

Aus der Klinik für Kardiologie und Pneumologie  
(Prof. Dr. med. G. Hasenfuß)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Dreifarbige STED-Nanoskopie von Calcium-  
Freisetzungseinheiten in humanem  
linksventrikulärem Gewebe verschiedener  
Subtypen hochgradiger Aortenklappenstenose

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hanne-Lea Schönberger

aus

Flensburg

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer: Prof. Dr. med. S. E. Lehnart

Ko-Betreuerin: Prof. Dr. med. E. Zeisberg

### **Prüfungskommission**

Referent: Prof. Dr. med. S. E. Lehnart

Ko-Referentin: Prof. Dr. med. E. Zeisberg

Drittreferent: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 22.08.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Dreifarbige STED-Nanoskopie von Calcium-Freisetzungseinheiten in humanem linksventrikulärem Gewebe verschiedener Subtypen hochgradiger Aortenklappenstenose“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

---

Ort, Datum

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Brandenburg S, Drews L, Schönberger H-L, Jacob CF, Paulke NJ, Beuthner BE, Topci R, Kohl T, Neuenroth L, Kutschka I et al. (2022): Direct proteomic and high-resolution microscopy biopsy analysis identifies distinct ventricular fates in severe aortic stenosis. *J Mol Cell Cardiol* 173, 1–15

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1 Epidemiologie der Aortenklappenstenose .....	7
1.2 Die Aortenklappenstenose .....	7
1.2.1 Ursachen und Pathomechanismen .....	7
1.2.2 Klinische Manifestation .....	9
1.2.3 Therapie .....	9
1.3 Echokardiografische Einteilung .....	10
1.4 Gebietseingrenzung und Systematisierung .....	11
1.4.1 Die elektromechanische Kopplung des Herzens .....	13
1.4.2 Bekannte myokardiale Veränderungen bei Herzinsuffizienz .....	13
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1 Prozessierung der Proben .....	18
2.2 Färbung der Paraffinschnitte .....	18
2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	18
2.2.2 Sirius-Red/Fast-Green-Färbung .....	19
2.2.3 Konjugation von Weizenkeim-Agglutinin mit <i>NHS-STAR 488</i> .....	19
2.2.4 Immunfärbungen .....	20
2.3 Mikroskopie und Bildgebung .....	21
2.3.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen .....	21
2.3.2 Lipofuscin-Autofluoreszenz-Aufnahmen .....	21
2.3.3 Aufnahmen der Immunfärbungen am STED Mikroskop .....	22
2.4 Bildanalysen .....	24
2.4.1 Bestimmung der Myozytenkernzahl pro Fläche und Gesamtkernzahl .....	24
2.4.2 Bestimmung des Zellquerschnitts .....	24
2.4.3 Bestimmung des interstitiellen Fibroseanteils .....	25

2.4.4	Bestimmung des Lipofuscinanteils .....	25
2.4.5	Segmentierung des transversal-axialen Tubulus-Netzwerks .....	26
2.4.6	Analyse der Tubulus-Ausrichtung .....	27
2.4.7	Analyse der Periodizität der RyR2-Cluster-Streifung.....	27
2.4.8	RyR2-Cluster-Analyse .....	28
2.5	Statistik .....	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
3.1	Klinische und echokardiografische Parameter der LV-Biopsien bei AS .....	33
3.2	Reduzierte Myozytenuclei-Anzahl der Subtypen I und II .....	35
3.3	Signifikante Kardiomyozytenhypertrophie der Subtypen I und II.....	36
3.4	Interstitieller Fibroseanteil .....	37
3.5	Vermehrte perinucleäre Lipofuscin-Aggregationen in linksventrikulären Kardiomyozyten von Subtyp IV .....	38
3.6	Axiale Orientierung des TAT-Netzwerks bei Subtyp II und Reduktion der TAT- Netzwerk-Dichte bei Subtyp I-III.....	39
3.7	RyR2-Cluster-Analyse .....	41
3.7.1	Reduktion der RyR2-Cluster-Streifung bei Subtyp III .....	41
3.7.2	Veränderungen der RyR2-Flächenfraktion, der Clusterdichte und -größe .....	42
3.7.3	Erhöhte Cav3-assoziierte RyR2-Clustergröße bei gleichzeitiger Abnahme des Cav3-assoziierten RyR2-Cluster-Anteils bei Subtyp IV .....	44
3.7.4	RyR2-Cluster-Fragmentation funktioneller Calcium-Freisetzungseinheiten .....	46
3.8	Korrelation von echokardiografischen Parametern und Analyseergebnissen ...	48
3.8.1	Kardiomyozytenhypertrophie bei Zunahme der Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe.....	48
3.8.2	Einfluss der RyR2-Clustergröße und -dichte auf die Ejektionsfraktion.....	49
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>51</b>
4.1	Spezifische Unterschiede zwischen den echokardiografisch definierten Subtypen – ein kurzer Überblick .....	51
4.2	Detaillierte Präsentation der Ergebnisse und Vergleich mit früheren Publikationen .....	52

---

4.2.1	Auf subzellularer Ebene zeigen sich Veränderungen des TAT-Netzwerk- Aufbaus .....	52
4.2.2	Veränderungen von RyR2-Clustern und deren subzellulärer Verteilung.....	54
4.2.3	Fragmentationsprozesse der RyR2-Cluster bei den Subtypen I-III.....	56
4.2.4	Myozytenzellhypertrophie der Subtypen I und II.....	57
4.2.5	Lipofuscinhaltige Aggregate bei Subtyp IV .....	59
4.3	Korrelative Beziehung einiger Echokardiografieparameter mit zellulären und subzellulären Elementen.....	60
4.4	Limitationen der Untersuchungen .....	61
4.5	Ausblick .....	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>70</b>

## **Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Lipofuscin autofluoreszenz bei Anregung mit verschiedenen Lichtspektren .....	22
<b>Abbildung 2:</b> Vergleich konfokaler Mikroskopie und STED Mikroskopie .....	23
<b>Abbildung 3:</b> Fast-Fourier-Transformation der RyR2-Zellausschnitte .....	28
<b>Abbildung 4:</b> Analyse der Myozytenuclei-Anzahl .....	35
<b>Abbildung 5:</b> Analyse des Zellquerschnitts .....	36
<b>Abbildung 6:</b> Analyse der interstitiellen Fibrose .....	37
<b>Abbildung 7:</b> Analyse der intrazellulären Lipofuscinaggregate .....	38
<b>Abbildung 8:</b> Analyse des TAT-Netzwerks .....	40
<b>Abbildung 9:</b> Analyse der RyR2-Cluster-Regelmäßigkeit mittels FFT .....	42
<b>Abbildung 10:</b> Analyse der RyR2-Cluster mittels STED-Nanoskopie .....	43
<b>Abbildung 11:</b> Analyse Cav3-assoziiierter RyR2-Cluster mittels STED-Nanoskopie ...	45
<b>Abbildung 12:</b> Analyse der RyR2-Cluster-Fragmentation innerhalb Gruppierungen funktioneller Calcium-Freisetzungseinheiten mittels STED-Nanoskopie.....	46
<b>Abbildung 13:</b> Analyse der RyR2-Cluster-Masse und -Anzahl bezogen auf die Größe funktioneller RyR2-Cluster-Gruppierungen mittels STED-Nanoskopie.....	48
<b>Abbildung 14:</b> Darstellung korrelativer Beziehungen zwischen $V_{max}$ und einigen Parametern des myokardialen Gewebes .....	49
<b>Abbildung 15:</b> Korrelation der Ejektionsfraktion mit den RyR2-Clusterparametern.....	50



## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die verschiedenen Aortenklappenstenose-Subtypen .....	12
<b>Tabelle 2:</b> Darstellung klinischer und echokardiografischer Parameter der AS-Subtypen.....	33
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht der echokardiografischen Parameter.....	34
<b>Tabelle 4:</b> Signifikante Unterschiede von vier Subtypen relativ zur gesunden Vergleichsgruppe .....	62
<b>Tabelle A1:</b> Verbrauchsmaterialien.....	66
<b>Tabelle A2:</b> Farbstoffe und Einbettmedien .....	66
<b>Tabelle A3:</b> Lösungen und Chemikalien .....	67
<b>Tabelle A4:</b> Primärantikörper für die STED-Mikroskopie.....	68
<b>Tabelle A5:</b> Sekundärantikörper und Fluorophore für die STED-Mikroskopie .....	68
<b>Tabelle A6:</b> Geräte .....	68
<b>Tabelle A7:</b> Software .....	69

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Aortenklappe
AS	Aortenklappenstenose
AT	axialer Tubulus
AVA	<i>Aortic Valve Area</i> , Aortenklappenöffnungsfläche
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , Rinderserumalbumin
Cav3	Caveolin-3
FFT	Fast-Fourier-Transformation
HE	Hämatoxylin/Eosin
LTCC	<i>L-Type-Calcium-Channel</i> , L-Typ-Calcium-Kanal
LV	linker Ventrikel
LV-KM	linksventrikuläre Kardiomyozyten
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
NF-Gruppe	<i>Non-Failing</i> -Gruppe, gesunde Vergleichsgruppe
$\Delta P_{\text{mean}}$	mittlerer Gradient über der Aortenklappe
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
ROS	<i>Reaktive Oxygen Species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
ROIs	<i>Regions of Interest</i>
RyR2	Ryanodinrezeptor-2-Calcium-Freisetzungskanal
SERCA	sarkoendoplasmatische Calcium-ATPase
SR/FG	Sirius-Red/Fast-Green
STED	<i>STimulated Emission Depletion</i>
SVI	Schlagvolumenindex
TAT-Netzwerk	transversal-axiales Tubulus-Netzwerk
TAVI	<i>Transcatheter Aortic Valve Implantation</i> , Katheter-gestützter Aortenklappenersatz
TT	transversaler Tubulus
$V_{\text{max}}$	maximale Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i> , Weizenkeimagglutinin

# **1 Einleitung**

## **1.1 Epidemiologie der Aortenklappenstenose**

Das Krankheitsbild der Aortenklappenstenose (AS) ist in unserer heutigen Gesellschaft präsent und beeinflusst zunehmend die Lebensqualität vieler Menschen. Gerade im höheren Lebensalter nimmt die Anzahl der an einer Aortenklappenstenose Erkrankten deutlich zu. Laut einer aktuellen Metaanalyse von sieben bevölkerungsbasierten Studien aus Europa und Nordamerika von Osnabrugge et al. (2013) liegt die Prävalenz der über 75-jährigen Betroffenen bereits bei 12,4 %. Die Häufigkeit einer schwergradigen Aortenklappenstenose in der älteren Bevölkerung wird mit 3,4 % angegeben. Auf die europäische Population bezogen, sind laut Osnabrugge et al. (2013) demnach nahezu 4,9 Millionen Menschen an einer Aortenklappenstenose und eine Million Menschen an einer hochgradigen Aortenklappenstenose erkrankt. Durch den demografischen Wandel ist mit einer weiteren Zunahme der alternden Bevölkerung zu rechnen. Prognostisch wird von einem Anstieg der über 75-Jährigen in Europa auf 10,7 % im Jahr 2025 und von einer weiteren Steigerung auf 16,6 % bis 2050 ausgegangen (Osnabrugge et al. 2013). Durch die Zunahme der älteren Bevölkerungsschicht wird es folglich auch zu einem Anstieg von Aortenklappenstenose-Erkrankungen kommen und das Verständnis und die Behandlung des Krankheitsbildes gewinnen weiter an Dringlichkeit.

## **1.2 Die Aortenklappenstenose**

### **1.2.1 Ursachen und Pathomechanismen**

Laut lung et al. (2003) sind mit 81,9 % degenerative, arteriosklerotische Vorgänge an der Aortenklappe die führenden Pathomechanismen. Rheumatische Ursachen stehen mit 11,2 % an zweiter Stelle, gefolgt von einer kongenitalen Pathogenese (5,4 %). Eine Endokarditis (0,8 %) und andere inflammatorische Prozesse (0,1 %) haben bezogen auf den europäischen Raum weniger Bedeutung (lung et al. 2003).

Akahori et al. (2018) beschreiben, dass bei der Pathogenese fibrotische und inflammatorische Prozesse sowie oxidativer Stress eine Rolle spielen. Zusätzlich sollen angiogenetische, osteogenetische und hämorrhagische Entwicklungen Einfluss haben (Akahori et al. 2018). Auf die Entstehung einer Aortenklappenstenose und auf das Fortschreiten bis zur Herzinsuffizienz haben viele Faktoren

Einfluss. Die Krankheitsentstehung ist komplex und es gibt einige Prozesse, die noch nicht geklärt sind.

Da im europäischen Raum die degenerative Form der Aortenklappenstenose vorwiegt (Lung et al. 2003), wird hier dieser Pathomechanismus erläutert, soweit bekannt. Laut Dweck et al. (2012) führen erhöhter mechanischer Stress und reduzierte Scherspannung zu einem endothelialen Schaden der Aortenklappenoberfläche. Durch die Verletzung dieses Gewebes können Lipide in die geschädigten Regionen einwandern und akkumulieren. Diese werden oxidativ modifiziert und wirken daraufhin hochzytotoxisch und proinflammatorisch (Dweck et al. 2012). Folgend wandern Makrophagen und T-Lymphozyten ein und schütten Botenstoffe wie Tumorstromafaktor- $\beta$ 1 (Jian et al. 2003) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  sowie Interleukin-1 $\beta$  (Kaden et al. 2003) aus, die eine weitere Entzündungsreaktion mit fibrotischen und kalzifizierenden Prozessen triggern. Dweck et al. (2012) nennt eine Studie, welche eine zunehmende Neoangiogenese um diese kalzifizierenden Prozesse beschreibt und mit dem Auftreten der T-Lymphozyten-Dichte korreliert (Mazzone et al. 2004). Zusätzlich sollen der Neovaskularisierung folgende hämorrhagische Prozesse zum Fortschreiten der Aortenklappenstenose beitragen (Akahori et al. 2011). Fibrotische Umbauten der extrazellulären Matrix sollen durch das Renin-Angiotensin-System gefördert werden. So wurde eine Hochregulation des gewebespezifischen Angiotensin-*Converting*-Enzyms und Angiotensin II festgestellt (O'Brien et al. 2002). Zusätzlich wurden Angiotensin-spezifische Rezeptoren an Myofibroblasten im Bereich der Aortenklappe gefunden (O'Brien et al. 2002). Der Kalzifizierungsprozess der Aortenklappentaschen soll durch eine Differenzierung der Myofibroblasten in Osteoblasten fortschreiten (Caira et al. 2006).

Laut Orłowska-Baranowska et al. (2004) kommt es bei der Aortenklappenstenose zu einer Verengung des Ausflusstraktes des linken Ventrikels (LV). Durch die darauffolgende erhöhte Druckbelastung des linksventrikulären Myokards und dem damit verbundenen myokardialen Stress findet eine reaktive Wandverdickung des linken Ventrikels statt. Wie stark die myokardialen Zellen hypertrophieren, hängt von physiologischen und pathologischen Faktoren ab (Orłowska-Baranowska et al. 2004). Im Verlauf kommt es zu einer kompensatorischen, konzentrischen Hypertrophie des linken Ventrikels, die in eine Herzinsuffizienz münden kann (Grimard et al. 2016).

### 1.2.2 Klinische Manifestation

Zu den Symptomen einer Aortenklappenstenose zählen die Angina Pectoris und Schwindel, sowie die Herzinsuffizienzsymptomatik mit Dyspnoe, systolischer und diastolischer Dysfunktion (Carabello 2013). Sobald Symptome einer hochgradigen Aortenklappenstenose auftreten, verschlechtert sich die Prognose bedeutend. Ohne Behandlung sinkt die Lebenserwartung auf drei Jahre (Carabello 2013). Auskultatorisch ist ein hartes, spätensteigendes systolisches Herzgeräusch, welches in die Karotiden fortgeleitet wird, klassisch (Grimard et al. 2016). Das Herzgeräusch ist über dem rechten zweiten Intercostalraum am lautesten hörbar (Grimard et al. 2016). Abhängig von der untersuchten Population treten mit unterschiedlicher Häufigkeit Komorbiditäten, wie pulmonale Hypertension (47-65 %), Diabetes (20-42 %), Anämien (49-64 %) sowie weitere Organerkrankungen, wie die chronische Nierenerkrankung (3-57 %) und die chronische Lebererkrankung (2-3 %), auf (Lindman and Patel 2016).

### 1.2.3 Therapie

Zurzeit gibt es keine kurative medikamentöse Therapie, die die Prognose einer hochgradigen Aortenklappenstenose bedeutend verbessern oder das Fortschreiten maßgeblich verringern würde (Marquis-Gravel et al. 2016). Die einzige definitive Therapie bei einer behandlungswürdigen Aortenklappenstenose ist bisher der operative oder Katheter-gestützte Klappenersatz (*Transcatheter Aortic Valve Implantation* - TAVI) (Marquis-Gravel et al. 2016; Nishimura et al. 2014; Vahanian et al. 2012). Hierfür hat die Deutsche Gesellschaft für Kardiologie 2016 ein aktualisiertes Positionspapier herausgegeben (Kuck et al. 2016): Bei Patienten > 85 Jahren, bei Patienten mit hohem Risiko (*Society of Thoracic Surgeons* (STS)-Score > 8% oder log. EuroSCORE > 20 %) sowie bei Patienten mit mittlerem Risiko (STS-Score  $\geq$  4–8 % oder log. EuroSCORE  $\geq$  10–20 %) ist die transfemorale TAVI die Erstlinientherapie. Der chirurgische Klappenersatz wird bei Niedrig-Risiko-Patienten (STS-Score < 4 % oder log. EuroSCORE < 10 %) bevorzugt. Die Aufwertung des Katheter-gestützten Klappenersatzes gegenüber dem chirurgischen Klappenersatz lässt sich durch das Ergebnis der PARTNER 1-3 Studien erklären. Bei Hoch-Risiko-Patienten mit hochgradiger AS wurde eine ähnliche 5-Jahres-Sterblichkeitsrate nach Klappenersatz (interventionell: 67,8 %, chirurgisch: 62,4 %) festgestellt (Mack et al. 2015). Bei inoperablen Patienten ist

die TAVI der konservativen Therapie trotz einer erhöhten Inzidenz für Schlaganfälle mit einer Reduktion der 1-Jahres-Sterblichkeit überlegen (Leon et al. 2010). Bei Patienten mit geringem chirurgischem Risiko und einer hochgradigen AS ist die Sterblichkeitsrate sowie die Inzidenz von Schlaganfällen oder Rehospitalisierung nach einem Jahr mit TAVI signifikant niedriger als nach chirurgischem Ersatz (Mack et al. 2019). Aufgrund der neuen Studienlage wurden durch die Deutsche Gesellschaft für Kardiologie und die Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie in einem Konsensuspapier 2020 für das Therapie-Management bei Niedrigrisikopatienten differenziertere Empfehlungen herausgegeben (Kuck et al. 2020): Ein chirurgischer Aortenklappenersatz (AKE) wird bei einem Alter von  $\leq 70$  Jahren weiterhin empfohlen. Bei  $> 75$ -Jährigen und einer für TAVI geeigneten Anatomie (Entscheidung im Herz-Team) wird diese empfohlen (Kuck et al. 2020). Im Alter von 70-75 Jahren ist die Entscheidung individuell unter Bewertung der Lebensperspektive des Patienten durch das Herz-Team zu treffen (Kuck et al. 2020). Die Empfehlung für den chirurgischen Aortenklappenersatz bei Patienten  $\leq 70$  Jahren hängt mit den noch nicht vorhandenen Langzeitdaten für diese Altersgruppe zusammen. Hierbei fehlen vor allem Daten bezüglich der Klappendegeneration auf längere Zeit (Kuck et al. 2020). Außerdem fehlen laut Kuck et al. (2020) Studien bezüglich TAVI bei bikuspiden Aortenklappen, welche bei jüngeren Patienten häufig in Zusammenhang mit der hochgradigen Aortenklappenstenose auftreten. Ein weiteres Kriterium ist die relativ hohe Rate an permanenten Schrittmacherimplantationen nach TAVI (Kuck et al. 2020).

### **1.3 Echokardiografische Einteilung**

Die Aortenklappenstenose wird echokardiografisch in drei Schweregrade unterteilt: Leicht-, mittel- und hochgradig. Nach Nishimura et al. (2014) wird die Aortenklappenstenose wie folgt unterteilt:

Von einem AS-Risiko wird bei einer bikuspiden oder sklerosierten Klappe mit einem maximalen Fluss über der Aortenklappe ( $V_{\max}$ )  $< 2$  m/s bei hämodynamischer Stabilität und Symptomlosigkeit gesprochen. Eine leichtgradige AS wird mit einer Flussgeschwindigkeit von  $V_{\max} = 2,0-2,9$  m/s oder einem Druckgradienten ( $\Delta P_{\text{mean}}$ )  $< 20$  mm Hg über der Aortenklappe bei normaler linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF) definiert. Bei einer mittelgradigen AS erhöht sich die Flussgeschwindigkeit auf  $V_{\max} = 3,0-3,9$  m/s oder der Gradient auf  $\Delta P_{\text{mean}} = 20-39$  mm Hg. Die hochgradige Aortenstenose wird zusätzlich in eine

symptomlose und eine symptomatische Form unterteilt. Generell wird von einer schweren AS gesprochen, wenn  $V_{\max} \geq 4$  m/s oder  $\Delta P_{\text{mean}} \geq 40$  mm Hg ist. Zusätzlich kann eine Aortenklappenstenose planimetrisch über die Aortenklappenöffnungsfläche (*Aortic Valve Area* - AVA) definiert werden. Bei einer hochgradigen Aortenklappenstenose ist die AVA auf  $\leq 1$  cm<sup>2</sup> reduziert. Eine symptomatische AS mit einer AVA  $\leq 1$  cm<sup>2</sup> gilt auch bei nicht erhöhter Flussgeschwindigkeit  $V_{\max} < 4$  m/s und nicht erhöhtem Druckgradienten  $\Delta P_{\text{mean}} < 40$  mm Hg als hochgradig (Nishimura et al. 2014).

#### **1.4 Gebietseingrenzung und Systematisierung**

Im Folgenden wird nur auf die hochgradige symptomatische Aortenklappenstenose genauer eingegangen, da diese Arbeit sich mit den pathologischen Unterschieden verschiedener Subtypen der hochgradigen symptomatischen Aortenklappenstenose auf Myokardebene beschäftigt. Die im Weiteren dargestellten Untersuchungen finden im Rahmen einer größeren Studie statt: „*Sammlung von Biomaterialien zur Untersuchung verschiedener Verlaufsformen der Aortenklappenstenose*“. Ziel dieser Studie ist es mehr über die Pathomechanismen der verschiedenen Verlaufsformen der Aortenklappenstenose sowie deren Folgen, wie Hypertrophie, diastolische Dysfunktion und Herzinsuffizienz zu erfahren, um einen grundlegenden Überblick für mögliche Therapieansätze zu gewinnen. Dies soll durch die Sammlung klinischer Parameter, die Gewinnung von Herzmuskel-Biopsien aus dem linken Ventrikel und folgende histologische und molekularbiologische Untersuchungen sowie morphologische und funktionelle Bildgebung erreicht werden. Dieser Teil der Studie befasst sich vor allem mit dem strukturellen Umbau des Myokards auf Ebene des Tubulus-Netzwerks und der Calcium-Freisetzungseinheiten. Dieser Umbau steht im Zusammenhang mit den Folgen einer Aortenklappenstenose. Diese können sich klinisch als Störungen der kardialen Pumpfunktion bis hin zum Endstadium einer absoluten Herzinsuffizienz darstellen (Wagner et al. 2012; Crossman et al. 2011; Crossman et al. 2015).

Hierfür wurden echokardiografisch vier Subgruppen gebildet, die auch in der *AHA/ACC Guideline* der *American Heart Association* von 2014 beschrieben wurden (Nishimura et al. 2014): Allen gemein ist eine AVA von  $\leq 1$  cm<sup>2</sup>. Die *high-flow/high-gradient* AS mit  $V_{\max} \geq 4$  m/s und  $\Delta P_{\text{mean}} \geq 40$  mm Hg wird unterteilt in **Typ I** mit normaler LVEF und **Typ II** mit reduzierter LVEF  $< 50$  %. Zusätzlich wird **Typ III** als *low-flow/low-gradient* AS mit  $V_{\max} < 4$  m/s und  $\Delta P_{\text{mean}} < 40$  mm Hg

sowie reduzierter LVEF < 50% definiert. **Typ IV** bezeichnet die *paradoxe low-flow/low-gradient* AS, die bei  $V_{max} < 4$  m/s und  $\Delta P_{mean} < 40$  mm Hg eine normale LVEF  $\geq 50$  % zeigt. Hierbei ist der Schlagvolumenindex (SVI) auf  $< 35$  ml/m<sup>2</sup> reduziert. Des Weiteren wurden Proben aus explantierten Spenderherzen als gesunde Vergleichsgruppe (*Non-Failing*-(NF)-Gruppe) mit einbezogen (siehe **Tabelle 1**).

**Tabelle 1:** Übersicht über die verschiedenen Aortenklappenstenose-Subtypen

	High-flow, high-gradient AS		Low-flow, low-gradient AS	Paradoxe low-flow, low-gradient AS
Non-failing	Subtyp I	Subtyp II	Subtyp III	Subtyp IV
Explantierte Spenderherzen	AVA $\leq 1$ cm <sup>2</sup> $V_{max} \geq 4$ m/s $\Delta P \geq 40$ mmHg LVEF $\geq 50$ %	AVA $\leq 1$ cm <sup>2</sup> $V_{max} \geq 4$ m/s $\Delta P \geq 40$ mmHg LVEF < 50 %	AVA $\leq 1$ cm <sup>2</sup> $V_{max} \leq 4$ m/s $\Delta P \leq 40$ mmHg LVEF < 50 %	AVA $\leq 1$ cm <sup>2</sup> $V_{max} \leq 4$ m/s $\Delta P \leq 40$ mmHg LVEF $\geq 50$ %  SVI < 35 ml/m <sup>2</sup> (kleiner LV)
5 Biospien	5 Biospien	5 Biospien	6 Biospien	5 Biospien

AVA = Aortenklappenöffnungsfläche (Aortic valve area)  
 $V_{max}$  = Maximale Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe  
 $\Delta P$  = Mittlerer Gradient über der Aortenklappe  
 LVEF = Linksventrikuläre Ejektionsfraktion  
 SVI = Schlagvolumenindex

Ziel dieser Arbeit ist es den Zusammenhang zwischen struktureller Reorganisation und beginnender Herzinsuffizienz bei hochgradiger Aortenklappenstenose besser zu verstehen und die echokardiografisch unterscheidbaren Subtypen möglicherweise in eine Beziehung miteinander bringen zu können. Lässt sich die Vermutung bestätigen, dass sich die Subtypen II und III aus dem Subtyp I entwickeln? Was unterscheidet den Subtyp IV von den anderen Subtypen? Durch Nutzung spezifischer histologischer Färbungen und Immunfluoreszenzfärbungen sowie konfokaler und *STimulated-Emission-Depletion*-(STED)-Bildgebung (im Folgenden als STED-Nanoskopie definiert, da Auflösungen unterhalb des Mikrometerbereiches erzielt werden) sollen verschiedene Zellparameter untersucht werden. Ein besonderer Fokus wird auf das transversal-axiale Tubulus-Netzwerk (TAT-Netzwerk) sowie den Ryanodinrezeptor-2-Calcium-Freisetzungskanal



(RyR2) gelegt, da diese in aktuellen Herzinsuffizienz-Modellen pathologisch verändert sind (Crossman et al. 2011; Wagner et al. 2012).

