

Aus dem  
CharitéCentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik m. S. Kardiologie  
Direktor: Prof. Dr. med. B. Pieske

## **Habilitationsschrift**

# **Kalzium-abhängige zelluläre Mechanismen ventrikulärer und atrialer Dysfunktion bei Herzinsuffizienz**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Experimentelle Kardiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité-Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. Felix Hohendanner**

Eingereicht: Mai 2019

Dekan: Prof. Dr. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. Lars Maier

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Volker Adams

## Inhalt

Einleitung.....	3
Ursachen, Formen und Diagnose der Herzinsuffizienz .....	3
Therapie.....	4
Zelluläre Veränderungen.....	4
Umbauprozesse in den Vorhöfen bei Herzinsuffizienz .....	6
Pathophysiologie des atrialen Remodeling bei Herzinsuffizienz.....	8
Klinische Relevanz des atrialen Remodeling bei Herzinsuffizienz .....	10
Therapie des atrialen Remodelings.....	11
Hypothesen .....	13
Eigene Arbeiten .....	14
“Intracellular dyssynchrony of diastolic cytosolic $[Ca^{2+}]$ decay in ventricular cardiomyocytes in cardiac remodeling and human heart failure.” .....	14
“Variations in local calcium signaling in adjacent cardiac myocytes of the intact mouse heart detected with two-dimensional confocal microscopy.” .....	27
“Dyssynchronous Ca removal in heart-failure induced atrial remodeling” .....	39
“Isolation of Atrial Cardiomyocytes from a Rat Model of Metabolic Syndrome-related Heart Failure with Preserved Ejection Fraction.” .....	48
“Cellular mechanisms of metabolic syndrome-related atrial decompensation in a rat model of HFpEF” .....	61
“The role of fibroblast – cardiomyocyte interaction for atrial dysfunction in HFpEF and hypertensive heart disease” .....	72
Diskussion.....	86
Zusammenfassung.....	93
Literaturangaben.....	94
Erklärung .....	99

## Einleitung

Herzinsuffizienz ist verantwortlich für einen Großteil aller Todesfälle in westlichen Gesellschaften. Das Krankheitsbild geht mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher und stellt Gesundheitssysteme weltweit vor große Herausforderungen. Allein in Deutschland ist das Auftreten einer Herzinsuffizienz der häufigste Grund für die stationäre Krankenhausaufnahme und gilt als zweithäufigste Todesursache. Während der letzten 30 Jahre konnten die Überlebensraten nach der Diagnose Herzinsuffizienz konstant gesteigert werden. Nichtsdestotrotz beträgt die Fünfjahresmortalität weiterhin etwa 50 % und weitere Forschung auf dem Gebiet der Herzinsuffizienz ist notwendig, um hier Verbesserungen zu erzielen.

## Ursachen, Formen und Diagnose der Herzinsuffizienz

Eine Herzinsuffizienz wird durch verschiedene Grunderkrankungen ausgelöst. Große Studien auf dem Gebiet der Herzinsuffizienzforschung konnten eine klare Assoziation mit anderen Diagnosen wie der koronaren Herzerkrankung, der arteriellen Hypertension, Diabetes mellitus oder Klappenerkrankungen herstellen. [1].

Klinisch werden zwei Formen der Herzinsuffizienz unterschieden. Erstens die Herzinsuffizienz mit reduzierter systolischer Auswurffraktion (HFrEF), bei der es durch ein akutes oder chronisches Pumpversagen zu den typischen Symptomen wie Dyspnoe, Leistungsminderung und Arrhythmien kommt. Und zweitens, die Herzinsuffizienz mit erhaltener Auswurffraktion (HFpEF), bei der es durch eine diastolische Relaxationsstörung des linken Ventrikels bei erhöhter Wandspannung zu den klinischen Symptomen von Dyspnoe und Leistungsminderung kommt. Allen Formen der Herzinsuffizienz sind myokardiale Anpassungsvorgänge („Remodeling“) gemeinsam. Hierbei kommt es durch hämodynamische Veränderungen, lokale Inflammation und neurohumorale Stimulation zum Umbau des Herzgewebes.

Gemäß der im Jahr 2016 veröffentlichten Herzinsuffizienzleitlinien der europäischen Gesellschaft für Kardiologie, wird erstmals eine 3. Form der Herzinsuffizienz eingeführt. Diese Herzinsuffizienz mit mäßiggradig eingeschränkter Ejektionsfraktion („Heart failure with mid range ejection fraction“, HFmrEF), ist klinisch von untergeordneter Relevanz, erlaubt allerdings eine genauere Erforschung der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz durch eine Differenzierung zwischen einer reinen systolischen Dysfunktion und einer reinen diastolischen Dysfunktion.

Bei allen Formen der Herzinsuffizienz erfolgt die klinische Einteilung gemäß der von der „New York Heart Association“ (NYHA) eingeführten Klassifikation. Sie basiert auf dem

Vorhandensein von Symptomen, wie Luftnot in Abhängigkeit von körperlicher Belastung (Ruhe, leichte körperliche Belastung, mittelschwere körperliche Belastung, schwere körperliche Belastung; NYHA IV-I).

Gemäß der aktuellen Herzinsuffizienz Leitlinien bedarf es zur Diagnosestellung einer Herzinsuffizienz dem Vorhandensein von Zeichen und Symptomen der Erkrankung sowie einer Einschränkung der systolischen Auswurffraktion <40% (HFrEF), 40-49% (HFmREF) oder <50% (HFpEF). Daneben werden für die Formen HFmREF und HFpEF erhöhte Spiegel natriuretischer Peptide sowie die Erfüllung mindestens eines der folgenden Kriterien gefordert: Diastolische Dysfunktion oder relevante strukturelle Herzerkrankung.

## Therapie

Klassischerweise wird die systolische, chronische Herzinsuffizienz durch die Gabe von Betablockern, Diuretika und Modulatoren des Renin Angiotensin Aldosteronsystems (ACE-Hemmer, AT1 Rezeptorblocker, Neprilysin-Hemmer) behandelt. Hierbei konnten positive Effekte auch auf das myokardiale Remodeling und die damit verbundene Mortalität nachgewiesen werden. Die Verringerung der Mortalität gegenüber Placebo beträgt für ACE-Hemmer 16 % (gemäß SOLVD-T Studie,[2]), für Betablocker 34 % (gemäß CIBIS II Studie, [3]), für Mineralkortikoid-Rezeptorantagonisten 30 % (gemäß RALES Studie,[4]) und für Angiotensinrezeptorblocker 17 % (gemäß CHARM-Alternative Studie,[5]). Durch die zusätzliche Gabe von Neprilysin-Hemmern konnte gemäß der PARADIGM-HF Studie [6] das relative Risiko zu Versterben bei Patienten mit NYHA II-IV und hochgradig eingeschränkter systolische LV-Funktion gegenüber Placebo um 16 % über 48 Monate gesenkt werden. Bei der diastolischen Herzinsuffizienz sind unsere aktuellen Therapieoptionen limitiert, ein Mortalitätsbenefit auf Basis einer medikamentösen Therapie konnte bisher nicht gezeigt werden. Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten können in ausgewählten Patienten mit HFpEF eine Therapie-Option darstellen[7, 8] .

## Zelluläre Veränderungen

Auf zellulärer Ebene spielt Kalzium eine maßgebliche Rolle zum Verständnis der Pathophysiologie von HFrEF und HFpEF. Grundsätzlich zeigt sich Kalzium verantwortlich für die Kontraktion, Relaxation und Signalmodulation des Kardiomyozyten. Im gesunden Herz führt der systolische Einstrom von Kalziumionen durch den L-Typ Kalziumkanal, spannungsabhängig zu einem kaskadenhaften Freisetzen weiterer Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über die sogenannten Ryanodinrezeptoren (RyR). L-Typ Kalziumkanäle, die primär auf tubulären Invaginationen der sarkolemmalem Membran, sog. T-

Tubuli lokalisiert sind und RyR bilden lokale Kalziumfreisetzungseinheiten („Cluster“). Diese Cluster tragen zur Entstehung von Kalziumsparks bei. Die synchronisierte SR Kalziumfreisetzung via Kalziumsparks wird als Kalziumtransient bezeichnet. Die lokale Kalziumkonzentration die notwendig wäre, um eine kaskadenartige Kalziumfreisetzung aus dem SR zu ermöglichen, beträgt  $> 100 \mu\text{M}$ . Eine synchrone Kalziumfreisetzung aus dem SR führt über Aktivierung der Myofilamente zur Kontraktion der Zelle und des Herzens während der Systole. Neben der Freisetzung von Kalzium über RyR, verfügen Kardiomyozyten über eine weitere Signalkasade, die eine lokale Veränderung der Kalziumfreisetzung bewirkt: Inositol-1,4,5-Phosphat Rezeptoren ( $\text{IP}_3\text{R}$ ). Die G-Protein abhängige Aktivierung von Phospholipase C führt dabei zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in  $\text{IP}_3$  und Diacylglycerin.  $\text{IP}_3$  führt nach Bindung an  $\text{IP}_3\text{R}$  zu SR Kalziumfreisetzung. Dieser Mechanismus wurde mit einer Vergrößerung der Öffnungswahrscheinlichkeit der RyR und damit Verstärkung der ECC in Verbindung gebracht. Nach Kalziumfreisetzung erfolgt zur diastolischen Relaxation des Kardiomyozyten und damit des Herzens, die Kalziumentfernung. Hierfür wird Kalzium via SR Kalzium ATPase (SERCA) zurück in das SR und via Natrium/Kalzium-Austauschers (NCX) in den Extrazellularraum verbracht[9]. Der lokale Kalziumspiegel wird zudem durch die Mitochondrien mittels langsamer und schneller Kalziumaufnahme via mitochondrialem Kalzium Uniporter (MCU) erfasst. Der Prozess von Kalziumfreisetzung, Kontraktion, Kalziumentfernung und Relaxation wird als Exzitations-Kontraktions-Kopplung (ECC) bezeichnet. Dieser Prozess ist durch diverse Mechanismen in Abhängigkeit der neurohumoralen und nervalen Aktivierung modulierbar.

Gleichzeitig kommt es im Rahmen von HFrEF und HFpEF zu weitreichenden maladaptiven Vorgängen: Eine wesentliche Veränderung betrifft die T-Tubuli der Zelle. Kardiomyozyten weisen eine inhomogenere Verteilung derselben auf, was zu einer inhomogeneren Kalziumfreisetzung durch verwaiste RyR [10] sowie zu einer Verminderung der Kalziumtransienten-Amplitude und somit Verschlechterung der Kontraktilität führt [11].

