ bpm versus C94Y+Dapa: $63,50 \pm 15,66$ bpm, $p = 0,1358$; **Abb. 36**).

In den EKG-Parametern waren ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ersichtlich, abgesehen von der QT-Zeit, welche in der Gruppe mit Dapagliflozin-Therapie signifikant erhöht war (**QT** C94Y: $362,7 \pm 46,11$ bpm versus C94Y+Dapa: $409,8 \pm 34,37$ bpm; * $p = 0,103$; **Abb. 37**).

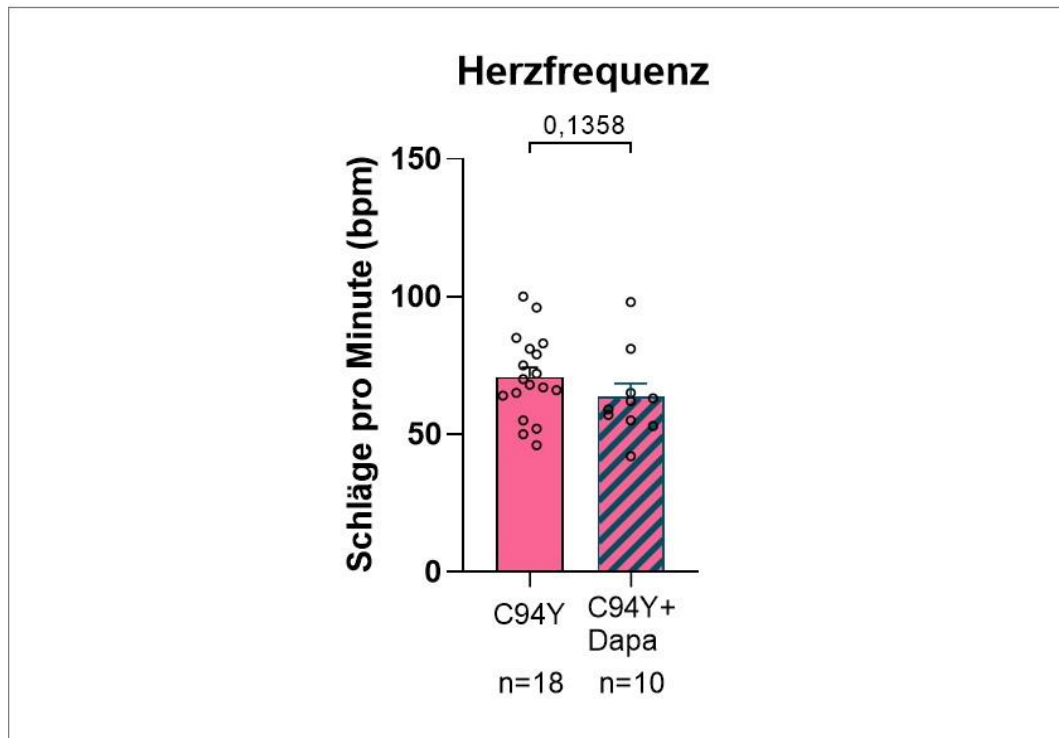


Abb. 36. Messung der Herzfrequenz mittels 12-Kanal-EKG in Diabetesschweinen und Diabetesschweinen mit Dapagliflozin-Therapie; ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

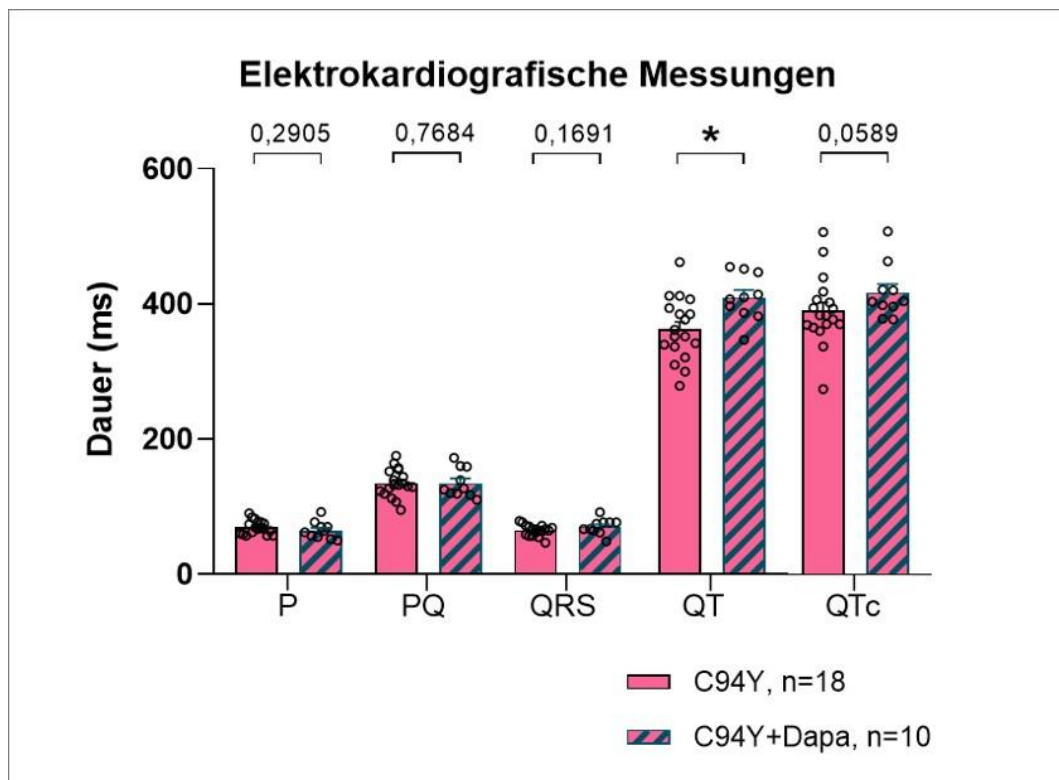


Abb. 37. Elektrokardiografische Messungen mittels 12-Kanal-EKG in Diabetesschweinen und Diabetesschweinen mit Dapagliflozin-Therapie; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

2.1.3. Elektrophysiologische Untersuchung

In der elektrophysiologischen Untersuchung wurde zu Beginn die Sinusknotenerholungszeit ermittelt, welche bei keiner der gemessenen Basiszykluslängen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigte (**Abb. 38**).

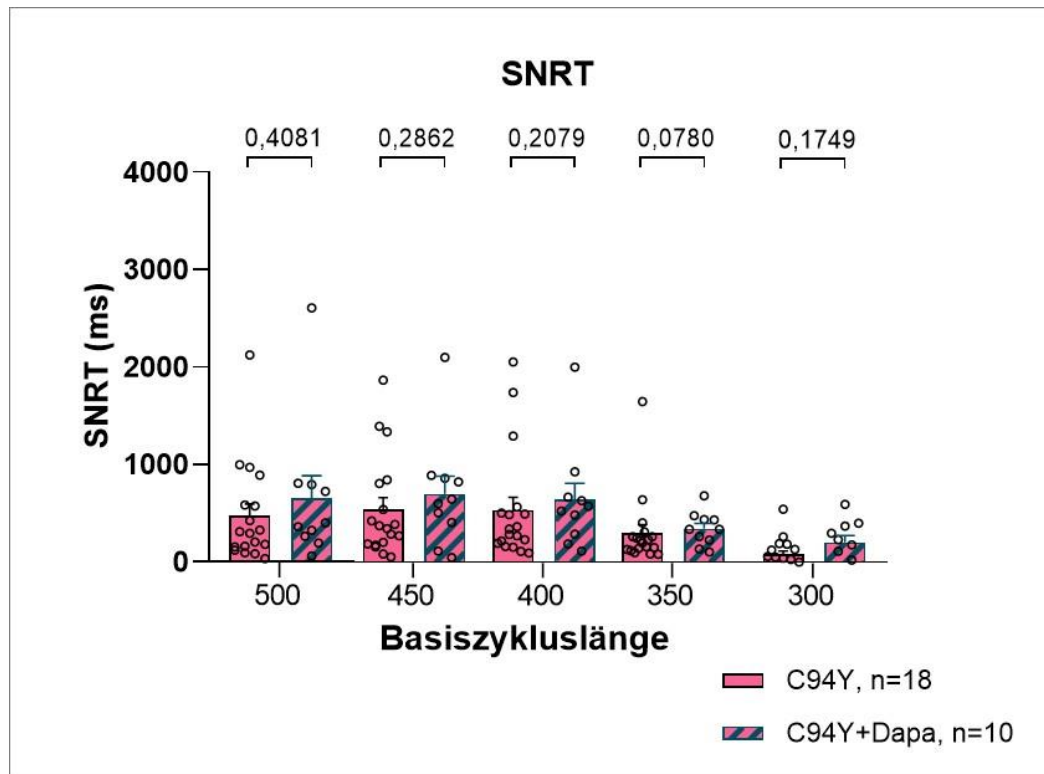


Abb. 38. Messung der Sinusknotenerholungszeit (SNRT). Messung bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms und 300 ms in Diabetesschweinen und Diabetesschweinen mit Dapagliflozin-Therapie, jeweils Mann-Whitney Test.

Bei der Untersuchung des Wenckebachpunkts zeigte sich eine signifikant reduzierte AV-Knotenleitung bei den Tieren mit Therapie (WB C94Y: $242,20 \pm 25,10$ ms versus C94Y+Dapa: $303,30 \pm 95,69$ ms, $*p = 0,0337$; **Abb. 39A**). Hinsichtlich der 2:1-Überleitung wurde kein signifikanter Unterschied deutlich (**Abb. 39B**).

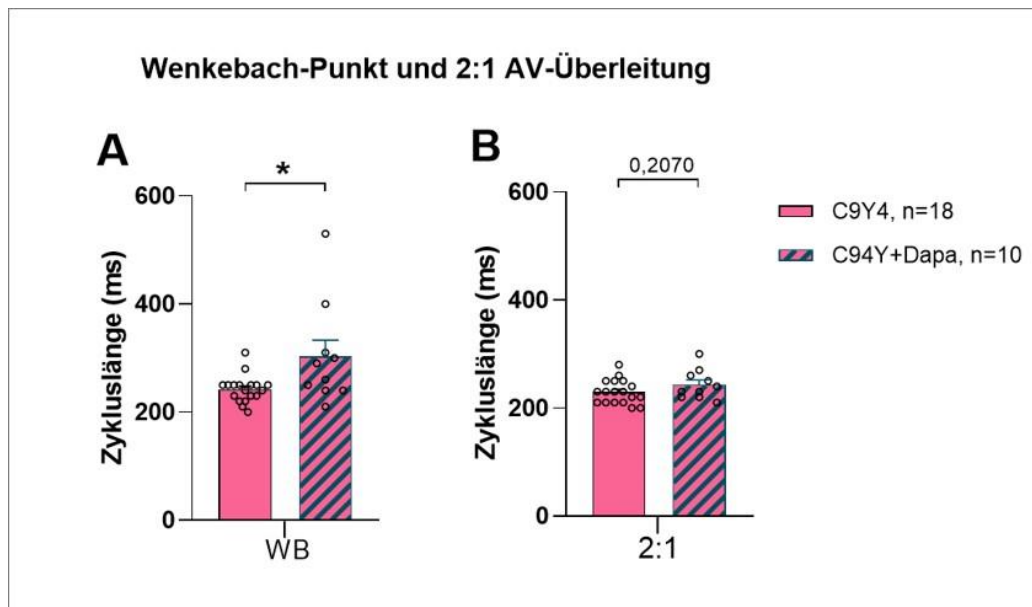


Abb. 39. Wenckebach-Punkt (A) und 2:1 Überleitung (B) in Diabetesschweinen und Diabetesschweinen mit Dapagliflozin-Therapie, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.**

Die atrioventrikuläre effektive Refraktärperiode war bei den Basiszykluslängen 500 ms, 450 ms und 400 ms bei den Tieren mit Dapagliflozin-Therapie signifikant verlängert (**AVERP 500 ms** ** $p = 0,003$; **AVERP 450 ms** *** $p = 0,0002$; **AVERP 400 ms** * $p = 0,0375$; (**Abb. 40**). Die atriale effektive Refraktärperiode (AERP) zeigte bei keiner Basiszykluslänge signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (**Abb. 41**).

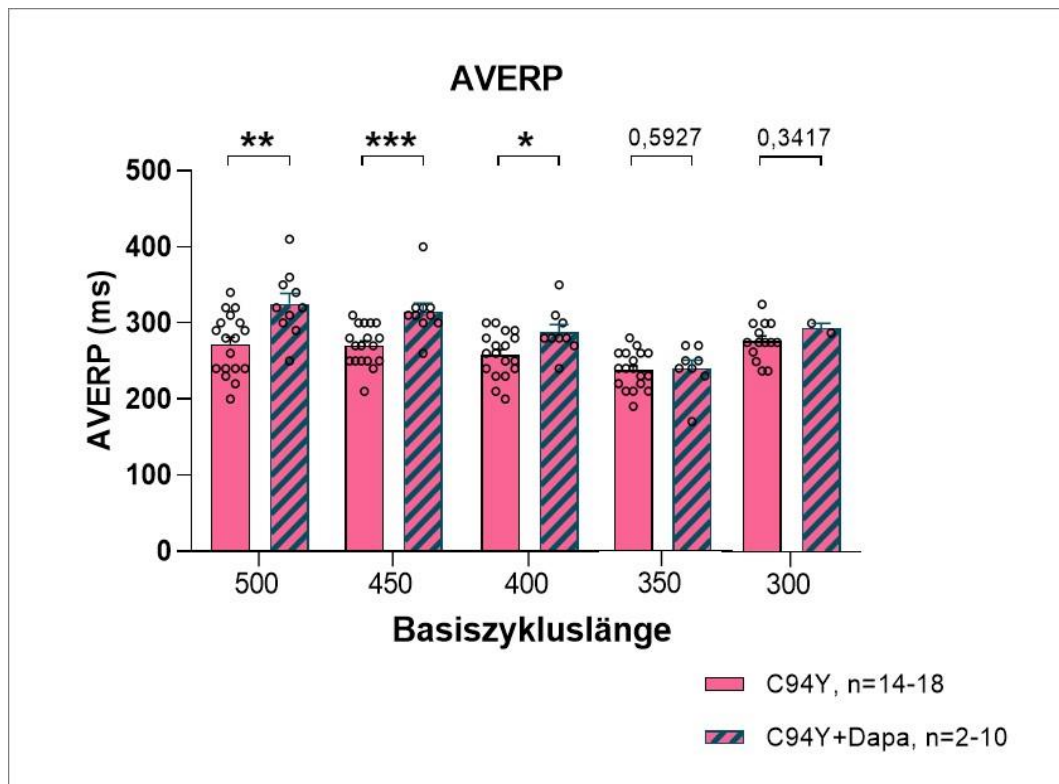


Abb. 40. Atrioventrikuläre effektive Refraktärperiode (AVERP) in Diabetesschweinen versus Diabetesschweinen mit Dapagliflozin-Therapie bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms und 300 ms, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

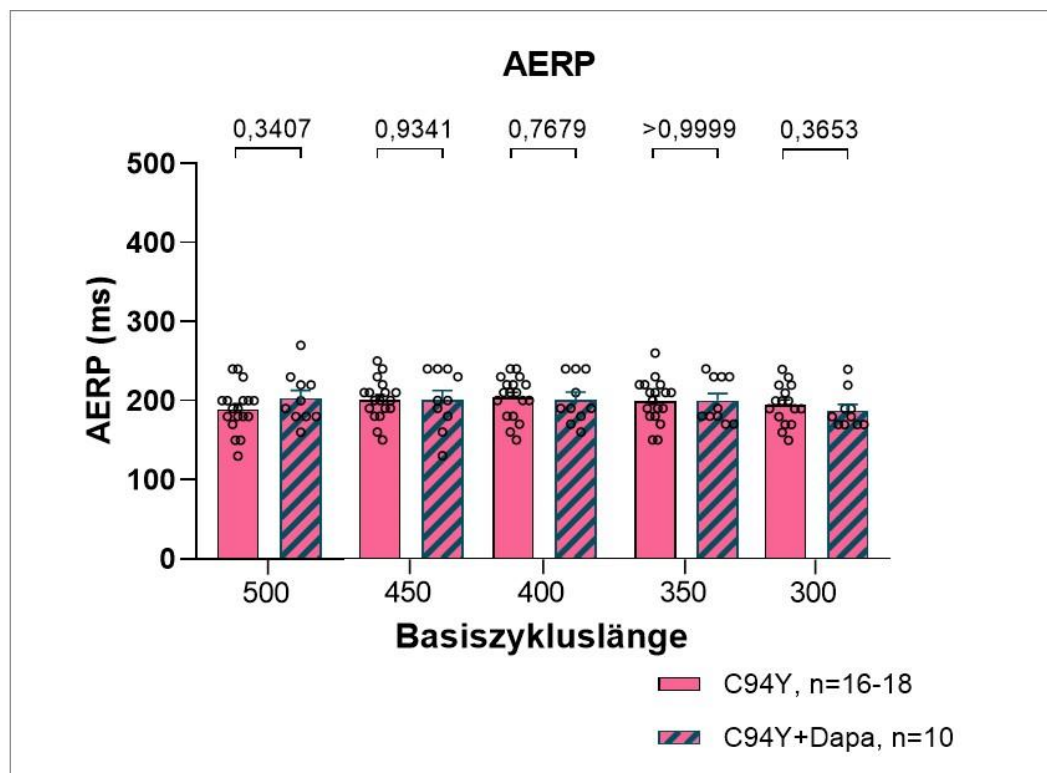


Abb. 41. Atriale effektive Refraktärperiode (AERP) bei Basiszykluslängen von 500 ms, 450 ms, 400 ms, 350 ms und 300 ms, jeweils Mann-Whitney-Test.

Die Vulnerabilität für Arrhythmieepisoden durch Burststimulation zeigte sich in der Gruppe der Diabetestiere mit Dapagliflozin-Therapie signifikant reduziert im Vergleich zu den Diabetestieren ohne Therapie. Der prozentuale Anteil der Tiere, bei denen mindestens eine Arrhythmieepisode ausgelöst werden konnte, lag bei den C94Y-Schweinen mit Dapagliflozin-Therapie bei 10,00%, wohingegen es in der Gruppe der C94Y-Schweine ohne Therapie bei 56,25% zu Vorhofflimmern kam (* $p=0,0184$; **Abb. 42A**). Außerdem zeigte sich eine reduzierte Rate erfolgreicher (d.h. zu Vorhofflimmern führender) Stimulationen pro Schwein (** $p=0,0035$; **Abb. 42B**). Eine kürzere mittlere Episodendauer war ebenfalls zu erkennen (**Abb. 42C**), welche sich in der reduzierten Gesamtdauer aller VHF-Episoden bestätigte (**Abb. 42D**).

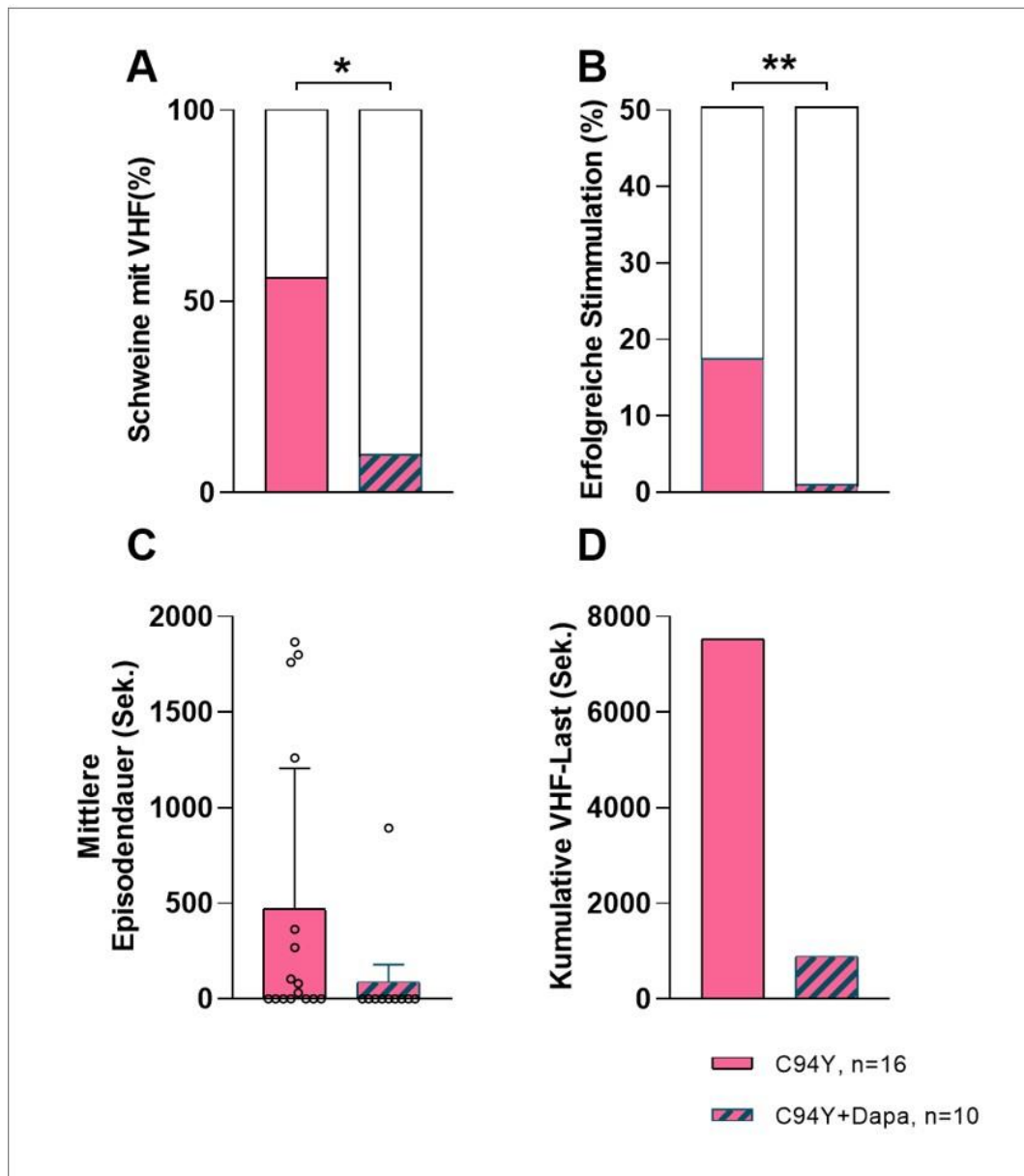


Abb. 42. A-D. Induzierbarkeit von Vorhofflimmern. **A.** Prozentualer Anteil der Schweine mit mindestens einer VHF-Episode; **B.** Prozentsatz erfolgreicher Stimulationen; **C.** Mittlere Episodendauer in Sekunden; **D.** Kumulative VHF-Last in Sekunden, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, A und B jeweils Chi-Square Test.

2.2. *Ex vivo* Ergebnisse des strukturellen Remodelings von *INS*^{C94Y}-Schweinen und *INS*^{C94Y}-Schweinen mit Dapagliflozin-Therapie

2.2.1. Evaluation der interstitiellen Fibrose

Die Quantifizierung der interstitiellen Fibrose des Herzgewebes erfolgte ebenfalls entsprechend in drei Regionen der linken Herzhälfte, dem linken Atrium (LAFW), dem linken Herzohr (LAA) und dem linken Ventrikel (LV) und in drei Regionen der rechten Herzhälfte, dem rechten Atrium (RAFW), dem rechten Herzohr (RAA) und dem rechten Ventrikel (RV). In keiner der untersuchten Regionen zeigte sich ein signifikanter Unterschied der interstitiellen Fibrose zwischen C94Y-Tieren und C94Y-Tieren mit Dapagliflozin-Therapie [**Fibrose LAFW** C94Y: $3,74 \pm 2,27$ % versus C94Y+Dapa: $4,00 \pm 2,94$ %, $p=0,5216$ (**Abb. 43A**); **Fibrose LAA** C94Y: $3,24 \pm 1,01$ % versus C94Y+Dapa: $3,17 \pm 1,71$ %, $p=0,6433$ (**Abb. 43B**); **Fibrose LV** C94Y: $2,19 \pm 1,79$ % versus C94Y+Dapa: $1,94 \pm 1,18$ %, $p=0,4910$ (**Abb. 43C**); **Fibrose RAFW** C94Y: $4,58 \pm 3,01$ % versus C94Y+Dapa: $4,56 \pm 3,94$ %, $p=0,4539$ (**Abb. 44A**), **Fibrose RAA** C94Y: $2,69 \pm 1,57$ % versus C94Y+Dapa: $3,39 \pm 1,05$ %, $p=0,2309$ (**Abb. 44B**); **Fibrose RV** C94Y: $2,08 \pm 1,43$ % versus C94Y+Dapa: $2,00 \pm 1,14$ %, $p>0,9999$ (**Abb. 44C**)].