#### **1.4.1 Die elektromechanische Kopplung des Herzens**

Der Sinusknoten fungiert als Schrittmacher des Herzens. Von ihm breitet sich die Erregung über die beiden Vorhöfe zum Artrioventrikular-(AV)-Knoten aus und wird über das His-Bündel, die beiden Tawara-Schenkel und zum Schluss über die Purkinje-Fasern auf das Kammermyokard übertragen (Silbernagl und Desopoulos 2012). In der Diastole führt das am Kammermyokard ankommende Aktionspotential an den T-Tubuli zur kurzzeitigen Öffnung des L-Typ-Calciumkanals und folgend zum Einstrom von Calcium ins Zellinnere der Herzmuskelzellen. Durch den Anstieg des zytosolischen Calciums von 100 nM auf  $\sim 10 \mu\text{M}$  werden die RyR2-Calcium-Freisetzungskanäle des junktionalen Sarkoplasmatischen Retikulum (jSR) durch Calcium induzierte Calcium-Freisetzung geöffnet (Prosser et al. 2010). Die Calcium-Freisetzung aus dem jSR amplifiziert dabei das Calcium-Signal (Prosser et al. 2010). Durch die Bindung der Calciumionen an Troponin-C wird eine Konformationsänderung im Troponin-/Tropomyosinkomplex ausgelöst, welche eine Interaktion von Myosin mit Aktin bewirkt und die Kontraktion der Herzmuskelzelle auslöst (Kushnir und Marks 2010). Das Calcium wird durch SERCA-(Sarcoendoplasmatische Calcium-ATPase)-2a wieder in das sarkoplasmatische Retikulum gepumpt oder durch den Natrium/Calcium-Austauscher wieder aus der Zelle befördert (Kushnir und Marks 2010). Der gesamte Prozess der elektrischen Aktivierung von Herzmuskel und -zelle wird allgemein als Erregungs-Kontraktions-Kopplung beschrieben (Eisner et al. 2017).

#### **1.4.2 Bekannte myokardiale Veränderungen bei Herzinsuffizienz**

Um das Aktionspotential in das Zellinnere zu leiten und die elektromechanische Kopplung zu aktivieren, ist das Tubulussystem der Herzmuskelzellen von zentraler Bedeutung. Das Tubulussystem besteht aus komponentenartigen Invaginationen der Zellmembran (Hong and Shaw 2017). Diese Membraninvaginationen bilden ein komplexes Netzwerk aus transversalen Z-Linien-assoziierten Tubuli, die innerhalb des Zytoplasmas durch axiale Tubuli miteinander verbunden sind (Hong and Shaw 2017). Dieses Membransystem ist besonders reich an Ionenkanälen, die für die elektromechanische Kopplung und die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials verantwortlich sind (Hong and Shaw 2017). Jayasinghe

et al. (2009) beschreiben das Tubulussystem in den ventrikulären Kardiomyozyten vor allem als Querreihungen transversal gerichteter Tubuli, welche frequentiell durch axiale Tubuli verbunden sind.

Bei vielen Pathologien des Herzens ist das Tubulussystem verändert. Im Maus-Modell konnten Wagner et al. (2012) die Veränderungen des Tubulusnetzwerks nach Myokardinfarkt bestätigen. Es fand eine qualitativ veränderte Organisation des Tubulusnetzwerks statt. Der Anteil transversaler Tubuli (TT) reduzierte sich bei gleichzeitiger Zunahme axialer Komponenten, zusätzlich waren dilatative Prozesse zu beobachten (Wagner et al. 2012). Bei Herzinsuffizienz konnten ähnliche Prozesse nachgewiesen werden. Crossman et al. (2011) wiesen an humanen Kardiomyozyten von Patienten mit idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie einen Wechsel der Orientierung des Tubulusnetzwerks hin zu mehr axialen Elementen nach. Crossman et al. (2015) konnten einen funktionellen Zusammenhang zwischen einer Abnahme transversaler Tubuli in humanen Kardiomyozyten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und einer verminderten Kontraktionskraft bestimmter Herzmuskelabschnitte feststellen. Louch et al. (2004) beschreiben den Zusammenhang einer reduzierten Synchronizität der Calcium-Freisetzung in humanen Kardiomyozyten verschiedener Arten von Herzinsuffizienz (ischämisch, dilatativ und nach kongenitaler Herzklappenerkrankung) und der Abnahme der transversalen Tubulus-Dichte. Es wurde die Vermutung aufgestellt, dass eine verminderte Synchronizität der RyR2-Calcium-Freisetzung zum Verlust der elektrochemischen Kopplung bei Herzinsuffizienz beiträgt (Louch et al. 2004).

Zusätzlich gibt es Veränderungen des RyR2-Kanals bei Herzinsuffizienz. Peng et al. (2016) beschreiben den kardialen RyR2-Kanal als > 2 mDa großen Homotetramer, der aus vier identisch großen Protomeren besteht. Jedes Protomer besteht aus einer zytoplasmatischen Region mit über 4500 Untereinheiten und einer Carboxy-Terminalen Transmembran-Pore (Peng et al. 2016). Die zytoplasmatischen Regionen dienen als Gerüst für Wechselwirkungen mit verschiedenen Liganden und Proteinmodulatoren (Peng et al. 2016). Die Transmembran-Pore wird durch sechs alpha-Helices (S1-S6) per Protomer geformt, welche zentral einen Calciumkanal bilden (S5-S6) (Des Georges et al. 2016). Bei einer geringen zytosolischen Calciumkonzentration (100-200 nM) ist der RyR2-Kanal normaler-

weise geschlossen, Calcium in submikromolarer Konzentration bindet an die zytosolische RyR2-Domäne und erhöht signifikant die Öffnungswahrscheinlichkeit (Santulli et al. 2018). Die Aktivität beziehungsweise Öffnungswahrscheinlichkeit ( $P_o$ ) des Kanals ist bei  $\sim 10 \mu\text{M}$  zytosolischer Calcium-Konzentration quasi maximal (Santulli et al. 2018). Eine weitere unphysiologische Erhöhung führt zu einer Abnahme der RyR2- $P_o$  (Santulli et al. 2018). Der Großteil der RyR2-Kanäle ist in unmittelbarer Nähe transversaler Tubuli und 1,6 % nahe axialer Tubuli lokalisiert, circa 16 % kommen solitär in der Zelle vor (Jayasinghe et al. 2009).

In Herzinsuffizienz-Studien wurde eine vermehrte Entkopplung der RyR2-Rezeptoren vom Tubulussystem beschrieben (Dries et al. 2018; Wagner et al. 2012; Song et al. 2006). Dries et al. (2018) zeigten eine vermehrte spontane Aktivität der solitären Calcium-Freisetzungskanäle anhand eines Schweine-Modells mit durch Myokardinfarkt ischämisch bedingter Kardiomyopathie und an humanen Herzen mit ischämischer und dilatativer Kardiomyopathie. In dieser Studie wurde eine Abhängigkeit der spontanen Aktivität von RyR2-Kanälen von der Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII)-Phosphorylierung und der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies- (*Reactive Oxygen Species* - ROS)-Produktion nachgewiesen (Dries et al. 2018). Anhand eines Modells mit spontan-hypertensiven Ratten zeigten Song et al. (2006) eine ähnliche Separierung einiger RyR2-Cluster bei Herzinsuffizienz. Laut Dries et al. (2018) führt die Desynchronität der zusätzlich vom Tubulussystem separierten Calciumfreisetzungskanäle zu einer reduzierten Amplitude der Calciumfreisetzung, einer Verlängerung der Freisetzungsdauer sowie Erregungsrückbildung und einer verminderten Calcium-Speicherung im sarkoplasmatischen Retikulum. Folgen können eine verminderte Kontraktionskraft des Herzens und eine größere Anfälligkeit für arrhythmogene Ereignisse sein (Dries et al. 2018).

Galice et al. (2018) wiesen eine Verbindung zwischen einer zunehmenden RyR2-Clustergröße und der Tendenz zu pathologischen diastolischen Calcium-Freisetzungseignissen in ventrikulären Kardiomyozyten nach. Macquaide et al. (2015) hingegen beschrieben eine stärkere Tendenz zu spontanen Calcium-Freisetzungseignissen bei zunehmender RyR2-Cluster-Fragmentation in atrialen Kardiomyozyten. Hierbei stehen jedoch einige dieser fragmentierten RyR2-Cluster noch (aufgrund der unmittelbaren Diffusions-Nähe der RyR2-Kanäle) in einem

funktionellem Zusammenhang miteinander und bilden so funktionelle Calciumfreisetzungseinheiten, die eine gesteigerte Wahrscheinlichkeit für Calcium-Freisetzungseignisse haben (Macquaide et al. 2015; Walker et al. 2014). Die Studien weisen einen Zusammenhang zwischen einer veränderten Größe molekular definierter Calcium-Freisetzungseinheiten und einer gesteigerten lokalen Calcium-Freisetzung in RyR2-Clustern beziehungsweise einem gesteigerten arrhythmogenen Risiko nach.

Wir untersuchen die Hypothese, dass möglicherweise durch den stark erhöhten Druckgradienten im linken Ventrikel bei einer schweren Aortenklappenstenose ähnliche Prozesse ausgelöst werden, die eine molekulare und zelluläre Erklärung für unterschiedliche Phänotypen des kardialen Umbaus bis hin zur Herzinsuffizienz als Ansatz liefern.

## 2 Material und Methoden

Zur Untersuchung der verschiedenen AS-Subtypen wurden 21 Biopsien von Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose während eines Katheter-gestützten transfemorale Aortenklappenersatzes (TAVI) entnommen. Zusätzlich wurden fünf *Non-Failing*-Proben aus gesundem Herzmuskelgewebe von explantierten Spenderherzen als Kontrollgruppe mit einbezogen. Durch die der TAVI vorausgegangenen transthorakalen und ösophagealen echokardiografischen Untersuchungen konnten die entnommenen Biopsien den entsprechenden AS-Subtypen zugeteilt werden. Hierbei wurden jeweils fünf Biopsien den Subtypen I, II und IV sowie sechs Biopsien dem Subtyp III zugeordnet.

Die Entnahme sowie die weitere Prozessierung der Proben fanden im Rahmen des Ethikantrages „*Sammlung von Biomaterialien zur Untersuchung verschiedener Verlaufsformen der Aortenklappenstenose*“ (Ethikantrag-Nummer: 10516) statt. Einschlusskriterien hierbei waren eine hochgradige Aortenklappenstenose oder -insuffizienz, die interventionell oder chirurgisch ersetzt werden sollte sowie die schriftliche Einwilligung des Patienten. Von der Studie ausgeschlossen wurden nicht einwilligungsfähige Patienten sowie Patienten mit fehlender Einwilligung. Zusätzlich wurden Patienten mit folgenden Kriterien ausgeschlossen: Niereninsuffizienz mit GFR (glomerulärer Filtrationsrate) < 30 ml/min, mit schweren Gerinnungsstörungen sowie dem Nachweis eines linksventrikulären Thrombus.

Im Rahmen des Ethikantrages wurden 120 Patienten in die Studie eingeschlossen. Jedem der Patienten wurden bei der TAVI fünf Herzmuskelbiopsien von 2-3 mm Durchmesser entnommen. Alle Biopsien werden über die *Biobank der Universitätsmedizin Göttingen* zentral verwahrt und verwaltet und an entsprechende Forschungsgruppen für weitere Analysen nach Absprache mit dem Studien-Komitee herausgegeben. 26 Biopsien verschiedener Patienten wurden im Rahmen dieses Forschungsvorhabens bei Katheter-gestützten Aortenklappenimplantationen im Zeitraum vom Juli 2017 bis September 2019 entnommen und direkt nach Entnahme weiterprozessiert.

Die Daten der verwendeten Geräte, Softwares, Antikörper und Materialien sind im Anhang aufgelistet (siehe **Tabelle A1-7**).

## **2.1 Prozessierung der Proben**

Nach Entnahme wurden die Biopsien über Nacht in 5 ml einer 4 % phosphatgepufferten Formaldehydlösung (Roti®-Histofix) fixiert. Danach wurden die Biopsien in einer Einbettkassette über 6 h unter fließendem Leitungswasser von dem Fixiermedium befreit. Im Einbettautomaten folgte der Entwässerungsprozess mit aufsteigender Alkoholreihe und Überführen der Proben in das Intermedium Chloroform und schließlich das Einbetten der Proben in Paraffin. Hierbei wurde versucht die Biopsien in Längsorientierung des Myokards einzubetten, um möglichst viele längsangeschnittene Herzmuskelzellen für weitere Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Mit dem Mikrotom wurden aus den einzelnen Proben 5 µm dünne Paraffinschnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Die durchschnittliche Biopsiefläche nach Fixierung, Schnitt und aufbringen auf die Objektträger beträgt durchschnittlich ca.  $0,8 \pm 0,2 \text{ mm}^2$  (n=13, Vermessung der ersten 13 erhaltenen Biopsien). Je nach Größe und Beschaffenheit der Biopsien stehen ungefähr 50-200 Paraffinschnitte für mikroskopische und strukturelle Untersuchungen zur Verfügung.

## **2.2 Färbung der Paraffinschnitte**

### **2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zur Übersicht und um die Zellorientierung festzustellen wurden Hämatoxylin-Eosin-(HE)-Färbungen angefertigt. Diese wurden zusätzlich zur Zellkernbestimmung genutzt.

Zunächst wurden die Schnitte 2 x 5 min in Xylol entparaffinisiert. Es folgte eine Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe (2 x 100 %, 2 x 90 %, 1 x 70 %, 1 x 50 %, 1 x 30 % Ethanol je 2 min und in destilliertem Wasser 2 min). Der anschließende Schritt war die eigentliche Zellkernfärbung mit dem basischen Farbstoff Hämatoxylin für 7 min, gefolgt vom Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser und dem Bläuen unter fließendem Leitungswasser. Danach wurden die Schnitte für 3 min in den zweiten sauren Zytoplasma-Farbstoff Eosin getaucht. Es folgte abschließend die Differenzierung und Dehydrierung mittels aufsteigender Alkoholreihe (80 %, 96 % Ethanol für je 1 min, 2 x 100 % Ethanol für je 2 min) sowie das Überführen in das Intermedium Xylol für 2 x 5 min. Es wurde ein Eindeckmedium auf Toluol-Basis (Cytoseal 60) verwendet.

### 2.2.2 Sirius-Red/Fast-Green-Färbung

Die *Sirius-Red/Fast-Green*-(SR/FG)-Färbung ist eine Kollagenfärbung und wurde verwendet um den Fibroseanteil der einzelnen Biopsien ermessen zu können. Hierbei bindet Sirius-Red an die  $[Gly-X-Y]_n$  Helixstruktur auf fibrillärem Kollagen und Sirius-Green an die nicht-kollagenösen Proteine des Gewebes (Chondrex 2019).

Zum Entparaffinisieren wurden die Schnitte für 2 x 5 min in Küvetten mit Xylol überführt. Die Rehydrierung mittels absteigender Alkoholreihe (2 x 100 %; 1 x 90 %; 1 x 70 %; 1 x 50 %; 1 x 30 % Ethanol je 5 min und in destilliertem Wasser 5 min) folgte. Die Färbung erfolgte mittels 200 µl Färbelösung (SR/FG *Kollagen Staining Kit*), die direkt auf die Schnitte pipettiert und dort für 30 min belassen wurde. Anschließend wurde der Überstand entfernt und die Proben kurz mit 0,5 ml destilliertem Wasser gespült. Abschließend wurde das Gewebe mittels aufsteigender Alkoholreihe (2 x 96 %, 2 x 100 % Ethanol je 4 min) dehydriert und in das Intermedium Xylol (2 x 4 min) überführt. Es wurde ein Eindeckmedium auf Toluol-Basis (Cytoseal 60) verwendet.

### 2.2.3 Konjugation von Weizenkeim-Agglutinin mit *NHS-STAR 488*

Um Weizenkeim-Agglutinin (WGA) als Marker für die Zellmembran und die Tubuli-Strukturen der Kardiomyozyten nutzen zu können, wurde es mit einem Aminreaktiven Succinimidylester-(NHS)-Farbstoff gekoppelt.

Genutzt wurde unkonjugiertes WGA und der *NHS-STAR 488* Farbstoff. Zur Aufreinigung wurde eine Gelsäule auf Polypropylen- und Polyethylen-Basis (PD Miditrap G-25) verwendet. Das WGA wurde in einem Verhältnis von 2 mg/ml in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) unter Zusatz von Natriumhydrogencarbonat-Puffer (Verhältnis 20/1, pH-Wert: 8,3) gelöst. Der Ester-Farbstoff (STAR 488) wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (1 mg Farbstoff/192 µl DMSO). 640 µl WGA-Lösung wurden mit 18,2 µl Farbstofflösung vermischt und für 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl 0,5 M Tris-Puffer-HCl-Lösung (pH-Wert: 7,4) konnte die Reaktion gestoppt werden. Abschließend erfolgte die Aufreinigung über der mittels PBS equilibrierten Gelsäule. Das Gemisch wurde auf die Säule gegeben und mit PBS eluiert. Die erste Lauffront wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgefangen und die jeweiligen Fraktionen zur Stabilisierung mit 0,05 % Rinderserumalbumin (*Bovine serum albumin*-BSA) versetzt.

## 2.2.4 Immunfärbungen

Für immunhistologische Färbungen erfolgte zunächst ein Entparaffinisierungs- und Rehydrierungsprozess mittels Xylol (2 x 7 min) und absteigender Alkoholreihe (2 x 100 %; 2 x 90 %; 1 x 70 %; 1 x 50 %; 1 x 30 % Ethanol je 5 min und in destilliertem Wasser 5 min). Zum Aufbrechen möglicher Quervernetzungen, die durch den Fixierungsprozess entstanden sind, wurde eine Epitop-Demaskierung mittels Citratpuffer durchgeführt. Hierzu wurde zehnfach konzentrierter Citratpuffer im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und die Paraffinschnitte für 40 min bei mindestens 97 °C in der Mikrowelle inkubiert. Nach dem Abkühlen erfolgte das Spülen der Schnitte mit PBS (3 x 5 min). Auf die Schnitte wurde für 1 h in einer feuchten Kammer jeweils 200 µl Blockpuffer (4 % BSA, 0,1 % Triton-X100 in PBS) gegeben. Danach wurden die zwei Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:250 (Anti-Cav3(Caveolin-3)) und 1:100 (Anti-RyR2) sowie das bereits konjugierte WGA (Verdünnung 1:100) in eine PBS-Lösung mit 4 % BSA gegeben und zu jeweils 400 µl auf die Schnitte aufgetragen. Die Primärantikörper wurden über Nacht auf den in einer feuchten Kammer gelagerten Schnitten inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte nach einem erneuten Waschschrift mittels PBS (3 x 5 min) die Inkubation mit den Sekundärantikörpern STAR 580 und STAR 635P (1:300 Verdünnung in PBS-Lösung mit 4 % BSA pro Schnitt, 400 µl für 2 h in feuchter Kammer). Abschließend wurden die Schnitte erneut in PBS gespült (3 x 5 min) und dann mit einem Einbettmedium auf Glycerin-Basis (*Pro Long Gold*) eingebettet. Nachdem das Einbettmedium getrocknet war, wurden die Deckgläser am dritten Tag mit Nagellack versiegelt.

### 2.2.4.1 Ryanodin-2-Caveolin-3-WGA-Dreifachfärbung

Bei dieser Färbung wurde das mit dem *STAR 488* Farbstoff gekoppelte WGA verwendet. Dieses bindet an Sialinsäure und *N*-Acetylglucosamin-reiche Glykolisierungen und dient somit zur Darstellung der Zellmembran und des Tubulusnetzwerkes der Kardiomyozyten (Peters et al. 1979). Zusätzlich wurden die Primärantikörper Anti-RyR2 zur Darstellung des Ryanodin-Rezeptors Typ 2 und Anti-Cav3 zur Darstellung von Caveolin-3 genutzt. Caveolin-3 ist ein membranständiges Strukturprotein, welches in Muskelzellen exprimiert und mit wichtigen Funktionen der Herzmuskelzelle z.B. Caveolae-Membraninvaginationen in Verbindung gebracht wird (Gratton et al. 2004). Caveolin 3 ist auch an der Entstehung des Tubulus-Systems beteiligt (Parton et al. 1997). Die Primärantikörper



wurden im Färbeprozess mit den Sekundärantikörpern und Fluorophoren STAR 635P und STAR 580 gekoppelt.

## **2.3 Mikroskopie und Bildgebung**

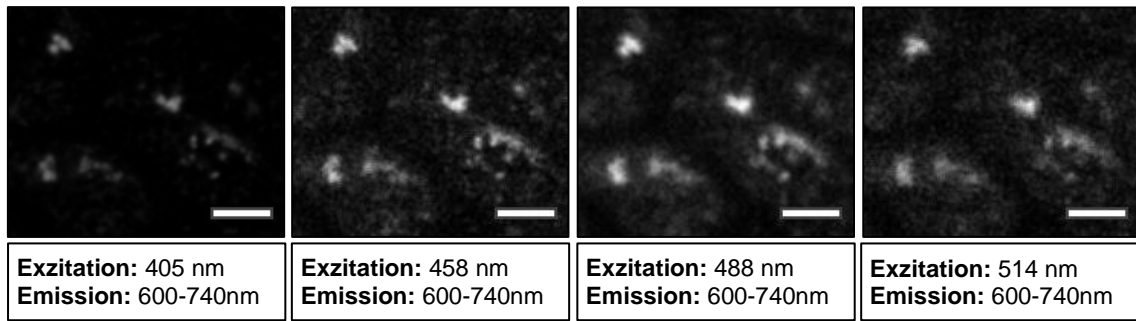
### **2.3.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen**

Mittels der Mikroskopkamera *Axiocam 105 Color* von Zeiss wurden sowohl Aufnahmen von den Hämatoxylin-Eosin-gefärbten als auch den *Sirius-Red/Fast-Green*-gefärbten Schnitten angefertigt. Hierbei wurde mit dem 10-x-Objektiv jeweils eine Übersichtsaufnahme angefertigt. Zusätzlich wurden Bilder mit dem 20-x- und 40-x-Objektiv aufgenommen, um Detailaufnahmen von sowohl transversal als auch longitudinal angeschnittenen Zellen zu erhalten.

### **2.3.2 Lipofuscin-Autofluoreszenz-Aufnahmen**

Lipofuscin lagert sich gehäuft in postmitotischen alternden Zellen, wie Neuronen und Kardiomyozyten ab (Brunk und Terman 2002). Es besteht aus akkumulierten Lipid- und Proteinresten, die zum Beispiel mit erhöhtem oxidativem Stress und dem Untergang destrukturierter Mitochondrien in Verbindung gebracht werden (König et al. 2017). Lipofuscin wird auch als Alterspigment bezeichnet und es soll einen Zusammenhang zwischen einer verminderten Autophagiefähigkeit alternder Zellen und der Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien innerhalb dieser Zellen bestehen (Leon and Gustafsson 2016). Die akkumulierten Proteine und Lipide haben, je nach Verbindung und Oxidationsgrad und Variabilität der Zusammensetzung, die Fähigkeit als endogenes Fluorophor zu wirken.

Diese Autofluoreszenz der Lipofuscinbestandteile ist vor allem im gelb-rötlichen Wellenlängenbereich sichtbar (Croce and Bottiroli 2014). Diese Fähigkeit kann zur Detektion und Messung des Lipofuscinanteils innerhalb der Zellen verwendet werden (Croce and Bottiroli 2014). Für die Bestimmung des Lipofuscingehaltes der Herzmuskelzellen wurde diese Autofluoreszenz der Lipofuscinaggregate genutzt. Hierbei wurden zunächst unterschiedliche Anregungswellenlängen und Emissionsspektren an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 getestet (siehe **Abbildung 1**).



**Abbildung 1:** Lipofuscinautofluoreszenz bei Anregung mit verschiedenen Lichtspektren. Oben: Konfokale Bildgebung eines definierten Bereichs von kardialen Herzmuskelgewebe. Maßstab: 10 µm. Unten: Zugehörige Anregungsspektren von 405 nm, 458 nm, 488 nm und 514 nm bei einem definierten Emissionsbereich von 600-740 nm. Bei einer Anregung mit 405 nm ist die Darstellung des Lipofuscins und die Abgrenzung zum restlichen Gewebe am deutlichsten.

Dabei konnte bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und einem Emissionsspektrum von 600-740 nm das Lipofuscin am besten dargestellt werden, ohne dass der Hintergrund beziehungsweise weitere Zellbestandteile zeitgleich angeregt und detektiert wurden. Für die Aufnahmen wurde das EC Plan-Neofluar 20 x/0.50 M27 Objektiv verwendet und es wurden möglichst longitudinal angechnittene Zellen aufgenommen. Es wurde eine Laserstärke von 2 % genutzt. Die Aufnahmen haben eine Pixelgröße von 0,21 µm x 0,21 µm bei einer Bildgröße von 425,1 µm x 425,1 µm. Die Bilder wurden mit der herstellereigenen Software ZEN 2009 (Zeiss) verarbeitet und als „.lsm“-Dateien abgespeichert. Für die weitere Analyse wurden die Bilder mittels Fiji in „.tif“-Dateien konvertiert.