Die Verringerung der Kalziumtransienten-Amplitude ist ein wesentliches Merkmal zellulärer Veränderungen bei der Herzinsuffizienz und eng mit einer Verringerung des SR Kalziumgehalts verknüpft [12-14]. Auch die Rate der Kalziumentfernung ist erniedrigt [15, 16]. Daneben ist die diastolische Kalziumkonzentration durch ein RyR und  $\text{IP}_3\text{R}$  vermitteltes Kalziumleck chronisch erhöht. Der dadurch bedingte verminderte Unterschied zwischen systolischem und diastolischem Kalzium führt zu einer Verringerung der Kontraktilität und zu einer diastolischen Dysfunktion. Zusätzlich dazu ist die frequenzabhängige Steigerung des

intrazellulären Kalzium-Spiegels bei der Herzinsuffizienz nicht mehr ausreichend vorhanden [17]. Die chronisch erhöhten Kalziumspiegel führen außerdem zu einer höheren Wahrscheinlichkeit für Nachdepolarisation, die insbesondere NCX abhängig zur Arrhythmogenese beiträgt. Die Tatsache, dass auch die Expression des NCX in den meisten Herzinsuffizienzmodellen erhöht ist, wirkt sich zusätzlich negativ aus [18]. Auf zellulärer Ebene konnte gleichzeitig gezeigt werden, dass im insuffizienten Herz eine übermäßige Phosphorylierung des RyR vorliegt. Diese Proteinkinase A und Calmodulin Kinase II (CaMKII) abhängige Überphosphorylierung führt zu einer Dissoziation der regulierenden FKBP Untereinheit des RyR und damit zu vermehrtem Kalziumleck [19, 20]. Weitere Veränderungen betreffen auch die Kalziumentfernung aus dem Zytosol: Die Wiederaufnahme von Kalzium in das SR ist im insuffizienten menschlichen Herzen verringert [21]. Die SERCA-Expression ist geringer und eine Überexpression von SERCA wurde zumindest im Tiermodell mit einer Verbesserung des klinischen Phänotyps assoziiert. Eine erste Gentherapiestudie im Menschen mit intrakoronarer Infusion von Adeno-assoziiertem Virus 1/SERCA2a zur Hochregulation von SERCA2a im Kardiomyozyten erbrachte jedoch keinen Vorteil hinsichtlich Mortalität oder Ereignisrate [22]. Des Weiteren ist die Regulation der SERCA beeinträchtigt. So trägt die Dephosphorylierung von Phospholamban (PLB) an Serin<sup>16</sup> durch die damit einhergehende Verringerung der Aktivität der SERCA, zu einer Verringerung des SR Kalziumgehalts bei [23, 24]. Die Kalziumhomöostase und die damit verbundenen Ionenverschiebungen sind auch energieabhängig. Defekte im Energiemetabolismus spielen daher bei der Herzinsuffizienz eine große Rolle. So wird die Effizienz diverser Kalziumpumpen bei der Herzinsuffizienz durch eine lokale Verminderung der ATP Konzentration negativ beeinflusst [25].

### Umbauprozesse in den Vorhöfen bei Herzinsuffizienz

Bei der Herzinsuffizienz rücken Umbauprozesse im Vorhof zunehmend in den Fokus der Forschung. Sowohl die elektrische als auch die mechanische atriale Dysfunktion sind bei HFpEF und HFrEF mit signifikanter Morbidität und Mortalität vergesellschaftet. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Verschlechterung der mechanischen Vorhoffunktion unabhängig von der ventrikulären Funktion mit einer erhöhten Mortalität assoziiert ist [26, 27]. Gleichzeitig geht auch das Vorhandensein von Vorhofflimmern im Kontext einer Herzinsuffizienz mit einem verschlechterten klinischen „Outcome“ einher. Ergebnisse rezenter Studien deuten darauf hin, dass eine kausale Behandlung des Vorhofflimmerns und Überführung in den Sinusrhythmus die Mortalität bei Herzinsuffizienzpatienten signifikant reduzieren kann [28].

Die Herzvorhöfe stellen spezialisierte Bereiche des Herzens dar, die sich von ventrikulärem Myokard hinsichtlich der Struktur und Funktion deutlich unterscheiden. Die atriale Kontraktion führt zu einer Verbesserung der Füllung des linken Ventrikels und trägt damit nicht unerheblich zur Funktion des Herzens bei. Während der Phasen des Herzzyklus fungieren die Vorhöfe als Reservoir, Konduit und sogenannte „booster pump“. Daneben zeigen sie sich für die Ausschüttung von natriuretischen Peptiden verantwortlich und haben damit eine endokrine Funktion. Wie bei ventrikulärem Remodeling, kommt es durch ähnliche druck- und volumenabhängige Mechanismen auch im Vorhof bei der Herzinsuffizienz zu Umbauprozessen [29]. Diese Umbauprozesse werden dabei gemäß der Klassifikation der europäischen Gesellschaft für Rhythmologie (EHRA), anhand der histopathologischen Charakteristika der atrialen Kardiomyopathie EHRA Klasse III (gemischt Kardiomyozyten und fibroblastenabhängige) zugeordnet. Hierbei spielen insbesondere zelluläre Hypertrophie, Zytolyse und fibrotische Veränderungen eine herausragende Rolle.

Interessanterweise führen ähnliche Risikofaktoren sowohl zu Herzinsuffizienz als auch zu Vorhofflimmern. Beide Krankheitsformen können zwar unabhängig voneinander auftreten, deren Prävalenz steigt jedoch in Gegenwart des jeweiligen „Partners“ rapide: So zeigen beispielsweise Patienten mit einer valvulären Kardiomyopathie in bis zu 50 % der Fälle ebenfalls Vorhofflimmern [30]. Unbehandeltes Vorhofflimmern kann durch das Auftreten einer Tachykardie induzierten Myopathie zu einer Verschlechterung der linksventrikulären Pumpfunktion führen. Gleichzeitig gehen die hämodynamischen Veränderungen, wie sie bei einer systolischen aber auch diastolischen Herzinsuffizienz zu beobachten sind, mit Umbauprozessen einher, die ebenfalls den Vorhof betreffen.

Die Prävalenz von atrialen Remodeling bei der Herzinsuffizienz ist hoch: So zeigt sich eine Veränderung des Vorhofmyokards bei Patienten mit verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz häufig: Bei HFpEF kommt es gemäß der TOPCAT und PARAMOUNT Studien in bis zu 61 % der Fälle zu einer Vergrößerung des linken Vorhofs als Ausdruck einer atrialen Kardiomyopathie. Bei HFrfEF wiesen gemäß der ARIC Studie bis zu 39 % atriales Remodeling auf.

Atriales Remodeling kann zu mechanischer und elektrischer Dysfunktion des Vorhofs führen. Eine atriale kontraktile Dysfunktion findet sich sowohl bei der systolischen [31] als auch der diastolischen [32] Herzinsuffizienz und konnte mit einer erhöhten Mortalität in Verbindung gebracht werden [26, 27]. Dabei weist die kontraktile Funktion des Vorhofs ein komplexes Bild auf. Durch echokardiografische Analysen des Vorhofstrains und der „strain rate“, lassen sich

die verschiedenen Phasen der Vorhofdiastole und Vorhofsystole differenzieren. Dabei spielen sowohl die Konduit als auch die Reservoirfunktion eine tragende Rolle bei der Volumenbelastung des Vorhofs. Daneben kann die aktive Kontraktion des linken Vorhofs zur verbesserten Füllung des linken Ventrikels, insbesondere bei der Herzinsuffizienz beitragen. Klinisch zeigt sich diese aktive Füllung des linken Vorhofs besonders deutlich bei der Auskultation eines Patienten mit systolischer Herzinsuffizienz: Das Vorhandensein eines 4. Herztones lässt auf die kräftige Kontraktion des linken Vorhofs und das Auftreffen des Blutes auf eine steife ventrikuläre Wand schließen. Auch die Fibrose des linken Vorhofs ist eine häufige Erscheinung bei der systolischen Herzinsuffizienz. Diese findet sich in bis zu einem Drittel der Patienten, wobei sie bei gesunden Individuen kaum beobachtet werden kann [33]. Bei der diastolischen Herzinsuffizienz konnte Fibrose mittels Histologie in ebenfalls bis zu 30% der Patienten zur Darstellung gebracht werden [34]. Zuletzt findet sich sowohl bei diastolischer als auch bei systolischer Herzinsuffizienz eine hohe Prävalenz elektrischen Remodelings und damit einhergehendem Vorhofflimmern (bis zu 50 % der Patienten) [35].

#### Pathophysiologie des atrialen Remodeling bei Herzinsuffizienz

Eine chronische Erhöhung des Drucks oder Volumens im Ventrikel, wie sie bei einer Herzinsuffizienz zu beobachten ist, geht mit einer Belastung des linken Vorhofs einher. Unabhängig von der linksventrikulären systolischen Funktion korrelieren dabei das linksatriale Volumen und die linksatriale Belastung mit dem enddiastolischen Druck des linken Ventrikels. Durch mechanischen Stress kommt es zu einer vermehrten Fibrose des Vorhofs [36, 37]. Hierbei spielen insbesondere die Aktivierung von profibrotischen Signalkaskaden eine besondere Rolle [38]. Eine mechanische Dysfunktion des Vorhofs lässt sich durch die im Rahmen der Herzinsuffizienz vorliegende erhöhte Wandspannung sowie eine Verringerung der atrialen Kontraktilität (suboptimaler Bereich der Frank-Starling Beziehung) beobachten. Die Druck- und Volumenbelastung des linken Vorhofs im Kontext der Herzinsuffizienz ist ausschlaggebend für die Veränderungen auf subzellulärer und zellulärer Ebene im Bereich des Vorhofs. Eine Differenzierung von belastungsunabhängigen herzinsuffizienzassoziierten Faktoren, die die Vorhoffunktion negativ beeinflussen, wird durch die im Rahmen der Herzinsuffizienz zwangsweise vorherrschende Druck bzw. Volumenbelastung erschwert. Wie in der MADIT-RIT Studie gezeigt, sind das myokardiale Remodeling und damit einhergehende Arrhythmien jedoch auch abhängig von dem Vorhandensein von Komorbiditäten wie Diabetes mellitus oder Bluthochdruck [39, 40].



Auf zellulärer Ebene kommt es im Bereich des Vorhofs zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie einer Aktivierung profibrotischer Signalkaskaden und einer mikrovaskulären Dysfunktion. Diese Prozesse werden durch neuroendokrine Aktivierung weiter verstärkt. Hierbei ist insbesondere die Rolle erhöhter Katecholamin-, Angiotensin- und Aldosteronspiegel als profibrotische und prohypertrophe Substanzen zu erwähnen. Häufig findet sich bei Patienten mit systolischer und diastolischer Dysfunktion auch ein Diabetes mellitus. Dieses Krankheitsbild ist neben der Adipositas meist mit einer Vergrößerung des linken Vorhofs vergesellschaftet. Bei der Entstehung atrialer Umbauprozesse im Rahmen des metabolischen Syndroms spielen neben lokalen Entzündungsvorgängen, oxidativen Stress auch profibrotische Signalkaskade eine Rolle [41].

Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass bei der systolischen Herzinsuffizienz eine Erhöhung der Kalziumtransienten auf Basis einer gesteigerten IP<sub>3</sub>R medierten Kalziumfreisetzung und einer Verringerung der mitochondrialen Kalziumaufnahme, zu beobachten ist [18]. Bei der diastolischen Herzinsuffizienz wurden ebenfalls im Tiermodell kompensatorische Mechanismen beobachtet, die zu einer Erhöhung der Kalziumtransienten beitragen. So konnte eine erhöhte Dichte tubulärer Strukturen in atrialen Kardiomyozyten im Rattenmodell mit gesteigerter Kalziumfreisetzung in Verbindung gebracht werden [42]. Ausdruck atrialen Remodelings ist neben der kontraktilen Dysfunktion auch eine elektrische Dysfunktion. Hierbei handelt es sich meistens um Vorhofflimmern. Auf zellulärer Basis konnten bei Vorhofflimmern eine gesteigerte Fibrose, Veränderungen der Aktionspotenzialkonfiguration, eine Hochregulation des NCX sowie ein gesteigertes SR Kalziumleck identifiziert werden [43, 44]. Neben einer Überexpression von TGF Beta, führen die bei der Herzinsuffizienz zu beobachtenden erhöhten Plasmaspiegel von Angiotensin II, zu gesteigerter Fibrose. Vorhofflimmern ist häufig mit der Präsenz von Fibrose vergesellschaftet [34]. Fibrotisches Myokard führt zu Mikro und Makro „Reentryprozessen“, welche das Auftreten von Rhythmusstörungen begünstigen. So konnte beispielsweise im Hundemodell einer systolischen Herzinsuffizienz gezeigt werden, dass schnelle artifizielle elektrische Stimulation des Vorhofs zu einer erhöhten Fibrose führt [45]. Weiterer pathophysiologische Faktoren sind eine Verringerung des L-Typ Kalziumstroms [46] sowie eine gesteigerte NCX Funktion und Expression [47]. Durch die elektrogene Natur des NCX kommt es zu verspäteten Nachdepolarisation, die zu positiven Einwärtsströmen beitragen und zur Depolarisation größerer Gewebeteile führen können. Des Weiteren konnte in Vorhofflimmer-Modellen im Schaf eine gesteigerte SR Kalziumfreisetzung auf Basis einer Überphosphorylierung des RyR identifiziert werden. Die Hemmung der CaMKII führte zu einer Verringerung von

Vorhofflimmern Episoden [48, 49]. Zusätzlich wurde im Vorhof eine erhöhte IP<sub>3</sub>R medierte Kalziumfreisetzung [18, 50] beschrieben.