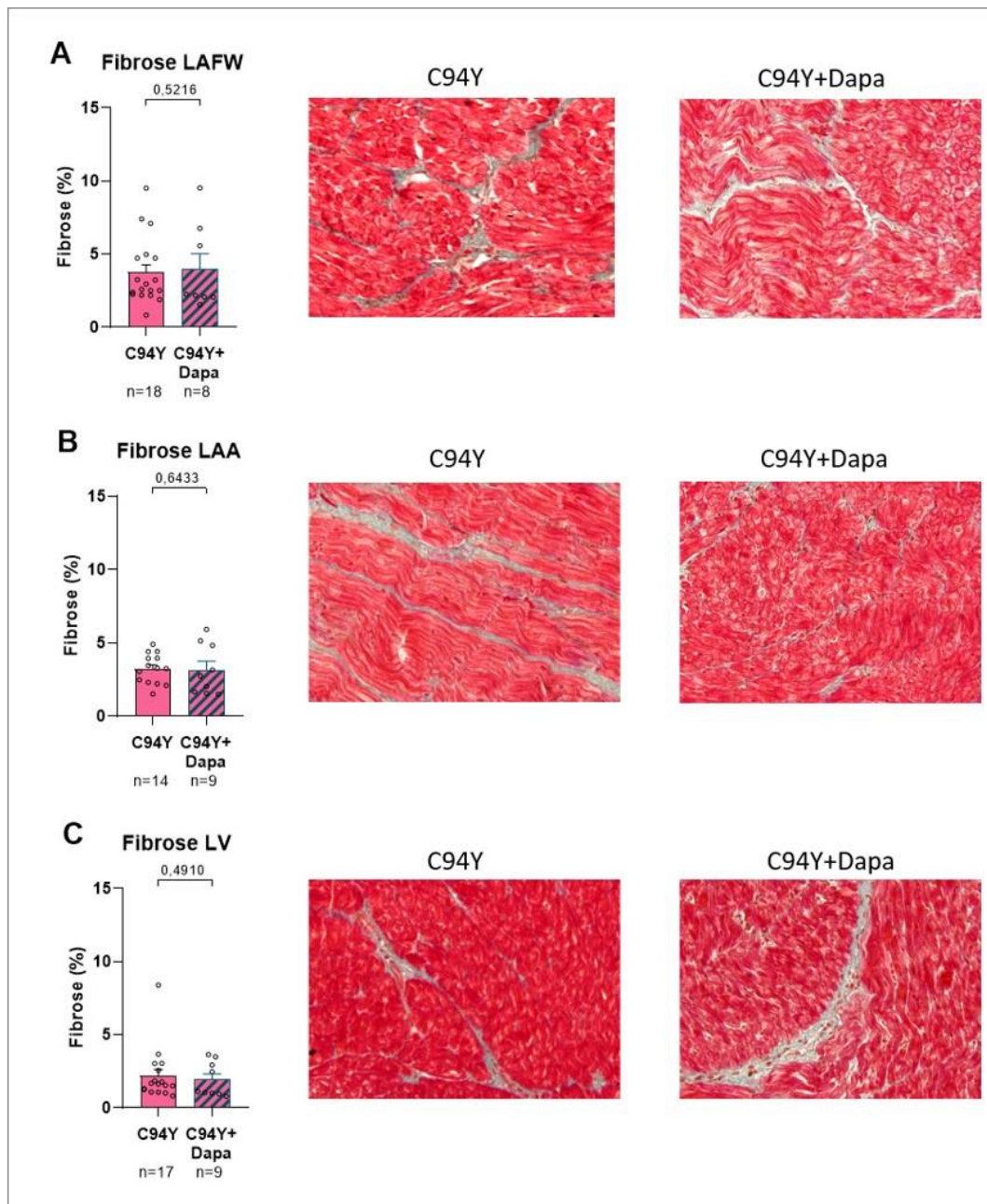


Abb. 43. Quantifizierung der interstitiellen Fibrose mittels Masson-Trichrom-Goldner Färbung. Diabetestiere versus Diabetestiere mit Dapagliflozin-Therapie **A.** Fibrose im linken Atrium, **B.** Fibrose im linken Herzohr, **C.** Fibrose im linken Ventrikel, jeweils Mann-Whitney-Test.

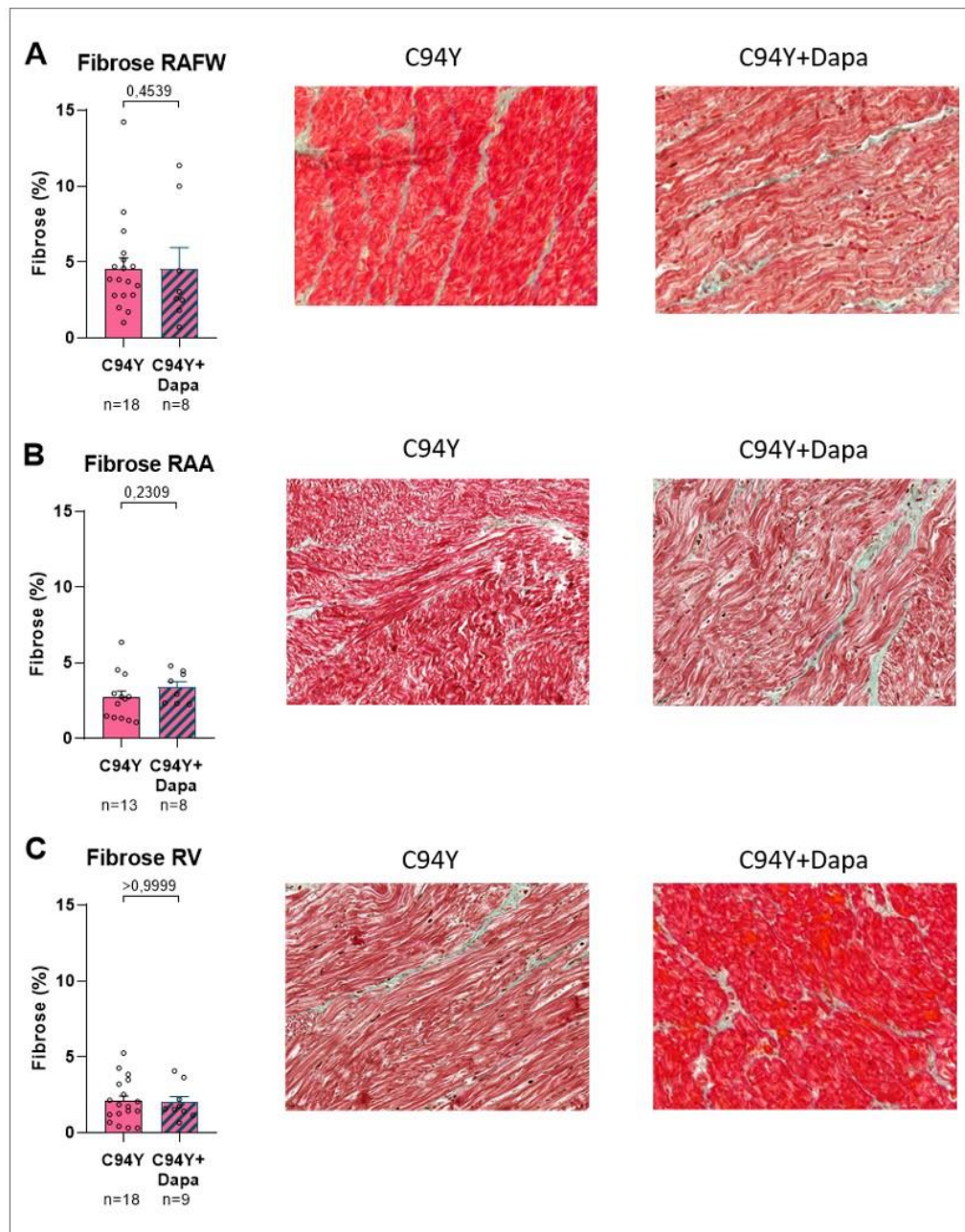


Abb. 44. Quantifizierung der interstitiellen Fibrose mittels Masson-Trichrom-Goldner Färbung. Diabetestiere versus Diabetestiere mit Dapagliflozin-Therapie **A.** Fibrose im rechten Atrium, **B.** Fibrose im rechten Herzhorn; **C.** Fibrose im rechten Ventrikel, jeweils Mann-Whitney-Test.

Die Korrelationsanalyse ergab weder in den Regionen der linken Herzhälfte [LAFW $r=0,2508$, $p=0,2071$ (Abb. 45A); LAA $r=0,2777$, $p=0,1996$ (Abb. 45B); LV $r=-0,1435$, $p=0,47753$ (Abb. 45C)], noch in den Regionen der rechten Herzhälfte eine signifikante Korrelation [RAFW $r=-0,4103$, $p=0,8422$ (Abb. 45D); RAA $r=-0,03508$, $p=0,8800$ (Abb. 45E); RV $r=-0,01832$, $p=0,9278$ (Abb. 45F)].

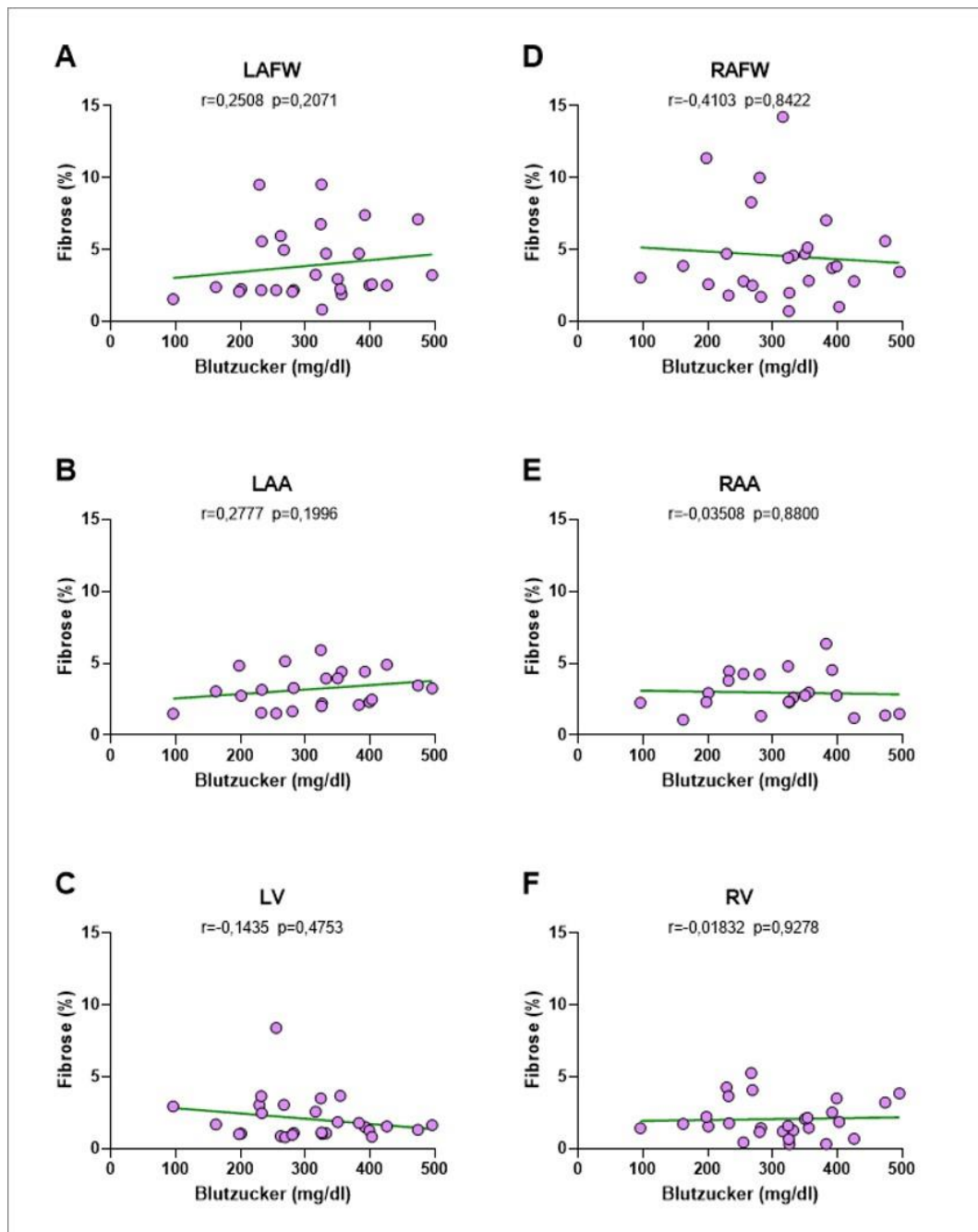


Abb. 45. Korrelationsanalyse zwischen interstitieller Fibrose und Blutglukosewerten. A. linkes Atrium, **B.** linkes Herzohr, **C.** linker Ventrikel, **D.** rechtes Atrium, **E.** rechtes Herzohr, **F.** rechter Ventrikel in Diabetestieren und Diabetestieren mit Dapagliflozin-Therapie .

2.2.2. Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung

Bei der Quantifizierung von YAP-positiven Nuklei zeigten sich für den Zelltyp der Fibroblasten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in allen vier untersuchten Herzregionen [**YAP-positive Fibroblasten LAFW** C94Y: $7,77 \pm 3,52$ % versus C94Y+Dapa: $8,19 \pm 4,68$ %, $p=0,9740$ (**Abb. 46A**); **YAP-positive Fibroblasten LV** C94Y: $14,50 \pm 5,65$ % versus C94Y+Dapa: $14,20 \pm 2,21$ %, $p=0,9307$ (**Abb. 46B**); **YAP-positive Fibroblasten RAFW** C94Y: $8,42 \pm 4,96$ % versus C94Y+Dapa: $8,05 \pm 4,14$ %, $p>0,9999$ (**Abb. 46C**); **YAP-positive Fibroblasten RV** C94Y: $17,76 \pm 7,66$ % versus C94Y+Dapa: $14,91 \pm 3,75$ %, $p=0,6991$ (**Abb. 46D**)].

Es zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen in allen untersuchten Regionen hinsichtlich des Anteils YAP-positiver Kardiomyozytennuklei [**YAP-positive Kardiomyozyten LAFW** C94Y: $27,71 \pm 5,55$ % versus C94Y+Dapa: $24,57 \pm 6,50$ %, $p=0,3939$ (**Abb. 47A**); **YAP-positive Kardiomyozyten LV** C94Y: $34,34 \pm 5,82$ % versus C94Y+Dapa: $27,64 \pm 4,45$ %, $p=0,0823$ (**Abb. 47B**); **YAP-positive Kardiomyozyten RAFW** C94Y: $25,22 \pm 9,76$ % versus C94Y+Dapa: $31,14 \pm 9,87$ %, $p=0,3939$ (**Abb. 47C**); **YAP-positive Kardiomyozyten RV** C94Y: $31,04 \pm 5,40$ % versus C94Y+Dapa: $30,70 \pm 6,25$ %, $p=0,8182$ (**Abb. 47D**)].

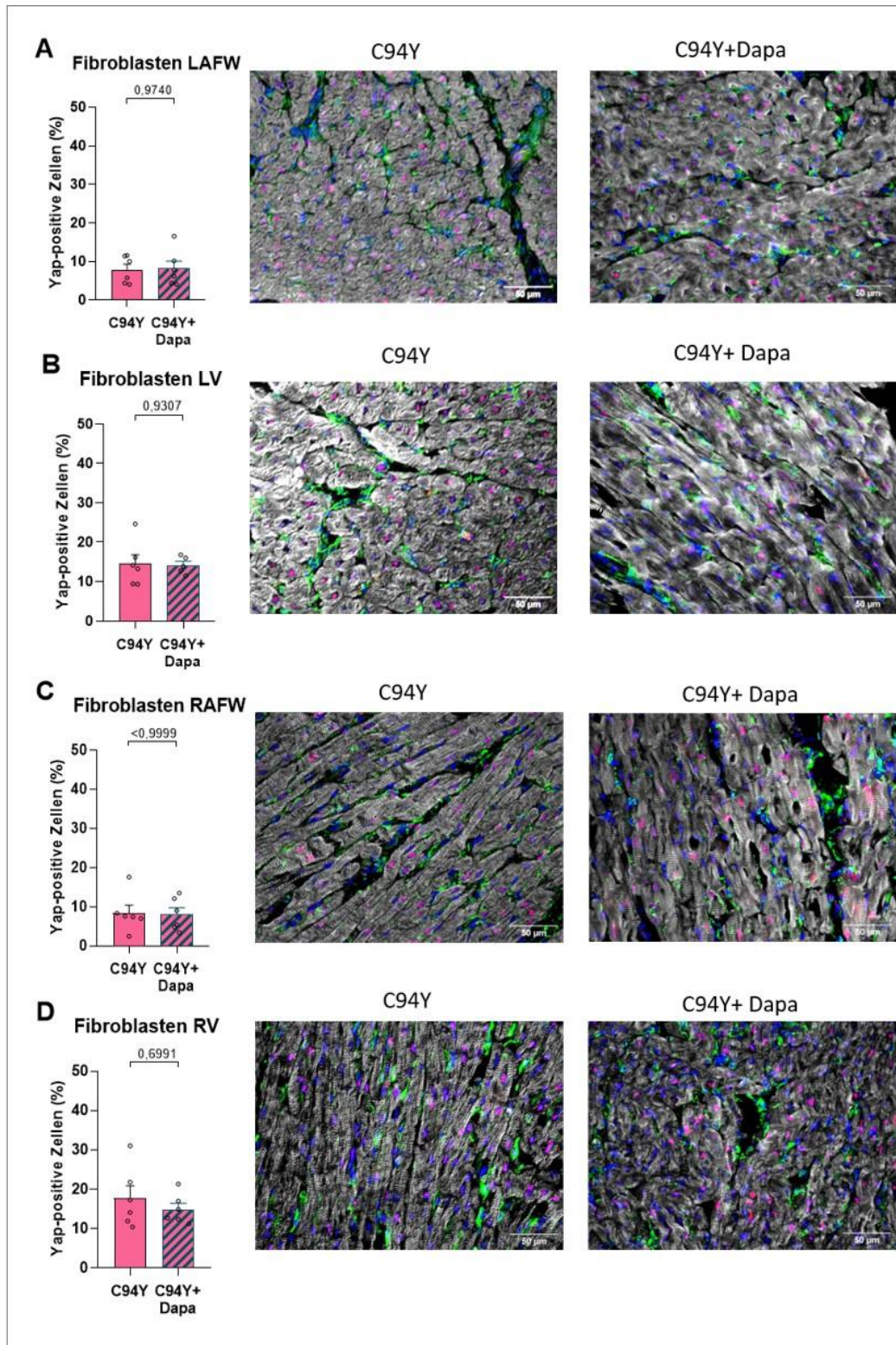


Abb. 46. Quantifizierung der YAP-positiven Fibroblasten. A. YAP-positive Fibroblasten im linken Atrium; B. YAP-positive Fibroblasten im linken Ventrikel; C. YAP-positive Fibroblasten im rechten Atrium; D. YAP-positive Fibroblasten im rechten Ventrikel in Diabetestieren und Diabetestieren mit Dapagliflozin-Therapie. Jeweils n=5-6, jeweils Mann-Whitney-Test.

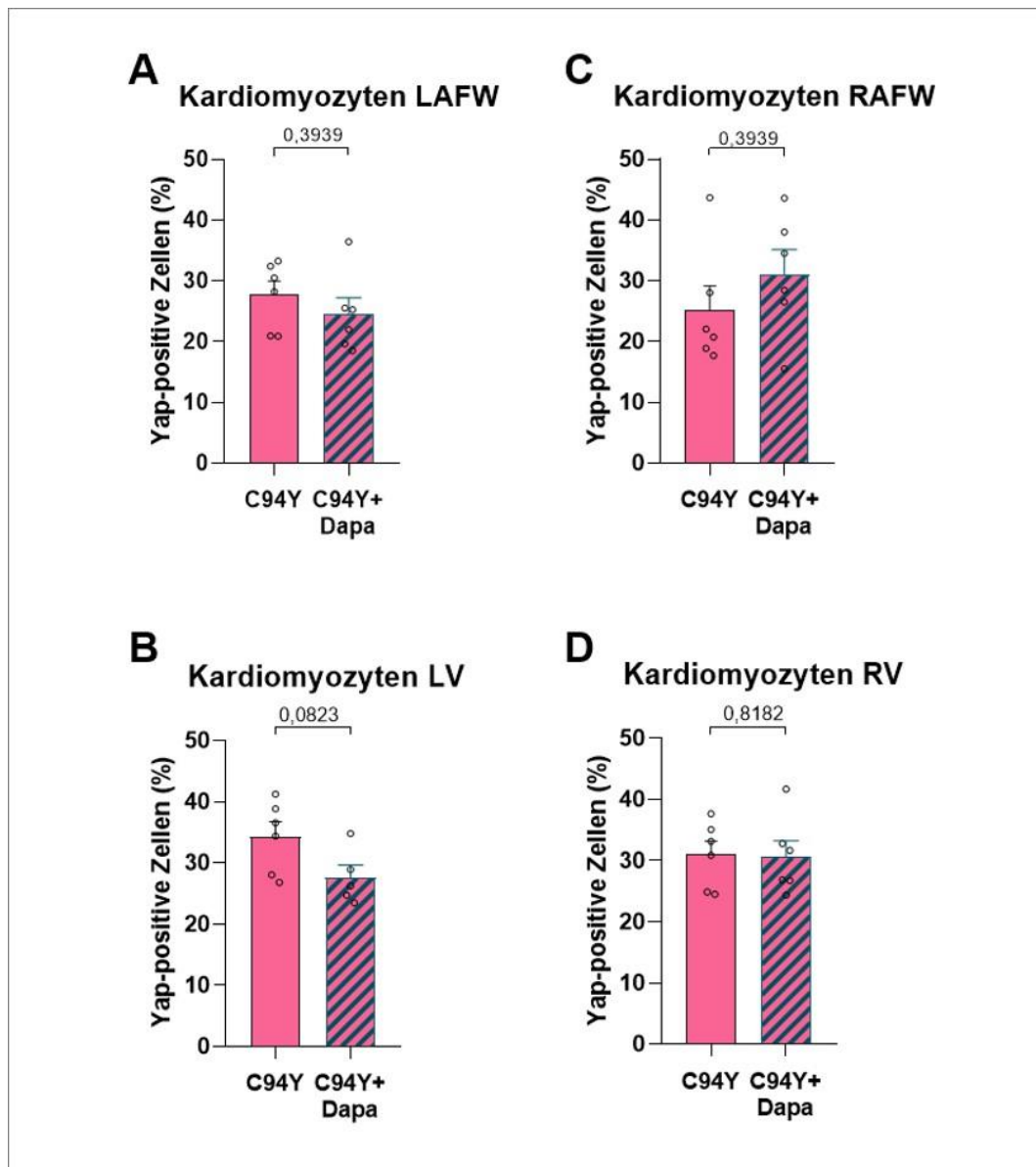


Abb. 47. Quantifizierung der YAP-positiven Kardiomyozyten. A. YAP-positive Kardiomyozyten im linken Atrium; B. YAP-positive Kardiomyozyten im linken Ventrikel; C. YAP- positive Kardiomyozyten im rechten Atrium; D. YAPpositive Kardiomyozyten im rechten Ventrikel in Diabetestieren versus Diabetestiere mit Dapagliflozin-Therapie, n=5-6, jeweils Mann-Whitney-Test.

Mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenzfärbung wurde ebenfalls eine Korrelationsanalyse zwischen dem Prozentsatz an YAP-positiven Zellen und dem entsprechend gemessenen Blutglukosewert erstellt. Dargestellt wurde diese Analyse für beide Gruppen in einem Graphen für die jeweilige Herzregion. In keiner der Regionen waren signifikante Korrelationen zu verzeichnen [LAFW $r=0,5499$, $p=0,0672$ (Abb. 48A); LV $r=0,02636$, $p=0,4348$ (Abb. 48B); RA FW $r=0,2098$, $p=0,5137$ (Abb. 48C); RV $r=0,4545$, $p=0,1404$ (Abb. 48D)].