### 2.3.3 Aufnahmen der Immunfärbungen am STED Mikroskop

Zur Nanoskopie dreifach-immungefärbter, myokardialer Gewebeschnitte wurde ein Leica TCS SP8 Setup und ein HC PL APO C2S 100x/1.40 Öl Objektiv verwendet. Das Mikroskop wurde sowohl im konfokalen (keine Nutzung des STED-Lasers) als auch im STED-Modus eingesetzt. Durch die STED Mikroskopie können Bilder unterhalb der bisherigen Auflösungsgrenze (Abbe-Limit) aufgenommen werden. Laut Klar et al. (2000) wird diese verbesserte Auflösung erreicht, indem durch STED alle peripher angeregten Fluorophore in einem konfokal angeregten punktförmigen Volumen mit einem Donut-förmigen STED-Laserstrahl mit zentralem Intensitäts-Minimum inaktiviert werden und so deren Emission Intensitäts-abhängig ausgeschaltet wird. Der STED-Laserstrahl bewirkt eine Anregung der peripheren Moleküle auf ein höheres energetisches Schwingungsniveau gefolgt von einer gezielten Deaktivierung durch STED, sodass die laterale Auflösung in XY um ein Vielfaches verbessert wird (Klar et al. 2000).

### 2.3.3.1 Konfokales Imaging

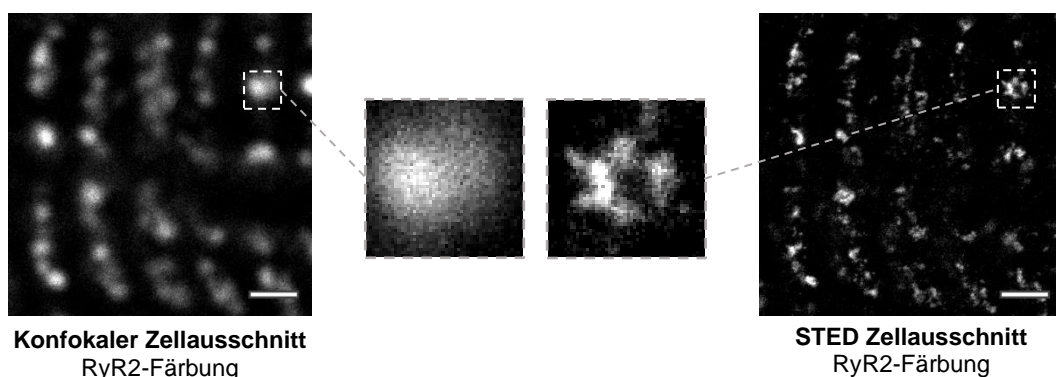
WGA-Kanal: STAR 488 wurde bei einer Wellenlänge von 500 nm mit einer Laserstärke von 0,4 % angeregt und bei 510-560 nm detektiert.

RyR2-Kanal: STAR 635P wurde bei einer Wellenlänge von 635 nm mit einer Laserstärke von 2 % angeregt und bei 650-700 nm detektiert.

Es wurden für die Bestimmung des Zelldurchmessers und -umfanges Bilder im WGA-Kanal mit einer Pixelgröße von 151,52 nm x 151,52 nm und einer Bildgröße von 155 µm x 155 µm aufgenommen. Hierbei wurde darauf geachtet, möglichst transversal angeschnittene Herzmuskelzellen zu erfassen. Für die TAT-Netzwerkanalyse und die Analyse der Regelmäßigkeit der RyR2-Cluster mittels Fast-Fourier-Transformation (FFT) wurden Bilder longitudinal angeschnittener Herzmuskelzellen bei einer Pixelgröße von 114 nm x 114 nm und einer Bildgröße von 116,25 µm x 116,25 µm sowohl im WGA-Kanal (TAT-Netzwerkanalyse) als auch im RyR2-Kanal (Regelmäßigkeit der RyR2-Cluster mittels FFT) aufgenommen.

### 2.3.3.2 STED Bildgebung für die RyR2-Clusteranalyse

Für die RyR2-Clusteranalyse wurde die *STimulated-Emission-Depletion*-Technologie des Mikroskops verwendet, da so auf RyR2-Cluster-Ebene eine deutlich bessere Auflösung erzielt werden kann, durchschnittlich bis auf 60 nm (Wagner et al. 2012). In **Abbildung 2** ist anhand eigener Aufnahmen die deutlich höhere Auflösung der STED-Mikroskopie verglichen mit der konfokalen Mikroskopie ersichtlich.



**Abbildung 2:** Vergleich konfokaler Mikroskopie und STED Mikroskopie.

Links: Konfokal aufgenommene RyR2-Cluster innerhalb eines humanen linksventrikulären gewebebeständigen Kardiomyozyten, rechts: Aufnahme des gleichen Bereichs mit STED-Nanoskopie. Maßstab: 1 µm. Eine deutlich verbesserte Auflösung der STED-Nanoskopie ist erkennbar. Dies wird besonders bei Betrachtung des Detailausschnittes eines RyR2-Clusters (Mitte) deutlich.

Für die STED-Nanoskopie wurden Bilder mit einer Pixelgröße von 16,23 nm x 16,23 nm und einer Bildgröße von 16,61 µm x 16,61 µm aufgenommen. Für die Aufnahmen wurden folgende weitere Einstellungen verwendet: *Pixel dwell time* (Pixelverweildauer) 400 ns, *Scanning speed* (Scangeschwindigkeit) 600 Hz, *Line averaging* („Linienmittelung“) 32 x.

RyR2-Kanal: STAR 635P wurde bei einer Wellenlänge von 635 nm angeregt mit einer Laserstärke von 12 % und bei 650-700 nm detektiert. Der STED 775 Laser wurde mit einer Leistung von 50 % genutzt.

Cav3-Kanal: STAR 580 wurde bei einer Wellenlänge von 580 nm angeregt mit einer Laserstärke von 18 % und bei 600-630 nm detektiert. Der STED 775 Laser wurde mit einer Leistung von 50 % genutzt.

## **2.4 Bildanalysen**

Alle Bildanalysen wurden mithilfe der *Open-Source-Software* Fiji (basierend auf Image J) durchgeführt (Schindelin et al. 2012). Hierzu wurden die aufgenommenen Bilder importiert und als Tif-Datei abgespeichert.

### **2.4.1 Bestimmung der Myozytenkernzahl pro Fläche und Gesamtkernzahl**

Zur Kernzahlbestimmung wurden 562.81 µm x 422.11 µm große Zellausschnitte der HE-Färbungen (20-x-Objektiv) jeder Biopsie genutzt. Hierbei wurde auf eine transversale Orientierung der Kardiomyozyten geachtet. Nun wurden Myozytenkerne und die Kerne der die Herzmuskelzellen umgebenden Matrix (Fibrozyten, Endothelzellen) separat ausgezählt. Bei den Berechnungen wurden die Myozytenkerne zunächst im Verhältnis zur Gewebefläche betrachtet und dann im Verhältnis zur Gesamtkernzahl.

### **2.4.2 Bestimmung des Zellquerschnitts**

Zur Bestimmung des Zellquerschnittes wurden die 155,15 µm x 155,15 µm konfokalen Aufnahmen transversal angeschnittener, mit WGA gefärbter, Kardiomyozyten verwendet. Hierbei wurden manuell die Zellquerschnitte vermessen und ROIs (*Regions of Interest*) generiert, mithilfe derer Fläche und Perimeter sowie kleinster und größter Durchmesser kalkuliert wurden. Es konnten je nach Biopsiegröße und Anschnittsfläche ca. 21-94 Zellen vermessen werden.

### 2.4.3 Bestimmung des interstitiellen Fibroseanteils

Zur Bestimmung des interstitiellen Fibroseanteils wurden von jeder Biopsie repräsentative Ausschnitte (Größe:  $93152 \pm 6622 \mu\text{m}^2$ ) von Arealen transversal angeschnittener Kardiomyozyten der SR/FG-Färbungen analysiert.

Hierfür wurde zunächst mithilfe des Befehls *"Measure"*, die Fläche des Areals bestimmt. Das RGB-Bild wurde mittels der Funktion *„Split Channels“* in seine drei Kanäle aufgeteilt. Zur Fibroseberechnung wurde der grüne Kanal ausgewählt.

Durch Erzeugen eines *Thresholds* wurde das Bild binarisiert:

```
setAutoThreshold("Default");  
run("Threshold...");  
setThreshold(0, 110);
```

Mit dem Befehl *„Measure“* konnte daraufhin die Fibrosefläche bestimmt werden. Die Gesamtfläche wurde abschließend zu der Fibrosefläche ins Verhältnis gesetzt, um den prozentualen Fibroseanteil zu ermitteln.

### 2.4.4 Bestimmung des Lipofuscinanteils

Zur Bestimmung des Lipofuscinanteils wurde pro Biopsie durchschnittlich eine Fläche von  $157787 \pm 65165 \mu\text{m}^2$  longitudinal angeschnittener Kardiomyozyten untersucht. Wie bei der Fibroseberechnung wurde zunächst die Fläche kalkuliert und dann das RGB-Bild in seine drei Kanäle aufgetrennt. Hier wurde nun zur weiteren Berechnung der rote Kanal ausgewählt.

Das Bild wurde invertiert und mittels eines *Thresholds* binarisiert:

```
setAutoThreshold("Default");  
run("Threshold...");  
setThreshold(0, 160);
```

Mit der Funktion *„Measure“* wurde die Lipofuscinfläche bestimmt. Die Lipofuscinfläche zur Gesamtfläche gibt den prozentualen Lipofuscinanteil wieder. Leider gab es möglicherweise fixations- oder auch gewebebedingt Unterschiede in der allgemeinen Helligkeit der Proben. Durch die daraus resultierende unterschiedliche Helligkeit der Aufnahmen musste bei der Hälfte der Proben eine individuelle Anpassung des Bildmaximums (*Adjust: Brightness&Contrast*) stattfinden.

Um den prozentualen Lipofuscingehalt auf die divergierenden Herzmuskelzellgrößen der Subtypen anzupassen, wurden die ermittelten Ergebnisse noch ins Verhältnis mit den entsprechenden Werten der Zellquerschnittsflächen gesetzt (siehe 2.4.2).

#### 2.4.5 Segmentierung des transversal-axialen Tubulus-Netzwerks

Zur Analyse des TAT-Netzwerks wurde ein eigens entwickeltes, standardisiertes und kürzlich publiziertes Protokoll als Bildanalyse-*Workflow* verwendet (Wagner et al. 2014). Die genutzten Werte der einzelnen Schritte wurden für die TAVI-Biopsien geringfügig angepasst. Für die Analyse wurden passende ROIs generiert, die das Zellinnere longitudinal angeschnittener Zellen beinhalten. Sowohl die Zellmembran als auch Zellkerne wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Um das Tubulus-Netzwerk für die weiteren Berechnungen binarisiert darzustellen, wurden mehrere Befehle hintereinander ausgeführt:

```
run("Subtract Background...", "rolling=5");
run("Enhance Local Contrast (CLAHE)", "blocksize=49 histogram=256
    maximum=3 mask=*None*");
run("Smooth");
run("Statistical Region Merging", "q=100 showaverages");
run("8-bit");
setAutoThreshold("Default");
setThreshold(75, 255);
setOption("BlackBackground", false);
run("Convert to Mask");
```

Das binärisierte Bild wurde abschließend skeletonisiert, um das so entstandene Tubulus-Skelett mit dem entsprechenden Plugin (*Analyze Skeleton (2D/3D)*) zu analysieren.

```
run("Skeletonize (2D/3D)");
run("Analyze Skeleton (2D/3D)", "prune=none");
```

Durch diese Fiji-Kommandos erhält man die Anzahl der Tubulus-Äste, die Tubulus-Länge sowie die Anzahl der Tubulus-Kreuzungen. Durch das Addieren aller Tubulus-Äste mit ihrer Länge konnte die Gesamtlänge des TAT-Netzwerks der

entsprechenden Zelle ermittelt werden. Die Dichte des TAT-Netzwerks wurde durch das Teilen der TAT-Netzwerk-Gesamtlänge durch die Mithilfe der ROIs ermittelten Flächen der einzelnen Zellen berechnet. Die Summe aller Äste multipliziert mit ihrer durchschnittlichen Astlänge und geteilt durch die Anzahl aller Äste ergibt die durchschnittliche Astlänge der Tubuli einer Zelle.

#### 2.4.6 Analyse der Tubulus-Ausrichtung

Zusätzlich wurde die Ausrichtung der Tubuli in Bezug auf die longitudinale Zellachse analysiert. Hierfür wurde folgender Befehl auf das skeletonisierte Bild angewendet:

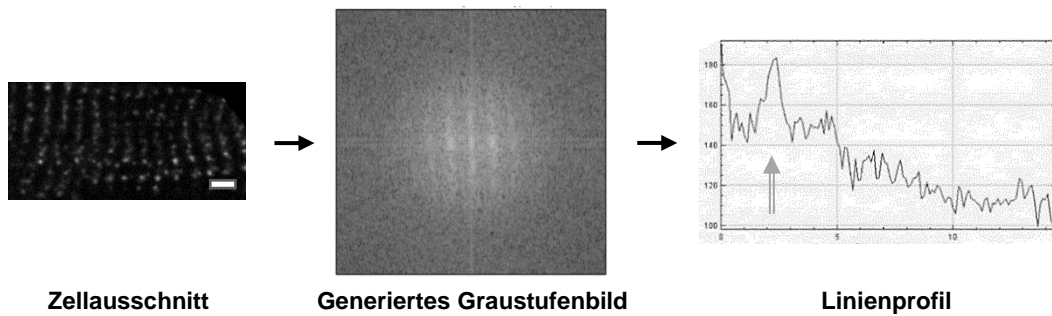
```
run("Directionality", "method=[Fourier components] nbins=180 histogram=-45  
display_table");
```

Mithilfe dieses Plugins konnten die Ausrichtung der Tubuli verglichen mit der longitudinalen Zellachse und die prozentuale Verteilung der Tubuli innerhalb einer Zelle ermittelt werden. Diese Verteilung stellt sich als zweigipflig verteiltes Histogramm dar.

Als axiale und damit parallel zur Zellachse verlaufende Tubuli wurden Strukturen von  $0 \pm 10^\circ$  definiert. Als oblique und damit schräg zur Zellachse gelegene Tubuli wurden Strukturen von  $45 \pm 10^\circ$  definiert. Transversale Tubuli sind dagegen senkrecht zur Zellachse ausgerichtet und werden als Strukturen von  $90 \pm 10^\circ$  definiert.

#### 2.4.7 Analyse der Periodizität der RyR2-Cluster-Streifung

Für diese Analyse der RyR2-Cluster-Streifung wurden Bildausschnitte longitudinal verlaufender Herzmuskelzellen im Format  $20,45 \mu\text{m} \times 10,23 \mu\text{m}$  ausgewählt. Hierbei wurden möglichst strukturell gut erhaltene, zellmembran- und kernfreie Zellabschnitte manuell ausgewählt. Um die Periodizität der RyR2-Cluster-Streifung zu untersuchen, war eine vorherige genaue Orientierung der longitudinalen Zellen zur horizontalen Bildachse notwendig. In Fiji wurde zur Bestimmung der Periodizität der RyR2-Cluster-Streifung die Fast-Fourier-Transformation (FFT) verwendet (siehe **Abbildung 3**).



**Abbildung 3:** Fast-Fourier-Transformation der RyR2-Zellausschnitte.

Links: Longitudinal orientierter humaner Kardiomyozyten-Zellausschnitt im Format 20,45  $\mu\text{m}$  x 10,23  $\mu\text{m}$ . Maßstab: 2  $\mu\text{m}$  Mitte: Generiertes Graustufenbild mittels Fast-Fourier-Transformation. Rechts: Darstellung der Intensität des Graustufenbildes als Linienprofil. Der *Peak* (grauer Pfeil) repräsentiert den Grad der Periodizität des Bildsignals (= Regelmäßigkeit der RyR2-Cluster-Streifung).

Hierbei wurde eine Linie (Liniengröße 5) vom Mittelpunkt des generierten FFT-Bildes bis zum rechten Bildrand gezogen. Anschließend wurde die Intensität des Graustufenbildes als Linienprofil dargestellt. Die Rohwerte wurden in Excel weiterverarbeitet.

## 2.4.8 RyR2-Cluster-Analyse

Für die RyR2-Cluster-Analyse wurden die STED-Co-Immunfärbungen des RyR2- und des Cav3-Kanals in Fiji importiert und dort ROIs longitudinal angeschnittener Herzmuskelzellausschnitte erstellt. Hierbei wurde darauf geachtet, Zellmembran und Zellkerne nicht mit in die Analyse einzuschließen. Die Clusterformationen wurden segmentiert und in binarisierte Bilder umgewandelt. Hierbei wurde ein kürzlich publiziertes Protokoll (Brandenburg et al. 2019) verwendet und entsprechend angepasst.

### 2.4.8.1 Segmentation von RyR2

Für die Segmentation des RyR2-Signals wurden nacheinander eine Reihe von Befehlen ausgeführt.

Zunächst wurde durch eine Reduktion des Hintergrundsignals und einer Steigerung des lokalen Kontrastes die Darstellung der RyR2-Cluster verbessert.

```
run("Subtract Background...", "rolling=45");
run("Enhance Local Contrast (CLAHE)", "blocksize=35 histogram=256
    maximum=3 mask=*None*");
run("Gaussian Blur...", "sigma=1");
```



Danach wurde ein lokaler *Threshold* auf die Zellausschnitte angewendet, um ein segmentiertes und binarisiertes Bild zu erhalten.

```
run("Auto Local Threshold", "method=Bernsen radius=20 parameter_1=0  
parameter_2=0 white");
```

Mit dem Befehl „*Analyze Particles*“ konnten abschließend Anzahl und Größe der RyR2-Cluster bestimmt werden. Hierbei wurden alle Cluster ab 0,001  $\mu\text{m}^2$  ausgewählt und vermessen. Die Segmente unter 0,001  $\mu\text{m}^2$  Größe wurden von der Analyse ausgeschlossen, um ein mögliches Hintergrundrauschen der Bilder nicht in die Analyse mit einzubeziehen und zusätzlich Bereiche auszusparen, die unterhalb der STED-Auflösungsgrenze liegen (Halbwertsbreite: FWHM - *Full Width at Half Maximum* durchschnittlich 60 nm).

```
run("Analyze Particles...", "size=0.001-Infinity add stack")
```

#### 2.4.8.2 Segmentation von Cav3

Zunächst wurde durch eine Reduktion des Hintergrundsignals und einer Steigerung des lokalen Kontrastes die Darstellung des Caveolin3-Signals verbessert.

```
run("Subtract Background...", "rolling=45");  
run("Enhance Local Contrast (CLAHE)", "blocksize=35 histogram=256  
maximum=3 mask=*None*");  
run("Gaussian Blur...", "sigma=1");
```

Anschließend wurde ein *Threshold* auf die Zellausschnitte angewendet um ein segmentiertes Cav3-Signal zu erhalten.

```
run("Auto Threshold", "method=Otsu ignore_black white");
```

Für den nächsten Schritt, eine Untersuchung des gemeinsamen Auftretens von RyR2-Clustern und dem Caveolin-3-Signal (als Tubulus-Marker), wurde das Cav3-Signal erweitert, um durch eine später daraus resultierende Überlappung mit den RyR2-Signal besser eine Bestimmung und Differenzierung Cav3-assoziierter (in der Nähe liegender) und nicht-Cav3 assoziierter RyR2-Cluster zu ermöglichen.

```
run("Dilate", "stack");
```

### 2.4.8.3 RyR2-Cav3-Assoziationsanalyse

Um Cav3-assozierte und nicht-Cav3-assozierte RyR2-Cluster differenzieren zu können wurden zunächst die RyR2- und Cav3-Segmentierungsergebnisse kombiniert:

```
imageCalculator("Add create stack", "segmentierte Cav3-Bilder.tif",  
               "segmentierte RyR2-Bilder.tif");  
selectWindow("Result of segmentierte Cav3-Bilder.tif");  
saveAs("Tiff", "kombinierte segmentierte Kanäle.tif");
```

Mittels des Befehls „Analyze Particles“ wurden die segmentierten Cluster der kombinierten Kanäle ermittelt, im ROI-Manager erfasst und abgespeichert.

```
run("Analyze Particles...", "size=0.001-Infinity add stack");  
roiManager("Save", "RoiSet_ kombinierte segmentierte Kanäle.zip");
```

Für die kombinierten ROIs wurde anschließend das segmentierte RyR2-Signal ermittelt und abgespeichert.

```
run("Set Measurements...", "area area_fraction stack redirect=None  
decimal=3");  
selectWindow("segmentierte RyR2-Bilder.tif");  
roiManager("Measure");  
saveAs("Results", "Results of segmentierte RyR2-Bilder.txt");  
run("Clear Results");
```

Abschließend wurde für die kombinierten ROIs das segmentierte Cav3-Signal bestimmt und abgespeichert.

```
selectWindow("segmentierte Cav3-Bilder.tif");  
roiManager("Measure");  
saveAs("Results", "Results of segmentierte RyR2-Bilder.txt");  
run("Clear Results");
```

Die abgespeicherten “.txt”-Dateien wurden in Excel importiert und dort weiter prozessiert.

#### 2.4.8.4 RyR2-Cluster-Fragmentation

Für die spezifische Fragmentationsanalyse der einzelnen RyR2-Cluster-Gruppierungen wurden die bereits segmentierten RyR2-Bilder verwendet (siehe 2.4.8.2).

Zunächst wurden die segmentierten Bilder in eine euclidische Distanz-Matrix konvertiert:

```
run("Distance Map", "stack");
```

Anschließend wurde ein *Threshold* für einen 100 nm *Edge-to-edge* Abstand der RyR2-Cluster zueinander bei einer Pixelgröße von 16 nm x 16 nm definiert.

```
setThreshold(0.0000, 3.125);  
setOption("BlackBackground", true);  
run("Convert to Mask", "method=Default background=Dark black");
```

Danach wurden mit dem Befehl „*Analyze Particles*“ die Cluster-Gruppierungen definiert und detektiert.

```
run("Analyze Particles...", "add stack");
```

Abschließend wurden die ermittelten Daten in Excel importiert und dort die RyR2-Clustergröße, die RyR2-Clustermasse, die RyR2-Clusterdichte, die RyR2-Cluster-Fraktion sowie die Größe der Clustergruppierungen ermittelt und miteinander verglichen.

## 2.5 Statistik

Für alle statistischen Auswertungen wurde das Programm Graphpad Prism 7 genutzt.

Für alle Vergleiche unter den AS-Subgruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse mittels *One-way ANOVA* (H. J. Motulsky 2017a) und nachfolgendem Post-hoc Tukey-Kramer Test (H. J. Motulsky 2017b) genutzt. Ein P-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant (\*) definiert. Alle Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM, *standard error of the mean*) angegeben. Zugehörig zu den einzelnen Diagrammen wurde

mit „n = (.../...)“ die Anzahl, der in die entsprechenden Untersuchungen einbezogenen Biopsien (hinten) sowie bei einigen Grafiken die Anzahl der untersuchten Zellen, Zellausschnitte beziehungsweise Cluster-Gruppierungen (vorne) angegeben.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen experimentellen Ergebnissen und relevanten klinischen, patientenspezifischen Daten, vor allem den Echoparametern, zu ermitteln, wurde eine Korrelationsanalyse nach Pearson genutzt. Definitionsgemäß stellt ein Wert von -1 einen stark gegenläufigen, ein Wert von +1 einen stark korrelativen Zusammenhang zwischen den zu vergleichenden Merkmalen dar. Ein Wert von Null lässt keinerlei Beziehung vermuten (H. J. Motulsky 2018).

### 3 Ergebnisse

Die Analysen zeigten in einigen Bereichen Gemeinsamkeiten, in anderen signifikante Unterschiede zwischen den definierten AS-Subtypen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten einige Unterschiede bezüglich des myokardialen Gewebes identifiziert werden. Dies betrifft die Zellgröße, aber auch subzelluläre Elemente, wie Lipofuscinaggregation, das TAT-Netzwerk und Veränderungen auf RyR2-Cluster-Ebene.

#### 3.1 Klinische und echokardiografische Parameter der LV-Biopsien bei AS

Zunächst wurden die klinischen und echokardiografischen Parameter untersucht und miteinander verglichen. Im Folgenden wird auf wesentliche analytisch gefundene Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den AS-Subgruppen eingegangen.

**Tabelle 2:** Darstellung klinischer und echokardiografischer Parameter der AS-Subtypen

	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV	One-Way ANOVA	Post-hoc Tukey/Kramer						
						I,II	I,III	I,IV	II,III	II,IV	III,IV	
Alter (Jahre)	76,4 ± 1	79,8 ± 3,75	76,67 ± 2,66	80,4 ± 1,69	NS							
Geschlecht	4♂ 1♀	3♂ 2♀	5♂ 1♀	3♂ 2♀	NS							
Größe (cm)	177,2 ± 2,46	177,2 ± 4,56	174,7 ± 3,16	170 ± 1,62	NS							
Gewicht (kg)	76,4 ± 4,8	79,2 ± 8,75	74,67 ± 5,51	92,6 ± 6,65	NS							
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,28 ± 1,32	25,01 ± 2,15	24,96 ± 1,62	29,92 ± 2,75	NS							
BSA (m <sup>2</sup> )	1,93 ± 0,07	1,96 ± 0,12	1,89 ± 0,07	2,02 ± 0,05	NS							
LVEF(visuell)(%)	60,14 ± 1,72	29,36 ± 4	35,92 ± 3,57	61,28 ± 2,92	***	***	***	NS	NS	***	***	
SVI (ml/m <sup>2</sup> )	37,58 ± 3,06	32,15 ± 3,06	27,41 ± 2,18	30,56 ± 1,12	NS							
LVEDV (ml)	63,87 ± 8,88	124,46 ± 15,91	114,03 ± 9,19	89,78 ± 18,08	*			NS				
LVESV (ml)	26,21 ± 4,6	90,12 ± 15,39	73,6 ± 7,69	35,6 ± 9,42	**	**	*	NS	NS	*	NS	
Septum (mm)	14,2 ± 0,66	13,8 ± 0,52	14,17 ± 1,21	16,2 ± 1,11	NS							
Hinterwand (mm)	13,6 ± 0,36	13,4 ± 1,19	13,33 ± 0,9	15,6 ± 0,61	NS							
LVEDD (mm)	42,2 ± 2,01	54,2 ± 4,8	49,5 ± 2,2	45,6 ± 2,17	NS							
LVESD (mm)	30,4 ± 2,8	47 ± 5,01	41,67 ± 9,3	30,8 ± 3,4	*	*	NS	NS	NS	*	NS	
LVMI (g/m <sup>2</sup> )	120,05 ± 6,55	168,38 ± 24,52	147,55 ± 14,96	155,06 ± 13,62	NS							
LVM (g)	226,2 ± 20,36	333,4 ± 59,5	283,33 ± 31,79	312,8 ± 35,72	NS							
LVOT (mm)	21 ± 0,75	21,6 ± 0,46	21 ± 0,78	20,6 ± 0,78	NS							
AVA <sub>V<sub>TI</sub></sub> (cm <sup>2</sup> )	0,62 ± 0,06	0,62 ± 0,06	0,75 ± 0,09	0,77 ± 0,06	NS							
V <sub>max</sub> (m/s)	4,35 ± 0,14	4,32 ± 0,09	3,29 ± 0,12	3,33 ± 0,11	***	NS	***	***	***	***	NS	
Δ P <sub>mean</sub> (mmHg)	45 ± 4,53	44,2 ± 1,37	24,67 ± 1,98	27,2 ± 2,2	***	NS	***	**	**	**	NS	
AVA/BSA (cm <sup>2</sup> /m <sup>2</sup> )	0,35 ± 0,01	0,32 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,39 ± 0,03	NS							
LAVI (ml/m <sup>2</sup> )	53,25 ± 2,63	60,42 ± 13,24	36,95 ± 4,13	59,66 ± 5,03	NS							
AK-Insuffizienz	5/0/0	3/2/0	2/3/0	2/2/0								
MK-Insuffizienz	3/2/0	3/2/0	5/1/0	1/4/0								
MK-Stenose	1/0/0	0	0	2/0/0								
TK-Insuffizienz	4/1/0	2/3/0	5/1/0	2/2/1								
TK-Stenose	0	0	0	0								
Schweregrad (1/2/3)						P-Wert: *P < 0,05 **P<0,01 ***P<0,001						

Die Daten werden als Mittelwert ± Standardfehler angegeben.