### Klinische Relevanz des atrialen Remodeling bei Herzinsuffizienz

Umbauprozesse im Bereich des linken Vorhofs wurden als unabhängiger Prädiktor der Mortalität identifiziert und sind ein wesentlicher Baustein bei der Erkennung von Herzerkrankungen. Insbesondere bei HFpEF wurde eine verschlechterte linksatriale Konduitfunktion mit einer verringerten Belastbarkeit assoziiert. Unabhängig von der linksventrikulären Pumpfunktion geht eine Vergrößerung des linken Vorhofs mit einer erhöhten Mortalität einher und eignet sich daher als Risikomarker: Die linksatriale Größe korreliert nicht nur mit einer erhöhten Inzidenz der systolischen Herzinsuffizienz [51], sondern auch dem plötzlichen Herztod [52]. Aus diesem Grund ist die Entität der linksatrialen Größe Bestandteil verschiedener Risikoscores (z.B. Framingham Risikoscore [53]). Im Rahmen der Herzchirurgie nimmt die Vorhofgröße eine tragende Rolle hinsichtlich des langfristigen „Outcomes“ ein [54].

Diverse Studien haben sich mit der Relevanz der atrialen mechanischen Funktion hinsichtlich eines Effektes auf den klinischen Verlauf von Herzinsuffizienz Patienten beschäftigt: Aus Computermodellen wissen wir, dass die linksventrikuläre Pumpfunktion von einer effektiven atrialen Kontraktion profitiert [27]. In gemischten Patientenkohorten (systolische und diastolische Herzinsuffizienz) zeigte sich, dass insbesondere bei der diastolischen Dysfunktion eine verstärkte linksatriale Wandsteifigkeit vorliegt [27]. Anders bei Patienten mit systolischer Dysfunktion - hier finden sich insbesondere ein verringertes linksatriales Volumen und eine Verringerung der Kontraktionsamplitude. Studien mit linksatrialer Schrittmacherstimulation, welche zu einer Verschlechterung der linksatrialen kontraktiven Funktion führte, machten deutlich, dass hierunter insbesondere auch die linksventrikuläre kontraktive Funktion leidet [55]. Der atriale Beitrag zur ventrikulären Füllung vermindert sich im Zuge der Verschlechterung einer Herzinsuffizienz [56]. Hierbei spielt eine Verstärkung der linksatrialen mechanischen Belastung und damit eine Verschlechterung der links ventrikulären Füllung eine Rolle.

Bis zu 50 % der Patienten mit HFrEF und bis zu 75 % der Patienten mit HFpEF entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung eine atriale Kardiomyopathie die mit Vorhofflimmern einhergeht [57]. Insbesondere Patienten mit diastolischer Dysfunktion leiden unter dem Auftreten von Vorhofflimmern. So zeigten in der RELAX Studie herzinsuffiziente Patienten mit einem Vorhofflimmern eine deutlich schlechtere Belastbarkeit [58].

Physiologischerweise befindet sich das Zentrum der Hormonproduktion des Herzens im Vorhof [59]. Hierbei spielen vor allem natriuretische Peptide und Vasopressin eine tragende Rolle [60]. Diese Hormone werden als Antwort auf mechanischen oder paraendokrinen Reiz, insbesondere durch atriale Kardiomyozyten und Fibroblasten ausgeschüttet. Sie bewirken dabei eine Veränderung des Volumenhaushalts. Sowohl bei systolischer als auch bei diastolischer Herzinsuffizienz ist die Produktion natriuretischer Peptide durch den fibrotischen Umbau des Vorhofs gestört [61].

### Therapie des atrialen Remodelings

Die Modifikation der natriuretischen Peptide stellt eine neue pharmakologische Option der Behandlung der atrialen Dysfunktion bei der Herzinsuffizienz dar. In der PARAMOUNT Studie zeigten sich, unabhängig von Effekten auf den Blutdruck, eine Verkleinerung der linksatrialen Größe durch die Hemmung von Nephilysin zur Erhöhung der BNP Spiegel [62]. Neben diesen neuen Therapieoptionen beeinflussen auch klassische Medikamente, die zur Behandlung der systolischen Herzinsuffizienz eingesetzt werden, wie beispielsweise Angiotensin converting Enzyminhibitoren oder Angiotensinrezeptorblocker sowie Aldosteron-Rezeptor Antagonisten die Größe des linken Vorhofs positiv. Auch bei Patienten ohne Herzinsuffizienz konnte ein Effekt auf die linksatriale Größe, unabhängig vom systolischen Blutdruck, auf das atriale Myokard nachgewiesen werden [6]. Eine weitere Möglichkeit der Behandlung der atrialen Dysfunktion stellt eine Verringerung der Herzfrequenz dar. Hierdurch wird eine Verbesserung der linksventrikulären Füllung erreicht. Auch die Verbesserung der Synchronizität der Kontraktilität des Herzens durch die Implantation eines CRT verbesserte den linksatrialen „Strain“ signifikant und weist auf eine Reversion der Umbauprozesse hin [63]. Des Weiteren wird die Pumpkraft des Herzens durch adäquate sequenzielle Stimulation des Vorhofs und Ventrikels bei Schrittmacherpatienten deutlich verbessert [55] - ein weiterer Hinweis auf die Wichtigkeit der Vorhofkontraktilität.

Neben therapeutischen Ansätzen, die eine Modulation der myokardialen Umbauprozesse zum Ziel haben, besteht zudem die Möglichkeit das Vorhofflimmern als Ausdruck des atrialen Remodeling direkt zu behandeln. So ist die Wiederherstellung des Sinusrhythmus mit einer deutlichen Verbesserung der linksventrikulären Füllung assoziiert [64-66]. Allein durch die Wiederherstellung des Sinusrhythmus lassen sich atriale Umbauprozesse teilweise rückgängig machen. In der CASTLE-AF Studie („Catheter Ablation vs. Conventional Therapy For Patients With AFib and LV Dysfunction“) konnte durch die Ablation von Vorhofflimmern bei Patienten mit HFrEF die Sterblichkeit signifikant gesenkt werden. Vorhofflimmern per se ist mit einer

Hyperkoagulabilität, unabhängig von der intermittierenden Präsenz eines Sinusrhythmus vergesellschaftet. Das individuelle Risiko eines Patienten mit atrialem Remodeling, einen Schlaganfall zu erleiden wird aktuell nur unzureichend bei Präsenz von Vorhofflimmern mittels CHADS-VASc-Score abgebildet [67]. Die orale Antikoagulation trägt aktuell wesentlich zur Senkung des Schlaganfallrisikos bei Vorhofflimmern bei.

Ventrikuläre und atriale Dysfunktion sind bei HFrEF und HFpEF eng miteinander verzahnt. Dieselben Prozesse, die zu einer systolischen aber auch diastolischen Dysfunktion des Ventrikels beitragen, führen ebenfalls zur atrialen Veränderungen. Hierbei sind insbesondere erhöhte Füllungsdrücke, aber auch neurohumorale und systemweite Dysregulationen zu erwähnen.

In der vorliegenden Arbeit werden Mechanismen und therapeutische Ziele der ventrikulären und atrialen Dysfunktion sowie deren Relevanz im Kontext einer systolischen oder diastolischen Herzinsuffizienz vorgestellt.

Die Rolle verschiedener Komorbiditäten bei der Entstehung von myokardialen Umbauprozessen ist bis dato ungenügend definiert und erhöht die Komplexität des Krankheitsbildes erheblich. Sowohl im Ventrikel als auch im Vorhof sind pharmakologische oder interventionelle Verfahren zur Revision myokardialer Umbauprozesse Schlüssel zur weiteren Senkung der Mortalität von Herzinsuffizienz Patienten. Die vorliegende Arbeit soll hierbei zum besseren Verständnis dieser Umbauprozesse und potentieller therapeutischer Ziele beitragen.

## Hypothesen

Die zentralen, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hypothesen sind:

1. Die Dyssynchronie der Kalziumfreisetzung und Kalziumentfernung ist wesentlich an der Pathophysiologie mechanischer atrialer und ventrikulärer Dysfunktion bei systolischer Herzinsuffizienz beteiligt.
2. Arrhythmien auf Ebene des Vorhofs werden im Kontext der systolischen Herzinsuffizienz durch lokale Unterschiede von am Kalziumhaushalt beteiligten und therapeutisch modulierbaren Proteinen begünstigt.
3. Bei der diastolischen Herzinsuffizienz und hypertensiven Herzerkrankung tragen verschiedene Kompensationsmechanismen zu einer Steigerung der Kontraktilität atrialer Zellen ex vivo bei.
4. Durch neurohumorale Veränderungen und die Interaktion von Fibroblasten sowie Kardiomyozyten kommt es zu einer in vivo und in vitro Dekompensation der atrialen mechanischen Funktion, welche zum HFpEF Phänotyp und zur Entwicklung atrialer Arrhythmien beitragen könnte.

## Eigene Arbeiten

“Intracellular dyssynchrony of diastolic cytosolic  $[Ca^{2+}]$  decay in ventricular cardiomyocytes in cardiac remodeling and human heart failure.”

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit von Hohendanner F, Ljubojević S, MacQuaide N, Sacherer M, Sedej S, Biesmans L, Wakula P, Platzer D, Sokolow S, Herchuelz A, Antoons G, Sipido K, Pieske B, Heinzel FR mit dem Titel “Intracellular dyssynchrony of diastolic cytosolic  $[Ca^{2+}]$  decay in ventricular cardiomyocytes in cardiac remodeling and human heart failure”, erschienen in Circulation Research am 16. August 2013; doi: [10.1161/CIRCRESAHA.113.300895](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300895), [68]:

*“RATIONALE: Synchronized release of  $Ca^{2+}$  into the cytosol during each cardiac cycle determines cardiomyocyte contraction.*

*OBJECTIVE: We investigated synchrony of cytosolic  $[Ca^{2+}]$  decay during diastole and the impact of cardiac remodeling.*

*METHODS AND RESULTS: Local cytosolic  $[Ca^{2+}]$  transients (1- $\mu$ m intervals) were recorded in murine, porcine, and human ventricular single cardiomyocytes. We identified intracellular regions of slow (slowCaR) and fast (fastCaR)  $[Ca^{2+}]$  decay based on the local time constants of decay ( $TAU_{local}$ ). The SD of  $TAU_{local}$  as a measure of dyssynchrony was not related to the amplitude or the timing of local  $Ca^{2+}$  release. Stimulation of sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  ATPase with forskolin or istaroxime accelerated and its inhibition with cyclopiazonic acid slowed  $TAU_{local}$  significantly more in slowCaR, thus altering the relationship between SD of  $TAU_{local}$  and global  $[Ca^{2+}]$  decay ( $TAU_{global}$ ).  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger inhibitor SEA0400 prolonged  $TAU_{local}$  similarly in slowCaR and fastCaR. FastCaR were associated with increased mitochondrial density and were more sensitive to the mitochondrial  $Ca^{2+}$  uniporter blocker Ru360. Variation in  $TAU_{local}$  was higher in pig and human cardiomyocytes and higher with increased stimulation frequency (2 Hz).  $TAU_{local}$  correlated with local sarcomere relengthening. In mice with myocardial hypertrophy after transverse aortic constriction, in pigs with chronic myocardial ischemia, and in end-stage human heart failure, variation in  $TAU_{local}$  was increased and related to cardiomyocyte hypertrophy and increased mitochondrial density.*

*CONCLUSIONS: In cardiomyocytes, cytosolic  $[Ca^{2+}]$  decay is regulated locally and related to local sarcomere relengthening. Dyssynchronous intracellular  $[Ca^{2+}]$  decay in cardiac remodeling and end-stage heart failure suggests a novel mechanism of cellular contractile dysfunction.”*

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dyssynchrone Kalziumentfernung zu einer dyssynchronen Relaxation führt und erheblich an der Pathophysiologie ventrikulärer myokardialer Umbauprozesse beteiligt ist.