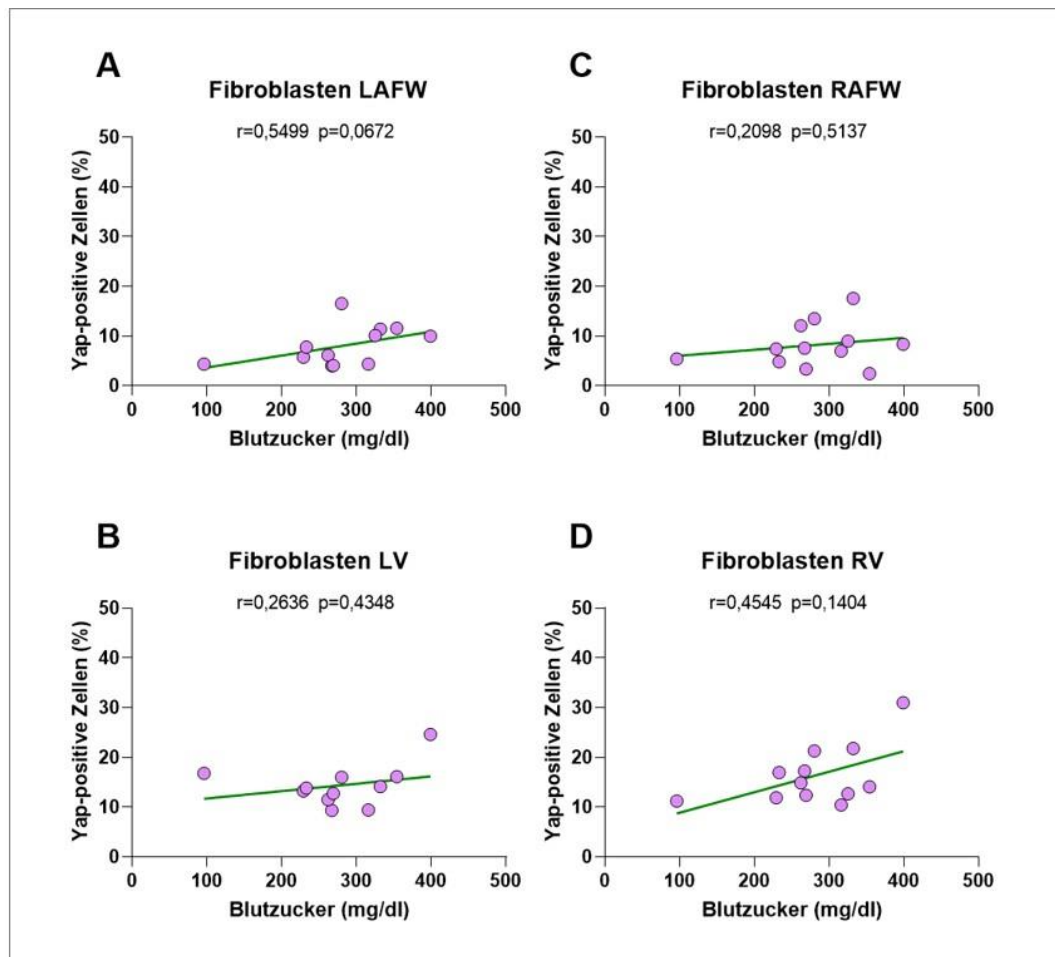


Abb. 48. Korrelationsanalyse zwischen YAP-positiven Fibroblasten und Blutglukosewerten. A. linkes Atrium, **B.** linker Ventrikel, **C.** rechtes Atrium, **D.** rechter Ventrikel, jeweils $n=10-12$

Ebenfalls wurde eine Korrelationsanalyse zwischen YAP-positiven Kardiomyozyten und Blutglukosespiegel durchgeführt, welche ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigte [LAFW $r=-0,3636$, $p=0,2464$ (Abb. 49A); LV $r=0,1455$, $p=0,6731$ (Abb. 49B); RAFW $r=0,1678$, $p=0,6039$ (Abb. 49C); RV $r=0,04895$, $p=0,8861$ (Abb. 49.D)].

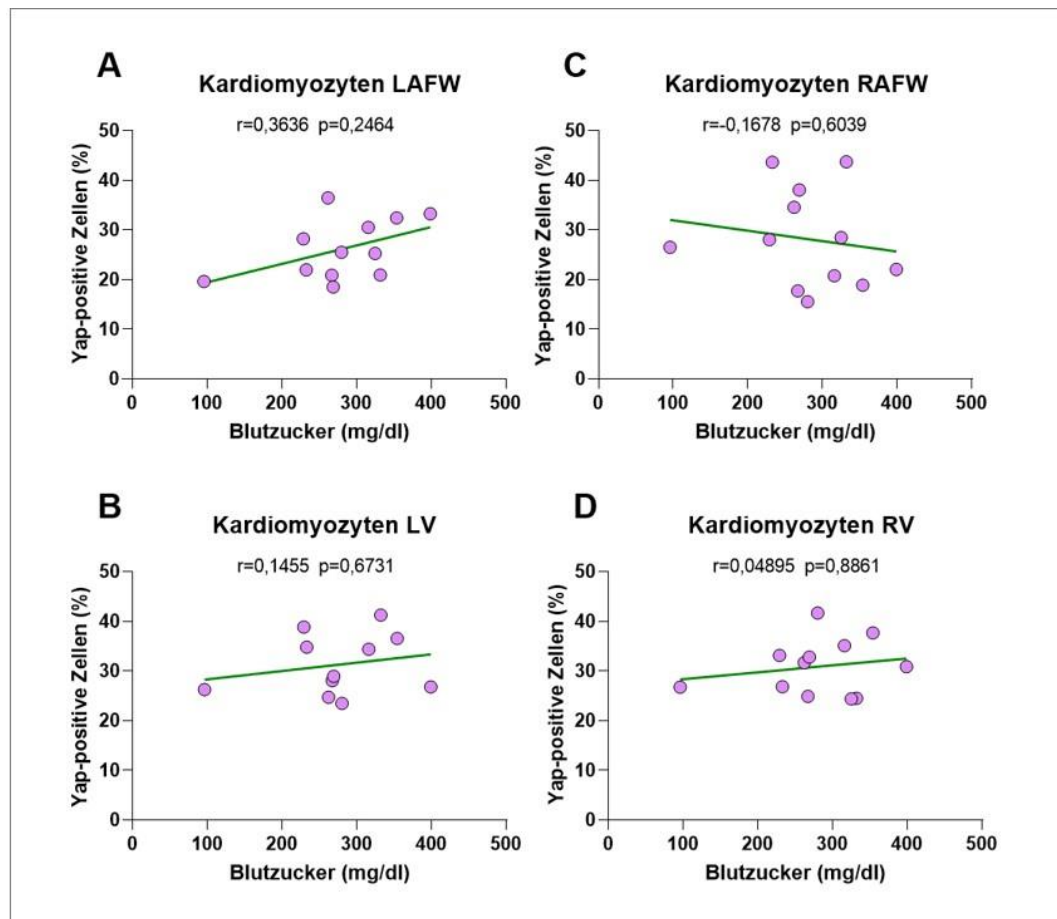


Abb. 49. Korrelationsanalyse zwischen YAP-positiven Kardiomyozyten und Blutglukosewerten
A. linkes Atrium, **B.** linker Ventrikel, **C.** rechtes Atrium, **D.** rechter Ventrikel, $n=10-12$.

2.2.3. Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Im rechten Vorhof konnte eine signifikante Expressionsreduktion des *YAP-1* Transkripts in Schweinen mit Dapagliflozin-Therapie beobachtet werden (**YAP RAFW C94Y** versus **C94Y+Dapa**, $*p=0,0115$; **Abb. 50C**).

Die Expression von Amphiregulin (*AREG*) war in keiner der Herzregionen signifikant unterschiedlich zwischen den Gruppen (**Abb. 51A-D**).

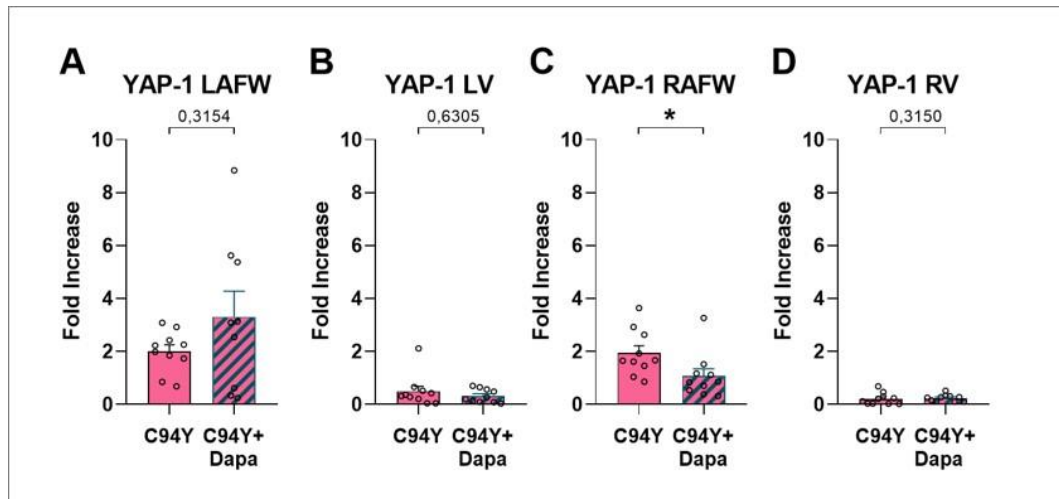


Abb. 50. Genexpressionsanalyse Yes-assoziierten Proteins (*YAP-1*). C94Y versus C94Y+ Dapagliflozin-Therapie **A.** linkes Atrium, **B.** linker Ventrikel, **C.** rechtes Atrium, **D.** rechter Ventrikel. Jeweils n=9-10., *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, jeweils Mann-Whitney-Test.

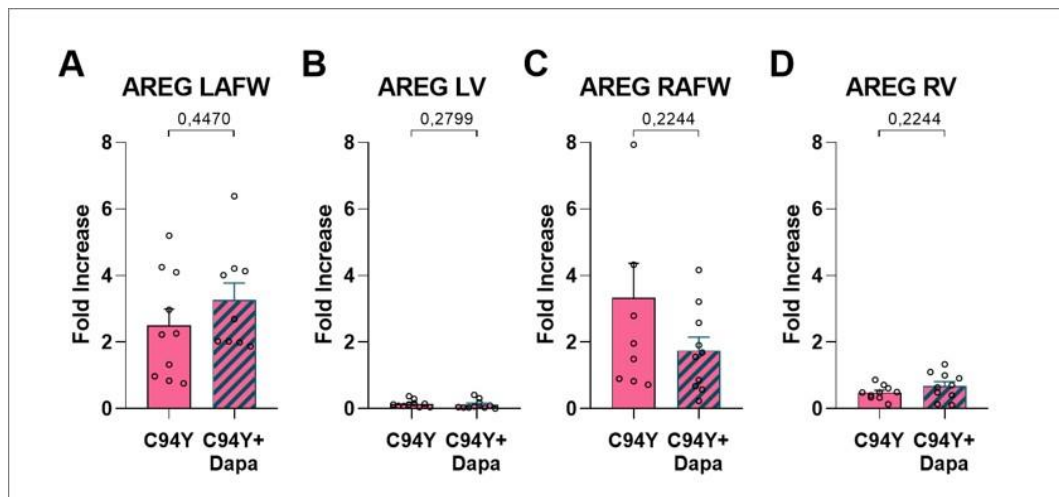


Abb. 51. Genexpressionsanalyse Amphiregulin (*AREG*). C94Y versus C94Y+ Dapagliflozin-Therapie **A.** linkes Atrium, **B.** linker Ventrikel, **C.** rechtes Atrium, **D.** rechter Ventrikel. Jeweils n=9-10, jeweils Mann-Whitney-Test.

Die Expression der Gene, welche Teil des TGF- β -Signalweges sind, zeigten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Expression von *TGF- β 1* war in der Gruppe der Diabetestiere mit Dapagliflozin-Therapie im linken Ventrikel und im rechten Vorhof signifikant reduziert, verglichen mit der Gruppe ohne Therapie [*TGF- β 1 LV* C94Y versus C94Y+Dapa, ***p<0,001 (**Abb. 52B**); *TGF- β 1 RAFW* C94Y versus C94Y+Dapa, **p=0,0084 (**Abb. 52C**)]. Die Expression von *SMAD3* war im linken Ventrikel, im linken Atrium, sowie im rechten Atrium in der Gruppe der Diabetestiere mit Dapagliflozin-Therapie signifikant reduziert, verglichen mit den Tieren ohne Therapie [*SMAD3 LAFW* C94Y versus C94Y+Dapa, ***p=0,0002 (**Abb. 52E**); *SMAD3 LV* C94Y versus

C94Y+Dapa, *p=0,0147 (**Abb. 52F**); **SMAD3 RAFW** C94Y versus C94Y+Dapa, *p=0,0147 (**Abb. 52G**)]. Die Expression von *COL1A1* war in der Gruppe der Dapagliflozin-therapierten Tiere im Bereich des linken Ventrikels signifikant reduziert [**COL1A1 LV** C94Y versus C94Y+Dapa, **p=0,0068 (**Abb. 52J**)]. Fibronektin zeigte eine signifikante Expressionsreduktion der Diabetesgruppe mit Therapie im Bereich des linken Atriums verglichen mit den nicht therapierten Tieren [**FN1 LAFW** C94Y versus C94Y+Dapa, **p=0,0021 (**Abb. 52M**)].

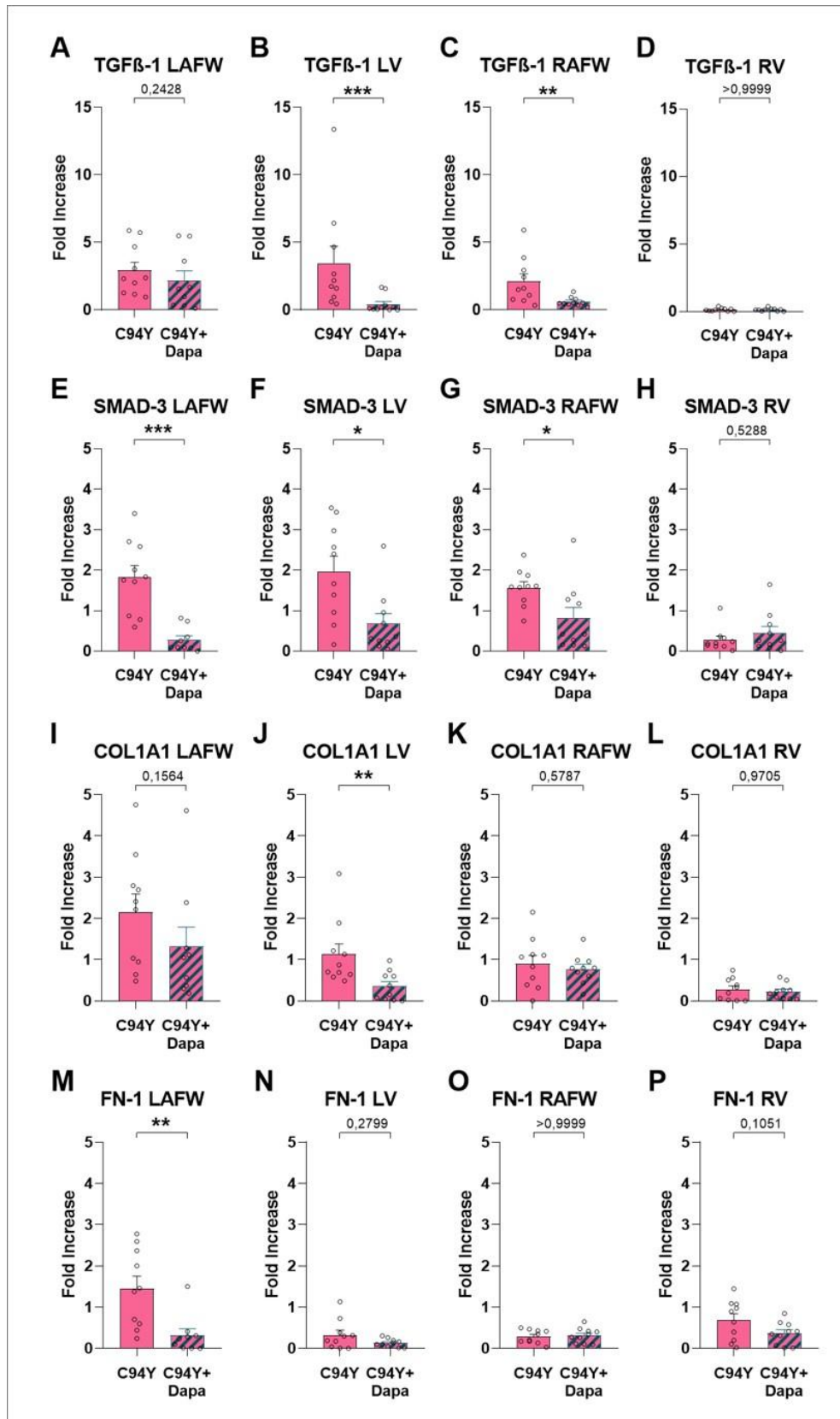


Abb. 52. Genexpressionsanalyse der Gene des TGF-Signalwegs. A. *TGF-β1*: linkes Atrium, B. *TGF-β1*: linker Ventrikel, C. *TGF-β1*: rechtes Atrium, D. *TGF-β1*: rechter Ventrikel; E. *SMAD3*: linkes Atrium, F. *SMAD3*: linker Ventrikel, G. *SMAD3*: rechtes Atrium, H. *SMAD3*: rechter Ventrikel; I. *COL1A1*: linkes Atrium, J. *COL1A1*: linker Ventrikel, K. *COL1A1*: rechtes Atrium, L. *COL1A1*: rechter Ventrikel; M. *FN1*: linkes Atrium; N. *FN1*: linker Ventrikel, O. *FN1*: rechtes Atrium, P. *FN1*: rechter Ventrikel, C94Y versus C94Y+ Dapagliflozin-Therapie, n=9-10, p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, jeweils Mann-Whitney-Test.

Die Genexpressionsanalyse der Matrix-Metalloproteinase 2 (*MMP2*), des ECM-assoziierten Gens *CTGF*, sowie des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 zeigten signifikant reduzierte Genexpressionen in der Dapagliflozin-Gruppe im Bereich des linken Ventrikels [***MMP2 LV*** C94Y versus C94Y+Dapa, **p=0,0052 (**Abb. 53B**); ***CTGF LV*** C94Y versus C94Y+Dapa, **p=0,0052 (**Abb. 53F**); ***PAI-1 LV*** C94Y versus C94Y+Dapa, **p=0,0039 (**Abb. 53J**)].

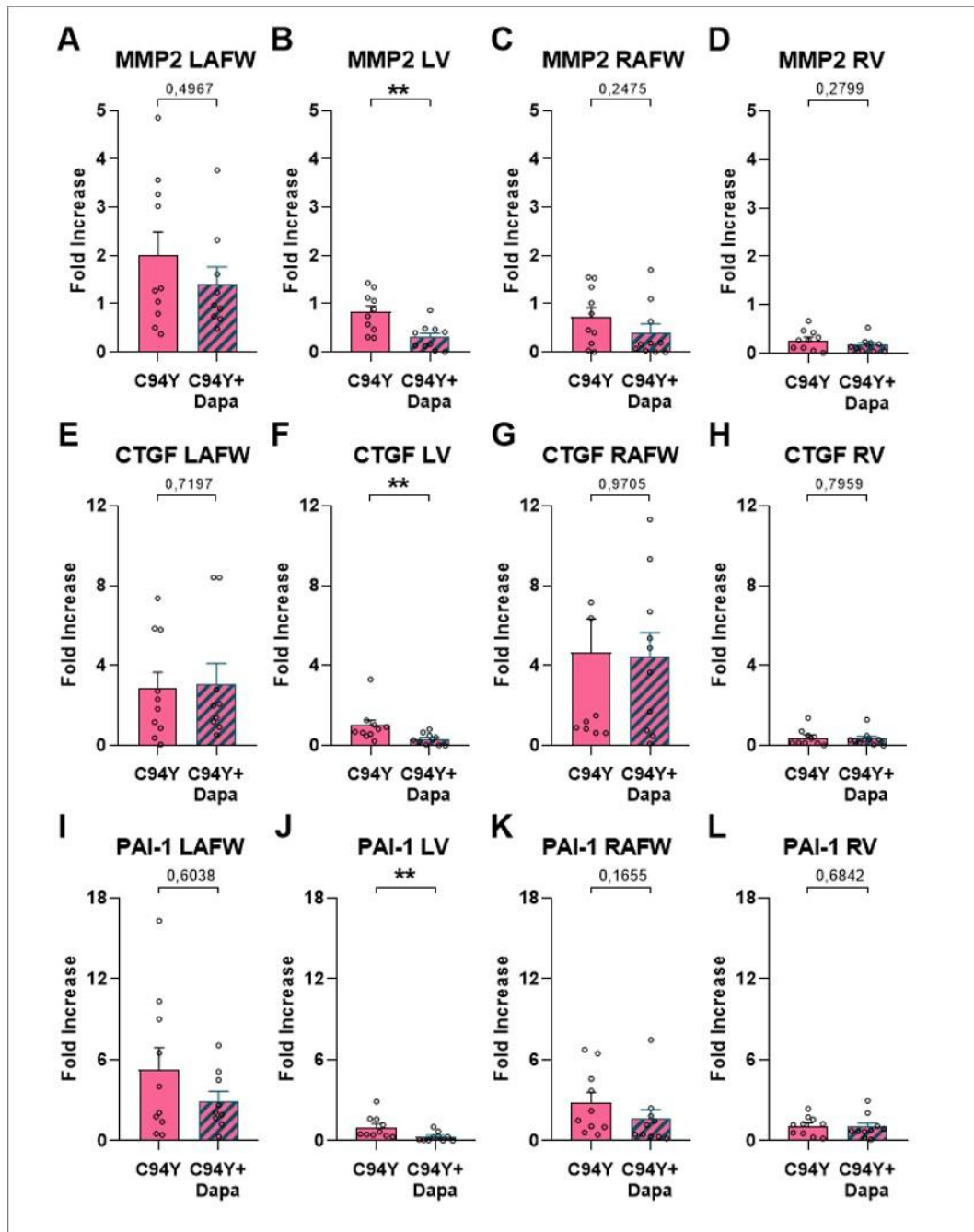


Abb. 53. Genexpressionsanalyse von *MMP* (A-D), *CTGF* (E-H) und *PAI-1* (I-L). A. *MMP2*: linkes Atrium, B. *MMP2*: linker Ventrikel, C. *MMP2*: rechtes Atrium, D. *MMP2*: rechter Ventrikel; E. *CTGF*: linkes Atrium, F. *CTGF*: linker Ventrikel, G. *CTGF*: rechtes Atrium, H. *CTGF*: rechter Ventrikel; I. *PAI-1*: linkes Atrium, J. *PAI-1*: linker Ventrikel, K. *PAI-1*: rechtes Atrium, L. *PAI-1*: rechter Ventrikel; C94Y versus C94Y+ Dapagliflozin-Therapie, n= 9-10, p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, jeweils Mann-Whitney-Test.

Im Bereich der proinflammatorischen Gene war die Expression des *Macrophage Migration Inhibitory Factor* im linken Vorhof und im linken Ventrikel in der Gruppe der Diabetestiere mit Dapagliflozin-Therapie signifikant reduziert verglichen mit den Tieren ohne Therapie. Die Expressionsanalyse des CC-

Chemokinligand-2 (*CCL2*) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen [*MIF* LAFW C94Y versus C94Y+Dapa, *** $p=0,0006$ (Abb. 54A); *MIF* LV C94Y versus C94Y+Dapa, **** $p<0,0001$ (Abb. 54B)].