**BMI** = Body-Mass-Index (Körpermasse-Index)

**BSA** = Body-Surface-Area (Körperoberfläche)

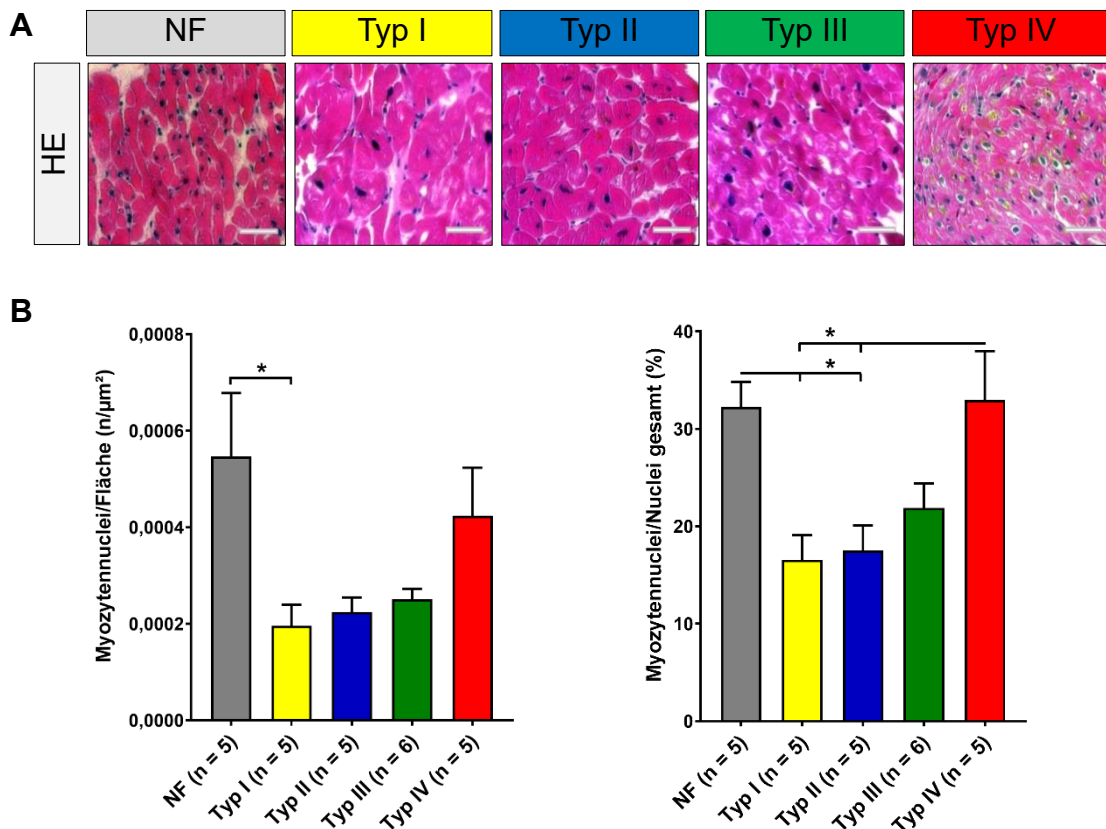
Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass bei den klinischen Daten der Subtypen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Alter, Geschlecht, Größe und Gewicht identifiziert wurden (siehe **Tabelle 2**).

**Tabelle 3:** Übersicht der echokardiografischen Parameter

Abkürzung	Parameter
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
SVI	Schlagvolumenindex
LVEDV	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
LVESV	Linksventrikuläres endsystolisches Volumen
LVEDD	Linksventrikulärer enddiastolischer Diameter
LVESD	Linksventrikulärer endsystolischer Diameter
LVMi	Linksventrikulärer Masseindex
LVM	Linksventrikuläre Masse
LVOT	Linksventrikulärer Ausflusstrakt
AVA	Aortenklappenöffnungsfläche
$V_{\text{MAX}}$	Maximale Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe
$\Delta P_{\text{mean}}$	Mittlerer Gradient über der Aortenklappe
LAVI	Linksatrialer Volumenindex

Bei den echokardiografischen Parametern (Abkürzungsverzeichnis siehe **Tabelle 3**) weichen diese, wie definitionsgemäß zu erwarten, hinsichtlich der Ejektionsfraktion, der Flussgeschwindigkeit ( $V_{\text{max}}$ ) und des Druckgradienten über der Aortenklappe ( $\Delta P_{\text{mean}}$ ) voneinander deutlich ab. Interessant ist, dass das linksventrikuläre endsystolische Volumen (LVESV) bei Typ II im Vergleich zu Typ I und IV deutlich erhöht ist, was vermutlich auf die reduzierte LVEF bei Typ II zurückzuführen ist. Eine signifikante Erhöhung ist auch bei Typ III verglichen mit Typ I zu erkennen. Des Weiteren ist der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser bei Typ II größer als bei Typ I und IV. Bei allen Subtypen treten neben einer Aortenklappenstenose auch andere Herzklappenfehler, vor allem Insuffizienzen an Aortenklappe (AK), Mitralklappe (MK) und Trikuspidalklappe (TK) (siehe **Tabelle 2**) auf.

### 3.2 Reduzierte Myozytenuclei-Anzahl der Subtypen I und II

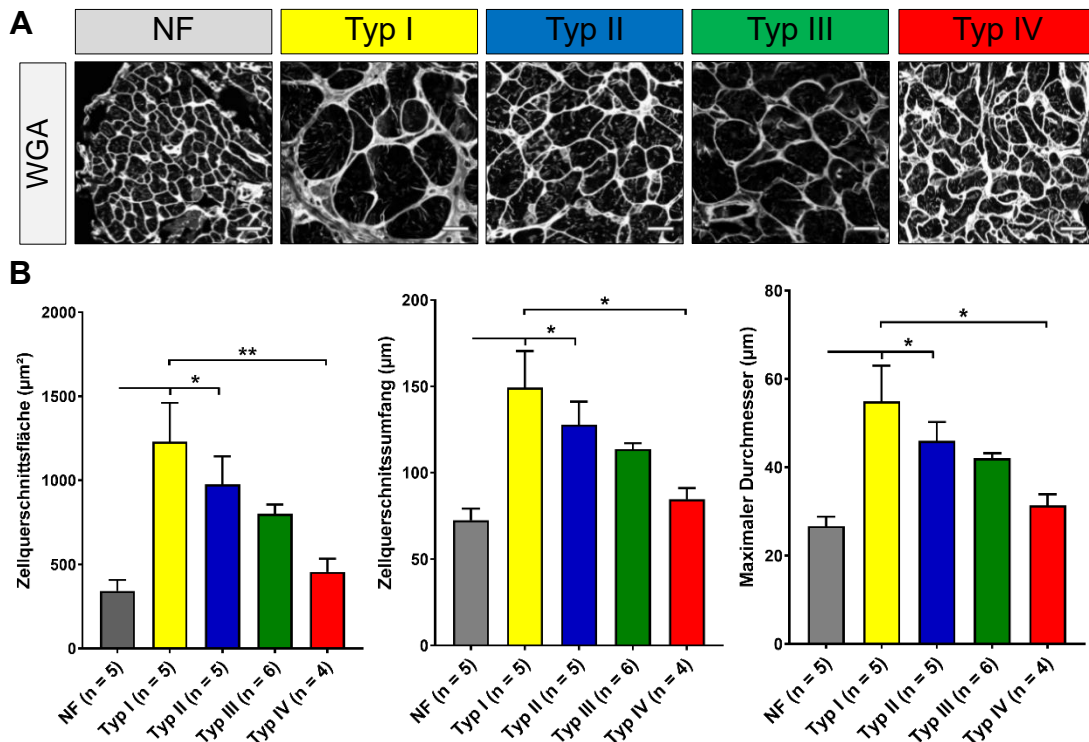


**Abbildung 4:** Analyse der Myozytenuclei-Anzahl. **(A)** Hämatoxylin-Eosin-Färbung von quer-geschnittenem linksventrikulärem humanem Myokard verschiedener AS-Subtypen. Maßstab: 50 μm. **(B)** Die Balkendiagramme zeigen die durchschnittliche Anzahl der Myozytenuclei pro Fläche (links) und pro Gesamtanzahl der Nuclei (rechts). Die signifikant geringere Anzahl an Myozyten-Nuclei der Subtypen I-II gibt indirekt einen Hinweis auf eine Myozytenhypertrophie dieser Subtypen. Durchschnittlich  $200575 \pm 7256 \mu\text{m}^2$  untersuchte Fläche pro Biopsie. One-way ANOVA mit Tukey-Kramer post-hoc Test, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Zunächst wurden HE-Färbungen zur Übersicht und zum Erkennen allgemeiner morphologischer Unterschiede zwischen den Subtypen angefertigt. In der Übersicht ist bereits ein Größenunterschied der linksventrikulären Kardiomyozyten (LV-KM) der einzelnen Subgruppen offensichtlich (**Abb.4, A**), wobei sich die LV-KM der Subtypen I-III verglichen mit den *Non-Failing*-Proben (NF) hypertrophiert zeigen. Subtyp IV zeigt keine klaren Tendenzen einer LV-KM-Zellhypertrophie. Nach manueller Quantifizierung konnte eine Verringerung der Myozytenuclei-Anzahl bestimmter Subtypen festgestellt werden. Analysiert zur Fläche hat Subtyp I eine signifikant verringerte Nuclei-Anzahl bezogen auf die *Non-Failing*-Proben (**Abb.4, B** links). Beurteilt man die Myozytenuclei-Anzahl betreffend der Gesamtkernanzahl eines Ausschnitts, haben Subtyp I und II eine statistisch relevant verringerte Myozytenuclei-Anzahl, verglichen mit den *Non-Failing*-Proben und Subtyp IV (**Abb.4, B** rechts). Dies kann indirekt ein Hinweis auf eine ausgeprägte

Hypertrophie von Subtyp I und II sein. Visuell ist mindestens tendenziell eine Vergrößerung der Zellkerne von Typ I-III zu erkennen. Die Kernlokalisierung relativ zentral in den Kardiomyozyten ist unauffällig. Auffällig sind viele bräunliche perinucleäre Einschlüsse bei Subtyp IV, die bei den anderen Subtypen weniger ausgeprägt sind.

### 3.3 Signifikante Kardiomyozytenhypertrophie der Subtypen I und II



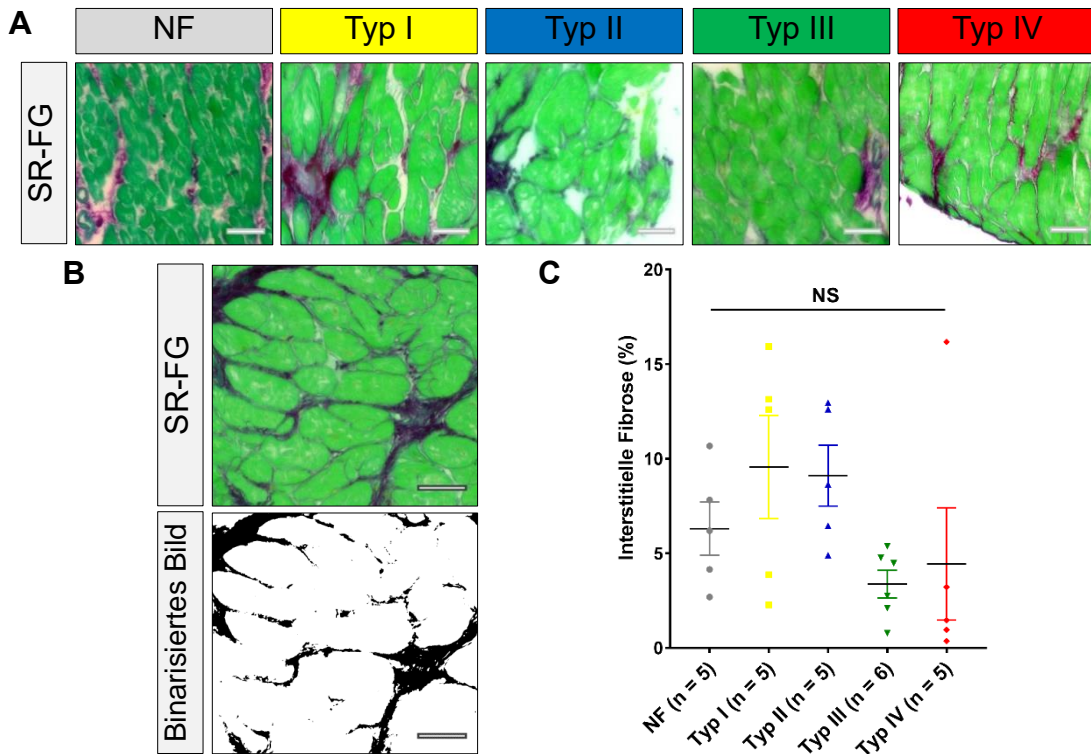
**Abbildung 5:** Analyse des Zellquerschnitts. **(A)** Konfokale Darstellung der äußeren Zellmembran querschnittener LV-KM der AS-Subtypen mittels fluoreszenzmarkiertem Weizenagglutinin (Fluorophor: Abberior STAR 488). Innerhalb der Myozyten sind Tubuli-Strukturen zu sehen. Maßstab: 50 µm. **(B)** Die Balkendiagramme zeigen die Zellquerschnittsfläche (links), den Zellquerschnittsumfang (Mitte) und den maximalen Durchmesser (rechts) der LV-KM der unterschiedlichen Subtypen. Hierbei zeigen sich signifikant vergrößerte LV-KM in Subtyp I-II (vgl. Abb. 1). Subtyp IV zeigt keine signifikante Myozytenhypertrophie im Vergleich zu der *Non-Failing*-Gruppe. 21-94 Zellen pro Biopsie. One-way ANOVA mit Tukey-Kramer post-hoc Test, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Um die Vermutung der Zellhypertrophie einzelner Subtypen zu beweisen, wurde anhand von WGA-Aufnahmen die Zellquerschnittsfläche, der Zellquerschnittsumfang und der maximale Zellquerschnittsdurchmesser transversal geschnittener LV-KM vermessen (**Abb.5**). Nach einer quantitativen Analyse der vorhandenen querangeschnittenen Herzmuskelzellen, kann eine signifikante Hypertrophie der Subtypen I-II bestätigt werden. Die Zellquerschnittsfläche und der Zellquerschnittsumfang sowie der maximale Durchmesser (**Abb.5, B**) der querangeschnittenen Kardiomyozyten ist in den Typen I und II verglichen mit den *Non-*



*Failing*-Proben signifikant vergrößert. Typ III und IV zeigen jedoch im Vergleich zu den NF-Proben keine signifikanten Veränderungen. Der Unterschied zwischen Typ I (hypertroph) und Typ IV ist jedoch signifikant (**Abb.5, B**).

### 3.4 Interstitieller Fibroseanteil

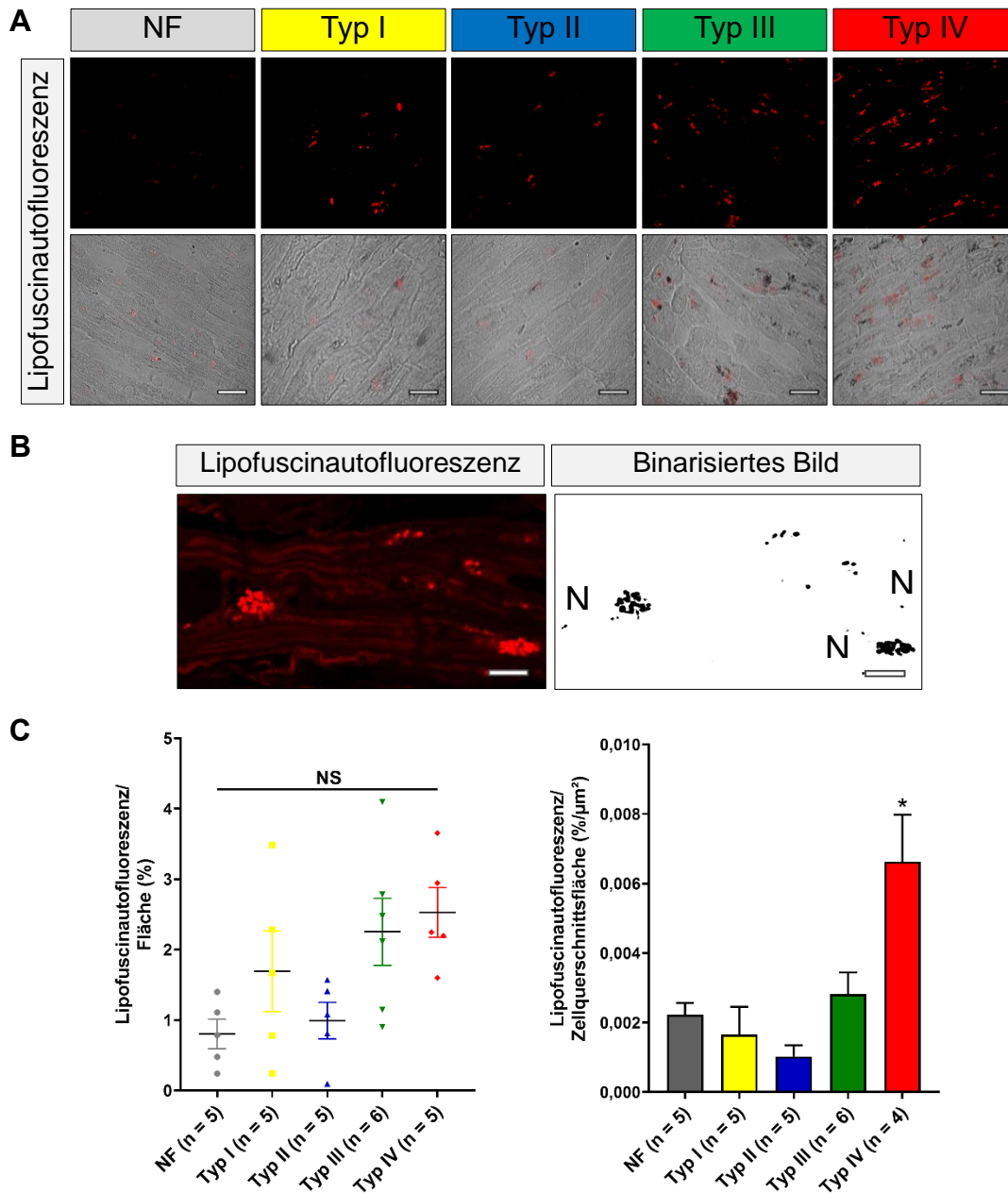


**Abbildung 6:** Analyse der interstitiellen Fibrose. **(A)** *Sirius-Red/Fast-Green*-(SR/FG)-Färbung transversal angeschnittenen humanen LV-Myokards. Maßstab: 50  $\mu$ m. **(B)** Oben: SR/FG-Färbung. Unten: Binarisiertes Bild zur quantitativen Berechnung des Fibroseanteils pro Fläche. Maßstab: 50  $\mu$ m. **(C)** Der Scatterplot zeigt die durchschnittliche interstitielle Fibrose pro Subtyp. Tendenziell zeigen Typ I und II vermehrt Fibrose, aufgrund der großen Streuung zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Durchschnittlich  $93152 \pm 6622 \mu\text{m}^2$  untersuchte Fläche pro Biopsie. One-way ANOVA mit Tukey-Kramer post-hoc Test, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Es wurden *Sirius-Red/Fast-Green*-Färbungen der vorhandenen Biopsien angefertigt, um einen Überblick über den Fibrose-Anteil der einzelnen Subtypen zu gewinnen.

Rein visuell betrachtet haben Subtyp III und IV, bis auf einen Ausreißer in Subtyp IV, weniger interstitielle Fibrose als Subtyp I und II (**Abb.6, A**). Wie in dem Scatterplot (**Abb.6, C**) zu erkennen weisen die einzelnen Biopsien jedoch eine relativ große Streuung ihres interstitiellen Fibroseanteils auf. Aufgrund dessen und wegen der limitierten Anzahl an Biopsien konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des interstitiellen Fibroseanteils bestimmt werden.

### 3.5 Vermehrte perinucleäre Lipofuscin-Aggregationen in linksventrikulären Kardiomyozyten von Subtyp IV



**Abbildung 7:** Analyse der intrazellulären Lipofuscinaggregate. **(A)** Oben: Konfokale Darstellung von Lipofuscinaggregaten mittels Autofluoreszenz in longitudinal angeschnittenen LV-KM der AS-Subtypen; Anregungswellenlänge: 405 nm, Emissionsspektrum: 600-740 nm. Unten: Zugehöriges lichtmikroskopisches Bild. Maßstab: 20 µm. **(B)** Links: Lipofuscin autofluoreszenz. Rechts: Binarisiertes Bild zur quantitativen Berechnung des Lipofuscinanteils pro Fläche. Die Lipofuscinaggregate lagern sich vorwiegend perinucleär ab (N=Nucleus). Maßstab: 10 µm. **(C)** Links: Der Scatterplot zeigt den Lipofuscinanteil pro Fläche. Rechts: Darstellung des Lipofuscinanteils in Bezug auf die durchschnittliche Zellquerschnittsfläche der AS-Subtypen. Subtyp IV zeigt einen signifikant erhöhten Anteil an Lipofuscinaggregaten verglichen mit den Subtypen I-III. Die Lipofuscinaggregate sind bereits in der HE-Färbung (**siehe Abb.1**) als bräunliche perinucleäre Signale zu erkennen. Durchschnittlich  $157788 \pm 65165 \mu\text{m}^2$  untersuchte Fläche pro Biopsie. One-way ANOVA mit Tukey-Kramer post-hoc Test, \* $P < 0.05$ . \*\* $P < 0.01$ . \*\*\* $P < 0.001$ .

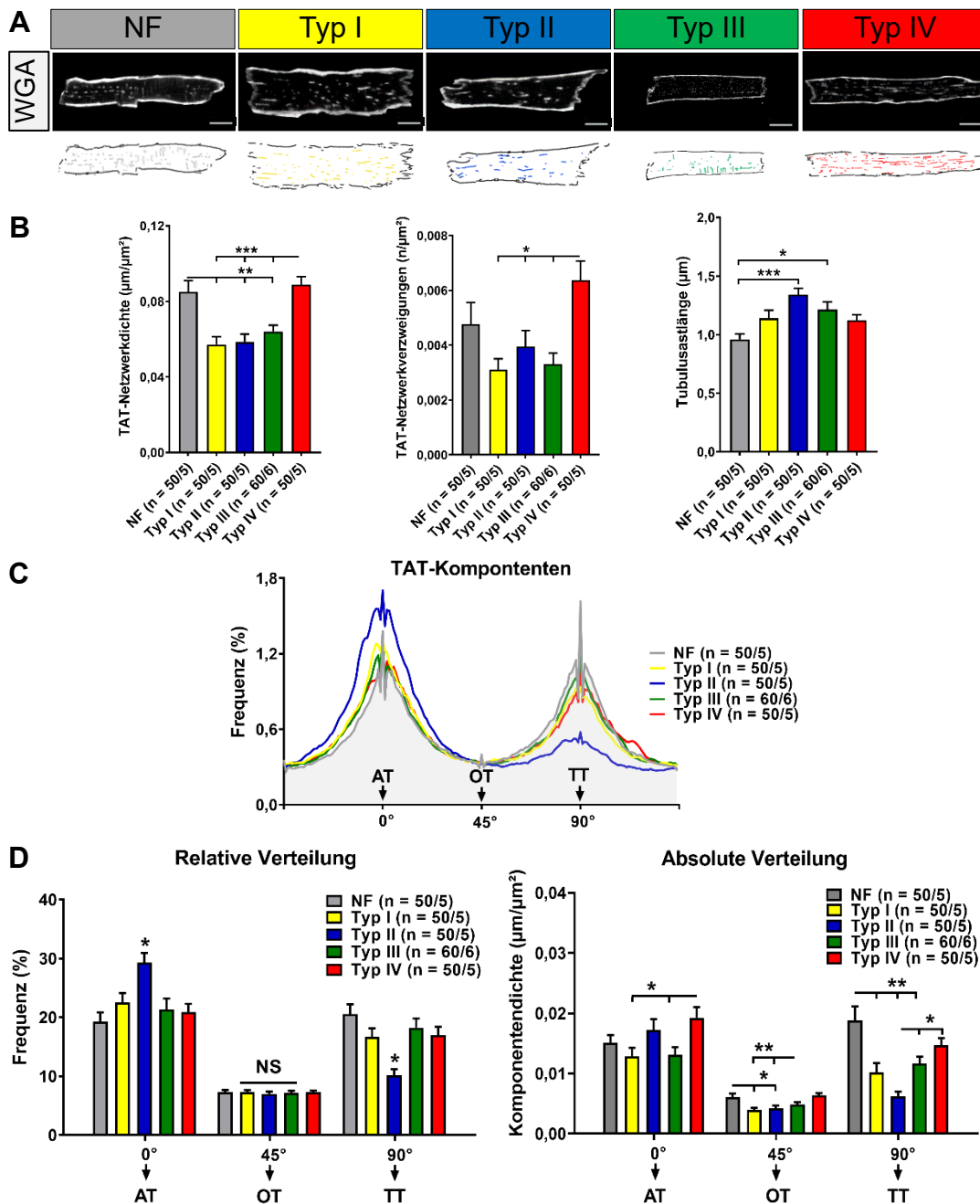
Da in den HE-Färbungen (**Abb.4, A**) bereits in Subtyp IV auffällig viele bräunliche perinucleäre Ablagerungen innerhalb der Kardiomyozyten erkennbar waren, wurde mittels Autofluoreszenz der Lipofuscingehalt der einzelnen Subtypen bestimmt (**Abb.7**). Dabei wurde eine Anregungswellenlänge von 405 nm, bei einem Emissionsspektrum von 600-740 nm, gewählt.