“Variations in local calcium signaling in adjacent cardiac myocytes of the intact mouse heart detected with two-dimensional confocal microscopy.”

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit von Hammer KP, Hohendanner F, Blatter LA, Pieske BM, Heinzel FR mit dem Titel “Variations in local calcium signaling in adjacent cardiac myocytes of the intact mouse heart detected with two-dimensional confocal microscopy”, erschienen in *Frontiers of Physiology* am 12. Januar 2015; doi: [10.3389/fphys.2014.00517](https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00517), [69]:

*“Dyssynchronous local Ca release within individual cardiac myocytes has been linked to cellular contractile dysfunction. Differences in Ca kinetics in adjacent cells may also provide a substrate for inefficient contraction and arrhythmias. In a new approach we quantify variation in local Ca transients between adjacent myocytes in the whole heart. Langendorff-perfused mouse hearts were loaded with Fluo-8 AM to detect Ca and Di-4-ANEPPS to visualize cell membranes. A spinning disc confocal microscope with a fast camera allowed us to record Ca signals within an area of 465  $\mu\text{m}$  by 315  $\mu\text{m}$  with an acquisition speed of 55 fps. Images from multiple transients recorded at steady state were registered to their time point in the cardiac cycle to restore averaged local Ca transients with a higher temporal resolution. Local Ca transients within and between adjacent myocytes were compared with regard to amplitude, time to peak and decay at steady state stimulation (250 ms cycle length). Image registration from multiple sequential Ca transients allowed reconstruction of high temporal resolution ( $2.4 \pm 1.3$  ms) local CaT in 2D image sets ( $N = 4$  hearts,  $n = 8$  regions). During steady state stimulation, spatial Ca gradients were homogeneous within cells in both directions and independent of distance between measured points. Variation in CaT amplitudes was similar across the short and the long side of neighboring cells. Variations in TAU and TTP were similar in both directions. Isoproterenol enhanced the CaT but not the overall pattern of spatial heterogeneities. Here we detected and analyzed local Ca signals in intact mouse hearts with high temporal and spatial resolution, taking into account 2D arrangement of the cells. We observed significant differences in the variation of CaT amplitude along the long and short axis of cardiac myocytes. Variations of Ca signals between neighboring cells may contribute to the substrate of cardiac remodeling.”*

Eine Dyssynchronie der Kalziumentfernung konnte auch in multi-zellulären Präparationen an intakten Mausherzen identifiziert werden.

## “Dyssynchronous Ca removal in heart-failure induced atrial remodeling”

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit von Hohendanner F, DeSantiago J, Heinzel FR, Blatter LA mit dem Titel “Dyssynchronous calcium removal in heart failure-induced atrial remodeling”, erschienen im American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology am 1. Dezember 2016; doi: [10.1152/ajpheart.00375.2016](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00375.2016), [70]:

*“We tested the hypothesis that in atrial myocytes from a rabbit left ventricular heart failure (HF) model, spatial inhomogeneity and temporal dyssynchrony of Ca removal during excitation-contraction coupling together with increased Na/Ca exchange (NCX) activity generate a substrate for proarrhythmic Ca release. Ca removal occurs via Ca reuptake into the sarcoplasmic reticulum and extrusion via NCX exclusively in the cell periphery since rabbit atrial myocytes lack transverse tubules. Ca removal kinetics were assessed by the time constant  $\tau$  of decay of local peripheral subsarcolemmal (SS) and central (CT) action potential (AP)-induced Ca transients (CaTs) recorded in confocal line scan mode (using Fluo-4). Spatial and temporal dyssynchrony of Ca removal was quantified by CV TAU, defined as the standard deviation of local  $\tau$  along the transverse cell axis divided by mean  $\tau$ . In normal cells CT CaT decline was slower compared with the SS domain, while in HF cells decline was accelerated, became equal in SS and CT regions, and a significant increase of CV TAU indicated an increased Ca removal dyssynchrony. In HF atrial cells NCX upregulation was accompanied by an overall higher incidence of spontaneous Ca waves and a higher propensity of arrhythmogenic Ca waves, defined as waves that triggered APs due to NCX-mediated membrane depolarization. NCX inhibition normalized CV TAU in HF atrial cells and decreased the propensity of Ca waves. In summary, HF atrial myocytes show accelerated but dyssynchronous diastolic Ca removal and altered sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase (SERCA) and NCX activity that result in increased susceptibility to arrhythmia.”*

In dieser Studie wurde das Konzept lokaler subzellulärer Veränderungen der Kalziumentfernung und Kalziumfreisetzung auf den Herzvorhof im Kontext von systolischer Herzinsuffizienz (Volumen-Druck Belastungsmodell beim Hasen) erweitert. So konnte auch im Vorhof die Dyssynchronie als wesentliche pathophysiologische Grundlage mechanischer, aber auch elektrischer Dysfunktion identifiziert werden. Ein wichtiger Mechanismus, insbesondere auch der gesteigerten Arrhythmie-Neigung wurde mit der erhöhten Aktivität des Natrium-/Kalzium-Austauschers in Verbindung gebracht. Mit dem Natrium-/Kalzium-Austauscher wurde zudem ein pharmakologisch modifizierbares Ziel zur Behandlung der Dyssynchronie beschrieben.



“Isolation of Atrial Cardiomyocytes from a Rat Model of Metabolic Syndrome-related Heart Failure with Preserved Ejection Fraction.”

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit von Bode D, Guthof T, Pieske BM, Heinzel FR, Hohendanner F mit dem Titel “Isolation of Atrial Cardiomyocytes from a Rat Model of Metabolic Syndrome-related Heart Failure with Preserved Ejection Fraction”, erschienen im Journal of Visualized Experiments am 26. Juli 2018; doi: [10.3791/57953](https://doi.org/10.3791/57953), [29]:

*“In this article, we describe an optimized, Langendorff-based procedure for the isolation of single-cell atrial cardiomyocytes (ACMs) from a rat model of metabolic syndrome (MetS)-related heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). The prevalence of MetS-related HFpEF is rising, and atrial cardiomyopathies associated with atrial remodeling and atrial fibrillation are clinically highly relevant as atrial remodeling is an independent predictor of mortality. Studies with isolated single-cell cardiomyocytes are frequently used to corroborate and complement in vivo findings. Circulatory vessel rarefaction and interstitial tissue fibrosis pose a potentially limiting factor for the successful single-cell isolation of ACMs from animal models of this disease. We have addressed this issue by employing a device capable of manually regulating the intraluminal pressure of cardiac cavities during the isolation procedure, substantially increasing the yield of morphologically and functionally intact ACMs. The acquired cells can be used in a variety of different experiments, such as cell culture and functional Calcium imaging (i.e., excitation-contraction-coupling). We provide the researcher with a step-by-step protocol, a list of optimized solutions, thorough instructions to prepare the necessary equipment, and a comprehensive troubleshooting guide. While the initial implementation of the procedure might be rather difficult, a successful adaptation will allow the reader to perform state-of-the-art ACM isolations in a rat model of MetS-related HFpEF for a broad spectrum of experiments.*

Zur Erforschung atrialer Dysfunktion in einem Ratten-Tiermodell bedarf es aufgrund der pathophysiologischen Veränderungen des Gewebes sowie der speziellen Anforderungen des Herzvorhofes der Ratte, optimierter Methoden zur Isolation von einzelnen Kardiomyozyten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neuartige Zellisolationmethode entwickelt, um atriales Remodeling an lebenden Herzmuskelzellen studieren zu können.

## “Cellular mechanisms of metabolic syndrome-related atrial decompensation in a rat model of HFpEF”

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit von Hohendanner F, Bode D, Primessnig U, Guthof T, Doerr R, Jeuthe S, Reimers S, Zhang K, Bach D, Wakula P, Pieske BM, Heinzel FR mit dem Titel “Cellular mechanisms of metabolic syndrome-related atrial decompensation in a rat model of HFpEF”, erschienen im Journal of Molecular and Cellular Cardiology am 28. Dezember 2017; doi: [10.1016/j.yjmcc.2017.12.012](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.12.012), [42]:

*“Heart failure (HF) with preserved ejection fraction (HFpEF) is present in about 50% of HF patients. Atrial remodeling is common in HFpEF and associated with increased mortality. We postulate that atrial remodeling is associated with atrial dysfunction in vivo related to alterations in cardiomyocyte Calcium (Ca) signaling and remodeling. We examined atrial function in vivo and Ca transients (CaT) (Fluo4-AM, field stim) in atrial cardiomyocytes of ZSF-1 rats without (Ln; lean hypertensive) and with metabolic syndrome (Ob; obese, hypertensive, diabetic) and HFpEF.*

*RESULTS: At 21weeks Ln showed an increased left ventricular (LV) mass and left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), but unchanged left atrial (LA) size and preserved atrial ejection fraction vs. wild-type (WT). CaT amplitude in atrial cardiomyocytes was increased in Ln ( $2.9 \pm 0.2$  vs.  $2.3 \pm 0.2$  F/F0 in WT;  $n=22$  cells/group;  $p<0.05$ ). Studying subcellular Ca release in more detail, we found that local central cytosolic CaT amplitude was increased, while subsarcolemmal CaT amplitudes remained unchanged. Moreover, Sarcoplasmic reticulum (SR) Ca content (caffeine) was preserved while Ca spark frequency and tetracaine-dependent SR Ca leak were significantly increased in Ln. Ob mice developed a HFpEF phenotype in vivo, LA area was significantly increased and atrial in vivo function was impaired, despite increased atrial CaT amplitudes in vitro ( $2.8 \pm 0.2$ ;  $p<0.05$  vs. WT). Ob cells showed alterations of the tubular network possibly contributing to the observed phenotype. CaT kinetics as well as SR Ca in Ob were not significantly different from WT, but SR Ca leak remained increased. Angiotensin II (Ang II) reduced in vitro cytosolic CaT amplitudes and let to active nuclear Ca release in Ob but not in Ln or WT.*

*SUMMARY: In hypertensive ZSF-1 rats, a possibly compensatory increase of cytosolic CaT amplitude and increased SR Ca leak precede atrial remodeling and HFpEF. Atrial remodeling in ZSF-1 HFpEF is associated with an altered tubular network in-vitro and atrial contractile dysfunction in vivo, indicating insufficient compensation. Atrial cardiomyocyte dysfunction in vitro is induced by the addition of angiotensin II.”*

Atriale Umbauprozesse sind besonders häufig bei der HFpEF anzutreffen. Wir untersuchten die atriale und ventrikuläre in vivo und in vitro Funktion in einem Herzinsuffizienz-Modell der Ratte. Zusammenfassend konnte sowohl bei der hypertensiven Herzerkrankung als auch der HFpEF in der Ratte durch subzelluläre Umbauprozesse eine gesteigerte Kalziumfreisetzung, bei jedoch verschlechterter in vivo Funktion bei ventrikulärem HFpEF Phänotyp beobachtet werden. Eine Veränderung des tubulären Netzwerks war hiermit assoziiert. Wir beobachteten zudem Veränderung der nukleären Kalziumfreisetzung in Abhängigkeit der Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die z.B. zur Aktivierung prohypertropher Signale führen könnten.