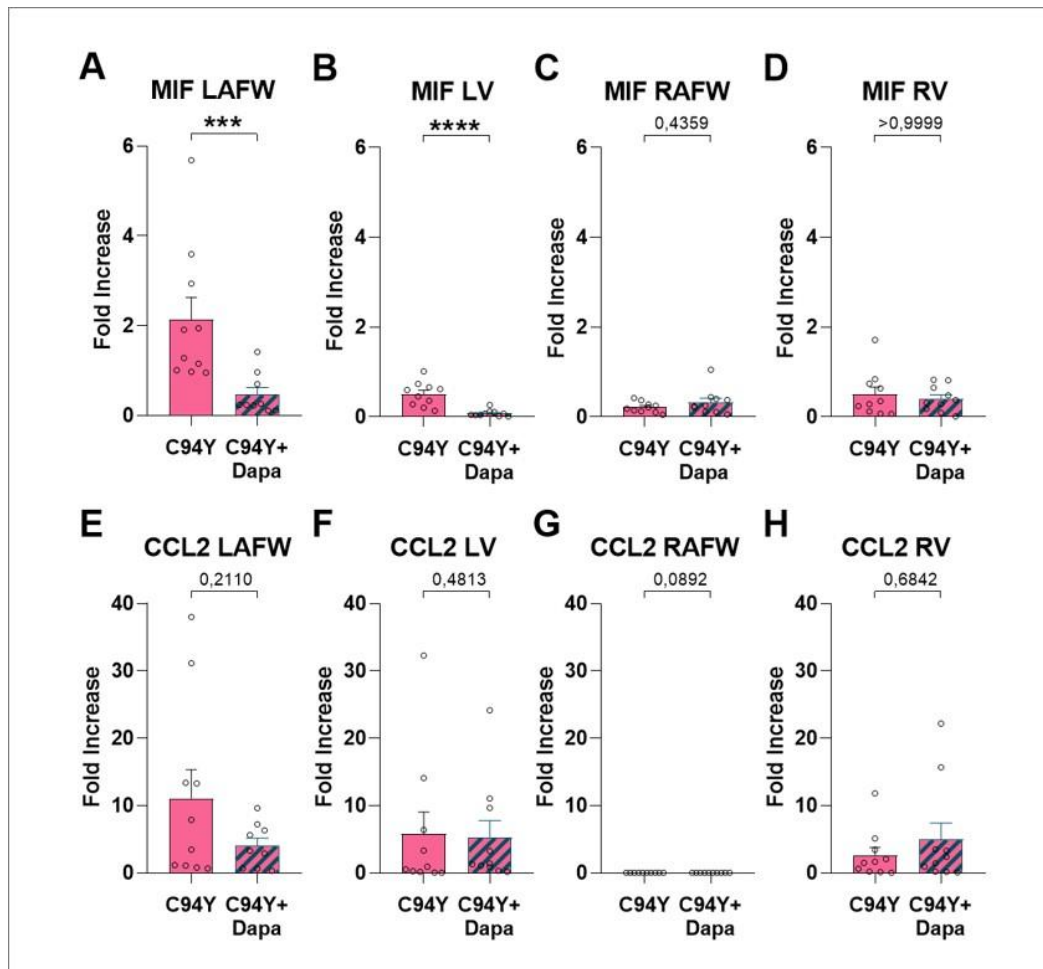


Abb. 54. Genexpressionsanalyse der proinflammatorischen Gene *MIF* (A-D) und *CCL2* (E-H). A. *MIF*: linkes Atrium, B. *MIF*: linker Ventrikel, C. *MIF*: rechtes Atrium, D. *MIF*: rechter Ventrikel; E. *CCL2*: linkes Atrium, F. *CCL2*: linker Ventrikel, G. *CCL2*: rechtes Atrium, H. *CCL2*: rechter Ventrikel. C94Y versus C94Y+Dapagliflozin-Therapie, $n=9-10$, $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$, jeweils Mann-Whitney-Test.

V. DISKUSSION

1. Wahl der Tierart

Vorhofflimmern ist die häufigste Herzrhythmusstörung im Menschen (Andrade et al., 2014). In der kardiovaskulären Forschung hat die Verwendung von Schweinemodellen in den vergangenen Jahrzehnten an Bedeutung gewonnen und gilt auch als vielversprechendes Modell für die Erforschung des VHF (Schüttler et al., 2020). Durch ihre anatomischen, hämodynamischen und elektrophysiologischen Eigenschaften, welche große Ähnlichkeit zum Menschen aufweisen, sind Schweine für kardiologische Fragestellungen besonders geeignet und weisen somit große Vorteile gegenüber Nagern auf (Clauss et al., 2019, Frydrychowski et al., 2020, Schüttler et al., 2020).

Aufgrund ihrer Körper- und Herzgröße weisen Nagetiere wesentliche Unterschiede zum Menschen hinsichtlich physiologischer Parameter (Ruheherzfrequenz, Blutdruck, Atemfrequenz etc.), hämodynamischer und elektrophysiologischer Eigenschaften auf (Kaese et al., 2012). Schweine sind hinsichtlich ihrer Körpergröße, -gewicht und Herzgewicht dem Menschen sehr ähnlich, was sich in der großen Übereinstimmung zahlreicher Eigenschaften wie Ruheherzfrequenz, Blutdruck und Atemfrequenz verdeutlicht. Dies lässt sich ebenso für die anatomischen Merkmale des Herzens beschreiben, da sie dem Menschen in Bezug auf die Klappenanatomie und Koronaranatomie sehr ähneln. Auch hinsichtlich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften (z.B. Dauer und Morphologie des Aktionspotentials) gibt es große Übereinstimmungen, da sie fast identische Ionenkanäle wie der Mensch exprimieren (Clauss et al., 2019, Schüttler et al., 2020). Diese Vorteile ermöglichen eine zuverlässige Übertragbarkeit der gewonnenen Daten vom Schwein auf den Menschen. Darüber hinaus kann aufgrund der anatomischen Ähnlichkeiten bei der Durchführung von Experimenten das in der Humanmedizin verwendete Standardequipment verwendet werden (Schüttler et al., 2020). Durch gezielte genetische Manipulation können im Schwein mittlerweile auch genetisch veränderte Tiere generiert werden (Renner et al., 2013, Park et al., 2015). Aus ethischer Sicht ist in den meisten Ländern die Verwendung von Schweinen verglichen mit anderen Großtiermodellen zu Forschungszwecken gesellschaftlich vertretbarer (Schüttler et al., 2020). VHF wurde in

Schweinemodellen reproduzierbar induziert, u.a. in Modellen des atrialen Tachypacings und der Ischämischen Kardiomyopathie (Clauss et al., 2020, Frydrychowski et al., 2020).

Viele Studien konnten aufweisen, dass eine Erkrankung an Diabetes mellitus das Risiko für die Ausbildung von VHF deutlich erhöht (Kannel et al., 1998). Jedoch sind die diabetes-spezifischen zellulären und molekularen Mechanismen, welche VHF begünstigen, bislang unvollständig verstanden (Bohne et al., 2019). Schweine gelten als klassische Tiermodelle in der diabetischen Forschung (Renner et al., 2016a). Gegenüber nicht-humanen Primaten ist ihre Verwendung von größerer ethischer Akzeptanz, ihre Reproduzierbarkeit ist deutlich ergiebiger und bedarf eines geringeren Zeitaufwands. Auch Methoden für genetische Veränderungen sind etabliert, was einen großen Vorteil auch gegenüber Hundemodellen aufweist. Außerdem ermöglicht es ihre Körpergröße eine angemessene Menge an Proben zu gewinnen unter Verwendung geringerer Tierzahlen und gewährleistet somit eine adäquate Anwendung des 3R-Prinzips (Renner et al., 2016b, Renner et al., 2020). Spezifisch für die Erforschung von Diabetes mellitus weist das Schwein einige weitere relevante Vorteile gegenüber Nagern auf. Sie zeigen ähnliche Nüchternblutglukosespiegel, den gleichen zirkadianen Rhythmus und ein diskontinuierliches Nahrungsverhalten wie der Mensch. Sie teilen gastrointestinale Eigenschaften und eine sehr ähnliche omnivore Ernährungsweise (Renner et al., 2016b). Im Unterschied zu Nagern basiert ihr Energiehaushalt bzgl. der Thermogenese nicht auf braunem Fettgewebe, da Schweine kein UCP 1 (engl.: *uncoupling protein 1*) kodieren (Jastroch et al., 2015). Das porcine Insulin unterscheidet sich nur in einer Aminosäure von dem des Menschen. Aus diesem Grund wurde es lange Zeit als therapeutisches Mittel in der Humanmedizin verwendet, bevor es durch rekombinantes Humaninsulin ersetzt wurde. Auch die Struktur und Vaskularisation der Inselzellen, ebenso wie das Verhältnis zwischen endokrinen Zelltypen und Betazellmasse weist große Ähnlichkeiten mit dem menschlichen Organismus auf (Hoang et al., 2014, Renner et al., 2016b, Bakhti et al., 2019, Renner et al., 2020).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die Verwendung der Spezies Schwein durch die benannten Vorteile, als die am besten geeignete Spezies für die vorliegende Arbeit angesehen werden kann.

2. Wahl des Tiermodells

Wie bereits beschrieben existieren für VHF eine Vielzahl unterschiedlicher Modelle. Diese unterscheiden sich sowohl im Induktionsverfahren als auch in der Anwendung der Spezies (Schüttler et al., 2020). Sie sollten entsprechend der zu untersuchenden Fragestellung des Experiments und der adäquaten Tierart kritisch hinterfragt und entsprechend ausgewählt werden (Clauss et al., 2019). Eine Vielzahl der Modelle zur Untersuchung von VHF wird unter Verwendung des atrialen Tachypacings durchgeführt. Hierbei wird unter Verwendung spezieller Schrittmacher das Substrat für VHF verursacht. 1995 zeigten Wijffels et al. zum ersten Mal, dass Tachykardie-induziertes Remodeling einen dem VHF zugrundeliegenden Mechanismus darstellt, der durch progressive Verkürzung der atrialen effektiven Refraktärzeit (AERP) gekennzeichnet war (Wijffels et al., 1995). In diesem im Schaf induzierten Modell konnte gezeigt werden, dass VHF-begünstigende Veränderungen durch VHF selbst verursacht werden, ein Phänomen, das als „VHF erzeugt VHF“ beschrieben wurde (Allessie et al., 2001b). Zum heutigen Tag ist bekannt, dass VHF selbst, aber auch andere Trigger einen progressiven Prozess des proarrhythmischen Remodlings in den Atrien induzieren. Studien im Schwein von Schwarzl et al. und Kazui et al. zeigten hierbei das Auftreten von strukturellen Veränderungen und der Ausbildung von Fibrose in den Atrien (Kazui et al., 2015, Schwarzl et al., 2016b). Auch in weiteren Studien konnte die besondere Eignung des Schweinmodells für die Untersuchung des strukturellen Remodelings bei Tachypacing-induziertem VHF aufgezeigt werden (Manninger et al., 2018, Citrini et al., 2020).

Aufgrund der verschiedenen Formen des Diabetes mellitus existieren hierzu ebenfalls verschiedene Tiermodelle (King, 2012), welche im Detail bereits beschrieben wurden. Zusammenfassend gibt es vier verschiedene übergeordnete Methoden zur Induktion eines Diabetes mellitus, welche ebenso beim Schwein Anwendung finden. Hierbei weist die genetische Veränderung der Tiere, im Fall der vorliegenden Arbeit die Veränderung des *INS*-Gens, einige Vorteile im Vergleich zu anderen Methoden auf. Die Manifestation der Erkrankung im *INS*^{C94Y}-Schweinmodell ähnelt der Erkrankung bei Menschen mit der *INS*^{C96Y}-Mutation. In beiden Fällen kommt es zu einer Akkumulation von fehlerhaft gefaltetem (Pro)-Insulin im endoplasmatischen Retikulum. Dieser Zustand führt zu Stress im ER und resultiert in der Apoptose der pankreatischen β -Zellen. Der Untergang der β -Zellen

verursacht eine reduzierte Insulin-Sekretion und Hypoinsulinämie (Liu et al., 2010). Das von Renner et al. generierte *INS^{C94Y}*-Schweinemodell ist mit dem *Ins2^{Akita}*-Mausmodell vergleichbar, überwindet jedoch aufgrund seiner Ähnlichkeit zum Menschen (Metabolismus, Gewicht, Körpergröße, Ernährungsweise) viele Limitationen des Nagermodells. Die Tiere zeigen bereits kurz nach der Geburt erhöhte Nüchternblutglukosespiegel. Im Alter von 4,5 Monaten zeigen sie bereits eine um 72%, reduzierte β -Zellmasse sowie einen um 60% reduzierten Insulinspiegel verglichen mit ihren Wurfgeschwistern (Wolf et al., 2023). Dieses Tiermodell bietet aufgrund seines eindeutig definierten Krankheitsbeginns und des stabilen Phänotyps große Vorteile gegenüber anderen Modellen (Renner et al., 2013). Der chirurgische Eingriff der Pankreatektomie bspw. ist hoch invasiv, zeitaufwendig und auch kostenintensiv. Die Verwendung von β -Zell-toxischen Substanzen, wie bspw. Streptozotocin oder Alloxan kann Wirkungsunterschiede in den verschiedenen Individuen aufweisen, was eine Vergleichbarkeit erschwert (Renner et al., 2013). Ebenfalls gelten die Substanzen als toxisch, was sich auch in anderen Organen ausprägen kann und somit Komplikationen oder Tierverluste zur Folge haben kann (Dufrane et al., 2006, King, 2012). Eine Diabetes mellitus Induktion mittels hochkalorischer Diät weist im Gegensatz zur genetischen Veränderung ebenfalls Limitationen auf. Zwar begünstigt diese die Entwicklung von Übergewicht (Renner et al., 2016b), Insulinresistenz und verringerter Glukosetoleranz, führt alleinstehend jedoch nicht zu einer ausreichenden Hyperglykämie in Schweinen (Feng et al., 2015, Panasevich et al., 2018). Aus diesem Grund ist eine Kombination mit β -Zell-toxischen Substanzen notwendig, um die β -Zellmasse zu reduzieren (Koopmans et al., 2006). Zuzüglich zu den bereits beschriebenen Komplikationen durch toxische Behandlungen, müssen die Tiere ebenfalls vor katabolischen oder ketoazidotischen Zuständen geschützt werden (Koopmans et al., 2011, Ludvigsen et al., 2015). Darüber hinaus spielt auch der genetische Hintergrund der Tiere einen entscheidenden Einfluss auf die diätetische Induktion des Diabetes mellitus (Neeb et al., 2010, Zhang et al., 2019a).

Zusammenfassend betrachtet erscheint das *INS^{C94Y}*-Schweinemodell als sehr adäquates Modell zur Untersuchung der in dieser Arbeit formulierten Hypothese. Durch den stabilen Phänotyp und den eindeutig definierten Krankheitsbeginn lassen sich die Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System und seine Manifestation gezielt und zuverlässig evaluieren (Renner et al., 2013). Die Untersuchung der

elektrischen und strukturellen Remodelingprozesse, die zu VHF führen, wurden bereits im Schwein etabliert (Schüttler et al., 2020). Die Untersuchung der Diabetes-induzierten profibrotischen Mechanismen kann durch die Verwendung des *INS*^{C94Y}-Modells ab einem sehr frühen Alter der Tiere gewährleistet werden, was im Schweinmodell durch seine rapide Wachstumsrate wichtig ist. Ebenfalls bestehen große Ähnlichkeiten in Anatomie, Hämodynamik, Elektrophysiologie und Metabolismus zwischen Schweinen und Menschen, was eine bestmögliche Übertragbarkeit der generierten Daten gewährleistet und somit ein entscheidender Beitrag in der Erforschung komplexer pathologischer Mechanismen geleistet werden kann.

3. Diskussion der Ergebnisse

3.1. Hämodynamik

Diabetes mellitus stellt einen unabhängigen Risikofaktor für die Ausbildung von VHF dar. Atriales strukturelles Remodeling, v.a. Fibrose gilt hierbei als ein wichtiges Substrat für Diabetes mellitus-assoziiertes VHF (Staerk et al., 2017). Die Ausbildung einer Herzinsuffizienz und die Ausbildung und Progression von VHF stehen im starken Zusammenhang und können sich gegenseitig bedingen (Fauchier et al., 2023). Studien zufolge haben Diabetes mellitus Patienten ein 2-fach erhöhtes Risiko für die Ausprägung einer systolischen und diastolischen Funktionseinschränkung des Myokards (Jia et al., 2018), welche sich in drei Formen der Herzinsuffizienz manifestieren kann: Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion (HFpEF), mit reduzierter Ejektionsfraktion (HFrEF), als auch dem intermediären Typ (HFmrEF) (Lehrke et al., 2017). Durch die Insuffizienz kommt es zu Kompensationsmechanismen des Herzens, um weiterhin ein ausreichendes Herzzeitvolumen zu gewährleisten. Die daraus resultierende Rechtsverschiebung der Druck-Volumen-Kurve führt zu vermindertem Schlagvolumen und erhöhten enddiastolischen Drücken, welche eine Dilatation des Ventrikels begünstigen können. Kennzeichen für die Ausbildung einer HFrEF ist neben der Reduktion der LV-Pumpfunktion eine Zunahme des LVEDP, welcher jedoch in allen Gruppen ähnlich war. Die Therapie mit Dapagliflozin hatte keinen Einfluss im Vergleich zu den Tieren ohne Therapie, ein Befund, der in einer Studie in diabetischen Mäusen ebenfalls gezeigt wurde (Tian et al., 2021). Mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden kann eine Herzinsuffizienz mit erhaltener

Ejektionsfraktion (HFpEF) nicht untersucht werden, weshalb keine Aussage zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz mit erhaltener Ejektionsfraktion getroffen werden kann. Da die Ausbildung einer systolischen Herzinsuffizienz mit einer vermehrten Fibrose in engem Zusammenhang steht (Van Heerebeek et al., 2008), konnte in dieser Arbeit anhand des unveränderten LVEDPS kein Hinweis auf eine systolische Herzinsuffizienz festgestellt werden. Die Ausbildung einer ventrikulären Herzinsuffizienz mit erhöhten atrialen Füllungsdruck bedarf eines Manifestationszeitraumes (Jankauskas et al., 2021), der evtl. in den verwendeten Tieren im Alter von 5-6 Monaten nicht erreicht wurde und somit keine Veränderungen festgestellt werden konnten.

3.2. Elektrophysiologische Untersuchung

Wie bereits erwähnt, bedarf es für die Ausbildung von VHF sowohl eines Triggers, als auch eines Substrats (Schotten et al., 2011). Da eine spontane Ausbildung von VHF in den meisten Tierarten bislang nicht beobachtet wurde, wurde die Vulnerabilität für VHF mittels Stimulation durch atriale Burststimulation überprüft. Hierbei wurde VHF als Vorhofarrhythmie mit atrialer Tachykardie, unregelmäßigen RR-Intervallen und einer Dauer von mindestens 10 Sekunden definiert. Die Vulnerabilität für VHF war in Diabetesschweinen, verglichen mit den Wildtypen signifikant erhöht. Diese konnte durch die Therapie mit Dapagliflozin signifikant reduziert werden. In einer Studie mit Akita-Mäusen als auch in Streptozotocin-induzierten diabetischen Mäusen wurde eine erhöhte Induzierbarkeit von VHF durch Burst-Pacing beobachtet (Polina et al., 2020). Nur 2 der 22 Wildtypen zeigten VHF, wohingegen 13 der 27 Akita-Mäuse VHF entwickelte, wobei die Ergebnisse der Streptozotocin-behandelten Mäuse vergleichbar waren. Dieses Ergebnis ging einher mit einer verlängerten Dauer der VHF-Episoden auf Seiten der Akita-Mäuse (62% 5-30 sec., 23% >30 sec.), auch hier war das Ergebnis der Streptozotocin-Mäuse ähnlich (Polina et al., 2020). Auch Watanabe et al. zeigten eine erhöhte Vulnerabilität für VHF in Streptozotocin-induzierten diabetischen Ratten (Watanabe et al., 2012). In einem Hundemodell für VHF (wöchentliches Tachypacing in nicht-diabetischen Hunden) wurde gezeigt, dass die Vulnerabilität für VHF bei Tieren mit SGLT2-Therapie signifikant reduziert werden konnte (Nishinarita et al., 2021). Dass die SGLT2-Inhibition auch unabhängig von einer Diabeteserkrankung rhythmusstabilisierende Effekte zu haben scheint, legt auch eine Metastudie mit einer totalen Anzahl von 63,604

Patienten nahe, die eine Reduktion der VHF-Inzidenz um 18% unter Therapie mit SGLT2-Inhibitoren zeigte (Zheng et al., 2022).

Ebenfalls war bei der elektrophysiologischen Untersuchung eine verkürzte atriale effektive Refraktärperiode ab einer Basiszykluslänge von 450 ms in der Gruppe der C94Y-Tiere verglichen mit der Wildtypgruppe zu erkennen. Eine verkürzte AERP als Korrelat des proarrhythmogenen Remodelings wurde erstmals von Wijffles et al. in dem bereits beschriebenen Schaf-Modell aufgezeigt (Wijffels et al., 1995). Die erhöhte Anfälligkeit für VHF war assoziiert mit einer Verkürzung der AERP bis zu 55% sowohl in Schafen als auch in späteren Studien in Hunden (Wijffels et al., 1995, Yue et al., 1997). In Schafen führte atriales Tachypacing zu progressiven Veränderungen der Ionenkanäle, wie bspw. einer Reduktion von $I_{Ca,L}$ und einer Steigerung von I_{K1} , I_{Kur} und $I_{K,Ach}$, so dass die Repolarisation verändert war, was zu einer Verkürzung der AERP führte (Nattel et al., 2020). Die physiologische atriale Refraktärperiode der Kardiomyozyten verhindert den Eintritt von Reentry-Kreisläufen. Sofern die Refraktärzeit jedoch verkürzt ist, können Zellen zu einem früheren Zeitpunkt erregbar sein, wodurch Reentry-Kreisläufe ermöglicht werden und zur Ausbildung von VHF führen kann (Lammers et al., 1993, Allessie et al., 2001b). In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Schafe, welche einem 4-wöchigen Tachypacing ausgesetzt waren, nach einer Woche Ruhezeit im Sinusrhythmus, bei erneutem Pacing zwar eine verstärkte Vulnerabilität für VHF aufwiesen, diese jedoch unabhängig von einer Veränderung der AERP war (Todd et al., 2004). In einem Hundemodell des VHF konnte unter Anwendung von Canagliflozin eine Reduktion der atrialen effektiven Refraktärperiode (AERP) beobachtet werden (Nishinarita et al., 2021). Obwohl *INS*^{C94Y}-Schweine, die mit Dapagliflozin behandelt wurden, eine reduzierte Vulnerabilität für Vorhofflimmern zeigten, konnte eine Veränderung der AERP durch die Therapie mit Dapagliflozin in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass zusätzlich zum elektrischen Remodeling auch weitere Faktoren an der Entstehung von VHF beteiligt sein müssen. Strukturelles Remodeling gilt hierfür als wichtiger Kandidat (Schotten et al., 2011).

Aus diesem Grund widmet sich der histologische und molekularbiologische Teil dieser Arbeit dem proarrhythmischen strukturellen Remodeling, sowie dessen mögliche Beeinflussung durch Dapagliflozinthherapie.

3.3. Masson-Trichrom-Goldner Färbung

Strukturelles Remodeling der Atrien, v.a. eine Vergrößerung der Atrien und Gewebsfibrose (Nattel et al., 2014), bilden essentielle Faktoren in der Pathogenese von VHF (Schotten et al., 2011). Diabetes mellitus ist assoziiert mit vermehrter Fibrosebildung, so dass atriales strukturelles Remodeling auch als wichtiges Substrat für Diabetes mellitus-assoziiertes VHF gilt (Bohne et al., 2019).

In der angefertigten Arbeit wurde mittels Masson-Goldner-Trichrom Färbung die Ausbildung von Fibrose in den folgenden sechs Herzregionen quantifiziert: linkes Atrium, linkes Herzohr, linker Ventrikel, rechtes Atrium, rechtes Herzohr und rechter Ventrikel. Anhand von Korrelationsanalysen konnte ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Blutglukose und der Ausprägung der Fibrose aufgezeigt werden. Da die Fibrose in fünf von sechs Herzregionen in den Diabetestieren signifikant erhöht war, unterstützt diese Arbeit die Hypothese, dass Diabetes mellitus die Ausprägung interstitieller Fibrose und somit strukturelles Remodeling begünstigt.

Verglichen mit den Wildtypen zeigten die Diabetestiere sowohl im linken als auch im rechten Atrium signifikant mehr Fibrose. Im Akita-Mausmodell konnte ebenfalls eine deutliche Zunahme an Fibrose in den Atrien mittels Pico-Sirius-Färbung nachgewiesen werden (Krishnaswamy et al., 2015). Ein Ergebnis, welches ebenso in den Atrien von Streptozotocin-induzierten diabetischen Ratten nachweisbar war (Kato et al., 2008, Li et al., 2016). Auch der linke und rechte Ventrikel zeigten eine signifikante Steigerung der Fibrose in der Gruppe der Diabetestiere. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Studien an ventrikulären Fibroblasten in Leptin-defizienten Mäusen (BKS.Cg-Dock7 $+/+$ *Lepr^{db/db}*), welche eine erhöhte Kollagen Typ I Produktion zeigten (Hutchinson et al., 2013). Auch in ventrikulären Fibroblasten hyperglykämischer Ratten wurde eine erhöhte Produktion von Kollagen Typ I nachgewiesen, in den Herzohren zeigte hingegen nur das linke Herzohr eine signifikante Steigerung der Fibrose verglichen mit den Wildtyptieren (Fiaschi et al., 2014).