Zunächst wurde der Lipofuscingehalt bezogen auf die Fläche des gemessenen Ausschnittes bestimmt (**Abb.7, C links**). Bezogen auf die Zellquerschnittsfläche der Kardiomyozyten zeigt sich ein signifikant erhöhter Anteil an Lipofuscinaggregaten in Typ IV (**Abb.7, C rechts**). Die Herzmuskelzellen der anderen Subtypen zeigen im Vergleich zu den *Non-Failing*-Proben keinen signifikanten Anstieg in ihrem Lipofuscin-Gehalt.

### **3.6 Axiale Orientierung des TAT-Netzwerks bei Subtyp II und Reduktion der TAT-Netzwerk-Dichte bei Subtyp I-III**

Auf intrazellulärer Ebene wurde das TAT-Netzwerk der einzelnen Subgruppen analysiert (**Abb.8**). Mittels Weizenkeim-Agglutinin konnten die intrazellulären Tubulusstrukturen konfokal dargestellt werden. Die aufgenommenen Strukturen wurden in Fiji weiter prozessiert und ein binarisiertes und segmentiertes Tubulussystem erstellt, um eine Auswertung der TAT-Netzwerkstrukturen zu erleichtern.

Zunächst wurde die Dichte des Tubulusnetzwerks beurteilt. Hierbei ist auffällig, dass die Subtypen I-III eine signifikante Reduktion der Netzwerkdichte aufweisen. Bei Subtyp IV ist das Tubulus-Netzwerk, gemessen an der Dichte des Netzwerks der *Non-Failing*-Proben, unverändert ausgeprägt (**Abb.8, B links**). Subtyp IV weist bezüglich der anderen Subtypen (I-III) signifikant mehr Verzweigungen des Tubulusnetzwerks auf (**Abb.8, B Mitte**). Beurteilt man die durchschnittlichen Tubulusastlängen der verschiedenen Subtypen, ist auffällig, dass die Subtypen II und III, bezogen auf die gesunde Vergleichsgruppe, deutlich längere Tubulusastlängen besitzen. Des Weiteren wurde die prozentuale Verteilung der einzelnen Tubulus-Netzwerk-Komponenten analysiert. Hierbei ist eine Unterteilung zwischen axialen Tubuli (AT), schräg/oblique verlaufenden Tubuli (OT) und transversalen Tubuli (TT) vorgenommen worden. In dem Histogramm (**Abb.8, C**) ist der zweigipflige Verlauf der einzelnen Tubuluskomponenten dargestellt. Der



**Abbildung 8** | Analyse des TAT-Netzwerks. **(A) Oben:** Konfokale Darstellung des Tubulusnetzwerks in LV-KM verschiedener AS-Subtypen mittels fluoreszenz-markiertem Weizenagglutinin (Fluorophor: Abberior STAR 488). **Unten:** Binarisiertes Bild für die quantitative TAT-Netzwerkanalyse. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . **(B)** Darstellung der Netzwerkdichte, der Anzahl der Netzwerkverzweigungen und der Tubulusastlänge der LV-KM der AS-Subtypen. **(C)** Das Histogramm zeigt die zweigipflige Verteilung der spezifischen TAT-Netzwerk-Komponenten: AT=AxiALE Tubuli (0°), OT=Oblique Tubuli (45°), TT=TransversALE Tubuli (90°); Subtyp II zeigt im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant mehr AT-Komponenten. **(D)** Die Balkendiagramme zeigen die relative und absolute Verteilung der drei verschiedenen TAT-Netzwerk-Komponenten;  $\text{Bining} \pm 10^\circ$ . 10 Zellen pro Biopsie. One-way ANOVA mit Tukey-Kramer post-hoc Test, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

graue Graph stellt die Verteilung der Netzwerkkomponenten der gesunden Vergleichsgruppe dar. Hierbei ist eine relativ gleichmäßige Verteilung zwischen axialen und transversalen Tubulusanteilen erkennbar. In dieser Übersicht ist besonders auffällig, dass der Subtyp II von der *Non-Failing*-Kontrollgruppe abweicht

und ein deutlich axialer ausgeprägtes Tubulus-Netzwerk besitzt. Quantitative Berechnungen konnten diese Abweichung als signifikant bestätigen: In der relativen Verteilung (**Abb.8, D links**) zeigt Subtyp II verglichen mit den anderen Gruppen einen deutlichen Anstieg an axial ausgerichteten Tubuli. Hinzu kommt eine Reduktion der transversalen Komponenten. Analysiert man den absoluten Anteil der einzelnen Komponenten durch Einbezug der Dichte (**Abb.8, D rechts**), zeigen sich, durch den allgemein größeren Anteil an Tubuli, bei Subtyp IV im axialen Bereich signifikant mehr Tubuli als bei den Subtypen I und III. Diesmal gibt es im Bereich der schrägverlaufenden Tubuli zusätzlich zu den Veränderungen im axialen und transversalen Tubulibereich signifikante Unterschiede. So sind die schrägverlaufenden Tubuli bei Subtyp I und III verglichen mit Subtyp IV und den *Non-Failing*-Proben signifikant verringert. Die transversalen Tubuli sind bezogen auf die gesunde Vergleichsgruppe bei den Subtypen I-III signifikant verringert. Zusätzlich gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen Subtyp II und IV: Subtyp II zeigt einen deutlichen Rückgang transversaler Netzwerkkomponenten.

### **3.7 RyR2-Cluster-Analyse**

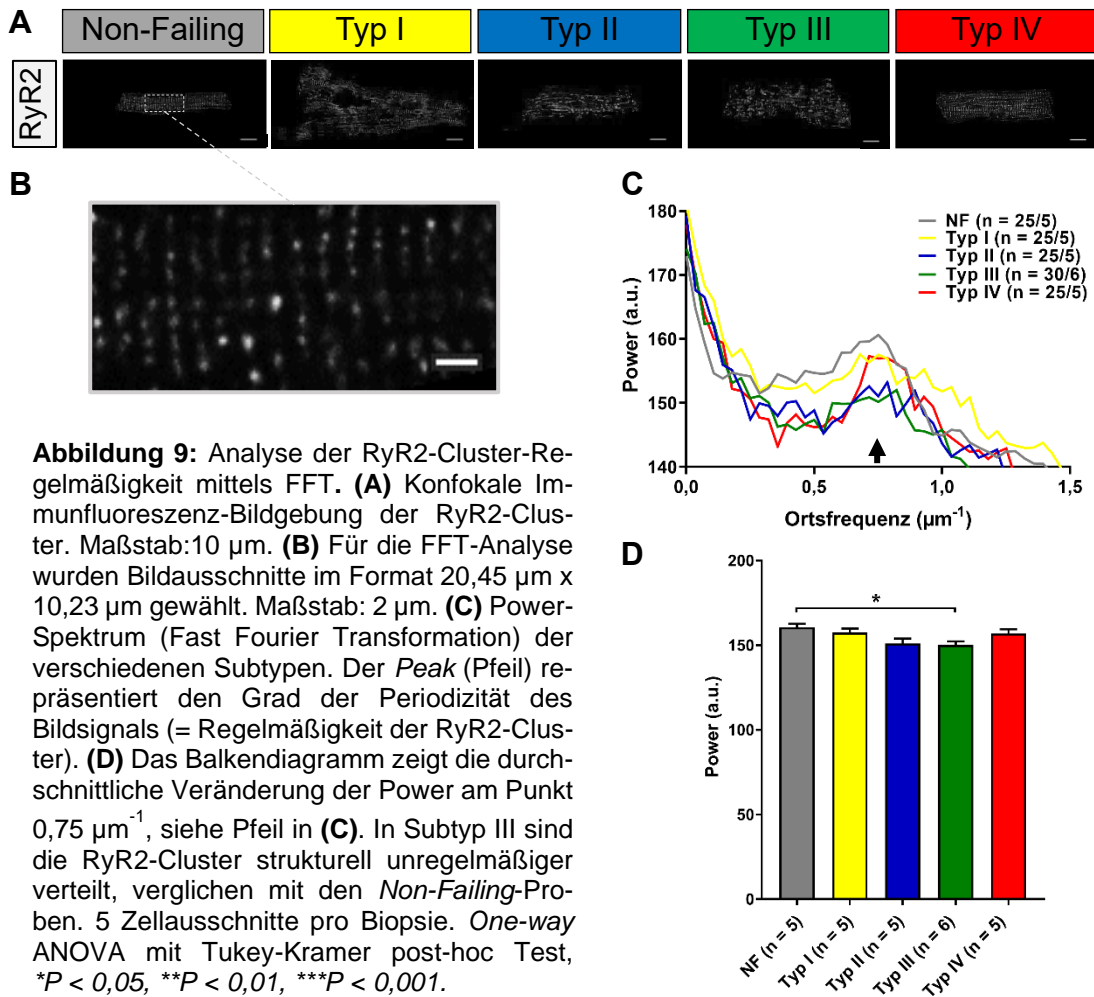
Da der RyR2-Kanal eine große Bedeutung für die Calcium-Freisetzung der Herzmuskelzellen hat, wurden strukturelle Analysen bezüglich der RyR2-Cluster-Regelmäßigkeit, -Dichte, -Anzahl, -Größe und -Beziehung zum TAT-Netzwerk abgeschlossen.

#### **3.7.1 Reduktion der RyR2-Cluster-Streifung bei Subtyp III**

Zunächst wurde mittels Fast-Fourier-Transformation das regelmäßige Auftreten der RyR2-Cluster aufgrund der erwarteten Assoziation mit Querstreifen der Herzmuskelzellen untersucht. Als Norm wurde die transversal zur Zellachse gerichtete Streifung der RyR2-Cluster definiert.

Hierbei scheinen die Subtypen I-III visuell eine unregelmäßigere Anordnung der RyR2-Cluster, verglichen mit den *Non-Failing*-Proben und Subtyp IV, zu haben (**Abb.9, A**). In dem Power-Spektrum (**Abb.9, C**) repräsentiert der erste *Peak* (Pfeil) den Grad der Regelmäßigkeit (Periodizität) des RyR2-Cluster-Signals (im Abstand von  $0,75 \mu\text{m}^{-1}$ , entspricht einem mittleren Abstand der Querstreifung von  $1,3 \mu\text{m}$ ). Hierbei ist auffällig, dass besonders bei den Subtypen II und III die Periodizität verringert ist, was eine unregelmäßigere Verteilung der Ryanodin-2-

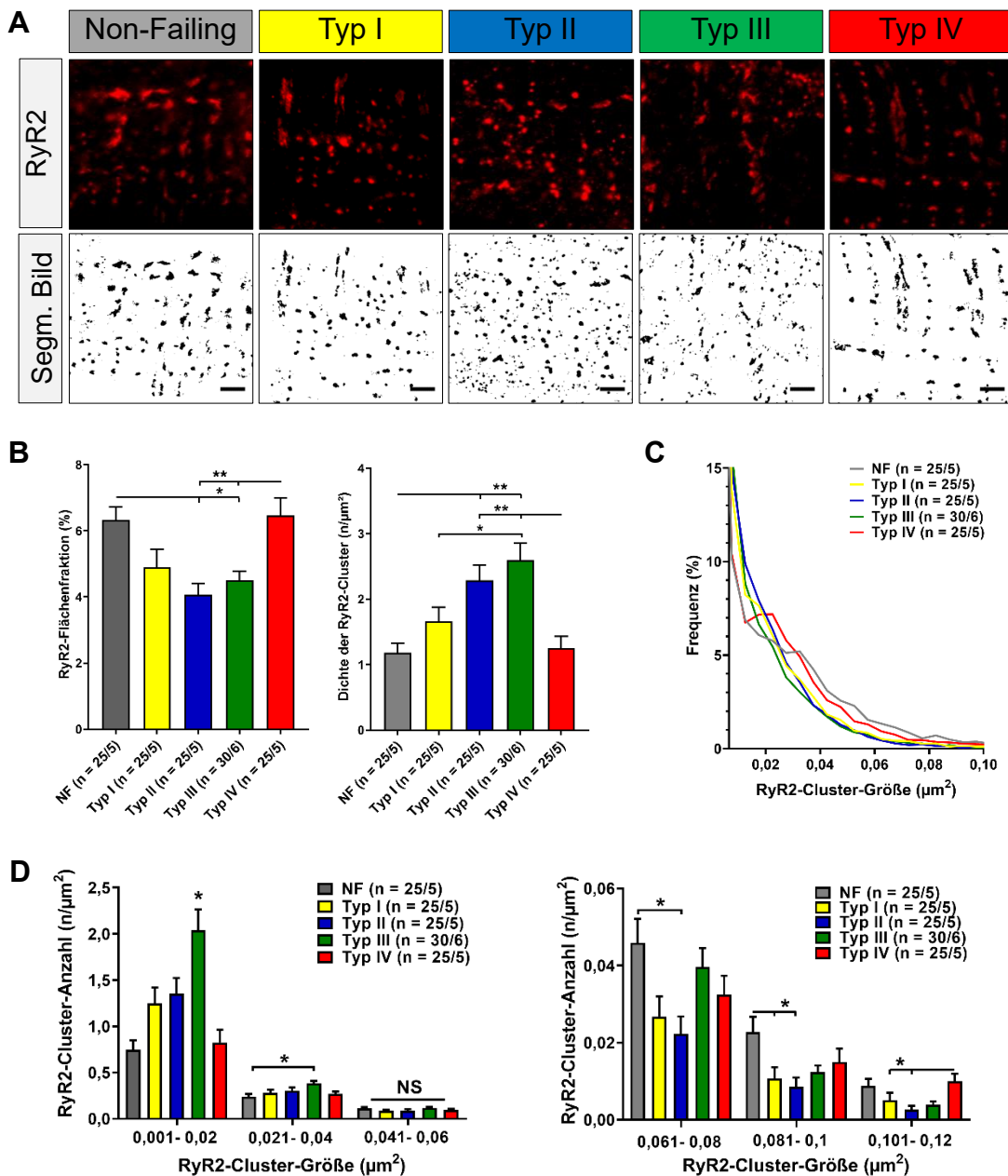
Cluster vermuten lässt. **Abb. 9, D** bestätigt einen signifikanten Unterschied zwischen Subtyp III und den *Non-Failing*-Proben im Abstand von  $1,3 \mu\text{m}$  (Pfeil).



### 3.7.2 Veränderungen der RyR2-Flächenfraktion, der Clusterdichte und -größe

Im Folgenden wurde die Morphologie und Anzahl der RyR2-Cluster in den Herzmuskelzellen untersucht. Hierzu wurden, um genaue Aussagen über die RyR2-Clustergröße, -anzahl und -verteilung treffen zu können, Aufnahmen von RyR2-Clustern innerhalb LV-KM bis zu einer Auflösung von  $60 \text{ nm}$  mittels STED-Nanoskopie angefertigt. Die intrazellulären Aufnahmen wurden innerhalb Fiji prozessiert und durch angepasste Segmentierung der Bildausschnitte sowie einer folgenden Partikelanalyse (= Clusteranalyse) ausgewertet.

Untersucht man den prozentualen Anteil der RyR2-Cluster-Fläche bezogen auf die Gesamtzellfläche (**Abb.10, B** links), ist eine signifikante Abnahme der RyR2-Clusteranteile bei den Subtypen II und III verglichen mit der NF-Gruppe und Subtyp IV zu erkennen. Bei der Clusterdichte (**Abb.10, B** rechts) ist die Anzahl der



**Abbildung 10:** Analyse der RyR2-Cluster mittels STED-Nanoskopie. **(A)** Oben: STED Immunofluoreszenz-Bildgebung der RyR2-Cluster in longitudinal angeschnittenen LV-KM. Unten: Segmentierte und binarisierte RyR2-Cluster-Bilder zur weiteren Analyse. Maßstab: 1 µm. **(B)** Links: Durchschnittliche RyR2-Flächenfraktion der LV-KM. Rechts: Durchschnittliche Dichte der RyR2-Cluster der LV-KM. **(C)** Das Histogramm zeigt die prozentuale Größenverteilung der RyR2-Cluster der verschiedenen Subtypen. Bin 0,005 µm<sup>2</sup>. **(D)** Links: Größenverteilung kleiner RyR2-Cluster. Rechts: Größenverteilung größerer RyR2-Cluster. Die kleineren RyR2-Cluster sind besonders bei Subtyp III signifikant erhöht, wohingegen bei den größeren RyR2-Clustern v. a. bei Typ I-II ein Rückgang der Anzahl im Vergleich zu den NF-Proben zu beobachten ist. 5 Zellausschnitte pro Biopsie. One-way ANOVA mit Tukey-Kramer post-hoc Test, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Cluster der Subtypen II und III jedoch signifikant erhöht. Wenn man beide Diagramme gemeinsam betrachtet, kann die Zunahme der RyR2-Cluster-Anzahl bei



gleichzeitigem Abfall des Gesamtflächenanteils der RyR2-Cluster für eine anteilhafte Fragmentation von RyR2-Clustern und einen gleichzeitigen Untergang einiger RyR2-Cluster-Komponenten bei den Subtypen II-III sprechen.

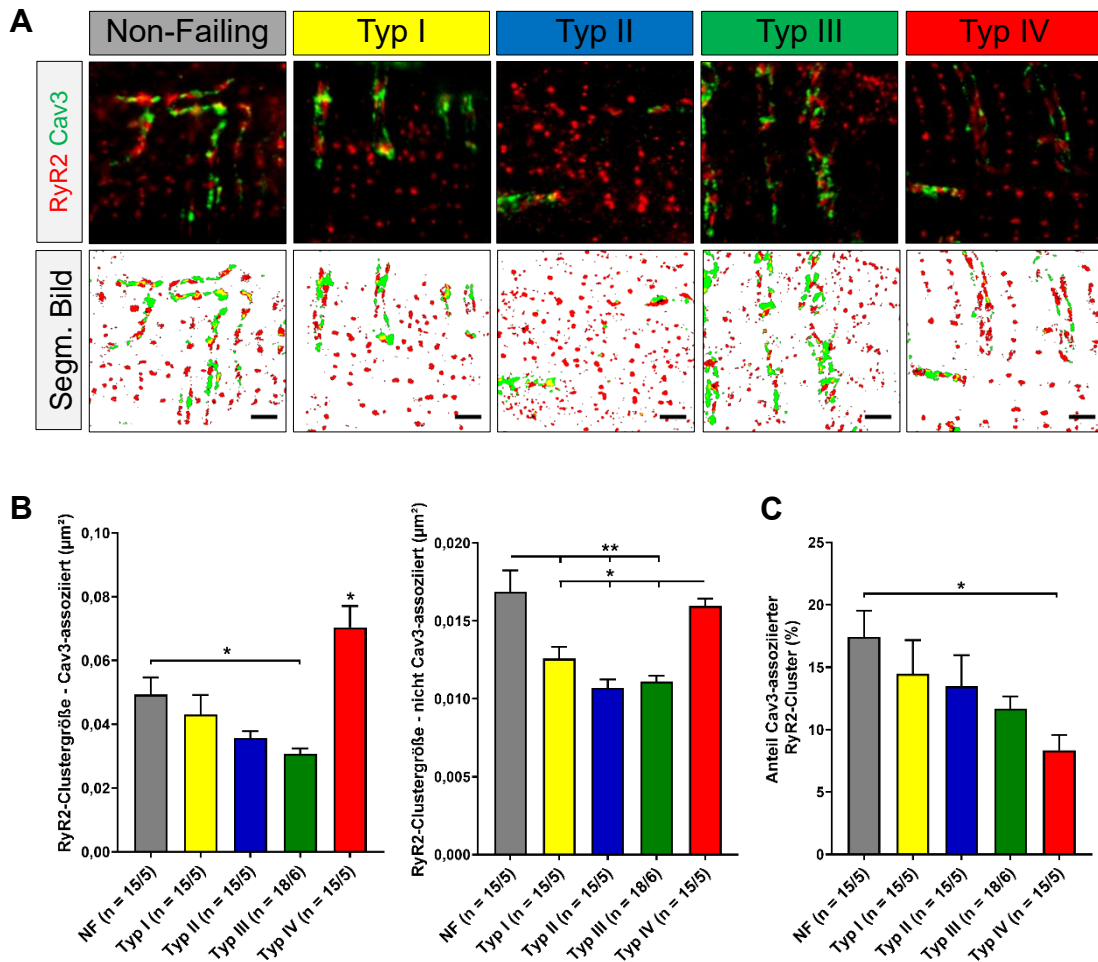
Bei genauerer Analyse der RyR2-Clustergröße zeigt sich bei der prozentualen Verteilung (**Abb.10, C**) eine nahezu exponentielle Abnahme der RyR2-Cluster-Anzahl der Subtypen I-III, startend bei vielen kleinen Clustern bis hin zu wenigen größeren RyR2-Clustern. Bei der *Non-Failing*-Gruppe und Subtyp IV wird der exponentielle Abfall bei einer Clustergröße von etwa  $0,02 \mu\text{m}^2$  durch einen Höhepunkt unterbrochen. Wenn man bestimmte RyR2-Clustergrößen separat analysiert (**Abb.10, D**), ist auffällig, dass die Anzahl der RyR2-Cluster von Subtyp III im Größenbereich von  $0,001-0,02 \mu\text{m}^2$  signifikant gegenüber allen anderen Gruppen erhöht ist. Ab einer Clustergröße von  $0,061-0,08 \mu\text{m}^2$  ist die Anzahl der Typ II-RyR2-Cluster im Vergleich zu den *Non-Failing*-Proben deutlich verringert. Bei einer Größenzunahme von  $0,081-0,1 \mu\text{m}^2$  reduziert sich die Anzahl der Typ I-RyR2-Cluster bezogen auf die gesunde Vergleichsgruppe zusätzlich signifikant. Interessant ist, dass ab einer Größe von  $0,101-0,12 \mu\text{m}^2$  Subtyp IV eine erhöhte Cluster-Anzahl verglichen mit den Subtypen I und II aufweist.

### **3.7.3 Erhöhte Cav3-assoziierte RyR2-Clustergröße bei gleichzeitiger Abnahme des Cav3-assoziierten RyR2-Cluster-Anteils bei Subtyp IV**

Mittels Caveolin-3 als Marker für das TAT-Netzwerk konnte die Beziehung der RyR2-Cluster zum TAT-Netzwerk analysiert werden. Die durch STED-Nanoskopie generierten Aufnahmen wurden in Fiji segmentiert und das RyR2-Signal mit dem Cav3-Signal verglichen. Im Folgenden wurden die mit dem Tubulussystem in Beziehung stehenden (Cav3-assoziierten) RyR2-Cluster und die solitär vorkommenden (Cav3-unabhängigen) RyR2-Cluster untersucht.

Deutlich ist, dass besonders die Cav3-assoziierten Cluster von Subtyp IV-Proben signifikant größer sind. Im Vergleich zu der *Non-Failing*-Gruppe sind die Cav3-assoziierten RyR2-Cluster von Subtyp III-Proben signifikant kleiner (**Abb.11, B links**). Betrachtet man den Anteil der nicht-junktionalen RyR2-Cluster (hier definiert als nicht-Cav3-assoziiert und damit nicht mit dem Tubulussystem assoziiert), sind die RyR2-Cluster der Subtypen I-III signifikant kleiner verglichen mit der NF-Gruppe und Subtyp IV (**Abb.11, B rechts**).