“The role of fibroblast – cardiomyocyte interaction for atrial dysfunction in HFpEF and hypertensive heart disease”

Der nachfolgende Text entspricht dem Abstrakt der Arbeit von Bode D, Lindner D, Schwarzl M, Westermann D, Deissler P, Primessnig U, Hegemann N, Blatter LA, van Linthout S, Tschöpe C, Schoenrath F, Soltani S, Stamm C, Duesterhoeft V, Rolim N, Wisløff U, Knosalla C, Falk V, Pieske BM, Heinzl FR, Hohendanner F mit dem Titel “The role of fibroblast – cardiomyocyte interaction for atrial dysfunction in HFpEF and hypertensive heart disease”, erschienen im Journal of Molecular and Cellular Cardiology am 18. April 2019; doi: [10.1016/j.yjmcc.2019.04.016](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.04.016), [71]:

*“Aims: Atrial contractile dysfunction is associated with increased mortality in heart failure (HF). We have shown previously that a metabolic syndrome-based model of HFpEF and a model of hypertensive heart disease (HHD) have impaired left atrial (LA) function in vivo (rat). In this study we postulate, that left atrial cardiomyocyte (CM) and cardiac fibroblast (CF) paracrine interaction related to the inositol 1,4,5-trisphosphate signaling cascade is pivotal for the manifestation of atrial mechanical dysfunction in HF and that quantitative atrial remodeling is highly disease-dependent.*

*Methods and Results: Differential remodeling was observed in HHD and HFpEF as indicated by an increase of atrial size in vivo (HFpEF), unchanged fibrosis (HHD and HFpEF) and a decrease of CM size (HHD). Baseline contractile performance of rat CM in vitro was enhanced in HFpEF. Upon treatment with conditioned medium from their respective stretched CF (CM-SF), CM (at 21 weeks) of WT showed increased Ca<sup>2+</sup> transient (CaT) amplitudes related to the paracrine activity of the inotrope endothelin (ET-1) and inositol 1,4,5-trisphosphate induced Ca<sup>2+</sup> release. Concentration of ET-1 was increased in CM-SF and atrial tissue from WT as compared to HHD and HFpEF. In HHD, CM-SF had no relevant effect on CaT kinetics. However, in HFpEF, CM-SF increased diastolic Ca<sup>2+</sup> and slowed Ca<sup>2+</sup> removal, potentially contributing to an in-vivo decompensation. During disease progression (i.e. at 27 weeks), HFpEF displayed dysfunctional excitation-contraction-coupling (ECC) due to lower sarcoplasmic-reticulum Ca<sup>2+</sup> content unrelated to CF-CM interaction or ET-1, but associated with enhanced nuclear [Ca<sup>2+</sup>]. In human patients, tissue ET-1 was not related to the presence of arterial hypertension or obesity.*

*Conclusions: Atrial remodeling is a complex entity that is highly disease and stage dependent. The activity of fibrosis related to paracrine interaction (e.g. ET-1) might contribute to in vitro and in vivo atrial dysfunction. However, during later stages of disease, ECC is impaired unrelated to CF.*

Im zuvor charakterisierten HFpEF Rattenmodell fand sich eine deutliche Verschlechterung der linksatrialen Funktion. Neben einer, im Rahmen der Herzinsuffizienz, erhöhten neurohumoralen Signalkaskade, könnte eine Interaktion zwischen Fibroblasten und Kardiomyozyten beim atrialen „remodeling“ zu in vivo und in vitro Dysfunktion beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit wird der Hypothese einer wechselseitigen Beeinflussung von Kardiomyozyten und Fibroblasten während verschiedener Krankheitsstadien und unter Berücksichtigung verschiedener Komorbiditäten im Tiermodell nachgegangen. Wir konnten erstmals zeigen, dass die o.g. Interaktion eine maßgebliche Rolle für die mechanische atriale Dysfunktion bei HFpEF spielt. Des Weiteren untersuchten wir Zytokine und andere

Mediatoren, die mechanistisch für diese Beobachtung verantwortlich sein könnten. Endothelin-1 und IP<sub>3</sub>-Rezeptor medierte Signalkaskaden wurden als potentielle parakrin wirksame Mechanismen identifiziert.

## Diskussion

Kalziumabhängige Veränderungen im Ventrikel und Vorhof während verschiedener Formen der Herzinsuffizienz sind seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung[72]. Kalzium, als für die mechanische und elektrische Funktion zentrales Ion, ist ubiquitär in der Zelle vorhanden. Erst seine Kompartimentalisierung, also lokal unterschiedliche Freisetzung in das Zytosol während der Systole und Entfernung aus dem Zytosol während der Diastole, ermöglicht es dem Herzmuskelgewebe und der einzelnen Herzmuskelzelle auf die Anforderungen des Organismus zu reagieren. Gleichzeitig sind Veränderungen der Kalziumfreisetzung und Kalziumentfernung in den verschiedenen zellulären Kompartimenten und Organellen wesentlicher pathophysiologischer Bestandteil der Entstehung, Progression und Aufrechterhaltung einer Herzinsuffizienz. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden primär Kalziumabhängige Mechanismen identifiziert, die zur ventrikulären und atrialen Dysfunktion im Kontext der Herzinsuffizienz beitragen.

Ein wesentlicher Mechanismus der Herzinsuffizienz und damit assoziierter Pathologien ist eine dyssynchrone Kalziumhomeostase. Die strukturellen Anforderungen für eine schnelle und sichere Kalziumfreisetzung und -entfernung sind, sowohl bei ventrikulären als auch bei atrialen Kardiomyozyten im Rahmen einer physiologischen Erregungs-Kraft-Koppelung gegeben: So tragen zelluläre Invaginationen (tubuläres System) und die räumlich orchestrierte Expression von Proteinen, die an der Kalzium-Freisetzung und -Entfernung beteiligt sind zur Zellkontraktion bei. Nichtsdestotrotz finden sich durch die Anwesenheit diverser Zellorganellen und zur lokalen Regulation von Kalziumabhängigen Signalkaskaden subzelluläre Kompartimente von Kalzium-Freisetzungs- und Kalzium-Entfernungs-Einheiten. So konnte gezeigt werden, dass die Kalziumfreisetzung durch t-tubuläre Strukturen regionale Unterschiede aufweist und dass eine Aggravierung dieser Unterschiede zu einer Verschlechterung der Kontraktilität bei der Herzinsuffizienz beitragen[73-75].

Interessanterweise lässt sich dieses Konzept des regional unterschiedlichen Kalziumhaushalts auch auf die Kalziumentfernung erweitern. Durch die in der Zelle ungleich verteilte Expression von SERCA, MCU und NCX kommt es zur dyssynchronen Kalziumentfernung, mit unmittelbarer Auswirkung auf die Synchronie der Sarkomerrelaxation[69, 76]. Die Wichtigkeit der synchronen Kontraktion und Relaxation auf zellulärer Ebene spiegelt sich in der Tatsache wider, dass eine herzweite Resynchronisationstherapie essentieller Bestandteil der aktuellen internationalen Kardiologie-Leitlinien der Herzinsuffizienz ist und die Asynchronie mit erhöhter Mortalität vergesellschaftet ist[63, 77]: Dyssynchronie wird bei der systolischen

Herzinsuffizienz mit hochgradig eingeschränkter Pumpfunktion durch die Implantation von sogenannten „cardiac resynchronization therapy“ Geräten ([78], CRT) therapiert. Für diese Geräte konnte ein Mortalitätsbenefit bei Patienten nachgewiesen werden[79]. Regionale Unterschiede der subzellulären Regulation der Kalziumentfernung zeigen sich bei verschiedenen Pathologien: Sowohl bei ischämischer Kardiomyopathie im Schweinemodell als auch im Volumen- Belastungsmodell in der Maus und bei humaner Herzinsuffizienz konnte unter anderem durch den Autor eine vermehrte Dyssynchronie nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigte sich die Dyssynchronie bei der Entfernung von Kalzium unabhängig von der Kalziumfreisetzung. Sie stellt daher eine eigene pathophysiologische Entität in der Herzinsuffizienz dar. Zusätzlich könnte die nicht-uniforme passive Dehnung der Myofilamente eine Rolle bei der Arrhythmogenese spielen[80].

Das Konzept des dyssynchronen Kalziumhaushalts als ubiquitärer pathophysiologischer Mechanismus bei Herzinsuffizienz lässt sich auch auf den Vorhof übertragen. In einem HFpEF Patienten-Kollektiv konnte beispielsweise echokardiographisch eine gesteigerte Vorhofdyssynchronie beschrieben werden[81], die zum Krankheitsprogress beiträgt[82]. Die mechanische und elektrische Vorhofdysfunktion sind essentiell an der Morbidität und Mortalität der Herzinsuffizienz beteiligt[61]. HFrEF, aber besonders auch HFpEF sind Krankheitsbilder, die sowohl mit ventrikulären wie auch mit atrialen Veränderungen vergesellschaftet sind. Atriales Remodeling und atriale Kardiomyopathie sind wesentliche, die Mortalität und Morbidität beeinflussende Faktoren. So weisen Patienten mit HFpEF überdurchschnittlich häufig vergrößerte Vorhöfe auf. Eine Vergrößerung des linken Vorhofs wird regelhaft bei atrialen Kardiomyopathien beobachtet.

Diese Vorhöfe neigen durch die bereits makroskopisch sichtbare Zunahme bindegewebiger Strukturen zur Entwicklung von Rhythmusstörungen, wie z.B. Vorhofflimmern[83]. Auf mikroskopischer Ebene konnten verschiedene Mechanismen identifiziert werden, die eine mögliche Kompensation einer ventrikulären Fehlfunktion auf Vorhofebene darstellen, aber gleichzeitig eine Steigerung der Arrhythmie-Neigung zur Folge haben: So ist die Kontraktilität atrialer Einzelzellen ex-vivo gesteigert. Mediator dieser Steigerung ist zum einen eine gesteigerte IP<sub>3</sub>-Rezeptor-medierte Kalziumfreisetzung und damit Sensibilisierung des RyR mit in der Folge erhöhter Rezeptoröffnungswahrscheinlichkeit. Zum anderen wurde eine verringerte Kalziumaufnahme über Mitochondrien und eine gesteigerte Expression von tubulären Strukturen mit der Augmentation der systolischen Kalziumkonzentration zur

Steigerung der Inotropie assoziiert[84]. Diese Veränderungen bedingen eine Steigerung der zellulären Kontraktilität und sind damit als potentielle Kompensationsmechanismen zu sehen.

Nachteil dieser Kompensationsmechanismen auf atrialer Ebene ist die damit einhergehende erhöhte Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung von Arrhythmien. Insbesondere durch die bei der Herzinsuffizienz vorliegende gesteigerte NCX- und IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Aktivität, kommt es häufiger zur frühen und späten Nachdepolarisationen und pro-arrhythmischer Kalziumfreisetzung.

Tatsächlich stellt eine dyssynchrone Kalziumentfernung ein Substrat für proarrhythmische Ereignisse dar: In normalen, gesunden Zellen ist die SERCA zu bis zu 90 % an der gesamten Kalziumentfernung beteiligt. Ca. 10 % werden durch den NCX geleistet[85]. Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass atriale Herzmuskelzellen wenig t-tubuläre Strukturen besitzen und somit, insbesondere in subsarcolemmalen Bereichen des Zytosols NCX von größerer Relevanz sein dürfte. Es gibt damit große regionale Unterschiede hinsichtlich der relativen Beteiligung der verschiedenen Proteine an der Kalziumentfernung in atrialen Zellen. In der Herzinsuffizienz und bei Vorhofflimmern ist die relative Beteiligung der SERCA und des NCX an der Kalziumentfernung verändert[86, 87].

Die Beschleunigung der zytosolischen Kalziumentfernung und die damit einhergehende erhöhte Dyssynchronie in der systolischen Herzinsuffizienz deutet darauf hin, dass die pathologische Hochregulation des NCX zwar den Prozess der Kalziumentfernung dominiert, dabei aber gesteigerte subzelluläre Inhomogenität hervorruft. Daneben zeigte sich eine erhöhte Inzidenz von Kalziumwellen, die durch Nachdepolarisationen die Wahrscheinlichkeit für Arrhythmien erhöhen[88]. Dies lässt sich mit einer generell erhöhten NCX Aktivität und der speziellen Anatomie der Vorhofkardiomyozyten verbinden: So wird der sarcolemmale NCX durch die Abwesenheit von T-Tubuli, wie beispielsweise in atrialen Hasen-Kardiomyozyten gezeigt, höheren Kalziumkonzentrationen ausgesetzt als in ventrikulären Zellen. Durch die pharmakologische Hemmung des NCX konnte die Arrhythmieneigung in Vorhofkardiomyozyten in der systolischen Herzinsuffizienz in diesem Tiermodell gesenkt werden[70].