Obwohl Dapagliflozin-behandelte Schweine signifikant weniger Vorhofflimmern zeigten, war die Fibrose in keiner der sechs untersuchten Herzregionen signifikant reduziert. Auch ein Zusammenhang zwischen Blutglukosewerten und der Ausbildung von Fibrose war in der Korrelationsanalyse nicht zu erkennen. In diabetischen Mäusen konnte hingegen ein lindernder Effekt von Empagliflozin

gezeigt werden, jedoch wurde hier keine Unterscheidung der Herzregionen vorgenommen, es handelte sich um ein polygenetisch verändertes Nagermodell (KK-Mäuse) und es wurde ein anderer SGLT2-Hemmer (Empagliflozin) verwendet, was u.U. die unterschiedlichen Effekte bedingen könnte (Li et al., 2019). Eine Studie in Streptozotocin-induzierten diabetischen Ratten zeigte einen lindernden Effekt auf die Ausbildung kardialer Fibrose im linken Ventrikel durch Dapagliflozin, die Fibrose in den Vorhöfen wurde hingegen nicht untersucht (Tian et al., 2021). Ein mildernder Effekt von Dapagliflozin auf das strukturelle Remodeling konnte in dieser Arbeit in keiner der Herzregionen beobachten werden. Da in diesen Studien entweder keine Unterteilung der Herzregionen vorgenommen wurde, oder nur der linke Ventrikel untersucht wurde, können sie keine Erkenntnisse über den Effekt von Dapagliflozin auf die Vorhöfe liefern. Die vorliegende Arbeit könnte somit erste Hinweise dafür liefern, dass eine Behandlung mit Dapagliflozin die Induzierbarkeit für VHF zwar signifikant reduziert, dieser Mechanismus jedoch nicht auf einer Reduktion der Fibrose in den Atrien zurückzuführen ist.

3.4. Immunfluoreszenzfärbung von YAP

Die Aktivierung der Fibroblasten und die damit zusammenhängende Differenzierung zu Myofibroblasten kann durch verschiedene Faktoren begünstigt werden. Mechanischer Stress, Ischämie, Entzündung, reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und hochfrequente elektrische Aktivität bilden bekannte Trigger. Jedoch sind die genauen Mechanismen bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht vollkommen verstanden (Yong et al., 2015). Da die Aktivierung des Yes-assoziierten Proteins (YAP) neuen Studien zufolge ein wichtiger Faktor im pathologischen ECM-Remodeling darzustellen scheint (Perestrelo et al., 2021, Mia et al., 2022b), wurde anhand einer Immunfluoreszenzfärbung der Anteil an YAP-positiven Fibroblasten in den folgenden Herzregionen bestimmt: linkes Atrium, linker Ventrikel, rechtes Atrium und rechter Ventrikel. In allen vier Herzregionen zeigten die Diabetestiere einen signifikant erhöhten Anteil an YAP-positiven Fibroblasten im Vergleich zu den Tieren der Wildtypgruppe. Mittels Korrelationsanalyse konnte ein Zusammenhang zwischen YAP-positiven Fibroblasten und den entsprechenden Blutglukosewerten dargestellt werden. Auch in einem diabetischen Rattenmodell konnte durch immunhistochemische Färbungen und Western Blots ein ähnlicher Befund aufgezeigt werden (Hu et al., 2021). In besagter Studie zeigte sich ebenfalls,

dass eine YAP-Inhibition die Proteinexpression von Fibronectin und CTGF in kardialen Fibroblasten und damit die interstitielle Fibrose signifikant reduzierte. In einem Rattenmodell der diabetischen Kardiomyopathie bestätigte sich dieser Befund, auch hier wurde durch Inhibition des YAP in Fibroblasten die Proteinexpression von CTGF, Fibronectin und SMAD3 signifikant vermindert (Yu et al., 2021).

Um einen therapeutischen Effekt von Dapagliflozin auf die Expression von YAP in kardialen Fibroblasten zu untersuchen, wurde die Gruppe der Diabetestiere mit den Dapagliflozin therapierten Diabetestieren verglichen. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den vier Herzregionen. Auch eine Korrelation zwischen Blutglukosewerten und der YAP-Expression war nicht zu erkennen. Da zum jetzigen Zeitpunkt keine Studien über mögliche Effekte von Dapagliflozin oder anderen SGLT2-Hemmern auf die YAP-Expression im Herzen existieren, untersuchte diese Arbeit zum ersten Mal einen möglichen Effekt. Zwar zeigte eine Studie in der Niere einen Effekt von Dapagliflozin auf die YAP-Expression, dieser konnte jedoch in keiner der untersuchten Herzregionen bestätigt werden. Diese Arbeit weist somit erstmals darauf hin, dass eine Therapie mit Dapagliflozin keinen Effekt auf die YAP-Expression in kardialen Fibroblasten hat.

Da Investigationen des Hippo-Signalwegs darauf hinweisen, dass YAP neben Effekten auf Fibroblasten und der damit verbundenen Fibroseausbildung auch Effekte auf andere Zelltypen des Herzens hat, wurde ebenfalls die YAP-Expression in den Kardiomyozyten, den Hauptzellen des Herzens, untersucht. In Studien, in welchen YAP in adulten Kardiomyozyten von Mäusen aktiviert wurde, konnte eine Verbesserung der Herzfunktion und eine erhöhte Überlebensrate nach Myokardinfarkt gezeigt werden (Lin et al., 2014, Leach et al., 2017). In dieser Arbeit konnte ausschließlich im linken Ventrikel eine signifikante Zunahme an YAP-positiven Kardiomyozyten auf Seiten der Diabetestiere festgestellt werden. Signifikante Veränderungen in den Atrien wurden nicht beobachtet. Die Korrelationsanalyse zeigte ebenfalls einen Zusammenhang des Blutglukosespiegels und der YAP-positiven Zellen in beiden Ventrikeln. Auch hier blieb eine signifikante Veränderung in den Atrien aus. Der Vergleich zwischen Diabetestieren mit und ohne Therapie zeigte hingegen keine signifikanten Unterschiede. Dieses Resultat legt nahe, dass atriales strukturelles Remodeling bei Diabetes mellitus durch die Hochregulation von YAP vorwiegend in den kardialen Fibroblasten

induziert werden könnte. Als bedeutender Transkriptionsfaktor könnte YAP durch Induktion profibrotischer Zielgene diese Effekte bewirken. Um dies näher zu untersuchen, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt.

3.5. Genexpressionsanalyse

Um die histologischen Ergebnisse zu bestätigen und die möglichen Effekte von YAP auf profibrotische Signalkaskaden zu untersuchen, wurde die Genexpression von YAP, seiner ECM-Zielgene sowie seiner profibrotischen und proinflammatorischen Zielgene mittels Real-Time-RT-PCR untersucht.

Die Genexpression von *YAP1* war im linken und rechten Atrium bei den Diabetestieren signifikant erhöht. Eine signifikante Reduktion der *YAP1*-Expression zeigte sich im rechten Atrium nach Dapagliflozin-Therapie. Ein ähnliches Ergebnis zeigt sich in einer Studie von Hu et al., in der eine erhöhte *Yap1*-Expression in kardialen Fibroblasten diabetischer Ratten nachgewiesen werden konnte (Hu et al., 2021). Eine Unterteilung der verschiedenen Herzregionen fand in dieser Studie jedoch nicht statt. Eine kürzlich erschienene Studie in der Niere brachte zum ersten Mal den therapeutischen Effekt von Dapagliflozin in direkten Zusammenhang mit seiner Wirkung auf das YAP (Feng et al., 2023). Hierbei wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit Dapagliflozin die *Yap*-Expression reduzierte, was ebenfalls für seine profibrotischen Zielgene *Ctgf* und *Areg* galt. Diese Studie weist darauf hin, dass Dapagliflozin einen YAP-regulierenden Effekt auf Inflammation, oxidativen Stress und Fibrose aufweist. Da YAP in den Atrien der Diabetestiere erhöht exprimiert war, deutet dies darauf hin, dass YAP durch eine Erkrankung an Diabetes mellitus in den Atrien hochreguliert wird und somit als profibrotischer und proinflammatorischer Mediator bei Diabetes mellitus gelten könnte. Eine Therapie mit Dapagliflozin zeigte außerdem einen YAP-reduzierenden Effekt im rechten Atrium. Ein ausbleibender Effekt der Dapagliflozin-Therapie auf histologischer Ebene könnte darauf zurückzuführen sein, dass die YAP-Expression regional unterschiedlich sein könnte, da sich die histologische Untersuchung nur auf einen spezifischen Ausschnitt bezieht. Eine weitere Erklärung könnte außerdem ein zeitlicher Effekt sein, da eine Genexpression zeitlich schneller ist und auf Proteinebene eine längere Behandlungsdauer nötig sein könnte, um Effekte zu erzielen.

Die Expression von Amphiregulin (*AREG*), welches an Prozessen wie

Zellproliferation, Apoptose und der Differenzierung von Fibroblasten beteiligt ist und ein Mediator des profibrotischen *Transforming Growth Factor β* (*TGF- β 1*) ist, war in der Diabetesgruppe sowohl im linken als auch im rechten Atrium erhöht. Der Vergleich zwischen den Diabetestieren mit und ohne Dapagliflozin zeigte keine signifikanten Unterschiede. In einem Mausmodell wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von AREG im Herzen zu einer verstärkten Kollagensynthese führte (Liu et al., 2020). In einem weiteren Mausmodell für Lungenfibrose konnte dargestellt werden, dass AREG als wichtiger Mediator der profibrotischen Aktivität des Transforming Growth Faktor β (*Tgfb*) gilt (Zhou et al., 2012). Die vorliegenden Ergebnisse weisen ebenfalls darauf hin, dass AREG ein wichtiger profibrotischer Faktor in den Atrien von Diabetestieren sein könnte, dieser jedoch nicht durch eine Dapagliflozin-Therapie beeinflusst wird.

Die gesteigerte Expression von profibrotischen Zytokinen wie bspw. dem *TGF- β* , welches u.a. *SMAD3* phosphoryliert und damit aktiviert, hat großen Einfluss auf die Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten, Kollagensynthese und der Expression von Fibronektin (Duprez et al., 2018). In der erfolgten Arbeit konnte eine signifikante Expressionssteigerung des *TGF β -1* in der Gruppe der Diabetestiere im Bereich des linken Atriums, als auch im linken Ventrikel beobachtet werden. Eine signifikante Reduktion der *TGF- β* Expression war durch die Therapie mit Dapagliflozin im rechten Atrium und im linken Ventrikel zu beobachten. In einem diabetischen Mausmodell konnte gezeigt werden, dass Fibroblasten der Herzventrikel eine erhöhte Expression des *Tgfb* und Kollagen Typ 1 (*Col1a1*) aufwiesen, eine Untersuchung der Vorhöfe wurde nicht durchgeführt (Hutchinson et al., 2013). Ebenfalls konnte YAP als Mediator des *TGF- β* -*SMAD*-Signalwegs in renaler Fibrogenese nachgewiesen werden (Szeto et al., 2016). Auch *SMAD3* war in der Gruppe der Diabetiker im linken Atrium signifikant erhöht exprimiert, ein Trend der ebenfalls im rechten Atrium als auch im linken Ventrikel zu beobachten war. Eine signifikante Reduktion der *SMAD3*-Expression durch Dapagliflozin-Therapie war in allen Regionen, außer dem rechten Ventrikel ersichtlich. In einem Myokardischämie-Modell in Schweinen konnte nach Therapie mit Canagliflozin eine deutliche Reduktion von Fibrose im Myokardgewebe (ohne Unterteilung der Herzregionen) in einer Masson-Trichrom-Färbung gezeigt werden, jedoch zeigte sich keine signifikant reduzierte Genexpression von *SMAD3* und *TGF- β* (Sabe et al., 2023). Der *connective tissue growth factor* (*CTGF*) wird

mit verschiedenen fibrotischen Dysregulationen in Zusammenhang gebracht und wird durch Fibroblasten nach Aktivierung des TGF- β -Signalwegs produziert. In einem Modell für chronische Herzinsuffizienz wurde *CTGF* als essentieller Faktor für atriale Fibrose identifiziert (Burstein et al., 2008). In der hier gezeigten Analyse konnte eine signifikante Expressionssteigerung an *CTGF* auf Seiten der Diabetestiere im rechten Atrium gezeigt werden. Auch in einem diabetischen Rattenmodell wurde nachgewiesen, dass *CTGF* auf Proteinebene in den Atrien der Diabetestiere signifikant erhöht war. Die Genexpression war durch die Therapie mit Dapagliflozin im Bereich des linken Ventrikels signifikant reduziert. In einer Studie von Tian et al. konnte ebenfalls aufgezeigt werden, dass die Genexpression von *Ctgf* und *Tgf- β* in Streptozotocin-induzierten diabetischen Ratten im linken Ventrikel durch die Gabe von Dapagliflozin signifikant reduziert wurde (Tian et al., 2021). Die Ergebnisse der Genexpression des Plaminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (*PAI-1*), welcher eine übersteigerte Akkumulation von Kollagen und anderen ECM-Proteinen begünstigt (Ghosh et al., 2012), zeigten eine gesteigerte Expression in der Diabetesgruppe im linken Atrium. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine Ausschaltung des *Yap* in diabetischen Ratten zu einer reduzierten Proteinexpression von CTGF und PAI-1 führt. Genexpressionsanalysen für *Pai-1* bestätigten dieses Ergebnis, jedoch wurde in dieser Studie keine Unterteilung der verschiedenen Herzregionen vorgenommen (Hu et al., 2021). Die Dapagliflozin-Therapie verursachte eine Reduktion von *PAI-1* in der Diabetesgruppe im linken Ventrikel. Diese Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten profibrotischen Gene im Bereich des linken und rechten Atriums in der Gruppe der Diabetestiere hochreguliert waren. In drei dieser Gene zeigte sich außerdem ein mildernder Effekt durch Dapagliflozin-Therapie im rechten Atrium. Dies weist darauf hin, dass Diabetes mellitus die Expression dieser profibrotischen Gene in den Atrien verstärkt, was größtenteils durch Dapagliflozin im rechten Atrium reduziert wurde. Trotz dieser Veränderungen auf Gen-Ebene konnte histologisch kein Effekt beobachtet werden. Auch hier wäre eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben eines therapeutischen Effekts des Dapagliflozins, die regionalen Unterschiede innerhalb des histologischen Gewebes, als auch ein zeitlicher Effekt, da eine Genexpression zeitlich schneller ist und auf Proteinebene eine längere Behandlungsdauer nötig sein könnte, um Effekte zu erzielen.

Im Bereich der ECM-Gene zeigte sich eine Expressionssteigerung von *COL1A1* auf Seiten der Diabetesgruppe verglichen mit Wildtypen im rechten Ventrikel. Eine Reduktion der *COL1A1*-Expression konnte durch die Therapie mit Dapagliflozin in allen vier Herzregionen erzielt werden, war jedoch nur im Bereich des linken Ventrikels signifikant. In einem Rattenmodell zeigten Landry et al., dass eine Überexpression von *Yap* die Expression von *Col1a1* in kardialen Fibroblasten *in vitro* steigerte (Landry et al., 2021). *FN1* war hingegen im rechten Atrium und rechten Ventrikel in der Gruppe der Wildtypen signifikant erhöht. Auf Proteinebene zeigten Molina et al. eine verstärkte Expression an FN1 und COL1A1 in Patienten mit Herzinsuffizienz mit und ohne VHF (Molina et al., 2018). Durch die Therapie von INSC94Y-Schweinen mit Dapagliflozin zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression von *FN1* im linken Atrium. Die Matrix Metalloproteinase 2 (*MMP2*) ist ein Protein, welches die ECM abbaut (Fan et al., 2012), und zeigte im rechten Ventrikel eine signifikant erhöhte Expression in den Wildtypen. Zusammenfassend zeigte sich mehrheitlich eine verstärkte Expression der meisten untersuchten ECM-Zielgene auf Seiten der Diabetesgruppe im Bereich des linken Atriums, was auf einen profibrotischen Effekt durch Diabetes mellitus hinweist. Eine Behandlung mit Dapagliflozin zeigte einen größtenteils reduzierenden Effekt im rechten und linken Atrium.

Im Bereich der proinflammatorischen Zielgene von YAP zeigte der *Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)*, ein Zytokin, welches in Patienten mit Vorhofflimmern erhöht ist und durch Aktivierung des TGF- β -Signalwegs kardiale Fibrose begünstigt, eine signifikant erhöhte Expression auf Seiten der Diabetiker im linken Vorhof. Die Expression von *MIF* im rechten Atrium war hingegen in den Diabetestieren signifikant erhöht. Die Therapie mit Dapagliflozin reduzierte die Expression von *MIF* im linken Atrium und im linken Ventrikel signifikant. Im Menschen konnte gezeigt werden, dass die Serumkonzentration von MIF in Patienten mit VHF deutlich erhöht ist (Wan et al., 2018). Bioinformatische Analysen zur Identifizierung VHF-assoziiierter Gene zeigten außerdem, dass *MIF* in Patienten mit VHF deutlich hochreguliert war (Pan et al., 2022). Das proinflammatorische Zytokin *CCL2*, welches von Fibroblasten sezerniert wird, zeigte wie *MIF* eine verstärkte Expression auf Seiten der Diabetiker im linken Atrium und eine verstärkte Expression der Wildtypgruppe im rechten Atrium. In kardialen Fibroblasten konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der

Expression von *Yap* und der Expression proinflammatorischer Gene, mitunter auch *Ccl2*, demonstriert werden. Hierbei wurde jedoch nur Gewebe aus den linken Ventrikeln verwendet (Francisco et al., 2021). Ein Effekt von Dapagliflozin war in keiner Herzregion zu beobachten. Diese Befunde zeigen eine verstärkte Expression der proinflammatorischen Zielgene in der Gruppe der Diabetestiere im linken Atrium. Eine Behandlung mit Dapagliflozin schien außerdem die Expression der profibrotischen Zielgene im linken Atrium zu reduzieren. Somit scheint Diabetes mellitus v.a. im linken Atrium die Expression proinflammatorischer Gene zu verstärken, was durch Dapagliflozin gemildert werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass alle untersuchten Gene in der Gruppe der Diabetestiere verglichen mit den Wildtypen im Bereich des linken Atriums verstärkt exprimiert sind (Tabelle 1). Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich im rechten Vorhof mit Ausnahme der proinflammatorischen Zielgene *MIF* und *CCL2*, die eine reduzierte Expression zeigten. Die Therapie mit Dapagliflozin zeigte im Bereich des rechten Atriums eine Reduktion von *YAP* und dessen profibrotischen und ECM-Zielgenen. Im linken Atrium konnte teilweise eine Reduktion der profibrotischen und proinflammatorischen Zielgene beobachtet werden, wobei *YAP* und *AREG* eine gesteigerte Expression nach Dapagliflozin-Therapie zeigten. Da insbesondere im rechten Vorhof die Diabetes-assoziierten Genexpressionsänderungen von *YAP* und dessen Zielgenen durch Behandlung mit Dapagliflozin teilweise normalisiert wurden, könnten *YAP*-vermittelte Mechanismen eine wichtige Rolle spielen, welche nicht in direkter Verbindung zum klassischen strukturellen Remodeling stehen, da ein Effekt von Dapagliflozin auf die Ausbildung von Fibrose ausblieb.

Gen		Gruppe							
		C94Y vs. WT				C94Y vs. C94Y+DAPA			
		LA	LV	RA	RV	LA	LV	RA	RV
<i>YAP</i>		↑	-	↑	↓	(↑)	-	↓	-
<i>AREG</i>		↑	↓	↑	-	(↑)	-	(↓)	-
Pro-fibrotische Gene	<i>TGF-β</i>	↑	(↑)	(↑)	↓	(↓)	↓	↓	-
	<i>SMAD3</i>	↑	(↑)	(↑)	(↓)	↓	↓	↓	-
	<i>CTGF</i>	(↑)	-	↑	-	-	↓	-	-
	<i>PAI-1</i>	↑	-	(↑)	-	-	↓	(↓)	-
ECM-Gene	<i>COL1A1</i>	(↑)	-	-	↓	(↓)	↓	(↓)	-
	<i>FN1</i>	(↑)	↓	↓	-	↓			(↓)
	<i>MMP2</i>	(↑)	-	-	-	(↓)	↓	(↓)	(↓)
Pro-Inflammatorische Gene	<i>MIF</i>	↑	-	↓	-	↓	↓	-	-
	<i>CCL2</i>	↑	(↓)	↓	-	(↓)	-	-	-

Tabelle 1. Übersicht der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Zielgene des Yes-assoziierten-Proteins (YAP); (↑=signifikant erhöht, (↑)= erhöht, ↓=signifikant reduziert, (↓) reduziert).

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Vorhofflimmern (VHF) ist die häufigste Herzrhythmusstörung im Menschen. Die derzeitigen Therapiemöglichkeiten weisen große Limitationen auf und gehen zum Teil mit erheblichen Nebenwirkungen einher. Die zugrundeliegenden proarrhythmischen Mechanismen, welche das Auftreten und die Manifestation von VHF begünstigen, sind bis zum heutigen Tag nur unzureichend verstanden, weshalb die derzeitige Behandlung mehrheitlich auch symptomatische, nicht aber kausale Therapien umfasst. Bekannt ist, dass elektrische und strukturelle Remodelingprozesse die wesentlichen Aspekte der Pathophysiologie darstellen und zur Bildung eines proarrhythmischen Substrats führen. Ein wichtiger Risikofaktor für das Auftreten von VHF ist Diabetes mellitus. Die kausalen Zusammenhänge sind nur unzulänglich verstanden, allerdings scheint das strukturelle Remodeling, insbesondere die Bildung von Fibrose, ein Schlüsselmechanismus zu sein, der möglicherweise durch Diabetes mellitus induziert wird. Studien zeigen, dass eine Therapie mittels SGLT2-Hemmern VHF in Patienten mit Diabetes mellitus reduzieren kann.

Da das Yes-assoziierte Protein (YAP) als wichtiger Mediator profibrotischer Prozesse gilt, wurde die Hypothese aufgestellt, dass YAP einen essenziellen Mediator für strukturelle atriale Remodelingprozesse und eine erhöhte Anfälligkeit für VHF bei Diabetes mellitus darstellt, was durch eine Therapie mittels SGLT2-Hemmer (Dapagliflozin) beeinflusst werden kann.

Um die komplexen hämodynamischen und elektrophysiologischen Eigenschaften des VHF in Bezug auf eine Diabetes mellitus Erkrankung nachzuvollziehen und innovative Therapieansätze zu generieren, bedarf es einer kliniknahen Abbildung der Erkrankungen in Tiermodellen. Durch eine monogenetische Veränderung der Tiere zeigten diese einen stabilen Phänotyp des permanenten neonatalen Diabetes mellitus (PNDM), welcher mit einer Apoptose der β -Zellen einhergeht. Die Vulnerabilität für VHF wurde in diesem Modell mittels Burst-Stimulation untersucht. Insgesamt wurden 45 Schweine verwendet und in folgende Gruppen unterteilt: Schweine mit Diabetes mellitus ($INS^{C94Y}/C94Y/DM$; $n=18$), Schweine ohne Diabetes mellitus (Wildtyp/ WT ; $n=17$), sowie Schweine mit Diabetes mellitus und Dapagliflozin-Therapie ($INS^{C94Y}/C94Y+Dapa/DM+Dapa$; $n=10$). Bei allen

Tieren wurden 12-Kanal-EKGs, Rechts- und Linksherzkatheteruntersuchungen und invasive elektrophysiologische Untersuchungen (EPU) durchgeführt. Anschließend wurden histologische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen von YAP und YAP-assoziierten profibrotischen Zielgenen mittels qPCR durchgeführt.

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass die genetisch veränderten *INS*^{C94Y}-Schweine eine signifikant erhöhte Vulnerabilität für VHF zeigen. Diese konnte durch die Therapie mit Dapagliflozin signifikant reduziert werden. Elektrophysiologische Veränderungen konnten bei Diabetestieren ohne Therapie aufgezeigt werden. Die Behandlung mit Dapagliflozin konnte diese Veränderungen nicht beeinflussen, so dass mögliche Dapagliflozin-Effekte auf das strukturelle Remodeling auf histologischer und molekularbiologischer Ebene untersucht wurden. In der histologischen Untersuchung mittel Masson-Trichrom-Goldner Färbung konnte im linken und rechten Atrium, als auch in beiden Ventrikeln eine signifikante Steigerung an interstitieller Fibrose in den *INS*^{C94Y}-Schweinen festgestellt werden. Die Therapie mit Dapagliflozin zeigte jedoch keinen Einfluss auf die Ausbildung der Fibrose. In der Immunfluoreszenz zeigte sich eine signifikante Steigerung von YAP-positiven Fibroblasten in der Gruppe der *INS*^{C94Y}-Schweine in allen vier Herzregionen. In einer Korrelationsanalyse konnte ein direkter Zusammenhang zwischen den Blutglukosewerten und den YAP-positiven Nuklei der Fibroblasten aufgezeigt werden. Die Behandlung mit Dapagliflozin beeinflusste dieses Ergebnis allerdings nicht. Des Weiteren wurde mittels qPCR die Expression von YAP und seiner Zielgene, sowie der mögliche Effekt von Dapagliflozin auf deren Expression untersucht. Hier zeigte sich in den *INS*^{C94Y}-Schweinen eine Hochregulation des YAP und seiner profibrotischen Zielgene v.a. im Bereich des linken und rechten Atriums. Eine Behandlung mit Dapagliflozin zeigte in v.a. einen reduzierenden Effekt von YAP und seiner profibrotischen und ECM-Zielgene im Bereich des rechten Atriums.

Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Erkrankung an Diabetes mellitus das Risiko erhöht, an Vorhofflimmern zu erkranken. Neben elektrischem, scheint insbesondere auch strukturelles Remodeling im Vorhof für dieses erhöhte Risiko verantwortlich zu sein. Außerdem weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass YAP durch erhöhte Blutglukosewerte in den Fibroblasten verstärkt exprimiert wird und somit ein wichtiger Mediator für die Diabetes-vermittelte Fibrosebildung sein

könnte. Zudem zeigte sich, dass die Behandlung mit Dapagliflozin das Risiko für Vorhofflimmern signifikant reduziert, diese protektiven Effekte scheinen jedoch nicht auf einer Beeinflussung der atrialen Fibrosebildung zu beruhen. Da aber insbesondere im rechten Vorhof die Diabetes-assoziierten Genexpressionsänderungen von *YAP* und dessen Zielgenen durch Behandlung mit Dapagliflozin zumindest teilweise wieder normalisiert werden, könnten *YAP*-vermittelte Mechanismen dennoch eine Schlüsselrolle spielen, möglicherweise jenseits des ‚klassischen‘ elektrischen oder strukturellen Remodelings.

Somit liefert diese Arbeit erste wichtige Einblicke in die dem erhöhten Risiko für Vorhofflimmern bei Diabetes mellitus zugrundeliegenden Mechanismen.

VII. SUMMARY

The role of the Yes-associated protein (YAP) in proarrhythmic to atrial fibrillation leading structural remodeling in the diabetic heart

Atrial fibrillation (AF) is the most common arrhythmia in humans. Current therapeutic strategies show great limitations and can be accompanied with severe side effects. The main proarrhythmic mechanisms leading to AF are still incompletely understood. This is why most treatment options are symptomatic rather than targeting causal mechanisms. Electrical and structural remodeling processes represent the main aspects in AF pathophysiology and contribute to a proarrhythmic substrate. Diabetes mellitus is an important risk factor for the development of AF in patients. The causal mechanisms are still inadequately understood, but a growing body of evidence suggests that structural remodeling, particularly the formation of fibrosis, is one of the key mechanisms in diabetes mellitus induced AF. Recent studies have shown that the treatment with SGLT2-inhibitors can reduce AF in patients with diabetes mellitus.

The Yes-associated protein (YAP) is an important mediator of profibrotic processes. Thus, the hypothesis of the project was that YAP is an essential mediator for structural atrial remodeling processes and for increased vulnerability for AF in diabetes mellitus, which could be affected by the treatment with the SGLT2-inhibitor Dapagliflozin.

To gain better insights of *in vivo* mechanisms and to further investigate histological and molecular changes in diabetes-associated AF, a genetically modified pig model (monogenic mutation in the *INS* gene) with a stable phenotype of permanent neonatal diabetes mellitus (PNDM) was used. AF inducibility was studied by burst pacing. The studies were operated in a total of 45 animals, which were divided into the following three groups: pigs with diabetes mellitus (*INS*^{C94Y}/C94Y/DM; n=18), wildtype pigs without diabetes mellitus (wildtype/WT; n=17), as well as pigs with diabetes mellitus treated with Dapagliflozin (*INS*^{C94Y}/C94Y+Dapa/DM+Dapa; n=10).

All animals were characterized *in vivo* by a 12-lead ECG, a right and a left heart

catheter examination and an invasive electrophysiological study including atrial burst stimulation to assess inducibility of arrhythmias. Furthermore, fibrosis was quantified histologically and gene expression analysis for *YAP* and *YAP*-associated profibrotic, ECM- and proinflammatory target genes was performed by qPCR.

Genetically modified *INS^{C94Y}* pigs displayed a significantly higher vulnerability for AF. This effect was significantly reduced by treatment with Dapagliflozin. Electrophysiological changes were revealed in the *INS^{C94Y}* pigs without treatment, but Dapagliflozin treatment showed no effects on these parameters. Therefore, the potential effects of Dapagliflozin on structural remodeling was assessed by histology and gene expression analysis. Using Masson-Trichrome-Goldner staining, a significantly increased interstitial fibrosis was displayed in left and right atria and both ventricles in the *INS^{C94Y}* pigs. The treatment with Dapagliflozin did not reveal an effect in the formation of fibrosis. Immunofluorescence staining showed a significant increase of *YAP*-positive fibroblasts in the *INS^{C94Y}*-pigs in all four examined heart regions. A correlation analysis revealed a direct relationship between blood glucose levels and the number of *YAP*-positive fibroblasts. No effect was observed by the treatment with Dapagliflozin. *INS^{C94Y}*-pigs showed an upregulation of *YAP* and its profibrotic target genes mainly in the regions of the left and right atria. The treatment with Dapagliflozin showed effects on *YAP* and partly on its profibrotic and ECM target genes in the right atrium.

These results confirm that diabetes mellitus is an important risk factor for AF. Besides electrical remodeling, it appears that particularly structural remodeling in the atria is responsible for this elevated risk since significantly enhanced atrial fibrosis was observed. Moreover, the results indicate that high blood glucose levels enhance the expression of *YAP* in cardiac fibroblasts suggesting that *YAP* could be an important mediator for diabetes-induced formation of fibrosis. The treatment with Dapagliflozin revealed a significant reduction in AF vulnerability. However, this protective effect was not due to a reduction in atrial fibrosis. Since the gene expression of *YAP* and partly of its target genes were normalized by Dapagliflozin treatment mainly in the right atrium, *YAP* could play a key role in AF, potentially by affecting non-classical remodeling mechanisms in the heart.

Therefore, this work reveals first important insights in the elevated risk for AF in diabetes mellitus and its underlying mechanisms.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Akar FG, Laurita KR, Rosenbaum DS. Cellular basis for dispersion of repolarization underlying reentrant arrhythmias. *J Electrocardiol* 2000;33 Suppl:23-31.

Al-awar A, Kupai K, Veszeka M, Szűcs G, Attieh Z, Murlasits Z, Török S, Pósa A, Varga C. Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models. *Journal of Diabetes Research* 2016;2016:9051426.

Aliot E, Botto GL, Crijns HJ, Kirchhof P. Quality of life in patients with atrial fibrillation: how to assess it and how to improve it. *Europace* 2014;16:787-96.

Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kléber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001a;103:769-77.

Allessie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kléber AG, Lab MJ, Legato MJ, Rosen MR, Schwartz PJ, Spooner PM, Van Wagoner DR, Waldo AL. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001b;103:769-77.

Allessie MA, de Groot NM, Houben RP, Schotten U, Boersma E, Smeets JL, Crijns HJ. Electropathological substrate of long-standing persistent atrial fibrillation in patients with structural heart disease: longitudinal dissociation. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2010;3:606-15.

Andrade J, Khairy P, Dobrev D, Nattel S. The clinical profile and pathophysiology of atrial fibrillation: relationships among clinical features, epidemiology, and mechanisms. *Circulation research* 2014;114:1453-68.

Anné W, Willems R, Roskams T, Sergeant P, Herijgers P, Holemans P, Ector H, Heidbüchel H. Matrix metalloproteinases and atrial remodeling in patients with mitral valve disease and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2005;67:655-66.

ANONYMUS. 10. Cardiovascular Disease and Risk Management: Standards of Medical Care in Diabetes-2022. *Diabetes Care* 2022;45:S144-s74.

Antzelevitch C. Electrical Heterogeneity, Cardiac Arrhythmias, and the Sodium Channel. *Circulation Research* 2000;87:964-5.

Arnar DO, Thorvaldsson S, Manolio TA, Thorgeirsson G, Kristjansson K, Hakonarson H, Stefansson K. Familial aggregation of atrial fibrillation in Iceland. *Eur Heart J* 2006;27:708-12.

Association AD. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2013;37:S81-S90.

Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care* 2017;41:S13-S27.

Association AD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care* 2018;42:S13-S28.

Asuzu CC, Walker RJ, Williams JS, Egede LE. Pathways for the relationship between diabetes distress, depression, fatalism and glycemic control in adults with type 2 diabetes. *Journal of Diabetes and its Complications* 2017;31:169-74.

Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. Type 1 diabetes. *The Lancet* 2014;383:69-82.

Aune D, Feng T, Schlesinger S, Janszky I, Norat T, Riboli E. Diabetes mellitus, blood glucose and the risk of atrial fibrillation: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *J Diabetes Complications* 2018;32:501-11.

Bakhti M, Böttcher A, Lickert H. Modelling the endocrine pancreas in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 2019;15:155-71.

Banday MZ, Sameer AS, Nissar S. Pathophysiology of diabetes: An overview. *Avicenna J Med* 2020;10:174-88.

Bauer A, McDonald AD, Donahue JK. Pathophysiological findings in a model of persistent atrial fibrillation and severe congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 2004;61:764-70.

Bauer W, Gyenesei A, Krętowski A. The Multifactorial Progression from the Islet Autoimmunity to Type 1 Diabetes in Children. *Int J Mol Sci* 2021;22.

Benes J, Jr., Melenovsky V, Skaroupkova P, Pospisilova J, Petrak J, Cervenka L, Sedmera D. Myocardial morphological characteristics and proarrhythmic substrate in the rat model of heart failure due to chronic volume overload. *Anat Rec (Hoboken)* 2011;294:102-11.

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.

Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, Delling FN, Djousse L, Elkind MSV, Ferguson JF, Fornage M, Jordan LC, Khan SS, Kissela BM, Knutson KL, Kwan TW, Lackland DT, Lewis TT, Lichtman JH, Longenecker CT, Loop MS, Lutsey PL, Martin SS, Matsushita K, Moran AE, Mussolino ME, O'Flaherty M, Pandey A, Perak AM, Rosamond WD, Roth GA, Sampson UKA, Satou GM, Schroeder EB, Shah SH, Spartano NL, Stokes A, Tirschwell DL, Tsao CW, Turakhia MP, VanWagner LB, Wilkins JT, Wong SS, Virani SS. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2019;139:e56-e528.

Bers DM, Perez-Reyes E. Ca channels in cardiac myocytes: structure and function in Ca influx and intracellular Ca release. *Cardiovasc Res* 1999;42:339-60.

Biondi-Zoccai G, De Falco E, Peruzzi M, Cavarretta E, Mancone M, Leoni O,

Caristo ME, Lotrionte M, Marullo AG, Amodeo A, Pacini L, Calogero A, Petrozza V, Chimenti I, D'Ascenzo F, Frati G. A novel closed-chest porcine model of chronic ischemic heart failure suitable for experimental research in cardiovascular disease. *Biomed Res Int* 2013;2013:410631.

Blas E, Kurup AS. Equity, social determinants and public health programmes World Health Organization; 2010.

Bohne LJ, Johnson D, Rose RA, Wilton SB, Gillis AM. The Association Between Diabetes Mellitus and Atrial Fibrillation: Clinical and Mechanistic Insights. *Front Physiol* 2019;10:135.

Boixel C, Fontaine V, Rücker-Martin C, Milliez P, Louedec L, Michel JB, Jacob MP, Hatem SN. Fibrosis of the left atria during progression of heart failure is associated with increased matrix metalloproteinases in the rat. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:336-44.

Boriani G, Savelieva I, Dan GA, Deharo JC, Ferro C, Israel CW, Lane DA, La Manna G, Morton J, Mitjans AM, Vos MA, Turakhia MP, Lip GY. Chronic kidney disease in patients with cardiac rhythm disturbances or implantable electrical devices: clinical significance and implications for decision making-a position paper of the European Heart Rhythm Association endorsed by the Heart Rhythm Society and the Asia Pacific Heart Rhythm Society. *Europace* 2015;17:1169-96.

Buist TJ, Zipes DP, Elvan A. Atrial fibrillation ablation strategies and technologies: past, present, and future. *Clinical Research in Cardiology* 2021;110:775-88.

Burstein B, Libby E, Calderone A, Nattel S. Differential behaviors of atrial versus ventricular fibroblasts: a potential role for platelet-derived growth factor in atrial-ventricular remodeling differences. *Circulation* 2008;117:1630-41.

Cadby G, McArdle N, Briffa T, Hillman DR, Simpson L, Knuiman M, Hung J. Severity of OSA is an independent predictor of incident atrial fibrillation hospitalization in a large sleep-clinic cohort. *Chest* 2015;148:945-52.

Cairns JA. The search for the ideal atrial fibrillation stroke risk prediction schema: is ATRIA a contender? *European Heart Journal* 2016;37:3211-2.

Calkins H, Hindricks G, Cappato R, Kim YH, Saad EB, Aguinaga L, Akar JG, Badhwar V, Brugada J, Camm J, Chen PS, Chen SA, Chung MK, Nielsen JC, Curtis AB, Davies DW, Day JD, d'Avila A, de Groot N, Di Biase L, Duytschaever M, Edgerton JR, Ellenbogen KA, Ellinor PT, Ernst S, Fenelon G, Gerstenfeld EP, Haines DE, Haissaguerre M, Helm RH, Hylek E, Jackman WM, Jalife J, Kalman JM, Kautzner J, Kottkamp H, Kuck KH, Kumagai K, Lee R, Lewalter T, Lindsay BD, Macle L, Mansour M, Marchlinski FE, Michaud GF, Nakagawa H, Natale A, Nattel S, Okumura K, Packer D, Pokushalov E, Reynolds MR, Sanders P, Scanavacca M, Schilling R, Tondo C, Tsao HM, Verma A, Wilber DJ, Yamane T. 2017 HRS/EHRA/ECAS/APHRS/SOLAECE expert consensus statement on catheter and surgical ablation of atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2017;14:e275-e444.

Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, Hindricks G, Kirchhof P. 2012 focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Eur Heart J* 2012;33:2719-47.

Carver W, Goldsmith EC. Regulation of tissue fibrosis by the biomechanical environment. *Biomed Res Int* 2013;2013:101979.

Ceriello A, Prattichizzo F. Variability of risk factors and diabetes complications. *Cardiovasc Diabetol* 2021;20:101.

Chasis H, Jolliffe N, Smith HW. THE ACTION OF PHLORIZIN ON THE EXCRETION OF GLUCOSE, XYLOSE, SUCROSE, CREATININE AND UREA BY MAN. *J Clin Invest* 1933;12:1083-90.

Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet* 2017;389:2239-51.

Chatterjee S, Sardar P, Lichstein E, Mukherjee D, Aikat S. Pharmacologic rate versus rhythm-control strategies in atrial fibrillation: an updated comprehensive review and meta-analysis. *Pacing Clin Electrophysiol* 2013;36:122-33.

Chen HY, Huang JY, Siao WZ, Jong GP. The association between SGLT2 inhibitors and new-onset arrhythmias: a nationwide population-based longitudinal cohort study. *Cardiovasc Diabetol* 2020;19:73.

Chen J, Harris RC. Interaction of the EGF Receptor and the Hippo Pathway in the Diabetic Kidney. *J Am Soc Nephrol* 2016;27:1689-700.

Chen Y, Surinkaew S, Naud P, Qi XY, Gillis MA, Shi YF, Tardif JC, Dobrev D, Nattel S. JAK-STAT signalling and the atrial fibrillation promoting fibrotic substrate. *Cardiovasc Res* 2017;113:310-20.

Chimenti C, Russo MA, Carpi A, Frustaci A. Histological substrate of human atrial fibrillation. *Biomed Pharmacother* 2010;64:177-83.

Christensen AA, Gannon M. The Beta Cell in Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rep* 2019;19:81.

Chugh SS, Havmoeller R, Narayanan K, Singh D, Rienstra M, Benjamin EJ, Gillum RF, Kim YH, McAnulty JH, Jr., Zheng ZJ, Forouzanfar MH, Naghavi M, Mensah GA, Ezzati M, Murray CJ. Worldwide epidemiology of atrial fibrillation: a Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation* 2014;129:837-47.

Citerni C, Kirchhoff J, Olsen LH, Sattler SM, Gentilini F, Forni M, Zannoni A, Grunnet M, Edvardsson N, Bentzen BH, Diness JG. Characterization of Atrial and Ventricular Structural Remodeling in a Porcine Model of Atrial Fibrillation Induced by Atrial Tachypacing. *Front Vet Sci* 2020;7:179.

Clauss S, Bleyer C, Schüttler D, Tomsits P, Renner S, Klymiuk N, Wakili R, Massberg S, Wolf E, Kääb S. Animal models of arrhythmia: classic

electrophysiology to genetically modified large animals. *Nature Reviews Cardiology* 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, Kääb S. Characterization of a porcine model of atrial arrhythmogenicity in the context of ischaemic heart failure. *PLoS One* 2020;15:e0232374.

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

De Caterina R, Husted S, Wallentin L, Andreotti F, Arnesen H, Bachmann F, Baigent C, Huber K, Jespersen J, Kristensen SD, Lip GY, Morais J, Rasmussen LH, Siegbahn A, Verheugt FW, Weitz JI. Vitamin K antagonists in heart disease: current status and perspectives (Section III). Position paper of the ESC Working Group on Thrombosis--Task Force on Anticoagulants in Heart Disease. *Thromb Haemost* 2013;110:1087-107.

De Jong AM, Van Gelder IC, Vreeswijk-Baudoin I, Cannon MV, Van Gilst WH, Maass AH. Atrial remodeling is directly related to end-diastolic left ventricular pressure in a mouse model of ventricular pressure overload. *PLoS One* 2013;8:e72651.

Dorian P, Jung W, Newman D, Paquette M, Wood K, Ayers GM, Camm J, Akhtar M, Luderitz B. The impairment of health-related quality of life in patients with intermittent atrial fibrillation: implications for the assessment of investigational therapy. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:1303-9.

Dublin S, Glazer NL, Smith NL, Psaty BM, Lumley T, Wiggins KL, Page RL, Heckbert SR. Diabetes mellitus, glycemic control, and risk of atrial fibrillation. *Journal of general internal medicine* 2010;25:853-8.

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.

Duprez DA, Heckbert SR, Alonso A, Gross MD, Ix JH, Kizer JR, Tracy RP, Kronmal R, Jacobs DR, Jr. Collagen Biomarkers and Incidence of New Onset of Atrial Fibrillation in Subjects With No Overt Cardiovascular Disease at Baseline: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2018;11:e006557.

Fan D, Takawale A, Lee J, Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2012;5:15.

Fauchier L, Bisson A, Bodin A. Heart failure with preserved ejection fraction and atrial fibrillation: recent advances and open questions. *BMC Med* 2023;21:54.

Feng L, Chen Y, Li N, Yang X, Zhou L, Li H, Wang T, Xie M, Liu H. Dapagliflozin delays renal fibrosis in diabetic kidney disease by inhibiting YAP/TAZ activation. *Life Sci* 2023;322:121671.

Feng Y, Yang S, Ma Y, Bai XY, Chen X. Role of Toll-like receptors in diabetic renal lesions in a miniature pig model. *Sci Adv* 2015;1:e1400183.

Fernández-Ruiz I. Gene therapy against Hippo triggers cardiomyocyte renewal after MI. *Nat Rev Cardiol* 2021;18:611.

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.

Fisher SJ, Shi ZQ, Lickley HL, Efendic S, Vranic M, Giacca A. Low-dose IGF-I has no selective advantage over insulin in regulating glucose metabolism in hyperglycemic depancreatized dogs. *J Endocrinol* 2001;168:49-58.

Fox CS, Parise H, D'Agostino RB, Sr., Lloyd-Jones DM, Vasan RS, Wang TJ, Levy D, Wolf PA, Benjamin EJ. Parental atrial fibrillation as a risk factor for atrial fibrillation in offspring. *Jama* 2004;291:2851-5.

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

Francisco J, Zhang Y, Jeong JI, Mizushima W, Ikeda S, Ivessa A, Oka S, Zhai P, Tallquist MD, Del Re DP. Blockade of Fibroblast YAP Attenuates Cardiac Fibrosis and Dysfunction Through MRTF-A Inhibition. *JACC: Basic to Translational Science* 2020;5:931-45.

Francisco J, Zhang Y, Nakada Y, Jeong JI, Huang CY, Ivessa A, Oka S, Babu GJ, Del Re DP. AAV-mediated YAP expression in cardiac fibroblasts promotes inflammation and increases fibrosis. *Sci Rep* 2021;11:10553.

Freeman JV, Simon DN, Go AS, Spertus J, Fonarow GC, Gersh BJ, Hylek EM, Kowey PR, Mahaffey KW, Thomas LE, Chang P, Peterson ED, Piccini JP. Association Between Atrial Fibrillation Symptoms, Quality of Life, and Patient Outcomes: Results From the Outcomes Registry for Better Informed Treatment of Atrial Fibrillation (ORBIT-AF). *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2015;8:393-402.

Frustaci A, Chimenti C, Bellocci F, Morgante E, Russo MA, Maseri A. Histological substrate of atrial biopsies in patients with lone atrial fibrillation. *Circulation* 1997;96:1180-4.

Frydrychowski P, Michałek M, Sławuta A, Noszczyk-Nowak A. Large animals as models of atrial fibrillation. *Adv Clin Exp Med* 2020;29:757-67.

Galicía-García U, Benito-Vicente A, Jebari S, Larrea-Sebal A, Siddiqi H, Uribe KB, Ostolaza H, Martín C. Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci* 2020;21.

Gehrmann J, Frantz S, Maguire CT, Vargas M, Ducharme A, Wakimoto H, Lee RT, Berul CI. Electrophysiological characterization of murine myocardial ischemia and infarction. *Basic Res Cardiol* 2001;96:237-50.

Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* 2012;227:493-507.

Giongo A, Gano KA, Crabb DB, Mukherjee N, Novelo LL, Casella G, Drew JC, Ilonen J, Knip M, Hyöty H. Toward defining the autoimmune microbiome for type 1 diabetes. *The ISME journal* 2011;5:82-91.

Grabmaier U, Kania G, Kreiner J, Grabmeier J, Uhl A, Huber BC, Lackermair K, Herbach N, Todica A, Eriksson U, Weckbach LT, Brunner S. Soluble Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) as a Biomarker in the Mouse Model of Experimental Autoimmune Myocarditis (EAM). *PLoS One* 2016;11:e0158299.

Guo Y, Tian Y, Wang H, Si Q, Wang Y, Lip GYH. Prevalence, incidence, and lifetime risk of atrial fibrillation in China: new insights into the global burden of atrial fibrillation. *Chest* 2015;147:109-19.

Gwathmey JK, Nakao S, Come PC, Goad ME, Serur JR, Als AV, Abelmann WH. An experimental model of acute and subacute viral myocarditis in the pig. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:864-9.

Gyöngyösi M, Pavo N, Lukovic D, Zlabinger K, Spannbauer A, Traxler D, Goliasch G, Mandic L, Bergler-Klein J, Gugerell A, Jakab A, Szankai Z, Toth L, Garamvölgyi R, Maurer G, Jaisser F, Zannad F, Thum T, Bátkai S, Winkler J. Porcine model of progressive cardiac hypertrophy and fibrosis with secondary postcapillary pulmonary hypertension. *J Transl Med* 2017;15:202.

Haïssaguerre M, Jaïs P, Shah DC, Takahashi A, Hocini M, Quiniou G, Garrigue S, Le Mouroux A, Le Métayer P, Clémenty J. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med* 1998;339:659-66.

Halper J, Kjaer M. Basic Components of Connective Tissues and Extracellular Matrix: Elastin, Fibrillin, Fibulins, Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, Tenascins and Thrombospondins. In: Halper J, ed. Progress in Heritable Soft Connective Tissue Diseases. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014:31-47.

Hara H, Takeda N, Kondo M, Kubota M, Saito T, Maruyama J, Fujiwara T, Maemura S, Ito M, Naito AT, Harada M, Toko H, Nomura S, Kumagai H, Ikeda Y, Ueno H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Hata Y, Uchiyama M, Komuro I. Discovery of a Small Molecule to Increase Cardiomyocytes and Protect the Heart After Ischemic Injury. *JACC Basic Transl Sci* 2018;3:639-53.

Hart RG, Pearce LA, Aguilar MI. Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med* 2007;146:857-67.