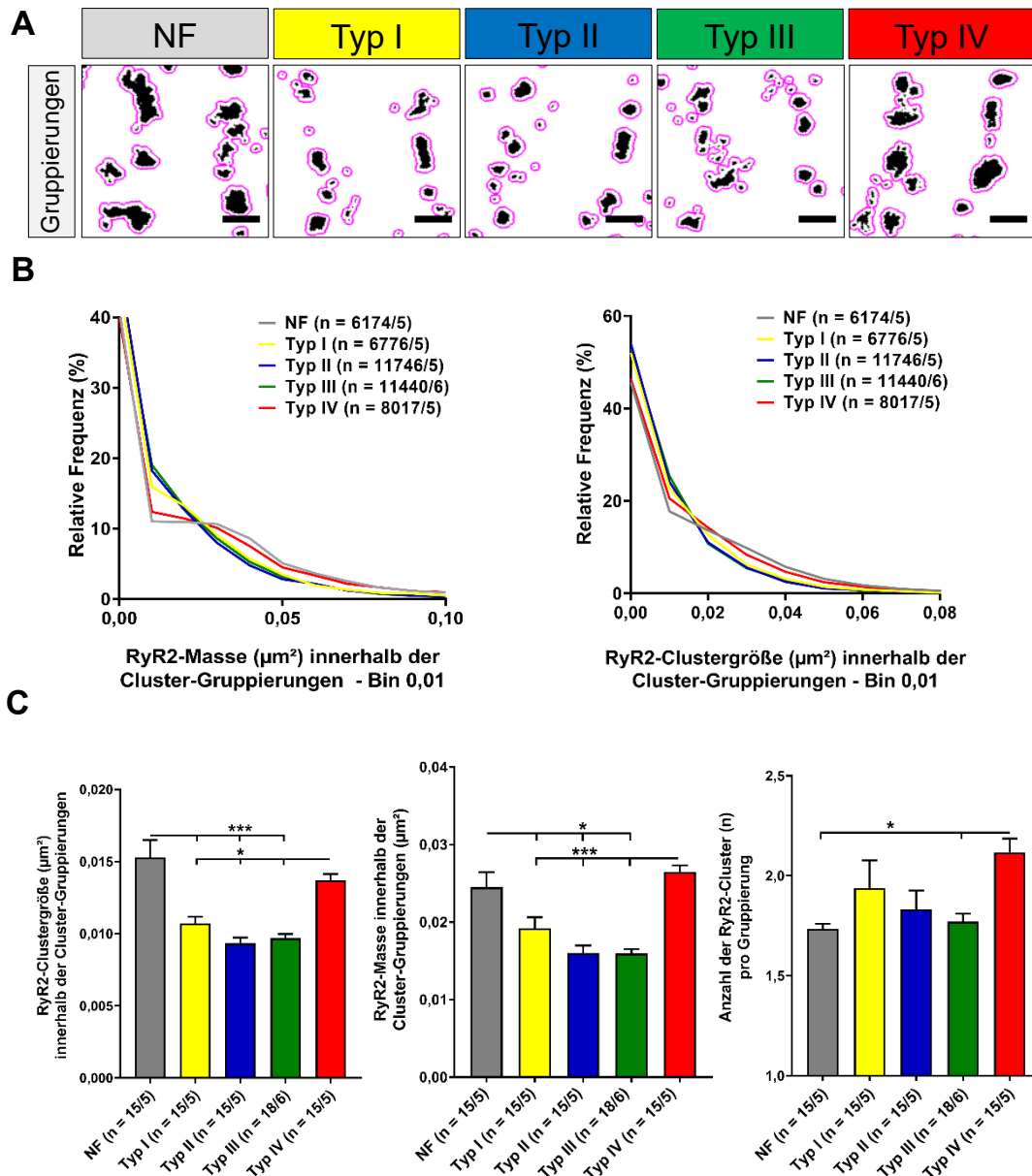




**Abbildung 11:** Analyse Cav3-assoziiertes RyR2-Cluster mittels STED-Nanoskopie. **(A)** Oben: STED Immunofluoreszenz-Bildgebung der RyR2-Cluster (rot) sowie Cav3-Cluster (grün). Unten: Segmentierte und binarisierte RyR2-/Cav3-Bilder für die weitere Analyse. Rot: RyR2-Signal, Grün: Cav3-Signal, Maßstab: 1 µm. **(B)** Links: Durchschnittliche, mit Cav3-assoziierte RyR2-Clustergröße in LV-KM der AS-Subtypen. Rechts: Durchschnittliche, nicht mit Cav3-assoziierte RyR2-Clustergröße in LV-KM der AS-Subtypen. **(C)** Anteil der Cav3-assoziierten RyR2-Cluster in Bezug auf alle RyR2-Cluster. Auffällig ist, dass bei Subtyp IV die Cav3-assoziierten RyR2-Cluster am größten sind, Subtyp IV bei der Anzahl assoziierter Cav3-Cluster jedoch den geringsten Anteil hat. 3 Zellausschnitte pro Biopsie. One-way ANOVA mit Tukey-Kramer post-hoc Test, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Der Anteil Cav3-assoziiertes RyR2-Cluster der Subgruppe IV ist signifikant kleiner als der, der gesunden Vergleichsgruppe (**Abb.11, C**). Bei Subtyp IV kommt es demnach zu einer Vergrößerung von netzwerknahe RyR2-Clustern bei Reduktion der allgemeinen Anzahl Netzwerk-assoziiertes RyR2-Cluster.

### 3.7.4 RyR2-Cluster-Fragmentation funktioneller Calcium-Freisetzungseinheiten



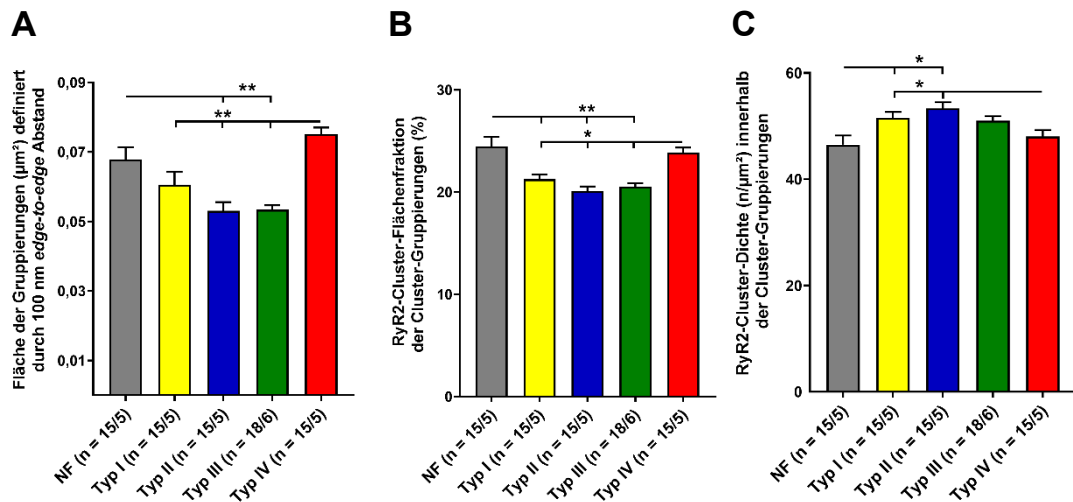
**Abbildung 12:** Analyse der RyR2-Cluster-Fragmentation innerhalb Gruppierungen funktioneller Calcium-Freisetzungseinheiten mittels STED-Nanoskopie. **(A)** Ausschnitte segmentierter RyR2-Cluster **Pink**: Darstellung der Begrenzung einzelner funktioneller Cluster-Gruppierungen (maximal 100 nm „Edge-to-edge“-Abstand). Maßstab: 500 nm. **(B)** **Links**: Prozentuale Verteilung der RyR2-Masse, **rechts**: Prozentuale Verteilung der RyR2-Clustergröße innerhalb der Gruppierungen. **(C)** **Links**: Durchschnittliche RyR2-Clustergröße, **Mitte**: Durchschnittliche RyR2-Masse, **rechts**: Durchschnittliche RyR2-Cluster-Anzahl innerhalb der Gruppierungen. Auffällig ist, dass bei den Subtypen I-III verglichen mit den *Non-Failing*-Proben und Subtyp IV ein Rückgang der RyR2-Clustergröße und -größe zu beobachten ist. Bei Subtyp IV scheint es eine Zunahme der RyR2-Cluster-Anzahl zu geben. 3 Zellausschnitte pro Biopsie. One-way ANOVA mit Tukey-Kramer post-hoc Test, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

Um die RyR2-Cluster-Fragmentation einzelner Subtypen genauer zu analysieren wurden RyR2-Cluster-Gruppierungen, die zusammen funktionelle Calcium-Frei-

setzungs-Einheiten bilden, untersucht. Es wurden Cluster zu funktionellen Gruppen zusammengefasst, die maximal einen Rand-zu-Rand (*Edge-to-edge*)-Abstand von 100 nm zueinander aufweisen. In diesen Gruppierungen wurden die RyR2-Masse, die Größe der einzelnen Cluster und die Anzahl der Cluster einer Gruppierung miteinander verglichen (**Abbildung 12**). Des Weiteren wurde die Größe der einzelnen Gruppierungen und daraufhin der prozentuale RyR2-Cluster-Anteil und die Dichte der RyR2-Cluster innerhalb der Gruppierungen der einzelnen AS-Subtypen bestimmt (**Abbildung 13**).

Schon in **Abbildung 12, A** ist ein Unterschied der RyR2-Clustergröße innerhalb der Gruppierungen bei den einzelnen Subtypen ersichtlich. Die Cluster in den Gruppierungen der Subtypen I-III sind deutlich kleiner. **Abbildung 12, B** stellt die relative Frequenz der RyR2-Masse (links) und der RyR2-Clustergröße (rechts) dar. Dabei ist erkennbar, dass die Subtypen I-III mehr Gruppierungen mit limitierter RyR2-Masse und kleineren, möglicherweise fragmentierten RyR2-Clustern zeigen. Die Balkendiagramme (**Abb. 12, C**) bestätigen diese Beobachtung: Bei Subtyp I-III ist ein signifikanter Rückgang der RyR2-Masse sowie eine Reduktion der Clustergröße verglichen mit den *Non-Failing*-Proben und dem Subtyp IV zu beobachten. Interessant ist, dass der Subtyp IV allein betrachtet eine signifikant erhöhte RyR2-Cluster-Anzahl innerhalb der Gruppierungen zeigt (**Abb. 12, C rechts**). Da jedoch sowohl die Gruppierungen des Subtyps IV als auch der *Non-Failing*-Proben signifikant größer sind (**Abb. 13, B links**) wurde zusätzlich die Cluster-Anzahl im Bezug zur Gruppierungsfläche betrachtet. Hierbei ist die Dichte der RyR2-Cluster der Subtypen I und II signifikant erhöht (**Abb. 13, B rechts**). Wenn man die RyR2-Masse im Verhältnis zur Gruppierungsfläche betrachtet, kommt es hierbei zu einem signifikanten Rückgang des prozentualen RyR2-Anteils der Subtypen I-III (**Abb.13, B Mitte**). Die Reduktion der Clustergröße und -masse (bei Subtyp I-III), bei gleichzeitiger Erhöhung der Dichte Gruppierungs-assoziiierter Cluster (Subtyp I-II) spricht für Fragmentationsprozesse bei den Subtypen I und II. Bei Subtyp III ist die Clusteranzahl innerhalb der Gruppierungen nicht erhöht. Die signifikante Erhöhung kleiner Cluster von Typ III in der allgemeinen Cluster-Analyse (**Abb. 10**) lässt vermuten, dass der Fragmentationsprozess so weit fortgeschritten ist, dass sich viele, ehemals funktionell zusammengehörige RyR2-Cluster nicht mehr in einem *Edge-to-edge*-Abstand von

100 nm zueinander befinden. Die Aufhebung der strukturellen Ordnung der RyR2-Cluster bei Typ III (**Abb. 9**) ist ein weiteres Zeichen der Fragmentation.



**Abbildung 13:** Analyse der RyR2-Cluster-Masse und -Anzahl bezogen auf die Größe funktioneller RyR2-Cluster-Gruppierungen mittels STED-Nanoskopie. **(A)** Fläche der funktionellen RyR2-Cluster-Gruppierungen. **(B)** Prozentualer Flächenanteil der RyR2-Cluster pro Gruppierung. **(C)** Dichte der RyR2-Cluster innerhalb der Gruppierungen. Die funktionellen Cluster-Gruppierungen der *Non-Failing*-Proben und von Subtyp IV sind verglichen mit den anderen Subtypen deutlich größer. Innerhalb dieser Gruppierungen ist der Flächenanteil von RyR2-Clustern bei den Subtypen I-III erniedrigt. Die RyR2-Clusterdichte der Subtypen I und II ist erhöht. 3 Zellausschnitte pro Biopsie. One-way ANOVA mit Tukey-Kramer post-hoc Test, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ .

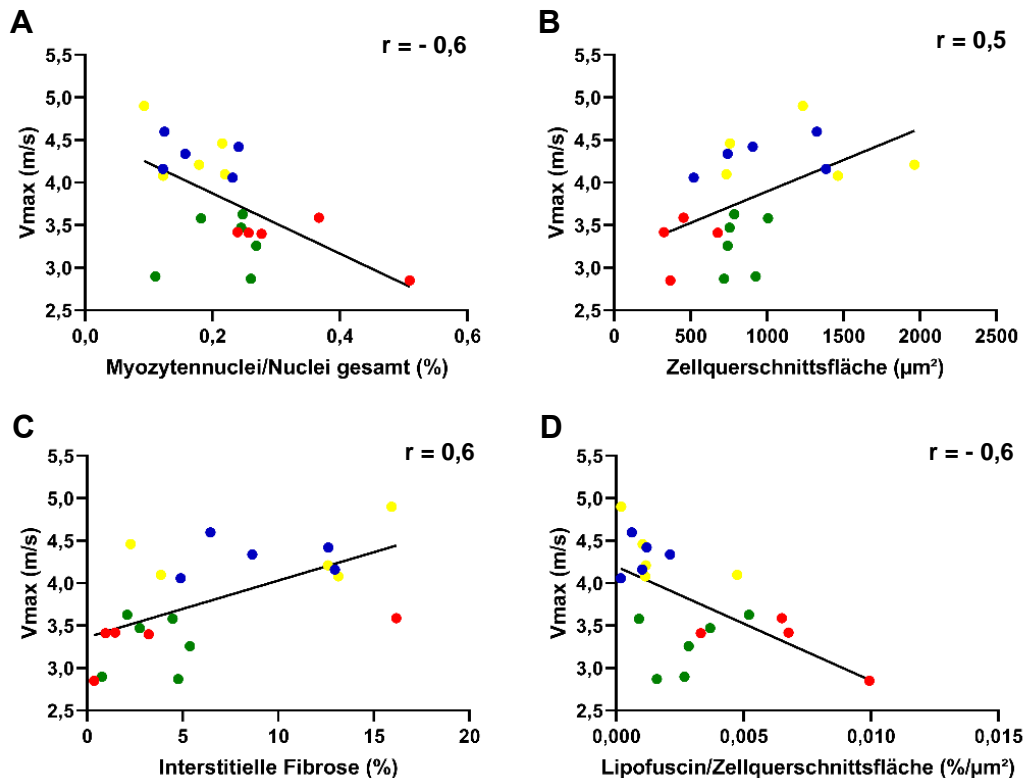
### 3.8 Korrelation von echokardiografischen Parametern und Analyseergebnissen

Abschließend wurden die hier erhobenen Ergebnisse der Bildanalysen mit den Parametern der Echokardiografie verglichen. Hierbei wurden mittels Korrelation nach Pearson mögliche Beziehungen zwischen den klinischen Parametern und den experimentell erhobenen Ergebnissen untersucht.

#### 3.8.1 Kardiomyozytenhypertrophie bei Zunahme der Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe

Zwischen der Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe und dem prozentualen Anteil der Myozytenuclei an der Gesamtnucleianzahl einer Fläche besteht eine negative lineare Beziehung (**Abb.14, A**). Bei erhöhter  $V_{\text{max}}$  reduziert sich der Myozytenucleianteil. Zusätzlich vergrößert sich der Zellquerschnitt bei steigender  $V_{\text{max}}$  (**Abb.14, B**). Beides sind Parameter für eine Verstärkung der Kardiomyozytenhypertrophie bei zunehmender Flussgeschwindigkeit über der Aortenklappe. Mit einem Pearson-Koeffizient von  $r = 0,6$  wird, im Rahmen der limitierten Probenanzahl, ein Zusammenhang zwischen der interstitiellen Fibrose des linken

Ventrikels und einer Zunahme der Flussgeschwindigkeit beschrieben (**Abb.14, C**). Interessant ist, dass der Lipofuscinanteil der Kardiomyozyten eher bei niedrigen  $V_{\max}$ -Werten ansteigt. Hier also ein negativer linearer Zusammenhang vorherrscht (**Abb 14, D**). Wobei hier bei Typ III (**Abb 14, D** grün) der negative lineare Zusammenhang beider Parameter schwächer zu sein scheint.



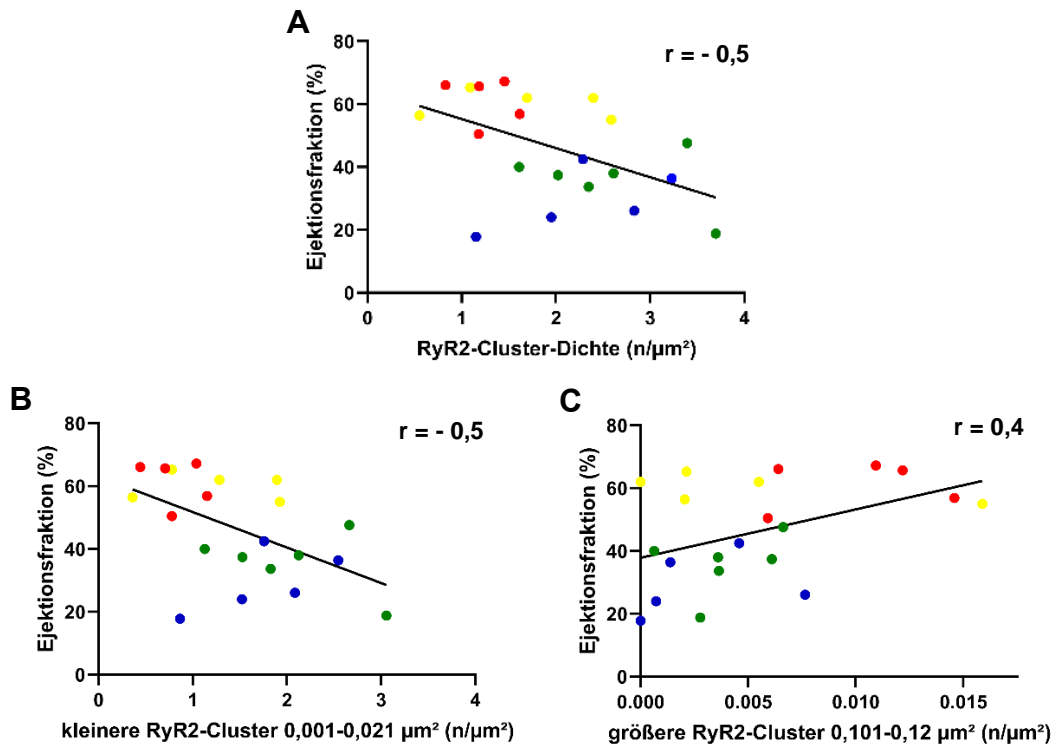
**Abbildung 14:** Darstellung korrelativer Beziehungen zwischen  $V_{\max}$  und einigen Parametern des myokardialen Gewebes. **(A)** Negativ lineare Beziehung zwischen  $V_{\max}$  und dem prozentualen Myozytenuclei-Anteil (bezogen auf die Gesamtnuclei-Anzahl). **(B)** Zunahme der Zellquerschnittsfläche der Kardiomyozyten bei erhöhter  $V_{\max}$ . **(C)** Beziehung zwischen einer vermehrten interstitiellen Fibrose und erhöhten  $V_{\max}$ -Werten. **(D)** Negative Beziehung zwischen  $V_{\max}$  und dem Lipofuscin-Anteil der Kardiomyozyten. Korrelation nach Pearson: Pearson-Korrelationskoeffizient ( $r$ ) bei +1 (bzw. -1) komplett positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang. Diagrammfarben: Gelb = Typ I, blau = Typ II, grün = Typ III, rot = Typ IV.

### 3.8.2 Einfluss der RyR2-Clustergröße und -dichte auf die Ejektionsfraktion

Die Ejektionsfraktion, als einer der Parameter, der zwischen Subtyp I und IV (LVEF  $\geq 50\%$ ) gegenüber Subtyp II und III (LVEF  $< 50\%$ ) differenziert, ist ein wichtiger klinischer Parameter für die Funktionalität und Kontraktionskraft des Herzens. **Abbildung 15** stellt das Verhältnis zwischen der Ejektionsfraktion und der RyR2-Clusterdichte sowie RyR2-Clustergröße dar.

In **Abb.15, A** wird der negativ lineare Zusammenhang zwischen der RyR2-Clusterdichte und der Ejektionsfraktion beschrieben. Bei Anstieg der allgemeinen

RyR2-Cluster-Anzahl kommt es zu einer Abnahme der Ejektionsfraktion. Hierbei ist ersichtlich, dass vorwiegend eine Zunahme kleinerer RyR2-Cluster Einfluss nimmt. Eine Abnahme der Ejektionsfraktion geht mit dem Anstieg der Anzahl kleinerer RyR2-Cluster (**Abb.16, B**) und der Abnahme größerer RyR2-Cluster (**Abb.16, C**) einher.



**Abbildung 15** | Korrelation der Ejektionsfraktion mit den RyR2-Clusterparametern. Die drei Diagramme zeigen die korrelative Beziehung zwischen der Ejektionsfraktion und der RyR2-Clusterdichte ( $n/\mu\text{m}^2$ ) (**A**) und der Anzahl kleinerer (**B**) bzw. größerer (**C**) RyR2-Cluster ausgewählter Größenbereiche. Korrelation nach Pearson: Pearson-Korrelationskoeffizient ( $r$ ) bei +1 (bzw. -1) komplett positiver (bzw. negativer) linearer Zusammenhang. Diagrammfarben: Gelb = Typ I, blau = Typ II, grün = Typ III, rot = Typ IV.

## 4 Diskussion

### 4.1 Spezifische Unterschiede zwischen den echokardiografisch definierten Subtypen – ein kurzer Überblick

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss subzellulärer myokardialer Veränderungen auf das klinische Bild der hochgradigen Aortenklappenstenose. Durch den Einsatz hochauflösender bildgebender Verfahren, hier der STED-Nanoskopie, konnten die klinisch erhobenen echokardiografischen Unterschiede, wie Veränderungen der LVEF, der  $V_{\max}$  und des  $\Delta P_{\text{mean}}$  auf struktureller nanoskopischer Ebene innerhalb linksventrikulärer humaner Kardiomyozyten, bestätigt werden. Hierzu wurden Herzmuskel-Biopsien von Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose nach echokardiografischen Kriterien in verschiedene Subtypen unterteilt (**Typ I:**  $V_{\max} \geq 4$  m/s,  $\Delta P_{\text{mean}} \geq 40$  mm Hg, LVEF  $\geq 50$  %; **Typ II:**  $V_{\max} \geq 4$  m/s,  $\Delta P_{\text{mean}} \geq 40$  mm Hg, LVEF  $< 50$  %; **Typ III:**  $V_{\max} < 4$  m/s,  $\Delta P_{\text{mean}} < 40$  mm Hg, LVEF  $< 50$  %; **Typ IV:**  $V_{\max} < 4$  m/s,  $\Delta P_{\text{mean}} < 40$  mm Hg, LVEF  $\geq 50$  %, SVI  $< 35$  ml/m<sup>2</sup> (Nishimura et al. 2014)). Die entnommenen Biopsien wurden in Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet, weiterverarbeitet und mikroskopisch untersucht.

Zunächst werden hier die Ergebnisse einführend dargestellt. Eine genaue Beschreibung von erhobenen Daten und ein Vergleich mit dem derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstand schließt sich in den darauffolgenden Abschnitten an.

Besonders das Transversal-Axiale-Tubulus-Netzwerk zeigt bei einigen Subtypen (Typ I-III) deutliche Veränderungen. Es kommt zu einem Rückgang der zellweiten TAT-Netzwerk-Dichte und einer Reduktion spezifischer transversaler Netzwerk-Komponenten (T-Tubuli). Hiervon ist der Subtyp II am deutlichsten betroffen. Interessant ist auch, dass es bei dem Subtyp IV zu keiner relevanten axialen Reorganisation des TAT-Netzwerks kommt. Auch auf Ebene der RyR2-Cluster zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen dem Subtyp IV, den anderen Subtypen sowie der Kontrollgruppe. Der Subtyp IV zeigt einen Rückgang der mit dem TAT-System assoziierten RyR2-Cluster und eine Größenzunahme dieser Cluster. Zusätzlich ist ein „Orphaning“ von RyR2-Clustern bei Subtyp IV zu beobachten, d.h. eine Zunahme, der vom TAT-Netzwerk entkoppelten, solitär vorkommenden RyR2-Cluster. Bei den Subtypen II-III ist die RyR2-Cluster-Dichte er-

höht, was hierbei aber mit einem Rückgang des prozentualen RyR2-Cluster-Flächenanteils einhergeht. Um die allgemeinen Fragmentationstendenzen von Subtyp II-III genauer zu untersuchen, wurden RyR2-Cluster im Bereich funktionell assoziierter Gruppierungen von 100 nm Rand-zu-Rand-Abstand analysiert (sogenannte Calcium-Freisetzungseinheiten – engl.: *Calcium-release-units*). Hierbei ließ sich eine allgemeine RyR2-Reduktion bestätigen. Es zeigte sich sowohl eine Reduzierung der RyR2-Clustergröße der Subtypen I-III als auch ein Rückgang der allgemeinen RyR2-Masse dieser Subtypen innerhalb der funktionell assoziierten Gruppierungen.

Zusätzlich zu den oben genannten Veränderungen konnten auf zellulärer Ebene signifikante Unterschiede festgestellt werden. So zeigte sich bei den Subtypen I-II eine signifikante Kardiomyozytenhypertrophie. Auch zeigten sich Auffälligkeiten bei der Ansammlung von Lipofuscin, dem sogenannten „Alterspigment“ perinucleär innerhalb der Kardiomyozyten. Hierbei zeigte Subtyp IV eine signifikant erhöhte Lipofuscinaggregation.

## **4.2 Detaillierte Präsentation der Ergebnisse und Vergleich mit früheren Publikationen**

### **4.2.1 Auf subzellulärer Ebene zeigen sich Veränderungen des TAT-Netzwerk-Aufbaus**

Da das TAT-Netzwerk für die elektromechanische Kopplung und die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials durch die Weiterleitung des Aktionspotentials ins Herzmuskelzellinnere von zentraler Bedeutung ist (Hong and Shaw 2017) und strukturelle tubuläre Veränderungen innerhalb linksventrikulärer Kardiomyozyten in der gängigen Literatur mit Herzmuskelpathologien korreliert werden (Louch et al. 2004; Crossman et al. 2015), wurde das linksventrikuläre myokardiale TAT-Netzwerk der einzelnen Subtypen untersucht.

Die TAT-Netzwerke der echokardiografisch definierten Subtypen zeigen signifikante Veränderungen. Besonders bei Subtyp II sind bei der relativen Orientierung der Netzwerkkomponenten deutliche Veränderungen zu beobachten. Es kommt zu einer signifikanten Zunahme axialer Tubuli (**Typ II = 29,29 ± 1,64; NF = 19,3 ± 1,49 %**), während die transversalen Abschnitte im Verhältnis zur Kontrollgruppe abnehmen (**Typ II = 10,15 ± 1; NF = 20,56 ± 1,66 %**).



In der absoluten Verteilung ist eine signifikante Abnahme der transversalen Komponenten der Subtypen I-III nachweisbar (**Typ I-III =  $0,01 \pm 0,001$** ;  $NF = 0,02 \pm 0,002 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ). Nur Subtyp IV scheint vom tubulären Umbau weniger betroffen zu sein. Zumindest sind keine signifikanten Unterschiede zur Non-Failing-Gruppe ersichtlich. Verglichen mit Subtyp IV sind aber bei den anderen Subgruppen I-III die TAT-Netzwerkverzweigungen erniedrigt, was sich durch vermehrte axiale Tubuli sowie die Reduktion der transversalen Komponenten und damit deren unter physiologischen Bedingungen häufigeren Netzwerk-Verzweigungen erklären lässt.