Atriale Kardiomyozyten sind zudem durch ihre spezielle Morphologie an die geringere Expression von tubulären Strukturen in diesem Zelltyp angepasst. So ist die Zellverkürzung in ventrikulären Kardiomyozyten, die mittels pharmakologischer Intervention detubuliert und damit „atrialisiert“ wurden, gestört. Dies ist nicht der Fall in atrialen Kardiomyozyten. Eine Rolle hierfür spielt die Abwesenheit von Mitochondrien im Bereich des subsarcolemmalen

Zytosols. Es konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Kalziumaufnahme via MCU die zentripetale Kalziumpropagation behindert, dabei jedoch auch das proarrhythmische Potenzial beeinflusst. Die Abwesenheit oder funktionelle Beeinträchtigung von Mitochondrien fördert daher ECC in atrialen Kardiomyozyten mit dem Preis einer erhöhten Arrhythmie-Tendenz[89]. Eine gesteigerte mitochondriale Kalziumaufnahme, wie sie beispielsweise durch ein  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher Knock-in-Modell erreicht werden kann, schützt vor der Entwicklung einer Herzinsuffizienz und Zelltod[90]. Neben diesen strukturellen Anpassungen atrialer Kardiomyozyten, führt auch die veränderte Expression von Kalziumfreisetzungskanälen zu einer im Vergleich zu ventrikulären Zellen divers regulierten Kalziumfreisetzung. Hier ist insbesondere die Expression von  $\text{IP}_3\text{R}$  von großer Wichtigkeit. So führt die Aktivierung von  $\text{IP}_3\text{R}$  durch Zugabe von Aktivatoren der neurohumoralen Signalkaskade zu einer gesteigerten Kalziumfreisetzung[91].  $\text{IP}_3$  bindet dabei an  $\text{IP}_3\text{R}$  und erhöht damit dessen Öffnungswahrscheinlichkeit für Kalzium. Eine erhöhte lokale zytosolische Kalziumkonzentration wiederum führt zur Sensibilisierung naher RyR und so zu einer insgesamt gesteigerten Kalziumfreisetzung.

Die gesteigerte pro-arrhythmischer Kalziumfreisetzung, welche durch die speziellen, möglicherweise kompensatorischen, strukturellen und funktionellen Anpassungen atrialer Kardiomyozyten zu Stande kommt, deckt sich mit der klinisch zu beobachtenden Vorhofflimmerneigung von herzinsuffizienten Patienten. Insbesondere bei HFpEF ist die atriale Dysfunktion mit einer erhöhten Mortalität vergesellschaftet[27].

Im Tiermodell, aber auch beim Menschen ist die zudem vorliegende mechanische atriale in-vivo Dysfunktion ein wesentlicher Bestandteil der Klinik[27]. Die Pumpkraft des Herzens wird beispielsweise durch adäquate sequenzielle Stimulation des Vorhofs und Ventrikels bei Schrittmacherpatienten deutlich verbessert [55]. Insbesondere in Studien zu Vorhofflimmern, konnte ein deutlicher Mortalitätsvorteil durch die Überführung in den Sinusrhythmus (mittels Katheterablation) gezeigt werden[28] – deutliche Hinweise auf die Wichtigkeit der atrialen Kontraktion. Bei der Herzinsuffizienz ist aber nicht nur das Vorhandensein von Vorhofflimmern mit einer atrialen kontraktile Dysfunktion vergesellschaftet; atriale Umbauprozesse und Fibrose selbst führen auch während des Sinusrhythmus zu einer Verschlechterung der Kontraktilität und damit der ventrikulären Füllung[92].

Dieser Befund deckt sich jedoch nicht mit den ex-vivo Befunden einer gesteigerten zellulären Kontraktilität auf Ebene des Vorhofs im HFpEF Tiermodell[42]. Zur Erklärung dieses Konundrums bedarf es der Berücksichtigung weiterer nicht-kardiomyozytärer Faktoren. Neben



der asynchronen Kalziumentfernung, die hierbei sicherlich eine Rolle spielt, weisen Organismen während der Herzinsuffizienz beispielsweise eine gesteigerte neurohumorale Aktivierung auf[93]. Diese erhöhte neurohumorale Aktivierung und die damit einhergehende chronische Senkung der SR Kalziumspiegel in-vivo wird zur beobachteten mechanischen Dysfunktion beitragen. Beispielsweise führt die Behandlung herzinsuffizienter Ratten mit dem Angiotensin Rezeptor Blocker Losartan zu einer Verbesserung der Kontraktilität durch eine Steigerung der SR Kalzium-Aufnahme[94].

Interessanterweise kommt es im Menschen zu einer wechselseitigen Beeinflussung von Vorhof und Ventrikel bzw. zur Beeinflussung der Freisetzung natriuretischer Peptide im Vorhof in Abhängigkeit von der ventrikulären Funktion[95]. Diese atrioventrikuläre Kopplung ist bei der Herzinsuffizienz weiterhin ungenügend untersucht, scheint aber insbesondere im Kontext von HFpEF eine große Rolle zu spielen. Die wechselseitige Beeinflussung ventrikulärer und atrialer Funktion ist klinisch häufig apparent. So zeigen beispielsweise Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und sekundärer Mitralklappen-Insuffizienz regelhaft eine Vergrößerung des linken Vorhofs und eine damit einhergehende erhöhte Wahrscheinlichkeit für elektrische und mechanische Vorhofdysfunktion[96]. Bei der Herzinsuffizienz lässt sich eine vermehrte (atriale) Ausschüttung neurohumoraler Peptide mit klinischer Dekompensation verbinden. Diese Peptide stellen daher nicht nur einen wichtigen Biomarker (z.B. nt-proBNP, ANP) dar, sondern sind auch therapeutischer Ansatz: Eine Nephilysin-Hemmung zur Steigerung der BNP-Spiegel ist Bestandteil der leitliniengerechten Herzinsuffizienz-Therapie und wirkt im Wesentlichen durch bisher ungenügend verstandene direkte Beeinflussung myokardialen Remodelings sowie durch einen blutdrucksenkenden Effekt[77].

Ein weiterer Mechanismus zur Erklärung einer atrialen mechanischen Dysfunktion in-vivo ist die Interaktion zwischen Fibroblasten und Kardiomyozyten. Atriale Fibrose sowie atriale Umbauprozesse per se sind in Hypertonie- und Herzinsuffizienz-Modellen häufig zu beobachtende Phänomene[97]. Allein durch den fibrotischen Umbau des Gewebes sowie lokale Inflammation und damit einhergehende Änderungen der lokalen Reizweiterleitungsgeschwindigkeit könnten Rhythmusstörungen, wie Vorhofflimmern getriggert werden. Gerade bei Patienten mit metabolischem Syndrom scheinen oxidativer Stress und lokale Inflammation für die Entwicklung von Vorhofflimmern ausschlaggebend zu sein[98]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun erstmals ein weiterer, von der Quantität der Fibrose unabhängiger Faktor beschrieben werden: Die parakrine Beeinflussung der

Kardiomyozyten durch Fibroblasten. Fibroblasten sezernieren neurohumorale Faktoren (z.B. Endothelin-1), welche den Kalziumhaushalt benachbarter Kardiomyozyten beeinflussen[99].

So konnte der Autor zeigen, dass insbesondere die von gestressten Fibroblasten sezernierten neurohumoralen Faktoren eine Steigerung der Inotropie atrialer Zellen bewirken. Endothelin-1 wird bekanntermaßen auch durch dehnungsabhängige Signalkaskaden von verschiedenen Zelltypen (u.a. Fibroblasten) sezerniert. Seine Hauptwirkung entfaltet Endothelin-1 durch eine Verstärkung der Kalziumfreisetzung via  $IP_3$  Rezeptoren. Es wirkt daher auch in Gegenwart einer verminderten Kalziumfreisetzung via RyR und stellt damit einen potentiellen Kompensationsmechanismus zur Steigerung der Kalziumfreisetzung bei der Herzinsuffizienz dar. Das Hormon zeichnet sich bisher insbesondere durch seine gefäßverengenden Eigenschaften in der Lungenstrombahn im Rahmen der pulmonalen Hypertonie aus. Eine Blockade von Endothelin-Rezeptoren mittels Bosentan ist daher eine klinisch etablierte Therapie bei pulmonaler Hypertonie. Gleichzeitig scheint es jedoch auch bei der Vermittlung kardialer Dysfunktion eine Rolle zu spielen: So konnte gezeigt werden, dass eine progressive atriale Fibrose durch Endothelin-1 vermittelt wird und an der Entstehung von Vorhofflimmern beteiligt ist[100]. Die Freisetzung von Endothelin-1 wird im Wesentlichen durch Stress hervorgerufen[101]. Dieses Verhalten ließ sich in unserem Tiermodell nachvollziehen: So führte eine chronische Dehnung von Fibroblasten zur gesteigerten Sezernierung von Endothelin-1.

Die kardiomyozytäre Inotropie-Steigerung durch von gestressten Fibroblasten sezerniertes Endothelin-1 wurde durch  $IP_3R$  mediierte Kalziumfreisetzung vermittelt und konnte nur in gesunden Kontrollzellen beobachtet werden. In HFpEF Zellen führte die Anwesenheit neurohumoraler Faktoren zu einer Verschlechterung des Kalziumhaushalts. Im Kontext einer kompensatorischen Steigerung der zellulären Inotropie als Antwort auf Dehnungs- und Stressreize könnte sich die Freisetzung von Endothelin-1 sowie anderen neurohumoralen Faktoren durch Fibroblasten als sinnvoll erweisen. Allerdings finden sich sowohl eine gesteigerte Steifigkeit des Herzmuskels sowie eine chronische Überdehnung häufig bei systolischer und diastolischer Herzinsuffizienz und werden durch rezidivierende hydropische Dekompensationen, wie sie im klinischen Alltag regelhaft zu finden sind, begünstigt[41]. Eine dadurch verursachte chronische Exposition gegenüber neurohumoralen Faktoren bzw. kompetitiven Blockern ändert die kardiomyozytäre Rezeptorexpression. Dies stellt einen Faktor da, der zur beobachteten kontraktilen Dekompensation bei HFpEF beitragen könnte[102].

Die beschriebenen Beobachtungen treffen jedoch nicht auf mit hypertensiver Herzerkrankung assoziiertes atriales Remodeling zu: Hier zeigte sich zwar ein Anstieg der durch gestresste Fibroblasten sezernierten Neurohormone, ein Effekt auf Kardiomyozyten blieb jedoch aus. Ein ähnliches Bild, wenngleich unter ungestressten Bedingungen, zeigten atriale Kardiomyozyten während der hypertensiven Kardiomyopathie in Experimenten durch Pluteanu et al: Kalzium Transienten waren unverändert, sowohl zu einem frühen als auch zu einem späten Untersuchungszeitpunkt.

Interessanterweise fand diese Forschungsgruppe eine reduzierte fraktionelle Kalziumfreisetzung bei insgesamt gesteigertem Kalziumgehalt des Sarkoplasmatischen Retikulums. Gleichzeitig fand sich eine erhöhte Arrhythmieneigung und mehr atriale Fibrose[103] im Verlauf der Erkrankung, so dass der Phänotyp, der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten atrialen Kardiomyopathie zwar ähnelt, gleichzeitig aber insbesondere strukturell deutliche Unterschiede aufweist. Bei genetisch ähnlichem Hintergrund ist von zeitabhängigen differenziellen Remodeling-Prozessen auszugehen. Ein weiterer Hinweis, dass es sich atriale Kardiomyopathie je nach Genese deutlich hinsichtlich makroskopischer und mikroskopischer Veränderungen unterscheiden können, liefern Harzheim et al mit Versuchen an spontan hypertensiven Ratten. Diese Tiere zeigten eine deutliche zelluläre Hypertrophie (die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten spontan hypertensiven Tiere zeigten eine Zellverkleinerung bei unveränderter Fibrose) sowie eine gesteigerte Kalziumfreisetzung in bestimmten Kompartimenten der Zelle. Hierfür verantwortlich zeigte sich  $IP_3$  Rezeptor medierte Kalziumfreisetzung[104], ein Mechanismus der durch den Autor bei der atrialen Kardiomyopathie im Rahmen der systolischen Herzinsuffizienz ebenfalls beschrieben wurde[18].