Harvey KF, Pflieger CM, Hariharan IK. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* 2003;114:457-67.

Hatem SN, Sanders P. Epicardial adipose tissue and atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2014;102:205-13.

He S, Chen Y, Wei L, Jin X, Zeng L, Ren Y, Zhang J, Wang L, Li H, Lu Y, Cheng J. Treatment and risk factor analysis of hypoglycemia in diabetic rhesus monkeys. *Exp Biol Med (Maywood)* 2011;236:212-8.

Hindricks G, Potpara T, Dagres N, Arbelo E, Bax JJ, Blomström-Lundqvist C, Boriani G, Castella M, Dan GA, Dilaveris PE, Fauchier L, Filippatos G, Kalman JM, La Meir M, Lane DA, Lebeau JP, Lettino M, Lip GYH, Pinto FJ, Thomas GN, Valgimigli M, Van Gelder IC, Van Putte BP, Watkins CL. 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS): The Task Force for the diagnosis and management of atrial fibrillation of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the

European Heart Rhythm Association (EHRA) of the ESC. *Eur Heart J* 2021;42:373-498.

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.

Hoang Do O, Thorn P. Insulin secretion from beta cells within intact islets: location matters. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2015;42:406-14.

Hoang DT, Matsunari H, Nagaya M, Nagashima H, Millis JM, Witkowski P, Periwal V, Hara M, Jo J. A conserved rule for pancreatic islet organization. *PLoS One* 2014;9:e110384.

Hobbelt AH, Siland JE, Geelhoed B, Van Der Harst P, Hillege HL, Van Gelder IC, Rienstra M. Clinical, biomarker, and genetic predictors of specific types of atrial fibrillation in a community-based cohort: data of the PREVEND study. *EP Europace* 2016;19:226-32.

Hu M, Wang H, Li S, Yan F, Fu C, Li L, Yu Y, Xiong J, Dong B. Yes-Associated Protein is Involved in Myocardial Fibrosis in Rats with Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2021;14:2133-43.

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.

Huxley RR, Filion KB, Konety S, Alonso A. Meta-analysis of cohort and case-control studies of type 2 diabetes mellitus and risk of atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 2011;108:56-62.

Indik JH, Allen D, Shanmugasundaram M, Zuercher M, Hilwig RW, Berg RA,

Kern KB. Predictors of resuscitation in a swine model of ischemic and nonischemic ventricular fibrillation cardiac arrest: superiority of amplitude spectral area and slope to predict a return of spontaneous circulation when resuscitation efforts are prolonged. *Crit Care Med* 2010;38:2352-7.

Jaïdane H, Sané F, Gharbi J, Aouni M, Romond MB, Hober D. Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models. *Diabetes Metab Res Rev* 2009;25:591-603.

Jankauskas SS, Kansakar U, Varzideh F, Wilson S, Mone P, Lombardi A, Gambardella J, Santulli G. Heart failure in diabetes. *Metabolism* 2021;125:154910.

Jastroch M, Andersson L. When pigs fly, UCP1 makes heat. *Mol Metab* 2015;4:359-62.

Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy: An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res* 2018;122:624-38.

Jiang W, Xiong Y, Li X, Yang Y. Cardiac Fibrosis: Cellular Effectors, Molecular Pathways, and Exosomal Roles. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2021;8.

Kääb S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, Marban E, Tomaselli GF. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res* 1996;78:262-73.

Kaese S, Verheule S. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front Physiol* 2012;3:345.

Kannel WB, Wolf PA, Benjamin EJ, Levy D. Prevalence, incidence, prognosis, and predisposing conditions for atrial fibrillation: population-based estimates. *Am J Cardiol* 1998;82:2n-9n.

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.

Kazui T, Henn MC, Watanabe Y, Kovács SJ, Lawrance CP, Greenberg JW, Moon M, Schuessler RB, Damiano RJ, Jr. The impact of 6 weeks of atrial fibrillation on left atrial and ventricular structure and function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2015;150:1602-8.

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

Kirchhof P, Bax J, Blomstrom-Lundquist C, Calkins H, Camm AJ, Cappato R, Cosio F, Crijns H, Diener HC, Goette A, Israel CW, Kuck KH, Lip GY, Nattel S, Page RL, Ravens U, Schotten U, Steinbeck G, Vardas P, Waldo A, Wegscheider K, Willems S, Breithardt G. Early and comprehensive management of atrial fibrillation: executive summary of the proceedings from the 2nd AFNET-EHRA consensus conference 'research perspectives in AF'. *Eur Heart J* 2009;30:2969-77c.

Kirchhof P, Benussi S, Kotecha D, Ahlsson A, Atar D, Casadei B, Castella M, Diener HC, Heidbuchel H, Hendriks J, Hindricks G, Manolis AS, Oldgren J, Popescu BA, Schotten U, Van Putte B, Vardas P. 2016 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation developed in collaboration with EACTS. *Eur Heart J* 2016;37:2893-962.

Kistler PM, Chieng D, Sugumar H, Ling LH, Segan L, Azzopardi S, Al-Kaisey A, Parameswaran R, Anderson RD, Hawson J, Prabhu S, Voskoboinik A, Wong G, Morton JB, Pathik B, McLellan AJ, Lee G, Wong M, Finch S, Pathak RK, Raja DC, Sterns L, Ginks M, Reid CM, Sanders P, Kalman JM. Effect of Catheter Ablation Using Pulmonary Vein Isolation With vs Without Posterior Left Atrial Wall Isolation on Atrial Arrhythmia Recurrence in Patients With Persistent Atrial Fibrillation: The CAPLA Randomized Clinical Trial. *Jama* 2023;329:127-35.

Koopmans SJ, Mroz Z, Dekker R, Corbijn H, Ackermans M, Sauerwein H. Association of insulin resistance with hyperglycemia in streptozotocin-diabetic

pigs: effects of metformin at isoenergetic feeding in a type 2-like diabetic pig model. *Metabolism* 2006;55:960-71.

Koopmans SJ, VanderMeulen J, Wijdenes J, Corbijn H, Dekker R. The existence of an insulin-stimulated glucose and non-essential but not essential amino acid substrate interaction in diabetic pigs. *BMC Biochem* 2011;12:25.

Krijthe BP, Kunst A, Benjamin EJ, Lip GY, Franco OH, Hofman A, Witteman JC, Stricker BH, Heeringa J. Projections on the number of individuals with atrial fibrillation in the European Union, from 2000 to 2060. *Eur Heart J* 2013;34:2746-51.

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.

Lambert R, Srodulski S, Peng X, Margulies KB, Despa F, Despa S. Intracellular Na⁺ Concentration ([Na⁺]_i) Is Elevated in Diabetic Hearts Due to Enhanced Na⁺-Glucose Cotransport. *J Am Heart Assoc* 2015;4:e002183.

Lammers WJ, Allessie MA. Pathophysiology of atrial fibrillation: current aspects. *Herz* 1993;18:1-8.

Landry NM, Rattan SG, Filomeno KL, Meier TW, Meier SC, Foran SJ, Meier CF, Koleini N, Fandrich RR, Kardami E, Duhamel TA, Dixon IMC. SKI activates the Hippo pathway via LIMD1 to inhibit cardiac fibroblast activation. *Basic Res Cardiol* 2021;116:25.

Leach JP, Heallen T, Zhang M, Rahmani M, Morikawa Y, Hill MC, Segura A, Willerson JT, Martin JF. Hippo pathway deficiency reverses systolic heart failure after infarction. *Nature* 2017;550:260-4.

Lee TM, Chang NC, Lin SZ. Dapagliflozin, a selective SGLT2 Inhibitor, attenuated cardiac fibrosis by regulating the macrophage polarization via STAT3 signaling in infarcted rat hearts. *Free Radic Biol Med* 2017;104:298-310.

Lehrke M, Marx N. Diabetes Mellitus and Heart Failure. *Am J Med* 2017;130:S40-s50.

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 C, Zhang J, Xue M, Li X, Han F, Liu X, Xu L, Lu Y, Cheng Y, Li T, Yu X, Sun B, Chen L. SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart. *Cardiovasc Diabetol* 2019;18:15.

Lin Z, von Gise A, Zhou P, Gu F, Ma Q, Jiang J, Yau AL, Buck JN, Gouin KA, van Gorp PR, Zhou B, Chen J, Seidman JG, Wang DZ, Pu WT. Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model. *Circ Res* 2014;115:354-63.

Lip GY, Nieuwlaat R, Pisters R, Lane DA, Crijns HJ. Refining clinical risk stratification for predicting stroke and thromboembolism in atrial fibrillation using a novel risk factor-based approach: the euro heart survey on atrial fibrillation. *Chest* 2010;137:263-72.

Lip GYH, Coca A, Kahan T, Boriani G, Manolis AS, Olsen MH, Oto A, Potpara TS, Steffel J, Marín F, de Oliveira Figueiredo MJ, de Simone G, Tzou WS, Chiang CE, Williams B, Dan GA, Gorenek B, Fauchier L, Savelieva I, Hatala R, van Gelder I, Brguljan-Hitij J, Erdine S, Lovic D, Kim YH, Salinas-Arce J, Field M. Hypertension and cardiac arrhythmias: a consensus document from the European Heart Rhythm Association (EHRA) and ESC Council on Hypertension, endorsed by the Heart Rhythm Society (HRS), Asia-Pacific Heart Rhythm Society (APHRS) and Sociedad Latinoamericana de Estimulación Cardíaca y Electrofisiología (SOLEACE). *Europace* 2017;19:891-911.

Liu L, Song S, Zhang YP, Wang D, Zhou Z, Chen Y, Jin X, Hu CF, Shen CX. Amphiregulin promotes cardiac fibrosis post myocardial infarction by inducing the endothelial-mesenchymal transition via the EGFR pathway in endothelial cells. *Exp Cell Res* 2020;390:111950.

Liu M, Hodish I, Haataja L, Lara-Lemus R, Rajpal G, Wright J, Arvan P. Proinsulin misfolding and diabetes: mutant INS gene-induced diabetes of youth. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:652-9.

Liu M, Weiss MA, Arunagiri A, Yong J, Rege N, Sun J, Haataja L, Kaufman RJ, Arvan P. Biosynthesis, structure, and folding of the insulin precursor protein. *Diabetes Obes Metab* 2018;20 Suppl 2:28-50.

Liu S, Martin JF. The regulation and function of the Hippo pathway in heart regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2019;8:e335.

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;25:402-8.

Ludvigsen TP, Kirk RK, Christoffersen B, Pedersen HD, Martinussen T, Kildegaard J, Heegaard PM, Lykkesfeldt J, Olsen LH. Göttingen minipig model of diet-induced atherosclerosis: influence of mild streptozotocin-induced diabetes on lesion severity and markers of inflammation evaluated in obese, obese and diabetic, and lean control animals. *J Transl Med* 2015;13:312.

Lugenbiel P, Wenz F, Govorov K, Schweizer PA, Katus HA, Thomas D. Atrial fibrillation complicated by heart failure induces distinct remodeling of calcium cycling proteins. *PLoS One* 2015;10:e0116395.

Lytvyn Y, Bjornstad P, Udell JA, Lovshin JA, Cherney DZI. Sodium Glucose Cotransporter-2 Inhibition in Heart Failure: Potential Mechanisms, Clinical Applications, and Summary of Clinical Trials. *Circulation* 2017;136:1643-58.

Ma J, Chen Q, Ma S. Left atrial fibrosis in atrial fibrillation: Mechanisms, clinical evaluation and management. *J Cell Mol Med* 2021;25:2764-75.

Magnussen C, Niiranen TJ, Ojeda FM, Gianfagna F, Blankenberg S, Njølstad I, Vartiainen E, Sans S, Pasterkamp G, Hughes M, Costanzo S, Donati MB, Jousilahti P, Linneberg A, Palosaari T, de Gaetano G, Bobak M, den Ruijter HM, Mathiesen E, Jørgensen T, Söderberg S, Kuulasmaa K, Zeller T, Iacoviello L, Salomaa V, Schnabel RB. Sex Differences and Similarities in Atrial Fibrillation Epidemiology, Risk Factors, and Mortality in Community Cohorts: Results From the BiomarCaRE Consortium (Biomarker for Cardiovascular Risk Assessment in Europe). *Circulation* 2017;136:1588-97.

Manninger M, Zweiker D, van Hunnik A, Alogna A, Prassl AJ, Schipke J, Zeemering S, Zirngast B, Schönleitner P, Schwarzl M, Herbst V, Thon-Gutsch E, Huber S, Rohrer U, Ebner J, Brussee H, Pieske BM, Heinzl FR, Verheule S, Antoons G, Lueger A, Mühlfeld C, Plank G, Schotten U, Post H, Scherr D. Arterial hypertension drives arrhythmia progression via specific structural remodeling in a porcine model of atrial fibrillation. *Heart Rhythm* 2018;15:1328-36.

Marionneau C, Brunet S, Flagg TP, Pilgram TK, Demolombe S, Nerbonne JM. Distinct cellular and molecular mechanisms underlie functional remodeling of repolarizing K⁺ currents with left ventricular hypertrophy. *Circ Res* 2008;102:1406-15.

Mellert J, Hering BJ, Liu X, Brandhorst D, Brandhorst H, Brendel M, Ernst E, Gramberg D, Bretzel RG, Hopt UT. Successful islet auto- and allotransplantation in diabetic pigs. *Transplantation* 1998;66:200-4.

Mia MM, Cibi DM, Ghani S, Singh A, Tee N, Sivakumar V, Bogireddi H, Cook SA, Mao J, Singh MK. Loss of Yap/Taz in cardiac fibroblasts attenuates adverse remodelling and improves cardiac function. *Cardiovasc Res* 2022a;118:1785-804.

Mia MM, Cibi DM, Ghani SABA, Singh A, Tee N, Sivakumar V, Bogireddi H, Cook SA, Mao J, Singh MK. Loss of Yap/Taz in cardiac fibroblasts attenuates

adverse remodelling and improves cardiac function. *Cardiovascular Research* 2021;118:1785-804.

Mia MM, Singh MK. New Insights into Hippo/YAP Signaling in Fibrotic Diseases. *Cells* 2022b;11.

Miyauchi Y, Zhou S, Okuyama Y, Miyauchi M, Hayashi H, Hamabe A, Fishbein MC, Mandel WJ, Chen LS, Chen PS, Karagueuzian HS. Altered atrial electrical restitution and heterogeneous sympathetic hyperinnervation in hearts with chronic left ventricular myocardial infarction: implications for atrial fibrillation. *Circulation* 2003;108:360-6.

Mohan M, Dihoum A, Mordi IR, Choy AM, Rena G, Lang CC. Left Ventricular Hypertrophy in Diabetic Cardiomyopathy: A Target for Intervention. *Front Cardiovasc Med* 2021;8:746382.

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;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;91:1588-95.

Morin DP, Bernard ML, Madias C, Rogers PA, Thihalolipavan S, Estes NA, 3rd. The State of the Art: Atrial Fibrillation Epidemiology, Prevention, and Treatment. *Mayo Clin Proc* 2016;91:1778-810.

Murphy NF, Simpson CR, Jhund PS, Stewart S, Kirkpatrick M, Chalmers J, MacIntyre K, McMurray JJ. A national survey of the prevalence, incidence, primary care burden and treatment of atrial fibrillation in Scotland. *Heart* 2007;93:606-12.

Nalliah CJ, Sanders P, Kalman JM. The Impact of Diet and Lifestyle on Atrial Fibrillation. *Curr Cardiol Rep* 2018;20:137.

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

Nattel S. Molecular and Cellular Mechanisms of Atrial Fibrosis in Atrial Fibrillation. *JACC Clin Electrophysiol* 2017;3:425-35.

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

Nattel S, Dobrev D. Electrophysiological and molecular mechanisms of paroxysmal atrial fibrillation. *Nat Rev Cardiol* 2016;13:575-90.

Nattel S, Harada M. Atrial remodeling and atrial fibrillation: recent advances and translational perspectives. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:2335-45.

Nattel S, Heijman J, Zhou L, Dobrev D. Molecular Basis of Atrial Fibrillation Pathophysiology and Therapy: A Translational Perspective. *Circ Res* 2020;127:51-72.

Nauck MA, Del Prato S, Meier JJ, Durán-García S, Rohwedder K, Elze M, Parikh SJ. Dapagliflozin versus glipizide as add-on therapy in patients with type 2 diabetes who have inadequate glycemic control with metformin: a randomized, 52-week, double-blind, active-controlled noninferiority trial. *Diabetes Care* 2011;34:2015-22.

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;60:300-15.

Nerbonne JM, Kass RS. Physiology and Molecular Biology of Ion Channels Contributing to Ventricular Repolarization. In: Gussak I, Antzelevitch C, Hammill

SC, Shen W-K, Bjerregaard P, eds. Cardiac Repolarization: Bridging Basic and Clinical Science. Totowa, NJ: Humana Press; 2003:25-62.

Nerbonne JM, Kass RS. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev* 2005;85:1205-53.

Neuberger HR, Schotten U, Verheule S, Eijssbouts S, Blaauw Y, van Hunnik A, Allessie M. Development of a substrate of atrial fibrillation during chronic atrioventricular block in the goat. *Circulation* 2005;111:30-7.

Nguyen BL, Fishbein MC, Chen LS, Chen PS, Masroor S. Histopathological substrate for chronic atrial fibrillation in humans. *Heart Rhythm* 2009;6:454-60.

Ni L, Yuan C, Chen G, Zhang C, Wu X. SGLT2i: beyond the glucose-lowering effect. *Cardiovasc Diabetol* 2020;19:98.

Niemann JT, Rosborough JP, Youngquist ST, Shah AP. Transthoracic defibrillation potential gradients in a closed chest porcine model of prolonged spontaneous and electrically induced ventricular fibrillation. *Resuscitation* 2010;81:477-80.

Nishinarita R, Niwano S, Niwano H, Nakamura H, Saito D, Sato T, Matsuura G, Arakawa Y, Kobayashi S, Shirakawa Y, Horiguchi A, Ishizue N, Igarashi T, Yoshizawa T, Oikawa J, Hara Y, Katsumura T, Kishihara J, Satoh A, Fukaya H, Sakagami H, Ako J. Canagliflozin Suppresses Atrial Remodeling in a Canine Atrial Fibrillation Model. *J Am Heart Assoc* 2021;10:e017483.

Nygaard AB, Jørgensen CB, Cirera S, Fredholm M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol* 2007;8:67.

Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, Linnenkamp U, Guariguata L, Cho NH, Cavan D, Shaw JE, Makaroff LE. IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040. *Diabetes Res Clin Pract* 2017;128:40-50.

Ohmae M, Kishimoto C, Tomioka N. Complete atrioventricular block in experimental murine myocarditis. *J Electrocardiol* 2005;38:230-4.

Oros A, Beekman JD, Vos MA. The canine model with chronic, complete atrio-ventricular block. *Pharmacol Ther* 2008;119:168-78.

Pallisgaard JL, Schjerning AM, Lindhardt TB, Procida K, Hansen ML, Torp-Pedersen C, Gislason GH. Risk of atrial fibrillation in diabetes mellitus: A nationwide cohort study. *Eur J Prev Cardiol* 2016;23:621-7.

Pan D, Zhou Y, Xiao S, Hu Y, Huan C, Wu Q, Wang X, Pan Q, Liu J, Zhu H. Identification of Differentially Expressed Genes and Pathways in Human Atrial Fibrillation by Bioinformatics Analysis. *Int J Gen Med* 2022;15:103-14.

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.

Panciera T, Azzolin L, Cordenonsi M, Piccolo S. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017;18:758-70.

Park DS, Cerrone M, Morley G, Vasquez C, Fowler S, Liu N, Bernstein SA, Liu FY, Zhang J, Rogers CS, Priori SG, Chinitz LA, Fishman GI. Genetically engineered SCN5A mutant pig hearts exhibit conduction defects and arrhythmias. *J Clin Invest* 2015;125:403-12.

Park JW, Yang PS, Bae HJ, Yang SY, Yu HT, Kim TH, Uhm JS, Joung B, Lee MH, Pak HN. Five-Year Change in the Renal Function After Catheter Ablation of Atrial Fibrillation. *Journal of the American Heart Association* 2019;8:e013204.

Pellman J, Zhang J, Sheikh F. Myocyte-fibroblast communication in cardiac

fibrosis and arrhythmias: Mechanisms and model systems. *J Mol Cell Cardiol* 2016;94:22-31.

Perestrelo AR, Silva AC, Oliver-De La Cruz J, Martino F, Horváth V, Caluori G, Polanský O, Vinarský V, Azzato G, de Marco G, Žampachová V, Skládal P, Pagliari S, Rainer A, Pinto-do-Ó P, Caravella A, Koci K, Nascimento DS, Forte G. Multiscale Analysis of Extracellular Matrix Remodeling in the Failing Heart. *Circ Res* 2021;128:24-38.

Pfister R, Cairns R, Erdmann E, Schneider CA. A clinical risk score for heart failure in patients with type 2 diabetes and macrovascular disease: an analysis of the PROactive study. *Int J Cardiol* 2013;162:112-6.

Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 2001;88:1159-67.

Polejaeva IA, Ranjan R, Davies CJ, Regouski M, Hall J, Olsen AL, Meng Q, Rutigliano HM, Dossall DJ, Angel NA, Sachse FB, Seidel T, Thomas AJ, Stott R, Panter KE, Lee PM, Van Wettre AJ, Stevens JR, Wang Z, MacLeod RS, Marrouche NF, White KL. Increased Susceptibility to Atrial Fibrillation Secondary to Atrial Fibrosis in Transgenic Goats Expressing Transforming Growth Factor- β 1. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2016;27:1220-9.

Polina I, Jansen HJ, Li T, Moghtadaei M, Bohne LJ, Liu Y, Krishnaswamy P, Egom EE, Belke DD, Rafferty SA, Ezeani M, Gillis AM, Rose RA. Loss of insulin signaling may contribute to atrial fibrillation and atrial electrical remodeling in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020;117:7990-8000.

Reddy VY, Möbius-Winkler S, Miller MA, Neuzil P, Schuler G, Wiebe J, Sick P, Sievert H. Left atrial appendage closure with the Watchman device in patients with a contraindication for oral anticoagulation: the ASAP study (ASA Plavix Feasibility Study With Watchman Left Atrial Appendage Closure Technology). *J Am Coll*

Cardiol 2013;61:2551-6.

Remes J, van Brakel TJ, Bolotin G, Garber C, de Jong MM, van der Veen FH, Maessen JG. Persistent atrial fibrillation in a goat model of chronic left atrial overload. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2008;136:1005-11.

Renner S, Blutke A, Clauss S, Deeg CA, Kemter E, Merkus D, Wanke R, Wolf E. Porcine models for studying complications and organ crosstalk in diabetes mellitus. *Cell and Tissue Research* 2020;380:341-78.

Renner S, Braun-Reichhart C, Blutke A, Herbach N, Emrich D, Streckel E, Wünsch A, Kessler B, Kurome M, Bähr 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, Zöls S, Wanke R, Ritzmann M, Wolf E. Comparative aspects of rodent and nonrodent animal models for mechanistic and translational diabetes research. *Theriogenology* 2016a;86:406-21.

Renner S, Dobenecker B, Blutke A, Zöls S, Wanke R, Ritzmann M, Wolf E. Comparative aspects of rodent and nonrodent animal models for mechanistic and translational diabetes research. *Theriogenology* 2016b;86:406-21.

Renner S, Fehlings C, Herbach N, Hofmann A, von Waldthausen DC, Kessler B, Ulrichs K, Chodnevskaja I, Moskalenko V, Amselgruber W, Göke B, Pfeifer A, Wanke R, Wolf E. Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes* 2010;59:1228-38.

Rich SS, Erlich H, Concannon P. Genetics of Type 1 Diabetes. In: Cowie CC, Casagrande SS, Menke A, Cissell MA, Eberhardt MS, Meigs JB, Gregg EW, Knowler WC, Barrett-Connor E, Becker DJ, Brancati FL, Boyko EJ, Herman WH, Howard BV, Narayan KMV, Rewers M, Fradkin JE, eds. *Diabetes in America*. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases

(US); 2018.

Röcken C, Peters B, Juenemann G, Saeger W, Klein HU, Huth C, Roessner A, Goette A. Atrial amyloidosis: an arrhythmogenic substrate for persistent atrial fibrillation. *Circulation* 2002;106:2091-7.

Rodriguez CJ, Soliman EZ, Alonso A, Swett K, Okin PM, Goff DC, Jr., Heckbert SR. Atrial fibrillation incidence and risk factors in relation to race-ethnicity and the population attributable fraction of atrial fibrillation risk factors: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Ann Epidemiol* 2015;25:71-6, 6.e1.