Bei dilatativer Herzinsuffizienz wird ähnlich wie bei Subtyp II in humanen Herzmuskelzellen von einer Reorganisation des Tubulus-Netzwerks mit weniger transversalen und mehr axialen Tubulus-Komponenten berichtet (Crossman et al. 2011). Crossman et al. (2015) beschreiben bei Kardiomyozyten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie eine signifikante Abnahme der transversalen Tubuli-Komponenten. Diese sind auch bei den Subtypen I-III verringert. Zusätzlich wird bei Crossman et al. (2015) ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Abnahme transversaler Tubuli und einer verminderten Kontraktionskraft von bestimmten Herzregionen mit reduziertem transversalen Tubuli-Netzwerk beschrieben (Crossman et al. 2015). Auch Wagner et al. (2012) beschreiben eine signifikante Reorganisation des TAT-Netzwerks nach Myokardinfarkt. Sie haben murine, gesunde Herzmuskelzellen und Herzmuskelzellen vier Wochen sowie acht Wochen nach Myokardinfarkt im Maus-Modell miteinander verglichen. Hierbei konnte nach vier Wochen eine signifikante Abnahme der transversalen sowie ein Anstieg der axialen Tubulus-Elemente festgestellt werden. Nach acht Wochen kam es zu einer ausgeprägten heterogenen Reorganisation des TAT-Membrannetzwerk mit teilweise unterbrochenen und stark dilatierten Tubulus-Komponenten.

Bei den Subtypen I-III kommt es zu einer signifikanten Reduktion der TAT-Netzwerk-Dichte (**Typ I + Typ II =  $0,06 \pm 0,004$** ; **Typ III =  $0,06 \pm 0,003$** ;  $NF = 0,09 \pm 0,006 \mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ ). Auch durch Lyon et al. (2009) wird neben der axial ausgeprägten Richtung des Netzwerks eine Reduktion der TAT-Netzwerkdichte als Folge von Herzinsuffizienz in humanen Kardiomyozyten und in Herzmuskelzellen von Ratten nach Myokardinfarkt beschrieben.

Die gleichzeitige signifikante Zunahme der Tubulusastlänge der Subtypen II und III, bei relevanter Reduktion des eigentlichen Tubulus-Netzwerks und signifikanter Zunahme axialer und Reduzierung transversaler Komponenten, sprechen für eine Ausbildung längerer nicht-verzweigter axialer Tubulusabschnitte. Aus Sicht der TAT-Netzwerkanalyse zeigen sowohl Subtyp II als auch III strukturelle Veränderungen, die in neueren wissenschaftlichen Publikationen bei Herzinsuffizienz auftreten und mit einer gestörten elektromechanischen Kopplung sowie verminderter Kontraktionskraft bestimmter Herzmuskelregionen in Zusammenhang gebracht werden (Crossman et al. 2015; Dries et al. 2018; Wagner et al. 2014). Klinisch korrelieren die TAT-Netzwerkveränderungen mit einer verminderten systolischen Leistung, definiert als LVEF von  $< 50\%$  bei Subtyp II und III.

#### 4.2.2 Veränderungen von RyR2-Clustern und deren subzellulärer Verteilung

„RyR2-Cluster“ wird als einschlägiger Begriff in der Literatur benutzt, um die Assemblierung mehrerer RyR2-Kanäle in räumlich abgrenzbaren Kanal-Gruppen ( $\geq 2$  bis  $\geq 100$  RyR2-Kanäle) in der SR-Membran von Kardiomyozyten mittels *Superresolution*-Nanoskopie zu beschreiben (Baddeley et al. 2009). Ähnlich wie bei den TAT-Netzwerk-Veränderungen lassen sich mittels STED-Nanoskopie auch im Bereich der RyR2-Cluster-Ausprägung deutliche Abweichungen von den physiologisch vorkommenden RyR2-Clustern feststellen. Auch hier kommt es zu einem deutlichen Unterschied zwischen Typ IV und den anderen Subtypen. Anders als bei dem TAT-Netzwerk zeigt Subtyp IV im Bereich der RyR2-Cluster aber auch deutliche Unterschiede verglichen mit der Kontrollgruppe. Bei dem Subtyp IV ist die TAT-Netzwerk-assoziierte durchschnittliche RyR2-Clustergröße interessanterweise signifikant zu den anderen Subtypen und der gesunden Vergleichsgruppe erhöht (**Typ IV =  $0,07 \pm 0,007$** ; Typ I =  $0,043 \pm 0,006$ ; Typ II =  $0,036 \pm 0,002$ ; Typ III =  $0,03 \pm 0,002$ ; NF =  $0,049 \pm 0,005 \mu\text{m}^2$ ). Möglicherweise als Ausdruck eines Kompensationsmechanismus, um die Auswurfleistung des Herzens zu erhalten (EF  $> 50\%$ ).

In einer Studie von Galice et al. (2018) wurde eine neue Methode entwickelt, um Calciumströme und die RyR2-Clustergröße in ventrikulären Kardiomyozyten von Ratten direkt *in vitro* miteinander zu vergleichen. Hierbei können Cluster mit 10-50 RyR2-Rezeptoren physiologische subzelluläre Calcium-Freisetzungs-Er-

eignisse reproduzieren, jedoch mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit zellweit propagierte arrhythmogene diastolische Calciumwellen erzeugen (Galice et al. 2018). Bei sehr großen RyR2-Clustern ( $> 75$  RyR2-Rezeptoren) erhöht sich dagegen die arrhythmogene Calciumwellen-Neigung (Galice et al. 2018). Entsprechend dem Modell von Galice et al. (2018) könnte demzufolge die Gefahr arrhythmogener Calcium-Wellen in Kardiomyozyten und ventrikulärer Arrhythmien bei Subtyp IV aufgrund mehr signifikant vergrößerter RyR2-Cluster erhöht sein.

Zusätzlich kommt es bei Subtyp IV zu einer Abnahme der Cav3-assoziierten Cluster-Anzahl (**Typ IV = 8,34  $\pm$  1,23**; NF = 17,43  $\pm$  2,1 %) und einer Zunahme solitär vorkommender RyR2-Cluster. Song et al. (2006) beschreiben anhand eines Modells bei Salz-sensitiven Ratten (SHRs) mit chronischer Herzinsuffizienz, dass räumliche Veränderungen der TAT-Netzwerkcomponenten auch L-Typ-Calcium-Kanäle (LTCCs) räumlich verschieben, sodass es zu einem erhöhten Abstand zwischen LTCCs und RyR2-Clustern kommt, was als Verwaisung (*Orphaning*) der RyR2-Cluster beschrieben wurde. Bei erhaltender Spannungsabhängigkeit und Amplitude des LTCC-Calciumstroms kommt es zu einer signifikanten Verlangsamung der Calcium-abhängigen-Aktivierung und -Inaktivierung. Subzellulär erhöht dies die Heterogenität der Calcium-Fluxe zwischen RyR2-Clustern (Song et al. 2006). Beides, eine erhöhte TAT-Netzwerk-assoziierte RyR2-Clustergröße sowie vermehrt solitär vorkommende RyR2-Cluster bei Subtyp IV, können zu kontraktile Dysfunktion und einem erhöhten Arrhythmie-Risiko beitragen.

Tendenziell ist die RyR2-Cluster-Anzahl bei den Subtypen I-II im Bereich kleinerer RyR2-Cluster erhöht. Bei dem Subtyp III kommt es in diesem Bereich (RyR2-Clustergröße: 0,001-0,02  $\mu\text{m}^2$ ) im Vergleich zu allen anderen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg (**Typ III = 2,04  $\pm$  0,22**; Typ I = 1,25  $\pm$  0,17; Typ II = 1,35  $\pm$  0,17; Typ IV = 0,82  $\pm$  0,13; NF = 0,75  $\pm$  0,1  $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ). Die Vermutung liegt nahe, dass es besonders bei den Subtypen II-III bei zusätzlich erhöhter allgemeiner Cluster-Anzahl (**Typ II = 2,29  $\pm$  0,23**; **Typ III = 2,65  $\pm$  0,24**; Typ IV = 1,25  $\pm$  0,18; NF = 1,18  $\pm$  0,14  $\text{n}/\mu\text{m}^2$ ) aber reduzierter RyR2-Flächenfraktion (**Typ II = 4,07  $\pm$  0,34**; **Typ III = 4,51  $\pm$  0,27**; Typ IV = 6,47  $\pm$  0,54; NF = 6,32  $\pm$  0,4 %) (siehe **Abb.7, B**) im Ergebnis zu einem in der Literatur disku-

tierten „Fragmentationsprozess“ kommt. Kolstad et al. (2018) beschreiben in einem Modell von Ratten mit ischämischer Kardiomyopathie nach Myokardinfarkt eine Fragmentation von RyR2-Clustern und damit eine größere Streuung lokaler Calcium-Fluxe kleinerer RyR2-Cluster in überlebenden ventrikulären Kardiomyozyten. Durch Fragmentation der RyR2-Cluster kommt es laut Kolstad et al. (2018) zu einem erhöhten Anstieg „stillere“ diastolischer Calcium-Freisetzungsergebnisse sowie zu einer Verlangsamung des Calciumtransienten durch vermehrte subzelluläre Heterogenität. Dies führt letztendlich zu einer Reduzierung der Kontraktibilität des Herzens (Kolstad et al. 2018). Folglich könnte eine strukturelle Fragmentation von RyR2-Clustern, auf mikroskopischer Ebene, bei den Subtypen I-II, auf Herzmuskelebene, zu einer Abnahme der Kontraktionskraft und diastolischen Funktionsstörungen führen.

#### 4.2.3 Fragmentationsprozesse der RyR2-Cluster bei den Subtypen I-III

Um Rückschlüsse auf Veränderungen innerhalb funktionell in Zusammenhang stehender RyR2-Cluster ziehen zu können, wurden zusätzlich Cluster-Gruppierungen von maximal 100 nm Rand-zu-Rand-Abstand zueinander untersucht. Dabei wurde die Definition einer funktionellen Einheit mit einem Rand-zu-Rand-Abstand von 100 nm der RyR2-Cluster zueinander als Grundlage verwendet (Baddeley et al. 2009).

Hierbei konnte eine Fragmentation von RyR2-Clustern bei den Subtypen I-III nachgewiesen werden. Verglichen mit der Kontrollgruppe zeigte sich eine Reduktion der RyR2-Masse (**Typ I =  $0,019 \pm 0,001$ ; Typ II =  $0,016 \pm 0,0009$ ; Typ III =  $0,016 \pm 0,0005$ ; NF =  $0,025 \pm 0,0008 \mu\text{m}^2$ ) sowie der RyR2-Clustergröße (**Typ I =  $0,01 \pm 0,0005$ ; Typ II =  $0,009 \pm 0,0004$ ; Typ III =  $0,01 \pm 0,0003$ ; NF =  $0,015 \pm 0,001 \mu\text{m}^2$ ) der Subtypen I-III. Die direkte Anzahl der RyR2-Cluster pro funktioneller Gruppierung war bei den Subtypen I-III nicht erhöht. Jedoch zeigte sich eine Erhöhung der Dichte der RyR2-Cluster bei den Subtypen I und II (**Typ I =  $51,55 \pm 1,07$ ; Typ II =  $53,31 \pm 1,13$ ; NF =  $46,48 \pm 1,7 \text{ n}/\mu\text{m}^2$ ). Dies weist auf eine beginnende Fragmentation dieser Subtypen hin. Stellt man die erhobenen Daten in Bezug zu der allgemeinen Clusteranalyse (siehe **Abb. 7 + 8**), bei der die Anzahl kleiner RyR2-Cluster des Subtyp III signifikant erhöht ist, spricht dies am ehesten dafür, dass bei diesem Subtyp der Fragmentationsprozess schon weiter fortgeschritten ist. Hierbei stehen viele dieser kleinen Cluster******

nicht mehr in einem funktionellen Zusammenhang (*Edge-to-edge*-Abstand: 100 nm) zueinander.

Macquaide et al. (2015) untersuchten die fixierten atrialen Kardiomyozyten von Schafen mit persistierendem Vorhofflimmern mittels STED-Mikroskopie und parallel Calciumströme lebender permeabilisierter atrialer Kardiomyozyten. Sie beschrieben einen Zusammenhang zwischen einer gesteigerten RyR2-Cluster-Fragmentation sowie -Umverteilung und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Calcium-Freisetzungs-Ereignissen. Hierbei führt die gesteigerte Cluster-Fragmentation in atrialen Kardiomyozyten zu einer erhöhten „*Spark*“-Frequenz mit gesteigerter „*Spark-to-Peak*“-Zeit sowie einer Verlängerung der Erregungsdauer (Macquaide et al. 2015). Allgemein sind zwischen der Studie von Macquaide et al. (2015) und den hier untersuchten Proben mehrere Unterschiede erkennbar: Anstatt atrialer Kardiomyozyten handelt es sich hier um Proben ventrikulärer Zellen. Anders als bei Macquaide et al. (2015) wurden die funktionellen Cluster-Gruppierungen der Subtypen mit einem Eck-zu-Eck-Abstand von 100 nm definiert (anstatt 150 nm). Trotz einiger Unterschiede gibt es jedoch auch einige Gemeinsamkeiten der RyR2-Cluster-Fragmentation, welche für eine ähnliche Veränderung der Funktionalität der Kardiomyozyten der Subtypen mit Tendenzen zu vermehrten spontanen Calcium-Freisetzungs-Ereignissen sprechen. Zusätzlich kommt es durch die Fragmentation zu einer Abnahme des allgemeinen Kontraktionsvermögens des Herzens (Kolstad et al. 2018).

#### 4.2.4 Myozytenzellhypertrophie der Subtypen I und II

Auf zellulärer Ebene zeigt sich bei den Subtypen ein bedeutender Unterschied in der Kardiomyozytengröße. Besonders bei den Subtypen I und II konnte eine signifikante Hypertrophie der Herzmuskelzellen verglichen mit der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (**Typ I =  $1149,52 \pm 186,49$** , **Typ II =  $971,75 \pm 174,82$** ,  $NF = 342,42 \pm 58,37 \mu\text{m}^2$ ). Interessant ist, dass die Zellquerschnittsfläche von Subtyp I auch zum Subtyp IV signifikant vergrößert ist (**Typ I =  $1149,52 \pm 186,49$** , **Typ IV =  $641,78 \pm 188,28 \mu\text{m}^2$** ). Eine Möglichkeit könnte sein, dass der Subtyp I zunächst als physiologische Kompensation auf die erhöhte Nachlast durch die Aortenklappenstenose mit Hypertrophie reagiert (siehe **Abb. 4 + 5**). Dieser Mechanismus kann vermutlich langfristig nicht aufrechterhalten werden und äußert sich dann durch eine Reduzierung der systolischen Funktionen. Folglich könnte es sekundär zu einem Phänotyp-Wechsel von Subtyp I zu II kommen. Hier würde

sich die systolische Dysfunktion schließlich als reduzierte Ejektionsfraktion von < 50 % darstellen.

In mehreren wissenschaftlichen humanen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen einer chronischen linksventrikulären Druckbelastung, wie bei einer Aortenklappenstenose, und einer kardialen Herzmuskelzellhypertrophie beschrieben (Grossman et al. 1975; Quinones et al. 1975). Rader et al. (2015) beschreiben diesen Vorgang als Versuch der Kompensation, der jedoch prognostisch keinerlei Besserung bringt und letztendlich zum Krankheitsbild einer Herzinsuffizienz führt. Ruppert et al. (2019) haben in einer Studie festgestellt, dass in mit Aorten-Banding behandelten Ratten die frühe Phase (nach sechs Wochen) der Druck-induzierten linksventrikulären Hypertrophie zunächst mit einer gesteigerten linkventrikulären Kontraktilität des Herzens einhergeht. Ursächlich ist hier unter anderem eine erhöhte myofilamentäre Calcium-Sensitivität auf Sarkomer-Ebene, hervorgerufen durch die Hyperphosphorylierung der Phosphokinase C-spezifischen Thr-144-Stelle von kardialem Troponin I (Ruppert et al. 2019). Dieser frühzeitige Kompensationsmechanismus kann jedoch in späteren Stadien der Hypertrophie (nach zwölf Wochen und 18 Wochen) nicht mehr aufrecht erhalten werden und führt zu einer reduzierten systolischen Leistung (Ruppert et al. 2019). Sicherlich haben hier auch Gesetze wie der Frank-Starling-Mechanismus Einfluss (Kobirumaki-Shimozawa et al. 2014).

Überraschenderweise zeigt der Subtyp IV keine Herzmuskelzellhypertrophie. Es zeigen sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe, in Bezug auf Subtyp I sind die Kardiomyozyten des Subtyp IV signifikant kleiner (**Typ IV = 641,78 ± 188,28**, Typ I = 1149,52 ± 186,49  $\mu\text{m}^2$ ).

Die auffällige Abwesenheit von hypertrophierten Kardiomyozyten, möglicherweise degenerativ zurückgebildet, in Subtyp IV-Biopsien könnte zusätzlich im Zusammenhang mit einer erhöhten Mortalität verglichen mit den Subtypen I und II stehen. Unsere erstmaligen Subtypen-spezifischen Hypertrophie-Beobachtungen könnten die Einschätzung von Mangner et al. (2018) stützen, dass *low-flow* (definiert als einen Schlagvolumenindex (SVI)  $\leq 35 \text{ ml/m}^2$ ) ein Haupteinflusskriterium für eine schlechtere Prognose ist. Sowohl die *low-flow/low-gradient AS* (Typ III) als auch die *paradoxe low-flow/low-gradient AS* (Typ IV) erfüllen das Kriterium einer *low-flow AS* mit durchschnittlichen SVIs von 27,4  $\text{ml/m}^2$  (Typ III)

und 30,6 ml/m<sup>2</sup> (Typ IV). Beide Subtypen haben in den histologischen Untersuchungen keine signifikant gesteigerte Hypertrophie gezeigt, wobei der Subtyp III visuell zumindest tendenziell vergrößerte Kardiomyozyten im Vergleich zu Subtyp IV aufweist (siehe **Abb.2, A**).

#### 4.2.5 Lipofuscinhaltige Aggregate bei Subtyp IV

Lipofuscin wird in der Wissenschaft als Begriff für spezielle nicht weiter funktionelle oder Abbau-fähige Stoffwechselprodukte in postmitotischen alternden Zellen u.a. neuronalen oder kardialen Ursprungs genutzt (Brunk und Terman 2002). Es fällt als bräunliche perinucleäre Ablagerung innerhalb dieser Zellen auf (Mitrut et al. 2018). Diese Lipofuscinaggregate bestehen u.a. aus akkumulierten Lipidresten, oxidierten vernetzten Proteinen und Metallen (insbesondere redoxaktivem Eisen) (Terman et al. 2010). Zusätzlich soll eine Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien stattfinden (Leon and Gustafsson 2016; König et al. 2017; Terman et al. 2010).

Da in den HE-Übersichtsaufnahmen der LV-Herzmuskelbiopsien diese bräunlichen perinucleären Einschlüsse bei einigen Subtypen, besonders bei Subtyp IV erkennbar waren, wurden diese näher untersucht. Hierbei wurde sich die Autofluoreszenz dieser Lipofuscinablagerungen zunutze gemacht (Croce and Bottioli 2014). Die Gewebeschnitte wurden mit einem Lichtspektrum von 405 nm angeregt und die Autofluoreszenz der einzelnen Herzmuskelzellen gemessen und quantifiziert. Hierbei zeigt AS-Subtyp IV, verglichen mit den anderen untersuchten Gruppen, als einzige Gruppe eine signifikante Erhöhung des perinucleären Lipofuscinanteils innerhalb der linksventrikulären Kardiomyozyten (**Typ IV = 0,007 ± 0,001**; Typ I = 0,002 ± 0,0007; Typ II = 0,001 ± 0,0003; Typ III = 0,003 ± 0,0006; NF = 0,002 ± 0,0003 %/μm<sup>2</sup>) (siehe **Abb.4**).

Lipofuscin wird einerseits als Abfallprodukt vor allem postmitotischer Zellen wie Nerven- und Herzmuskelzellen beschrieben, andererseits kann es aktiv in deren Metabolismus eingreifen (Höhn and Grune 2013). Laut Höhn and Grune (2013) soll es die Fähigkeit besitzen, redoxaktive Übergangsmetalle zu integrieren und Sauerstoffradikale zu formen. Zusätzlich wird durch die kompetitive sterische Bindung der Lipofuscinaggregate an das Proteasom der Abbau proapoptotischer Proteine gehemmt, dieses verstärkt das Phänomen der Apoptose und reduziert somit die Lebensfähigkeit dieser Zellen (Powell et al. 2005; Höhn et al. 2011). In

einer Studie mit humanen Fibroblasten und HeLA-Zellen von König et al. (2017) konnte festgestellt werden, dass die Anhäufung von dysfunktionalen Mitochondrien zu einer erhöhten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species* - ROS) führt. Möglicherweise existiert ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Autophagiefähigkeit alternder Herzmuskelzellen und der Akkumulation dysfunktionaler Mitochondrien innerhalb dieser Zellen (Leon and Gustafsson 2016). Mehrere Studien weisen darauf hin, dass eine Reduktion der Autophagiefähigkeit kardialer Muskelzellen in Verbindung mit deutlich erhöhten Levels an reaktiver Sauerstoffspezies und anderen Komponenten oxidativem Stress, einer gestörten Kontraktilität bis hin zur Herzinsuffizienz sowie einer Verkürzung der Lebensspanne stehen (Taneike et al. 2010; Wohlgemuth et al. 2014; Leon and Gustafsson 2016).

Schlussfolgernd könnte die auffällige Zunahme an Lipofuscinaggregaten des Subtyp IV möglicherweise durch vermehrten Untergang mitochondrialer und bislang unbekannter Protein-Komponenten erklärt werden. Durch vermehrten oxidativen Stress und Protein-Lipid-Aggregate könnte die Lebensfähigkeit der Herzmuskelzellen zusätzlich kompromittiert werden. Um diese Vermutung zu bestätigen, wären weiterführende molekulare und morphologische Analysen der Mitochondrien sowie oxidativer Stresstargets wichtig.

#### **4.3 Korrelative Beziehung einiger Echokardiografieparameter mit zellulären und subzellulären Elementen**

Durch die Korrelation nach Pearson konnte der Einfluss der erhöhten Flussgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) über der Aortenklappe auf eine verstärkte Myozytenhypertrophie festgestellt werden. Dies passt zu der verstärkten Myozytenhypertrophie der Subtypen I und II. Diese Subtypen sind echokardiografisch die Gruppen mit erhöhter  $V_{\max}$ . Eine Beziehung zwischen diesem klinischen Parameter und der Myozytenhypertrophie ist deshalb naheliegend.

Der Zusammenhang zwischen einer erniedrigten Ejektionsfraktion und einer gesteigerten RyR2-Clusterdichte, bei Zunahme kleinerer und Abnahme größerer RyR2-Cluster, spiegelt möglicherweise die Abhängigkeit der systolischen Leistungsfähigkeit des Herzens (hier dargestellt durch die Ejektionsfraktion) von der



Fragmentation einiger RyR2-Cluster wider. Diese Fragmentation scheint vor allem bei den Subtypen II und III vorzukommen, bei denen klinisch die Ejektionsfraktion  $< 50\%$  liegt.

#### **4.4 Limitationen der Untersuchungen**

Es konnten viele Unterschiede zwischen den Subtypen gefunden werden und es liegt nun ein genaueres Bild zu den einzelnen Subtypen vor. Jedoch gibt es einige Faktoren, die spezifischere Betrachtungen einschränken.

Dadurch, dass es sich um Proben von lebenden humanen Spendern handelt, war sowohl die Anzahl als auch die Probengröße limitiert. Durch die einzelnen Biopsien konnte nur ein kleiner Ausschnitt der linken Herzkammer untersucht werden. Dabei stellt sich das Zellbild innerhalb eines Ventrikels vermutlich nicht überall gleich, sondern inhomogen und mit lokalen Unterschieden dar. Deshalb ist es wichtig, die hier erhobenen Ergebnisse nicht als allgemeingültige Darstellung des Herzmuskel-Phänotyps, sondern als Hinweis auf eine Tendenz möglicher Veränderungen einzelner Herzmuskelabschnitte bei verschiedenen Subtypen hochgradiger Aortenklappenstenose anzusehen.

Zusätzlich gibt es selten das Krankheitsbild der isolierten Aortenklappenstenose. Häufig treten weitere Erkrankungen auf, wie beispielsweise die arterielle Hypertonie oder Fettstoffwechselstörungen. Diese können weiteren Einfluss auf myokardiale Veränderungen haben.

Um genügend Material für die STED-Mikroskopie zu erhalten, musste das Gewebe nach Entnahme direkt fixiert werden. Mit dem fixierten Gewebe waren nur strukturelle und keine funktionellen Analysen mehr möglich. Die hier erzielten Ergebnisse stützen sich also allein auf strukturelle Bildanalysen. Zusätzlich ist schwer zu beurteilen, ob es durch den Fixierungsprozess zu relevanten strukturellen Veränderungen an den Biopsien gekommen ist. Da jedoch alle Subtypen und auch die *Non-Failing*-Kontrollgruppe hierbei denselben Prozess durchlaufen haben, können Unterschiede zwischen den Subgruppen als signifikant betrachtet werden. Zusätzlich bietet die Fixierung die Möglichkeit einer Momentaufnahme und die Unterbindung weiterer Stoffwechselprozesse nach Entnahme des Gewebes und somit eine Annäherung an das strukturelle Bild des *in vivo* Herzmuskelgewebes.