Nach Progression der Herzinsuffizienz, im Rahmen der natürlichen Alterung im HFpEF Tiermodell, zeigte sich eine kardiomyozytäre Dysfunktion unabhängig vom Einfluss durch Fibroblasten, aber in Assoziation mit einem reduzierten Kalziumgehalt des sarkoplasmatischen Retikulums. Auch wenn das Konzept einer wechselseitigen Beeinflussung von Kardiomyozyten und Fibroblasten auf Ebene des Vorhofs und potentiell des Ventrikels ein neues therapeutisches Ziel darstellen könnte, so scheint sich die Relevanz dieser Achse je nach Grunderkrankung und Erkrankungszeitpunkt zu ändern.

## Zusammenfassung

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass eine Dyssynchronie der Kalziumentfernung auf Basis veränderter lokaler SERCA und MCU Aktivität bei der systolischen Herzinsuffizienz auf Ventrikel Ebene zu beobachten ist. Diese Dyssynchronie stellt einen neuen subzellulären Mechanismus dar, der an der Pathophysiologie ventrikulärer mechanischer Dysfunktion bei der Herzinsuffizienz beteiligt ist. Auf Ebene des Vorhofs konnte bei der systolischen Herzinsuffizienz eine lokale Kompartimentalisierung von am Kalziumhaushalt beteiligten Proteinen (z.B. des Natrium-/Kalzium-Austauschers) mit einer gesteigerten Arrhythmieneigung vergesellschaftet werden. Die Modulation des Natrium-/Kalzium-Austauschers könnte sich hier als therapeutisches Ziel eignen.

Des Weiteren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass es bei der diastolischen Herzinsuffizienz sowie der hypertensiven Herzerkrankung als Vorstufe der diastolischen Herzinsuffizienz, im Vorhof zu einer kompensatorischen Modulation der Kalziumfreisetzung zum Erhalt der kontraktilen Funktion kommt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der mechanischen Vorhoffunktion bei HFpEF. Es konnten diverse Mechanismen beschrieben werden, die hierbei eine Rolle spielen: Neben einer morphologischen subzellulären Anpassung durch die erhöhte Ausprägung tubulärer Strukturen, wurde die Fibroblasten – Kardiomyozyten Interaktion als wesentlicher, in dieser Form bisher unbekannter pathophysiologischer Faktor identifiziert.

Hierbei erwies sich insbesondere Endothelin-1 als relevantes Neurohormon, dass von gestressten Fibroblasten sezerniert wird und einen direkten Effekt auf die kardiomyozytäre Funktion aufweist. Dieser Effekt zeigte sich in ausgeprägter Abhängigkeit von Erkrankungsstadium und Grunderkrankung: So hatten gestresste Fibroblasten weder einen Effekt bei hypertensivem Remodeling noch bei fortgeschrittenem HFpEF. Diese Ergebnisse wurden in humanen Gewebeproben bestätigt. Hier fand sich kein Zusammenhang zwischen der Endothelin-1 Konzentrationen und dem Vorliegen eines Hypertonus oder Adipositas – eine Tatsache, die die komplexen Mechanismen der atrialen Dysfunktion bei der Herzinsuffizienz unterstreicht.

Die Identifikation der Dyssynchronie der Kalziumentfernung, die Untersuchung der Mechanismen lokaler Kompartimentalisierung des Kalziumhaushalts und der Effekte atrioventrikulärer Kopplung sowie der Interaktion zwischen Fibroblasten und Kardiomyozyten trägt zum besseren Verständnis der Pathophysiologie kalziumabhängiger Veränderungen an Ventrikel und Vorhof bei der Herzinsuffizienz bei.

## Literaturangaben

1. Goyal, A., et al., *Predictors of incident heart failure in a large insured population: a one million person-year follow-up study*. *Circ Heart Fail*, 2010. **3**(6): p. 698-705.
2. Investigators, S., et al., *Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure*. *N Engl J Med*, 1991. **325**(5): p. 293-302.
3. *The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial*. *Lancet*, 1999. **353**(9146): p. 9-13.
4. Pitt, B., et al., *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(10): p. 709-17.
5. Granger, C.B., et al., *Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial*. *Lancet*, 2003. **362**(9386): p. 772-6.
6. McMurray, J.J., et al., *Angiotensin-neprilysin inhibition versus enalapril in heart failure*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(11): p. 993-1004.
7. Solomon, S.D., et al., *Influence of ejection fraction on outcomes and efficacy of spironolactone in patients with heart failure with preserved ejection fraction*. *Eur Heart J*, 2016. **37**(5): p. 455-62.
8. Shah, A.M., et al., *Cardiac structure and function in heart failure with preserved ejection fraction: baseline findings from the echocardiographic study of the Treatment of Preserved Cardiac Function Heart Failure with an Aldosterone Antagonist trial*. *Circ Heart Fail*, 2014. **7**(1): p. 104-15.
9. Bers, D.M., *Cardiac excitation-contraction coupling*. *Nature*, 2002. **415**(6868): p. 198-205.
10. Louch, W.E., et al., *Reduced synchrony of Ca<sup>2+</sup> release with loss of T-tubules—a comparison to Ca<sup>2+</sup> release in human failing cardiomyocytes*. *Cardiovasc Res*, 2004. **62**(1): p. 63-73.
11. Houser, S.R., V. Piacentino, 3rd, and J. Weissner, *Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart*. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2000. **32**(9): p. 1595-607.
12. Lindner, M., E. Erdmann, and D.J. Beuckelmann, *Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure*. *J Mol Cell Cardiol*, 1998. **30**(4): p. 743-9.
13. Piacentino, V., 3rd, et al., *Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes*. *Circ Res*, 2003. **92**(6): p. 651-8.
14. Hobai, I.A. and B. O'Rourke, *Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure*. *Circulation*, 2001. **103**(11): p. 1577-84.
15. Beuckelmann, D.J., M. Nabauer, and E. Erdmann, *Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure*. *Circulation*, 1992. **85**(3): p. 1046-55.
16. Gwathmey, J.K., et al., *Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure*. *Circ Res*, 1987. **61**(1): p. 70-6.
17. Gwathmey, J.K., et al., *Diastolic dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy. Effect on active force generation during systole*. *J Clin Invest*, 1991. **87**(3): p. 1023-31.
18. Hohendanner, F., et al., *Inositol-1,4,5-trisphosphate induced Ca<sup>2+</sup> release and excitation-contraction coupling in atrial myocytes from normal and failing hearts*. *The Journal of Physiology*, 2015. **593**(6): p. 1459-1477.
19. Marx, S.O., et al., *PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts*. *Cell*, 2000. **101**(4): p. 365-76.
20. Ai, X., et al., *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase modulates cardiac ryanodine receptor phosphorylation and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak in heart failure*. *Circ Res*, 2005. **97**(12): p. 1314-22.
21. Hasenfuss, G., et al., *Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium*. *Circulation research*, 1994. **75**(3): p. 434-42.

22. Greenberg, B., et al., *Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial*. *Lancet*, 2016. **387**(10024): p. 1178-86.
23. Schwinger, R.H., et al., *Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation*. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 1999. **31**(3): p. 479-91.
24. Dash, R., et al., *Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca2+-handling in failing human myocardium*. *J Mol Cell Cardiol*, 2001. **33**(7): p. 1345-53.
25. Bers, D.M., *Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes*. *Annual review of physiology*, 2008. **70**: p. 23-49.
26. Rossi, A., et al., *Left atrium in heart failure with preserved ejection fraction: structure, function, and significance*. *Circ Heart Fail*, 2014. **7**(6): p. 1042-9.
27. Melenovsky, V., et al., *Left atrial remodeling and function in advanced heart failure with preserved or reduced ejection fraction*. *Circ Heart Fail*, 2015. **8**(2): p. 295-303.
28. Marrouche, N.F., et al., *Catheter Ablation for Atrial Fibrillation with Heart Failure*. *N Engl J Med*, 2018. **378**(5): p. 417-427.
29. Bode, D., et al., *Isolation of Atrial Cardiomyocytes from a Rat Model of Metabolic Syndrome-related Heart Failure with Preserved Ejection Fraction*. *J Vis Exp*, 2018(137).
30. Hohendanner, F., et al., *Pathophysiological and therapeutic implications in patients with atrial fibrillation and heart failure*. *Heart Fail Rev*, 2018. **23**(1): p. 27-36.
31. Triposkiadis, F., et al., *Left atrial systolic function is depressed in idiopathic and preserved in ischemic dilated cardiomyopathy*. *Eur J Clin Invest*, 1999. **29**(11): p. 905-12.
32. Morris, D.A., et al., *Left atrial systolic and diastolic dysfunction in heart failure with normal left ventricular ejection fraction*. *J Am Soc Echocardiogr*, 2011. **24**(6): p. 651-62.
33. Ohtani, K., et al., *High prevalence of atrial fibrosis in patients with dilated cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 1995. **25**(5): p. 1162-9.
34. Duca, F., et al., *Interstitial Fibrosis, Functional Status, and Outcomes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Insights From a Prospective Cardiac Magnetic Resonance Imaging Study*. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2016. **9**(12).
35. Neuberger, H.R., et al., *Management of atrial fibrillation in patients with heart failure*. *Eur Heart J*, 2007. **28**(21): p. 2568-77.
36. Li, D., et al., *Promotion of atrial fibrillation by heart failure in dogs: atrial remodeling of a different sort*. *Circulation*, 1999. **100**(1): p. 87-95.
37. Schoonderwoerd, B.A., et al., *Atrial ultrastructural changes during experimental atrial tachycardia depend on high ventricular rate*. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2004. **15**(10): p. 1167-74.
38. Anne, W., et al., *Self-terminating AF depends on electrical remodeling while persistent AF depends on additional structural changes in a rapid atrially paced sheep model*. *J Mol Cell Cardiol*, 2007. **43**(2): p. 148-58.
39. Zeitler, E.P., et al., *Multiple Comorbidities and Response to Cardiac Resynchronization Therapy: MADIT-CRT Long-Term Follow-Up*. *J Am Coll Cardiol*, 2017. **69**(19): p. 2369-2379.
40. Ruwald, M.H., et al., *Influence of diabetes mellitus on inappropriate and appropriate implantable cardioverter-defibrillator therapy and mortality in the Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial-Reduce Inappropriate Therapy (MADIT-RIT) Trial*. *Circulation*, 2013. **128**(7): p. 694-701.
41. Cavalera, M., J. Wang, and N.G. Frangogiannis, *Obesity, metabolic dysfunction, and cardiac fibrosis: pathophysiological pathways, molecular mechanisms, and therapeutic opportunities*. *Transl Res*, 2014. **164**(4): p. 323-35.
42. Hohendanner, F., et al., *Cellular mechanisms of metabolic syndrome-related atrial decompensation in a rat model of HFpEF*. *J Mol Cell Cardiol*, 2018. **115**: p. 10-19.
43. Nattel, S., *New ideas about atrial fibrillation 50 years on*. *Nature*, 2002. **415**(6868): p. 219-26.
44. Voigt, N., et al., *Cellular and molecular mechanisms of atrial arrhythmogenesis in patients with paroxysmal atrial fibrillation*. *Circulation*, 2014. **129**(2): p. 145-56.
45. Mary-Rabine, L., et al., *The relationship of human atrial cellular electrophysiology to clinical function and ultrastructure*. *Circulation research*, 1983. **52**(2): p. 188-99.