Rosenstock J, Jelaska A, Zeller C, Kim G, Broedl UC, Woerle HJ. Impact of empagliflozin added on to basal insulin in type 2 diabetes inadequately controlled on basal insulin: a 78-week randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 2015;17:936-48.

Rossetti L, Smith D, Shulman GI, Papachristou D, DeFronzo RA. Correction of hyperglycemia with phlorizin normalizes tissue sensitivity to insulin in diabetic rats. *J Clin Invest* 1987;79:1510-5.

Rutherford OW, Jonasson C, Ghanima W, Holst R, Halvorsen S. New score for assessing bleeding risk in patients with atrial fibrillation treated with NOACs. *Open Heart* 2018;5:e000931.

Sabe SA, Xu CM, Sabra M, Harris DD, Malhotra A, Aboulgheit A, Stanley M, Abid MR, Sellke FW. Canagliflozin Improves Myocardial Perfusion, Fibrosis, and Function in a Swine Model of Chronic Myocardial Ischemia. *J Am Heart Assoc* 2023;12:e028623.

Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, Colagiuri S, Guariguata L, Motala AA, Ogurtsova K. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes research and clinical practice* 2019;157:107843.

Sagris M, Vardas EP, Theofilis P, Antonopoulos AS, Oikonomou E, Tousoulis D. Atrial Fibrillation: Pathogenesis, Predisposing Factors, and Genetics. *Int J Mol Sci* 2021;23.

Saguner AM, Maurer T, Wissner E, Santoro F, Lemes C, Mathew S, Sohns C, Heeger CH, Reißmann B, Riedl J, Fink T, Hayashi K, Wohlmuth P, Kuck KH, Ouyang F, Metzner A. Catheter ablation of atrial fibrillation in very young adults: a 5-year follow-up study. *Europace* 2018;20:58-64.

Scheuermann-Freestone M, Freestone NS, Langenickel T, Höhnel K, Dietz R, Willenbrock R. A new model of congestive heart failure in the mouse due to chronic volume overload. *Eur J Heart Fail* 2001;3:535-43.

Schnabel RB, Yin X, Gona P, Larson MG, Beiser AS, McManus DD, Newton-Cheh C, Lubitz SA, Magnani JW, Ellinor PT, Seshadri S, Wolf PA, Vasan RS, Benjamin EJ, Levy D. 50 year trends in atrial fibrillation prevalence, incidence, risk factors, and mortality in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet* 2015;386:154-62.

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

Schotten U, Dobrev D, Platonov PG, Kottkamp H, Hindricks G. Current controversies in determining the main mechanisms of atrial fibrillation. *J Intern Med* 2016;279:428-38.

Schotten U, Verheule S, Kirchhof P, Goette A. Pathophysiological mechanisms of atrial fibrillation: a translational appraisal. *Physiol Rev* 2011;91:265-325.

Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential Distribution of Cardiac Ion Channel Expression as a Basis for Regional Specialization in Electrical Function. *Circulation Research* 2002;90:939-50.

Schüttler D, Bapat A, Kääh S, Lee K, Tomsits P, Clauss S, Hucker WJ. Animal Models of Atrial Fibrillation. *Circ Res* 2020;127:91-110.

Schwarzl M, Alogna A, Zweiker D, Verderber J, Huber S, Manninger M, Scherr D, Antoons G, Pieske BM, Post H, Lueger A. A porcine model of early atrial fibrillation using a custom-built, radio transmission-controlled pacemaker. *J Electrocardiol* 2016a;49:124-31.

Schwarzl M, Alogna A, Zweiker D, Verderber J, Huber S, Manninger M, Scherr D, Antoons G, Pieske BM, Post H, Lueger A. A porcine model of early atrial fibrillation using a custom-built, radio transmission-controlled pacemaker. *Journal of electrocardiology* 2016b;49:124-31.

Shinagawa K, Shi YF, Tardif JC, Leung TK, Nattel S. Dynamic nature of atrial fibrillation substrate during development and reversal of heart failure in dogs. *Circulation* 2002;105:2672-8.

Sinno H, Derakhchan K, Libersan D, Merhi Y, Leung TK, Nattel S. Atrial ischemia promotes atrial fibrillation in dogs. *Circulation* 2003;107:1930-6.

Skyler JS, Bakris GL, Bonifacio E, Darsow T, Eckel RH, Groop L, Groop PH, Handelsman Y, Insel RA, Mathieu C, McElvaine AT, Palmer JP, Pugliese A, Schatz DA, Sosenko JM, Wilding JP, Ratner RE. Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis. *Diabetes* 2017;66:241-55.

Sosenko JM. Staging the Progression to Type 1 Diabetes with Pre-Diagnostic Markers. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 2016;23:297.

Spach MS, Josephson ME. Initiating reentry: the role of nonuniform anisotropy in small circuits. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1994;5:182-209.

Spencer TM, Blumenstein RF, Pryse KM, Lee SL, Glaubke DA, Carlson BE, Elson EL, Genin GM. Fibroblasts Slow Conduction Velocity in a Reconstituted Tissue

Model of Fibrotic Cardiomyopathy. ACS Biomater Sci Eng 2017;3:3022-8.

Staerk L, Sherer JA, Ko D, Benjamin EJ, Helm RH. Atrial Fibrillation: Epidemiology, Pathophysiology, and Clinical Outcomes. Circ Res 2017;120:1501-17.

Steg PG, Alam S, Chiang CE, Gamra H, Goethals M, Inoue H, Krapf L, Lewalter T, Merioua I, Murin J, Naditch-Brûlé L, Ponikowski P, Rosenqvist M, Silva-Cardoso J, Zharinov O, Brette S, Neill JO. Symptoms, functional status and quality of life in patients with controlled and uncontrolled atrial fibrillation: data from the RealiseAF cross-sectional international registry. Heart 2012;98:195-201.

Steinberg JS, O'Connell H, Li S, Ziegler PD. Thirty-Second Gold Standard Definition of Atrial Fibrillation and Its Relationship With Subsequent Arrhythmia Patterns. Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology 2018;11:e006274.

Sygitowicz G, Maciejak-Jastrzębska A, Sitkiewicz D. A Review of the Molecular Mechanisms Underlying Cardiac Fibrosis and Atrial Fibrillation. J Clin Med 2021;10.

Szeto SG, Narimatsu M, Lu M, He X, Sidiqi AM, Tolosa MF, Chan L, De Freitas K, Bialik JF, Majumder S, Boo S, Hinz B, Dan Q, Advani A, John R, Wrana JL, Kapus A, Yuen DA. YAP/TAZ Are Mechanoregulators of TGF- β -Smad Signaling and Renal Fibrogenesis. J Am Soc Nephrol 2016;27:3117-28.

Tahrani AA, Barnett AH, Bailey CJ. SGLT inhibitors in management of diabetes. Lancet Diabetes Endocrinol 2013;1:140-51.

Takemoto Y, Ramirez RJ, Yokokawa M, Kaur K, Ponce-Balbuena D, Sinno MC, Willis BC, Ghanbari H, Ennis SR, Guerrero-Serna G, Henzi BC, Latchamsetty R, Ramos-Mondragon R, Musa H, Martins RP, Pandit SV, Noujaim SF, Crawford T, Jongnarangsin K, Pelosi F, Bogun F, Chugh A, Berenfeld O, Morady F, Oral H, Jalife J. Galectin-3 Regulates Atrial Fibrillation Remodeling and Predicts Catheter Ablation Outcomes. JACC Basic Transl Sci 2016;1:143-54.

Tian J, Zhang M, Suo M, Liu D, Wang X, Liu M, Pan J, Jin T, An F. Dapagliflozin alleviates cardiac fibrosis through suppressing EndMT and fibroblast activation via AMPK α /TGF- β /Smad signalling in type 2 diabetic rats. *J Cell Mol Med* 2021;25:7642-59.

Todd DM, Fynn SP, Walden AP, Hobbs WJ, Arya S, Garratt CJ. Repetitive 4-week periods of atrial electrical remodeling promote stability of atrial fibrillation: time course of a second factor involved in the self-perpetuation of atrial fibrillation. *Circulation* 2004;109:1434-9.

Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res* 2016;118:1021-40.

Tselentakis EV, Woodford E, Chandy J, Gaudette GR, Saltman AE. Inflammation effects on the electrical properties of atrial tissue and inducibility of postoperative atrial fibrillation. *J Surg Res* 2006;135:68-75.

Uthman L, Baartscheer A, Bleijlevens B, Schumacher CA, Fiolet JWT, Koeman A, Jancev M, Hollmann MW, Weber NC, Coronel R, Zuurbier CJ. Class effects of SGLT2 inhibitors in mouse cardiomyocytes and hearts: inhibition of Na(+)/H(+) exchanger, lowering of cytosolic Na(+) and vasodilation. *Diabetologia* 2018;61:722-6.

van Heerebeek L, Hamdani N, Handoko ML, Falcao-Pires I, Musters RJ, Kupreishvili K, Ijsselmuiden AJ, Schalkwijk CG, Bronzwaer JG, Diamant M, Borbély A, van der Velden J, Stienen GJ, Laarman GJ, Niessen HW, Paulus WJ. Diastolic stiffness of the failing diabetic heart: importance of fibrosis, advanced glycation end products, and myocyte resting tension. *Circulation* 2008;117:43-51.

Vasilakou D, Karagiannis T, Athanasiadou E, Mainou M, Liakos A, Bekiari E, Sarigianni M, Matthews DR, Tsapas A. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors for type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2013;159:262-74.

Venteclef N, Guglielmi V, Balse E, Gaborit B, Cotillard A, Atassi F, Amour J, Leprince P, Dutour A, Clément K, Hatem SN. Human epicardial adipose tissue induces fibrosis of the atrial myocardium through the secretion of adipo-fibrokinases. *Eur Heart J* 2015;36:795-805a.

Verma S, Mazer CD, Yan AT, Mason T, Garg V, Teoh H, Zuo F, Quan A, Farkouh ME, Fitchett DH, Goodman SG, Goldenberg RM, Al-Omran M, Gilbert RE, Bhatt DL, Leiter LA, Jüni P, Zinman B, Connelly KA. Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Mass in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease: The EMPA-HEART CardioLink-6 Randomized Clinical Trial. *Circulation* 2019;140:1693-702.

Voigt N, Li N, Wang Q, Wang W, Trafford AW, Abu-Taha I, Sun Q, Wieland T, Ravens U, Nattel S, Wehrens XH, Dobrev D. Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak and increased Na^{+} - Ca^{2+} exchanger function underlie delayed afterdepolarizations in patients with chronic atrial fibrillation. *Circulation* 2012;125:2059-70.

Volders PG, Sipido KR, Vos MA, Kulcsár A, Verduyn SC, Wellens HJ. Cellular basis of biventricular hypertrophy and arrhythmogenesis in dogs with chronic complete atrioventricular block and acquired torsade de pointes. *Circulation* 1998;98:1136-47.

von Scholten BJ, Kreiner FF, Gough SCL, von Herrath M. Current and future therapies for type 1 diabetes. *Diabetologia* 2021;64:1037-48.

Vos MA, de Groot SH, Verduyn SC, van der Zande J, Leunissen HD, Cleutjens JP, van Bilsen M, Daemen MJ, Schreuder JJ, Allessie MA, Wellens HJ. Enhanced susceptibility for acquired torsade de pointes arrhythmias in the dog with chronic, complete AV block is related to cardiac hypertrophy and electrical remodeling. *Circulation* 1998;98:1125-35.

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

Wan C, Li Z. Serum macrophage migration inhibitory factor is correlated with atrial fibrillation. *J Clin Lab Anal* 2018;32.

Wang B, Chandrasekera PC, Pippin JJ. Leptin- and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev* 2014;10:131-45.

Watanabe M, Yokoshiki H, Mitsuyama H, Mizukami K, Ono T, Tsutsui H. Conduction and refractory disorders in the diabetic atrium. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2012;303:H86-95.

Weber KT, Sun Y, Bhattacharya SK, Ahokas RA, Gerling IC. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart. *Nat Rev Cardiol* 2013;10:15-26.

Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1999;104:787-94.

Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allessie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;92:1954-68.

Wilding JP. The role of the kidneys in glucose homeostasis in type 2 diabetes: clinical implications and therapeutic significance through sodium glucose co-transporter 2 inhibitors. *Metabolism* 2014;63:1228-37.

Winzell MS, Åhrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53 Suppl 3:S215-9.

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

Wolf E, Kind A, Aigner B, Schnieke A. Gentechnisch veränderte Großtiere in der Biomedizin. In: Niemann H, Wrenzycki C, eds. Biotechnologie bei Nutztieren 2: Aufkommende Züchtungstechnologien. Cham: Springer International Publishing; 2023:189-239.

Wright EM. SGLT2 Inhibitors: Physiology and Pharmacology. *Kidney* 2021;2:2027-37.

Xiao Y, Hill MC, Li L, Deshmukh V, Martin TJ, Wang J, Martin JF. Hippo pathway deletion in adult resting cardiac fibroblasts initiates a cell state transition with spontaneous and self-sustaining fibrosis. *Genes Dev* 2019;33:1491-505.

Xiao Y, Hill MC, Zhang M, Martin TJ, Morikawa Y, Wang S, Moise AR, Wythe JD, Martin JF. Hippo Signaling Plays an Essential Role in Cell State Transitions during Cardiac Fibroblast Development. *Dev Cell* 2018;45:153-69.e6.

Xiong Q, Proietti M, Senoo K, Lip GY. Asymptomatic versus symptomatic atrial fibrillation: A systematic review of age/gender differences and cardiovascular outcomes. *Int J Cardiol* 2015;191:172-7.

Xu T, Wang W, Zhang S, Stewart RA, Yu W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila* *lats* gene encodes a putative protein kinase. *Development* 1995;121:1053-63.

Yao X, Shah ND, Sangaralingham LR, Gersh BJ, Noseworthy PA. Non-Vitamin K Antagonist Oral Anticoagulant Dosing in Patients With Atrial Fibrillation and Renal Dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2017;69:2779-90.

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.

Yong KW, Li Y, Huang G, Lu TJ, Safwani WK, Pingguan-Murphy B, Xu F.

Mechanoregulation of cardiac myofibroblast differentiation: implications for cardiac fibrosis and therapy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015;309:H532-42.

Yoshioka M, Kayo T, Ikeda T, Koizumi A. A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice. *Diabetes* 1997;46:887-94.

Youn JY, Zhang J, Zhang Y, Chen H, Liu D, Ping P, Weiss JN, Cai H. Oxidative stress in atrial fibrillation: an emerging role of NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol* 2013;62:72-9.

Yu G, Yu Y, Li YN, Shu R. Effect of periodontitis on susceptibility to atrial fibrillation in an animal model. *J Electrocardiol* 2010;43:359-66.

Yu S, Dong X, Yang M, Yu Q, Xiong J, Chen J, Dong B, Su Q. (Pro)renin receptor involves in myocardial fibrosis and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy via the PRR-YAP pathway. *Sci Rep* 2021;11:3259.

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;81:512-25.

Yue L, Xie J, Nattel S. Molecular determinants of cardiac fibroblast electrical function and therapeutic implications for atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* 2011;89:744-53.

Zhang C, Yasuno S, Kuwahara K, Zankov DP, Kobori A, Makiyama T, Horie M. Blockade of angiotensin II type 1 receptor improves the arrhythmia morbidity in mice with left ventricular hypertrophy. *Circ J* 2006;70:335-41.

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* 2019a;19:162-76.

Zhang M, Hill MC, Kadow ZA, Suh JH, Tucker NR, Hall AW, Tran TT, Swinton PS, Leach JP, Margulies KB, Ellinor PT, Li N, Martin JF. Long-range Pitx2c enhancer-promoter interactions prevent predisposition to atrial fibrillation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019b;116:22692-8.

Zheng RJ, Wang Y, Tang JN, Duan JY, Yuan MY, Zhang JY. Association of SGLT2 Inhibitors With Risk of Atrial Fibrillation and Stroke in Patients With and Without Type 2 Diabetes: A Systemic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Cardiovasc Pharmacol* 2022;79:e145-e52.

Zhou Y, Lee J-Y, Lee C-M, Cho W-K, Kang M-J, Koff JL, Yoon P-O, Chae J, Park H-O, Elias JA, Lee CG. Amphiregulin, an Epidermal Growth Factor Receptor Ligand, Plays an Essential Role in the Pathogenesis of Transforming Growth Factor- β -induced Pulmonary Fibrosis. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287:41991-2000.

Ziegler A-G, Schmid S, Huber D, Hummel M, Bonifacio E. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. *Jama* 2003;290:1721-8.

IX. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1. Die kardiale elektrische Aktivität</i>	11
<i>Abbildung 2. Die Hauptkomponenten des atrialen Remodelings in Zusammenhang mit der Pathogenese des VHF</i>	13
<i>Abbildung 3. Der Zusammenhang zwischen VHF und Fibrose.</i>	16
<i>Abbildung 4. Vom Fibroblasten zur Fibrose</i>	19
<i>Abbildung 5. Aktivierende Faktoren der Differenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten</i>	20
<i>Abbildung 6. Der Hippo-Signalweg</i>	22
<i>Abbildung 7. Tiermodelle des VHF</i>	33
<i>Abbildung 8. Vor- und Nachteile derzeitiger Strategien von diabetischen Schweinemodellen</i>	36
<i>Abbildung 9. Vergleich von Blutglukose (A), Kaliumspiegel im Blut (B), Körpergewicht (C), sowie Herzgewicht (D) und dem Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht (E) in WT- und DM- Schweinen</i>	77
<i>Abbildung 10. Systolische ((A) systol. BD) und diastolische ((B) diastol. BD) Blutdruckmessung in WT und DM-Schweinen</i>	78
<i>Abbildung 11. Hämodynamische Messungen des linken und rechten Herzens in WT- und DM-Schweinen</i>	79
<i>Abbildung 12. Messung der Herzfrequenz mittels 12-Kanal-EKG in WT- und DM-Schweinen</i>	80
<i>Abbildung 13. Elektrokardiografische Messungen mittels 12-Kanal-EKG in WT- und DM-Schweinen</i>	81
<i>Abbildung 14. Messung der Sinusknotenerholungszeit (SNRT) in WT- und DM-Schweinen</i>	82

<i>Abbildung 15. Wenckebach-Punkt (A) und 2:1 Überleitung (B)</i>	
<i>in WT- und DM-Schweinen</i>	83
<i>Abbildung 16. Atrioventrikuläre effektive Refraktärperiode (AVERP)</i>	
<i>in WT- und DM-Schweinen</i>	84
<i>Abbildung 17. Atriale effektive Refraktärperiode (AERP)</i>	
<i>in WT- und DM-Schweinen</i>	84
<i>Abbildung 18. Induzierbarkeit von Vorhofflimmern</i>	
<i>in WT- und DM-Schweinen</i>	86
<i>Abbildung 19. Quantifizierung der interstitiellen Fibrose mittels</i> <i>Masson-Trichrom-Goldner Färbung des linken Herzens</i>	
<i>in WT- und DM-Schweinen</i>	88
<i>Abbildung 20. Quantifizierung der interstitiellen Fibrose mittels</i> <i>Masson-Trichrom-Goldner-Färbung des rechten Herzens</i>	
<i>in WT- und DM-Schweinen</i>	89
<i>Abbildung 21. Korrelationsanalyse zwischen interstitieller Fibrose</i> <i>und Blutglukosewerten in WT- und DM-Schweinen</i>	90
<i>Abbildung 22. Quantifizierung der YAP-positiven Fibroblasten in</i> <i>in WT- und DM-Schweinen</i>	92
<i>Abbildung 23. Quantifizierung der YAP-positiven Kardiomyozyten</i> <i>in WT- und DM-Schweinen</i>	93
<i>Abbildung 24. Korrelationsanalyse zwischen YAP-positiven</i> <i>Fibroblasten und Blutglukosewerten in WT- und DM-Schweinen</i>	94
<i>Abbildung 25. Korrelationsanalyse zwischen YAP-positiven</i> <i>Kardiomyozyten und Blutglukosewerten in WT- und DM-Schweinen</i>	95
<i>Abbildung 26. Genexpressionsanalyse Yes-assoziierten Proteins (YAP-1)</i> <i>in WT- und DM-Schweinen</i>	96
<i>Abbildung 27. Genexpressionsanalyse Amphiregulin (AREG)</i> <i>in WT- und DM-Schweinen</i>	97
<i>Abbildung 28. Genexpressionsanalyse Transforming Growth Factor</i>	

<i>beta (TGF- β1) in WT- und DM-Schweinen</i>	97
<i>Abbildung 29. Genexpressionsanalyse SMAD3 und COL1A1 in WT- und DM-Schweinen</i>	98
<i>Abbildung 30. Genexpressionsanalyse FN1 und MMP2 in WT- und DM-Schweinen</i>	99
<i>Abbildung 31. Genexpressionsanalyse CTGF und PAI-1 in WT- und DM-Schweinen</i>	100
<i>Abbildung 32. Genexpressionsanalyse MIF und CCL2 in WT- und DM-Schweinen</i>	101
<i>Abbildung 33. Darstellender Vergleich von Blutglukose (A), Kaliumspiegel im Blut (B), Körpergewicht (C), sowie Herzgewicht (D) und dem Verhältnis zwischen Herz- und Körpergewicht (E) in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	103
<i>Abbildung 34. A. Systolische (systol. BD) und B. diastolische (diastol. BD) Blutdruckmessung in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	104
<i>Abbildung 35. Hämodynamische Messungen des linken und rechten Herzens in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	105
<i>Abbildung 36. Messung der Herzfrequenz mittels 12-Kanal-EKG in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	106
<i>Abbildung 37. Elektrokardiografische Messungen mittels 12-Kanal-EKG in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	106
<i>Abbildung 38. Messung der Sinusknotenerholungszeit (SNRT) in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	107
<i>Abbildung 39. Wenckebach-Punkt (A) und 2:1 Überleitung (B) in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	108
<i>Abbildung 40. Atrioventrikuläre effektive Refraktärperiode (AVERP) in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	109
<i>Abbildung 41. Atriale effektive Refraktärperiode (AERP) in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	109

<i>Abbildung 42. Induzierbarkeit von Vorhofflimmern (A-D) in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	<i>111</i>
<i>Abbildung 43. Quantifizierung der interstitiellen Fibrose mittels Masson-Trichrom-Goldner-Färbung des linken Herzens in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	<i>113</i>
<i>Abbildung 44. Quantifizierung der interstitiellen Fibrose mittels Masson-Trichrom-Goldner-Färbung des rechten Herzens in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	<i>114</i>
<i>Abbildung 45. Korrelationsanalyse zwischen interstitieller Fibrose und Blutglukosewerten in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	<i>115</i>
<i>Abbildung 46. Quantifizierung der YAP-positiven Fibroblasten in DM- und DM+ Dapagliflozin- Schweinen</i>	<i>117</i>
<i>Abbildung 47. Quantifizierung der YAP-positiven Kardiomyozyten in DM- und DM+ Dapagliflozin- Schweinen</i>	<i>118</i>
<i>Abbildung 48. Korrelationsanalyse zwischen YAP-positiven Fibroblasten und Blutglukosewerten in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	<i>119</i>
<i>Abbildung 49. Korrelationsanalyse zwischen YAP-positiven Kardiomyozyten und Blutglukosewerten in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	<i>120</i>
<i>Abbildung 50. Genexpressionsanalyse Yes-assoziierten Proteins (YAP-1) in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	<i>121</i>
<i>Abbildung 51. Genexpressionsanalyse Amphiregulin (AREG) in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	<i>121</i>
<i>Abbildung 52. Genexpressionsanalyse der Gene des TGF-Signalwegs in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	<i>123</i>
<i>Abbildung 53. Genexpressionsanalyse von MMP, CTGF und PAI-1 in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen</i>	<i>124</i>
<i>Abbildung 54. Genexpressionsanalyse der proinflammatorischen Gene</i>	

*MIF und CCL2**in DM- und DM+ Dapagliflozin-Schweinen*

125

2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1. Übersicht der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der Zielgene des Yes-assoziierten Proteins (YAP) alle Gruppen</i>	140
--	-----

3. Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Eckhard Wolf für die Leitung dieses Promotionsvorhabens und seine große Unterstützung in ihrer Fertigstellung. Des Weiteren danke ich meinem Betreuer PD Dr. med. Sebastian Clauß, der diese Arbeit begleitet und korrigiert hat. Außerdem möchte ich mich sehr bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Clauß bedanken. Jeder Einzelne von euch hat einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit hinzugetragen und ich bin dankbar für all eure konstruktiven Vorschläge, Ideen und Erklärungen, sowie für eure Kollegialität, eure Zeit und euren Optimismus.

Vor allem gilt mein Dank meinen Eltern, welche mir in dieser Zeit keine bessere Unterstützung hätten sein können.