#### 4.5 Ausblick

Insgesamt konnten Subtyp-spezifische Membrankomponenten-Veränderungen des TAT-Netzwerks, der RyR2-Cluster-Fragmentierung, der Kardiomyozyten-Zellgröße und der perinucleären Lipofuscinaggregation nachgewiesen werden. Die ausgeprägtesten Unterschiede sind in **Tabelle 4** vergleichend dargestellt. Diese fasst qualitative Unterschiede zwischen den vier Subtypen relativ zur gesunden Vergleichsgruppe (*Non-Failing*) durch Pfeilsymbole zusammen:

**Tabelle 4:** Signifikante Unterschiede von vier Subtypen relativ zur gesunden Vergleichsgruppe. Pfeile zeigen eine relative Zunahme oder Abnahme (P mind. < 0,05)

	Typ I	Typ II	Typ III	Typ IV
<b>TAT-Netzwerk-Veränderungen</b>				
TAT-Netzwerk-Dichte ( $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ )	↓	↓	↓	
Tubulusastlänge ( $\mu\text{m}$ )		↑	↑	
rel. axiale Tubulienteile (%)		↑		
rel. transversale Tubulienteile (%)		↓		
abs. transversale Tubulienteile ( $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ )	↓	↓	↓	
<b>RyR2-Cluster-Veränderungen</b>				
RyR2-Regelmäßigkeit (a.u.)			↓	
RyR2-Cluster-Flächenfraktion (%)		↓	↓	
RyR2-Cluster-Anzahl/Fläche ( $\text{n}/\mu\text{m}^2$ )		↑	↑	
kleine RyR2-Cluster ( $<0,02 \mu\text{m}^2$ )			↑	
große RyR2-Cluster ( $0,061 \mu\text{m}^2 - 0,1 \mu\text{m}^2$ )	↓	↓		
Cav3-assoziierte-RyR2-Clustergröße ( $\mu\text{m}^2$ )			↓	↑
nicht-Cav3-assoziierte-RyR2-Clustergröße ( $\mu\text{m}^2$ )	↓	↓	↓	
Anteil Cav3-assoziiierter-RyR2-Cluster (%)				↓
<b>Kardiomyozytengröße</b>				
Myozyten-Nuclei/Nuclei-Anzahl gesamt (%)	↑	↑		
Maximaler Myozytendurchmesser ( $\mu\text{m}$ )	↑	↑		
<b>Lipofuscinaggregation</b>				
Lipofuscinanteil ( $\%/ \mu\text{m}$ )				↑

$P < 0,05$ , One-way ANOVA mit Tukey-Kramer post-hoc Test

Diese in der vorliegenden Arbeit ermittelten Unterschiede können relevant für die Myokardfunktion sein und zum differentiellen Verständnis, der Prognose und der Behandlung unterschiedlicher klinischer Subtypen der hochgradigen symptomatischen Aortenklappenstenose beitragen.

Zusätzlich können die Befunde durch zukünftige Studien, beispielsweise bezogen auf Änderungen mitochondrialer Atmungskomplexe und Membranstrukturen, Zytoskelett-Proteine und -Filamente und die extrazelluläre Matrix, weiter vertieft werden. Außerdem könnten folgende Fragestellungen näher analysiert werden:

1. Wo ist die Fragmentation der RyR2-Cluster besonders stark ausgeprägt? Gibt es bestimmte Herzmuskelabschnitte die verstärkt betroffen sind? Und

sind innerhalb der Kardiomyozyten eher die Cluster in den oberflächennahen peripheren Regionen oder zentralere Junctionen betroffen?

2. Ist bei Subtyp IV die Hypertrophie weniger ausgeprägt oder degenerativ zurückgebildet bei zusätzlich stark vermehrter Lipofuscinaggregation? Ist das Anhäufen von Lipofuscinaggregaten ein Ausdruck vermehrten oxidativen Proteom- und Lipid-Stresses?
3. Kommt es zu einem verstärkten Zelltod von Kardiomyozyten bei spezifischen Subtypen? Untersuchungen mit Apoptosemarkern, wie *TNF-related apoptosis-stimulating-ligand* (TRAIL) und Caspase-3 könnten wegweisend sein (Teringova and Tousek 2017).
4. Sind weitere Schlüssel-Proteine der elektrochemischen Kopplung signifikant verändert? Korrelieren diese mit Veränderungen der Genexpression in proteo-genomischen Analysen? Insbesondere scheinen Proteine myokardialer Calciumsignalprozesse, wie Phospholamban, SERCA2a, der L-Typ-Calciumkanal Cav 1.2 und Junctophilin-2 von Interesse.

## 5 Zusammenfassung

Mittels konfokaler Mikroskopie und STED-Nanoskopie linksventrikulärer Herzmuskelbiopsien von Patienten mit hochgradiger Aortenklappenstenose konnten Mechanismen eines dysfunktionalen kardialen Umbaus auf zellulärer und subzellulärer Ebene untersucht werden. Das Verständnis über diese Mechanismen ist entscheidend, um gezielte Maßnahmen in Hinblick auf Prognose und Therapie ergreifen zu können.

Hierzu wurden echokardiografisch vier Subtypen definiert: **Typ I:**  $V_{\max} \geq 4$  m/s,  $\Delta P_{\text{mean}} \geq 40$  mm Hg, LVEF  $\geq 50$  %; **Typ II:**  $V_{\max} \geq 4$  m/s,  $\Delta P_{\text{mean}} \geq 40$  mm Hg, LVEF  $< 50$  %; **Typ III:**  $V_{\max} < 4$  m/s,  $\Delta P_{\text{mean}} < 40$  mm Hg, LVEF  $< 50$ %; **Typ IV:**  $V_{\max} < 4$  m/s,  $\Delta P_{\text{mean}} < 40$  mm Hg, LVEF  $\geq 50$  %, SVI  $< 35$  ml/m<sup>2</sup> (Nishimura et al. 2014).

Es konnten sowohl auf zellulärer als auch auf subzellulärer Ebene signifikante Unterschiede zwischen den Subtypen festgestellt werden. Besonders Subtyp I und II zeigen Ähnlichkeiten. Beide zeigen deutliche Anzeichen einer Hypertrophie der Kardiomyozyten. Vermutlich ist der erhöhte Druckgradient beider Subtypen ( $\Delta P_{\text{mean}} > 40$  mmHg) hier ein entscheidender Einflussfaktor. Bei den Subtypen I-III kommt es zu deutlichen Veränderungen des transversal-axialen Tubulus-Netzwerks. Die Dichte des Netzwerks ist deutlich reduziert. Während alle drei Subtypen stark an transversalen Tubulus-Komponenten verlieren, ist es Subtyp II, der eine deutliche Zunahme axialer Tubulus-Abschnitte zeigt. Diese Veränderungen werden auch bei Herzinsuffizienz beschrieben (Wagner et al. 2012; Crossman et al. 2011; Dries et al. 2018) und führen zu einer verminderten Kontraktionskraft des Herzens (Crossman et al. 2015). Die Subtypen I-III zeigen signifikante Hinweise einer RyR2-Cluster-Fragmentation. Bei Subtyp III ist die Anzahl detektierbarer kleinerer RyR2-Cluster bei Abnahme der Tubuli-assoziierten RyR2-Clustergröße deutlich erhöht. Die Subtypen I und II zeigen bei der Analyse funktioneller RyR2-Cluster-Gruppierungen ein Missverhältnis zwischen einer reduzierten RyR2-Masse sowie RyR2-Clustergröße und einer Zunahme der Dichte Gruppierungs-assoziiierter RyR2-Cluster. Solche Fragmentationsprozesse werden mit einer reduzierten Kontraktilität des Herzens verbunden (Kolstad et al. 2018). Subtyp IV weicht in seinen zellulären Veränderungen von den anderen Subgruppen ab. Das Tubulussystem ist in seiner Orientierung und Ausprägung

strukturell wenig verändert. Es gibt weniger Tubuli-assoziierte RyR2-Cluster, die jedoch signifikant vergrößert sind. Gleichzeitig ist eine Verschiebung hin zu mehr solitär, vom Tubulussystem unabhängig, stehenden RyR2-Clustern zu beobachten. Beide Veränderungen verstärken das arrhythmogene Potential von Subtyp IV (Galice et al. 2018; Song et al. 2006). Zusätzlich ist Subtyp IV die einzige Subgruppe, die keinerlei aktuelle Anzeichen einer Herzmuskelzellhypertrophie zeigt, möglicherweise nach degenerativer Rückbildung. Des Weiteren kommt es bei Subtyp IV zu einer vermehrten Ablagerung von Lipofuscinbestandteilen innerhalb der Kardiomyozyten. Vielleicht ist dies durch erhöhten oxidativen Stress unter anderem durch reaktive Sauerstoffspezies und eine mangelnde Fähigkeit zur Autophagie bedingt (Brunk und Terman 2002; König et al. 2017; Leon and Gustafsson 2016; Taneike et al. 2010).

Die Ergebnisse zeigen, dass es deutliche Unterschiede zwischen den Subtypen gibt. Diese Unterschiede auf Myokardebene können relevant für die Myokardfunktion sein. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse können zum differentiellen Verständnis, der Prognose und der Behandlung unterschiedlicher klinischer Subtypen der hochgradigen symptomatischen Aortenklappenstenose beitragen.

## 6 Anhang

**Tabelle A1:** Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsgut	Firma
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Deckgläser 18x18mm Stärke 1,5mm	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5ml, 1,5ml & 2ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen (ohne Filter) 10µl-20µl, 100-200µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Dako Pen	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Gelsäule: PD Miditrap G-25	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Nagellack durchsichtig	Handelsüblich

**Tabelle A2:** Farbstoffe und Einbettmedien

Produkt	Firma
Mayers Hämatoxylinlösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Eosin Y Lösung, Alkoholisch	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Sirius Red/Fast Green Collagen Staining Kit	AMS Biotechnology (Europe) Ltd, Frankfurt am Main, Deutschland
Richard-Allan Scientific Cytoseal 60	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
ProLong Gold	Molecular Probes, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle A3:** Lösungen und Chemikalien

Substanz	Firma
Ethanol 99%ig vergällt	Apotheke
Roti-Histofix	Roth, Nürnberg, Deutschland
1x DPBS	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
10x DPBS	Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA
Xylol J.T. Baker	Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland
Triton x-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dako 10x Citratpuffer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Weizenkeimaggutinin (WGA), Unkonjugiert	Biozol, Eching, Deutschland
Natronlauge 2N (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl) rauchend 37%	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
KHPO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
KCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle A4:** Primärantikörper für die STED-Mikroskopie

Antikörper	Verdünnung	Anbieter	Bestellnummer
Rabbit Anti-RyR2 Prestige	1:100	Sigma-Aldrich	HPA020028
Rabbit Anti-Jph2	1:250	Invitrogen	40-5300
Mouse Anti-Cav3	1:250	Abcam	ab2912

**Tabelle A5:** Sekundärantikörper und Fluorophore für die STED-Mikroskopie

Antikörper	Verdünnung	Anbieter	Bestellnummer
Abberior STAR 488, NHS Ester	1:300	Abberior	1-0101-006-9
Abberior STAR 635p, Goat Anti-Rabbit IgG	1:300	Abberior	2-0012-007-2
Abberior STAR 580, Goat Anti-Mouse IgG	1:300	Abberior	2-0002-005-1

**Tabelle A6:** Geräte

Geräte	Firma
Einbettautomat Leica TP1020	Leica, Wetzlar, Deutschland
Ausgießstation Leica EG150H + EG1140C	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrotom Leica RM2165	Leica, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle OMW 310-s	Ok., Ingolstadt, Deutschland
Zeiss Axiocam 105 Color	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Konfokalmikroskop Lsm 710 <i>mit EC Plan-Neofluar 20 x/0.50 M27 Objektiv</i>	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
TCS SP8 STED Mikroskop <i>mit HC PL APO CS2 100x/1.4 Öl-Objektiv</i>	Leica, Wetzlar, Deutschland



**Tabelle A7:** Software

Programm	Anwendung	Anbieter
Fiji	Bildanalyse und -verarbeitung	<a href="http://fiji.sc/">http://fiji.sc/</a>
GraphPad Prism	Datenorganisation, -analyse und -darstellung	GraphPad Software, La Jolla, USA
Office 2010	Text- und Datenverarbeitung	Microsoft Inc., Redmont, WA, USA
ZEN 2009	Konfokale Mikroskopie (LSM710)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
LAS X (Leica Application Suite)	STED Mikroskopie	Leica, Wetzlar, Deutschland
Citavi 6	Zitieren	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz

## 7 Literaturverzeichnis

Akahori H, Tsujino T, Masuyama T, Ishihara M (2018): Mechanisms of aortic stenosis. *J Cardiol* 71, 215–220

Akahori H, Tsujino T, Naito Y, Matsumoto M, Lee-Kawabata M, Ohyanagi M, Mitsuno M, Miyamoto Y, Daimon T, Hao H et al. (2011): Intraleaflet haemorrhage is associated with rapid progression of degenerative aortic valve stenosis. *Eur Heart J* 32, 888–896

Baddeley D, Jayasinghe ID, Lam L, Rossberger S, Cannell MB, Soeller C (2009): Optical single-channel resolution imaging of the ryanodine receptor distribution in rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 22275–22280

Brandenburg S, Pawlowitz J, Eikenbusch B, Peper J, Kohl T, Mitronova GY, Sossalla S, Hasenfuss G, Wehrens XH, Kohl P et al. (2019): Junctophilin-2 expression rescues atrial dysfunction through polyadic junctional membrane complex biogenesis. *JCI Insight* 4, e127116

Brunk UT, Terman A (2002): The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Eur J Biochem* 269, 1996–2002

Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, Spelsberg TC, McCarthy PM, Rahimtoola SH, Rajamannan NM (2006): Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *J Am Coll Cardiol* 47, 1707–1712

Carabello BA (2013): Introduction to aortic stenosis. *Circ Res* 113, 179–185

Croce AC, Bottiroli G (2014): Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *Eur J Histochem* 58, 2461

Crossman DJ, Ruygrok PN, Ruygrok PR, Soeller C, Cannell MB (2011): Changes in the organization of excitation-contraction coupling structures in failing human heart. *PLoS ONE* 6, e17901

Crossman DJ, Young AA, Ruygrok PN, Nason GP, Baddeley D, Soeller C, Cannell MB (2015): T-tubule disease: Relationship between t-tubule organization and regional contractile performance in human dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 84, 170–178

- Des Georges A, Clarke OB, Zalk R, Yuan Q, Condon KJ, Grassucci RA, Hendrickson WA, Marks AR, Frank J (2016): Structural basis for gating and activation of RyR1. *Cell* 167, 145-157
- Dries E, Santiago DJ, Gilbert G, Lenaerts I, Vandenberg B, Nagaraju CK, Johnson DM, Holemans P, Roderick HL, Macquaide N et al. (2018): Hyperactive ryanodine receptors in human heart failure and ischaemic cardiomyopathy reside outside of couplons. *Cardiovasc Res* 114, 1512–1524
- Dweck MR, Boon NA, Newby DE (2012): Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium. *J Am Coll Cardiol* 60, 1854–1863
- Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW (2017): Calcium and excitation-contraction coupling in the heart. *Circ Res* 121, 181–195
- Galice S, Xie Y, Yang Y, Sato D, Bers DM (2018): Size matters: Ryanodine receptor cluster size affects arrhythmogenic sarcoplasmic reticulum calcium release. *J Am Heart Assoc* 7, e008724
- Gratton JP, Bernatchez P, Sessa WC (2004): Caveolae and caveolins in the cardiovascular system. *Circ Res* 94, 1408–1417
- Grimard BH, Safford RE, Burns EL (2016): Aortic stenosis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician* 93, 371–378
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975): Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56, 56–64
- Höhn A, Grune T (2013): Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol* 1, 140–144
- Höhn A, Jung T, Grimm S, Catalgol B, Weber D, Grune T (2011): Lipofuscin inhibits the proteasome by binding to surface motifs. *Free Radic Biol Med* 50, 585–591
- Hong T, Shaw RM (2017): Cardiac t-tubule microanatomy and function. *Physiol Rev* 97, 227–252

lung B, Baron G, Butchart E, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang O, Tornos P, Vanoverschelde J, Vermeer F, Boersma E et al. (2003): A prospective survey of patients with valvular heart disease in europe: The euro heart survey on valvular heart disease. *Eur Heart J* 24, 1231–1243

Jayasinghe ID, Cannell MB, Soeller C (2009): Organization of ryanodine receptors, transverse tubules, and sodium-calcium exchanger in rat myocytes. *Biophys J* 97, 2664–2673

Jian B, Narula N, Li Qy, Mohler ER, Levy RJ (2003): Progression of aortic valve stenosis: TGF- $\beta$ 1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg* 75, 457–465

Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kılıç R, Sarıkoç A, Brueckmann M, Vahl C, Hagl S, Haase KK et al. (2003): Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* 170, 205–211

Klar TA, Jakobs S, Dyba M, Egner A, Hell SW (2000): Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8206–8210

Kobirumaki-Shimozawa F, Inoue T, Shintani SA, Oyama K, Terui T, Minamisawa S, Ishiwata Si, Fukuda N (2014): Cardiac thin filament regulation and the frank-starling mechanism. *J Physiol Sci* 64, 221–232

Kolstad TR, van den Brink J, Macquaide N, Lunde PK, Frisk M, Aronsen JM, Norden ES, Cataliotti A, Sjaastad I, Sejersted OM et al. (2018): Ryanodine receptor dispersion disrupts Ca<sup>2+</sup> release in failing cardiac myocytes. *Elife* 7, e39427

König J, Ott C, Hugo M, Jung T, Bulteau A-L, Grune T, Höhn A (2017): Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. *Redox Biol* 11, 673–681

Kuck K-H, Bleiziffer S, Eggebrecht H, Ensminger S, Frerker C, Möllmann H, Nef H, Thiele H, Treede H, Wimmer-Greinecker G et al. (2020): Konsensuspapier der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) und der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG) zur kathetergestützten Aortenklappenimplantation (TAVI) 2020. *Kardiologie* 14, 182–204

- Kuck K-H, Eggebrecht H, Elsässer A, Hamm C, Haude M, Ince H, Katus H, Möllmann H, Naber CK, Schunkert H et al. (2016): Qualitätskriterien zur Durchführung der kathetergestützten Aortenklappenimplantation (TAVI). *Kardiologie* 10, 282–300
- Kushnir A, Marks AR (2010): The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease; *Adv Pharmacol* 59, 1–30
- Leon LJ, Gustafsson ÅB (2016): Staying young at heart: autophagy and adaptation to cardiac aging. *J Mol Cell Cardiol* 95, 78–85
- Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, Tuzcu EM, Webb JG, Fontana GP, Makkar RR et al. (2010): Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *N Engl J Med* 363, 1597–1607
- Lindman BR, Patel J (2016): Multimorbidity in older adults with aortic stenosis. *Clin Geriatr Med* 32, 305–314
- Louch WE, Bito V, Heinzel FR, Macianskiene R, Vanhaecke J, Flameng W, Mubagwa K, Sipido KR (2004): 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* 62, 63–73
- Lyon AR, MacLeod KT, Zhang Y, Garcia E, Kanda GK, Lab MJ, Korchev YE, Harding SE, Gorelik J (2009): Loss of t-tubules and other changes to surface topography in ventricular myocytes from failing human and rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6854–6859
- Mack MJ, Leon MB, Smith CR, Miller DC, Moses JW, Tuzcu EM, Webb JG, Douglas PS, Anderson WN, Blackstone EH et al. (2015): 5-year outcomes of transcatheter aortic valve replacement or surgical aortic valve replacement for high surgical risk patients with aortic stenosis (partner 1): a randomised controlled trial. *The Lancet* 385, 2477–2484
- Mack MJ, Leon MB, Thourani VH, Makkar R, Kodali SK, Russo M, Kapadia SR, Malaisrie SC, Cohen DJ, Pibarot P et al. (2019): Transcatheter aortic-valve replacement with a balloon-expandable valve in low-risk patients. *N Engl J Med* 380, 1695–1705

- Macquaide N, Tuan H-TM, Hotta J-I, Sempels W, Lenaerts I, Holemans P, Hofkens J, Jafri MS, Willems R, Sipido KR (2015): Ryanodine receptor cluster fragmentation and redistribution in persistent atrial fibrillation enhance calcium release. *Cardiovasc Res* 108, 387–398
- Mangner N, Stachel G, Woitek F, Haussig S, Schlotter F, Höllriegel R, Adam J, Lindner A, Mohr FW, Schuler G et al. (2018): Predictors of mortality and symptomatic outcome of patients with low-flow severe aortic stenosis undergoing transcatheter aortic valve replacement. *J Am Heart Assoc* 7, e007977
- Marquis-Gravel G, Redfors B, Leon MB, Généreux P (2016): Medical treatment of aortic stenosis. *Circulation* 134, 1766–1784
- Mazzone A, Epistolato MC, Caterina R de, Storti S, Vittorini S, Sbrana S, Gianetti J, Bevilacqua S, Glauber M, Biagini A et al. (2004): Neoangiogenesis, t-lymphocyte infiltration, and heat shock protein-60 are biological hallmarks of an immunomediated inflammatory process in end-stage calcified aortic valve stenosis. *J Am Coll Cardiol* 43, 1670–1676
- Mitrut R, Stepan AE, Pirici D (2018): Histopathological aspects of the myocardium in dilated cardiomyopathy. *Curr Health Sci J* 44, 243–249
- Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, Guyton RA, O’Gara PT, Ruiz CE, Skubas NJ, Sorajja P et al. (2014): 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: executive summary: a report of the american college of cardiology/american heart association task force on practice guidelines. *Circulation* 129, 2440–2492
- O’Brien KD, Shavelle DM, Caulfield MT, McDonald TO, Olin-Lewis K, Otto CM, Probstfield JL (2002): Association of angiotensin-converting enzyme with low-density lipoprotein in aortic valvular lesions and in human plasma. *Circulation* 106, 2224–2230
- Orlowska-Baranowska E, Placha G, Gaciong Z, Baranowski R, Zakrzewski D, Michalek P, Hoffman P, Rawczynska-Englert I (2004): Influence of ACE I/D genotypes on left ventricular hypertrophy in aortic stenosis: gender-related differences. *J Heart Valve Dis* 13, 574–581

- Osnabrugge RLJ, Mylotte D, Head SJ, van Mieghem NM, Nkomo VT, LeReun CM, Bogers AJJC, Piazza N, Kappetein AP (2013): Aortic stenosis in the elderly: disease prevalence and number of candidates for transcatheter aortic valve replacement: a meta-analysis and modeling study. *J Am Coll Cardiol* 62, 1002–1012
- Parton RG, Way M, Zorzi N, Stang E (1997): Caveolin-3 associates with developing t-tubules during muscle differentiation. *J Cell Biol* 136, 137–154
- Peng W, Shen H, Wu J, Guo W, Pan X, Wang R, Chen SRW, Yan N (2016): Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2. *Science* 354, 6310
- Peters BP, Ebisu S, Goldstein IJ, Flashner M (1979): Interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid. *Biochemistry* 18, 5505–5511
- Powell SR, Wang P, Divald A, Teichberg S, Haridas V, McCloskey TW, Davies KJA, Katzeff H (2005): Aggregates of oxidized proteins (lipofuscin) induce apoptosis through proteasome inhibition and dysregulation of proapoptotic proteins. *Free Radic Biol Med* 38, 1093–1101
- Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ (2010): Subcellular Ca<sup>2+</sup> signaling in the heart: the role of ryanodine receptor sensitivity. *J Gen Physiol* 136, 135–142
- Quinones MA, Gaasch WH, Cole JS, Alexander JK (1975): Echocardiographic determination of left ventricular stress-velocity relations. *Circulation* 51, 689–700
- Rader F, Sachdev E, Arsanjani R, Siegel RJ (2015): Left ventricular hypertrophy in valvular aortic stenosis: mechanisms and clinical implications. *Am J Med* 128, 344–352
- Ruppert M, Bódi B, Korkmaz-Icöz S, Loganathan S, Jiang W, Lehmann L, Oláh A, Barta BA, Sayour AA, Merkely B et al. (2019): Myofilament Ca<sup>2+</sup> sensitivity correlates with left ventricular contractility during the progression of pressure overload-induced left ventricular myocardial hypertrophy in rats. *J Mol Cell Cardiol* 129, 208–218

- Santulli G, Lewis D, Des Georges A, Marks AR, Frank J (2018): Ryanodine receptor structure and function in health and disease. *Subcell Biochem* 87, 329–352
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B et al. (2012): Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682
- Silbernagl S, Despopoulos A: Taschenatlas Physiologie, 8., überarb. und erw. Aufl; Thieme, Stuttgart 2012
- Song L-S, Sobie EA, McCulle S, Lederer WJ, Balke CW, Cheng H (2006): Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4305–4310
- Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, Hikoso S, Takeda T, Mizote I, Oka T, Tamai T, Oyabu J, Murakawa T et al. (2010): Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. *Autophagy* 6, 600–606
- Teringova E, Tousek P (2017): Apoptosis in ischemic heart disease. *J Transl Med* 15, 87
- Terman A, Kurz T, Navratil M, Arriaga EA, Brunk UT (2010): Mitochondrial turnover and aging of long-lived postmitotic cells: the mitochondrial-lysosomal axis theory of aging. *Antioxid Redox Signal* 12, 503–535
- Vahanian A, Alfieri O, Andreotti F, Antunes MJ, Barón-Esquivias G, Baumgartner H, Borger MA, Carrel TP, Bonis M de, Evangelista A et al. (2012): Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012). *Eur Heart J* 33, 2451–2496
- Wagner E, Brandenburg S, Kohl T, Lehnart SE (2014): Analysis of tubular membrane networks in cardiac myocytes from atria and ventricles. *J Vis Exp* 92, e51823
- Wagner E, Lauterbach MA, Kohl T, Westphal V, Williams GSB, Steinbrecher JH, Streich J-H, Korff B, Tuan H-TM, Hagen B et al. (2012): Stimulated emission depletion live-cell super-resolution imaging shows proliferative remodeling of T-tubule membrane structures after myocardial infarction. *Circ Res* 111, 402–414



Walker MA, Williams GSB, Kohl T, Lehnart SE, Jafri MS, Greenstein JL, Lederer WJ, Winslow RL (2014): Superresolution modeling of calcium release in the heart. *Biophys J* 107, 3018–3029

Wohlgemuth SE, Calvani R, Marzetti E (2014): The interplay between autophagy and mitochondrial dysfunction in oxidative stress-induced cardiac aging and pathology. *J Mol Cell Cardiol* 71, 62–70

Chondrex (2019): Collagen detection kit descriptions. <https://www.chondrex.com/collagen/type-i-ii-collagen-detection>, abgerufen am: 08.11.2019

H. J. Motulsky (2017a): "One-way anova, kruskal-wallis and friedman tests", graphpad statistics guide. [https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat\\_comparing\\_three\\_or\\_more\\_groups.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_comparing_three_or_more_groups.htm), abgerufen am: 27.11.2019

H. J. Motulsky (2017b): "Tukey and dunnett methods", graphpad statistics guide. [https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat\\_the\\_methods\\_of\\_tukey\\_and\\_dunne.htm?q=tukey](https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_the_methods_of_tukey_and_dunne.htm?q=tukey), abgerufen am: 27.11.2019

H. J. Motulsky (2018): "Key concepts: correlation", graphpad statistics guide. [https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?stat\\_correlation.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/7/statistics/index.htm?stat_correlation.htm), abgerufen am: 03.03.2019