46. Ouadid, H., B. Albat, and J. Nargeot, *Calcium currents in diseased human cardiac cells*. Journal of cardiovascular pharmacology, 1995. **25**(2): p. 282-91.
47. Li, D., et al., *Effects of experimental heart failure on atrial cellular and ionic electrophysiology*. Circulation, 2000. **101**(22): p. 2631-8.
48. Barlucchi, L., et al., *Canine ventricular myocytes possess a renin-angiotensin system that is upregulated with heart failure*. Circulation research, 2001. **88**(3): p. 298-304.
49. Chelu, M.G., et al., *Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> leak promotes atrial fibrillation in mice*. The Journal of clinical investigation, 2009. **119**(7): p. 1940-51.
50. Hohendanner, F., et al., *Calcium and IP<sub>3</sub> dynamics in cardiac myocytes: experimental and computational perspectives and approaches*. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 35.
51. Yamaguchi, K., et al., *Left atrial remodeling and recurrence of congestive heart failure in patients initially diagnosed with heart failure*. Echocardiography, 2014. **31**(8): p. 936-40.
52. Bayes-Genis, A., et al., *Left atrial enlargement and NT-proBNP as predictors of sudden cardiac death in patients with heart failure*. Eur J Heart Fail, 2007. **9**(8): p. 802-7.
53. Armstrong, A.C., et al., *Left atrial dimension and traditional cardiovascular risk factors predict 20-year clinical cardiovascular events in young healthy adults: the CARDIA study*. Eur Heart J Cardiovasc Imaging, 2014. **15**(8): p. 893-9.
54. Mosquera, V.X., et al., *Indexed left atrial size predicts all-cause and cardiovascular mortality in patients undergoing aortic valve surgery*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2017. **153**(6): p. 1275-1284 e7.
55. Liang, H.Y., et al., *Influence of atrial function and mechanical synchrony on LV hemodynamic status in heart failure patients on resynchronization therapy*. JACC Cardiovasc Imaging, 2011. **4**(7): p. 691-8.
56. Kono, T., et al., *Left atrial contribution to ventricular filling during the course of evolving heart failure*. Circulation, 1992. **86**(4): p. 1317-22.
57. Sartipy, U., et al., *Atrial Fibrillation in Heart Failure With Preserved, Mid-Range, and Reduced Ejection Fraction*. JACC Heart Fail, 2017. **5**(8): p. 565-574.
58. Zakeri, R., et al., *Impact of atrial fibrillation on exercise capacity in heart failure with preserved ejection fraction: a RELAX trial ancillary study*. Circ Heart Fail, 2014. **7**(1): p. 123-30.
59. McGrath, M.F., M.L. de Bold, and A.J. de Bold, *The endocrine function of the heart*. Trends Endocrinol Metab, 2005. **16**(10): p. 469-77.
60. Barclay, J.L., et al., *Relation of left atrial volume to B-type natriuretic peptide levels in patients with stable chronic heart failure*. Am J Cardiol, 2006. **98**(1): p. 98-101.
61. Triposkiadis, F., et al., *Global left atrial failure in heart failure*. Eur J Heart Fail, 2016. **18**(11): p. 1307-1320.
62. Solomon, S.D., et al., *The angiotensin receptor neprilysin inhibitor LCZ696 in heart failure with preserved ejection fraction: a phase 2 double-blind randomised controlled trial*. Lancet, 2012. **380**(9851): p. 1387-95.
63. Donal, E., et al., *Left atrial reverse remodeling and cardiac resynchronization therapy for chronic heart failure patients in sinus rhythm*. J Am Soc Echocardiogr, 2009. **22**(10): p. 1152-8.
64. Tops, L.F., et al., *Left atrial strain predicts reverse remodeling after catheter ablation for atrial fibrillation*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(3): p. 324-31.
65. Marsan, N.A., et al., *Comparison of left atrial volumes and function by real-time three-dimensional echocardiography in patients having catheter ablation for atrial fibrillation with persistence of sinus rhythm versus recurrent atrial fibrillation three months later*. Am J Cardiol, 2008. **102**(7): p. 847-53.
66. Santarpino, G., et al., *Atrial fibrillation ablation induces reverse remodelling and impacts cardiac function*. Minerva Cardioangiol, 2011. **59**(1): p. 17-29.
67. Melgaard, L., et al., *Assessment of the CHA<sub>2</sub>DS<sub>2</sub>-VASc Score in Predicting Ischemic Stroke, Thromboembolism, and Death in Patients With Heart Failure With and Without Atrial Fibrillation*. JAMA, 2015. **314**(10): p. 1030-8.
68. Hohendanner, F., et al., *Intracellular dyssynchrony of diastolic cytosolic [Ca<sup>2+</sup>(+)] decay in ventricular cardiomyocytes in cardiac remodeling and human heart failure*. Circ Res, 2013. **113**(5): p. 527-38.

69. Hammer, K.P., et al., *Variations in local calcium signaling in adjacent cardiac myocytes of the intact mouse heart detected with two-dimensional confocal microscopy*. *Front Physiol*, 2014. **5**: p. 517.
70. Hohendanner, F., et al., *Dyssynchronous calcium removal in heart failure-induced atrial remodeling*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2016. **311**(6): p. H1352-H1359.
71. Bode, D., et al., *The role of fibroblast - Cardiomyocyte interaction for atrial dysfunction in HFpEF and hypertensive heart disease*. *J Mol Cell Cardiol*, 2019. **131**: p. 53-65.
72. Pool, P.E. and E. Braunwald, *Fundamental mechanisms in congestive heart failure*. *Am J Cardiol*, 1968. **22**(1): p. 7-15.
73. Heinzl, F.R., et al., *Spatial and temporal inhomogeneities during Ca<sup>2+</sup> release from the sarcoplasmic reticulum in pig ventricular myocytes*. *Circulation research*, 2002. **91**(11): p. 1023-30.
74. Louch, W.E., et al., *Reduced synchrony of Ca<sup>2+</sup> release with loss of T-tubules-a comparison to Ca<sup>2+</sup> release in human failing cardiomyocytes*. *Cardiovascular research*, 2004. **62**(1): p. 63-73.
75. Bitó, V., et al., *Alterations in excitation-contraction coupling in chronically ischemic or hibernating myocardium*. *Experimental and clinical cardiology*, 2005. **10**(3): p. 142-5.
76. Hohendanner, F., et al., *Intracellular dyssynchrony of diastolic cytosolic [Ca<sup>2+</sup>(+)] decay in ventricular cardiomyocytes in cardiac remodeling and human heart failure*. *Circulation research*, 2013. **113**(5): p. 527-38.
77. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC*. *Eur J Heart Fail*, 2016. **18**(8): p. 891-975.
78. Yu, C.M., et al., *Benefits of cardiac resynchronization therapy for heart failure patients with narrow QRS complexes and coexisting systolic asynchrony by echocardiography*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. **48**(11): p. 2251-7.
79. Palmisano, P., et al., *Reduced long-term overall mortality in heart failure patients with prolonged QRS treated with CRT combined with ICD vs. heart failure patients with narrow QRS treated with ICD only*. *Europace*, 2016. **18**(9): p. 1374-82.
80. Ter Keurs, H.E., et al., *Spatial nonuniformity of contraction causes arrhythmogenic Ca<sup>2+</sup> waves in rat cardiac muscle*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1047**: p. 345-65.
81. Bytyci, I. and G. Bajraktari, *Left atrial changes in early stages of heart failure with preserved ejection fraction*. *Echocardiography*, 2016. **33**(10): p. 1479-1487.
82. Sanchis, L., et al., *Interatrial Dyssynchrony May Contribute to Heart Failure Symptoms in Patients with Preserved Ejection Fraction*. *Echocardiography*, 2015. **32**(11): p. 1655-61.
83. Hohendanner, F., et al., *Atrial remodeling in heart failure: recent developments and relevance for heart failure with preserved ejection fraction*. *ESC Heart Fail*, 2018. **5**(2): p. 211-221.
84. Hohendanner, F., et al., *Inositol-1,4,5-trisphosphate induced Ca<sup>2+</sup> release and excitation-contraction coupling in atrial myocytes from normal and failing hearts*. *J Physiol*, 2015. **593**(6): p. 1459-77.
85. Weber, C.R., et al., *Dynamic regulation of sodium/calcium exchange function in human heart failure*. *Circulation*, 2003. **108**(18): p. 2224-9.
86. Schotten, U., et al., *Atrial fibrillation-induced atrial contractile dysfunction: a tachycardiomyopathy of a different sort*. *Cardiovasc Res*, 2002. **53**(1): p. 192-201.
87. Lugenbiel, P., et al., *Atrial fibrillation complicated by heart failure induces distinct remodeling of calcium cycling proteins*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0116395.
88. Grandi, E., et al., *Human atrial action potential and Ca<sup>2+</sup> model: sinus rhythm and chronic atrial fibrillation*. *Circulation research*, 2011. **109**(9): p. 1055-66.
89. Hohendanner, F., J.T. Maxwell, and L.A. Blatter, *Cytosolic and nuclear calcium signaling in atrial myocytes: IP<sub>3</sub>-mediated calcium release and the role of mitochondria*. *Channels (Austin)*, 2015. **9**(3): p. 129-38.
90. Luongo, T.S., et al., *The mitochondrial Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchanger is essential for Ca<sup>(2+)</sup> homeostasis and viability*. *Nature*, 2017. **545**(7652): p. 93-97.
91. Hohendanner, F., et al., *Calcium and IP<sub>3</sub> dynamics in cardiac myocytes: Experimental and computational perspectives and approaches*. *Frontiers in Pharmacology*, 2014. **5**.



92. Hohendanner, F., et al., *Extent and magnitude of low-voltage areas assessed by ultra-high-density electroanatomical mapping correlate with left atrial function*. Int J Cardiol, 2018. **272**: p. 108-112.
93. White, M., et al., *Effects of enalapril, candesartan or both on neurohumoral activation and LV volumes and function in patients with heart failure not treated with a beta-blocker*. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2009. **3**(2): p. 113-21.
94. Babick, A., et al., *Reversal of subcellular remodelling by losartan in heart failure due to myocardial infarction*. J Cell Mol Med, 2012. **16**(12): p. 2958-67.
95. Moe, G.W., et al., *Response of atrial natriuretic factor to acute and chronic increases of atrial pressures in experimental heart failure in dogs. Role of changes in heart rate, atrial dimension, and cardiac tissue concentration*. Circulation, 1991. **83**(5): p. 1780-7.
96. Lisi, M., et al., *Mitral regurgitation severity correlates with symptoms and extent of left atrial dysfunction: Effect of mitral valve repair*. J Clin Ultrasound, 2018. **46**(1): p. 32-40.
97. Lau, D.H., et al., *Atrial arrhythmia in ageing spontaneously hypertensive rats: unraveling the substrate in hypertension and ageing*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72416.
98. Karam, B.S., et al., *Oxidative stress and inflammation as central mediators of atrial fibrillation in obesity and diabetes*. Cardiovasc Diabetol, 2017. **16**(1): p. 120.
99. Mackenzie, L., et al., *The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction*. Journal of cell science, 2004. **117**(Pt 26): p. 6327-37.
100. Thanigaimani, S., et al., *Molecular mechanisms of atrial fibrosis: implications for the clinic*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2017. **15**(4): p. 247-256.
101. Gustafsson, T., et al., *Elevations of local intravascular pressures release vasoactive substances in humans*. Clin Physiol Funct Imaging, 2013. **33**(1): p. 38-44.
102. Lee, T.M., et al., *Additive effects of combined blockade of AT1 receptor and HMG-CoA reductase on left ventricular remodeling in infarcted rats*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H1281-9.
103. Pluteanu, F., et al., *Early subcellular Ca<sup>2+</sup> remodelling and increased propensity for Ca<sup>2+</sup> alternans in left atrial myocytes from hypertensive rats*. Cardiovasc Res, 2015. **106**(1): p. 87-97.
104. Harzheim, D., et al., *Elevated InsP3R expression underlies enhanced calcium fluxes and spontaneous extra-systolic calcium release events in hypertrophic cardiac myocytes*. Channels (Austin), 2010. **4**(1): p. 67-71.

# Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Unterschrift