

Aus dem Institut für Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Pulmonal-endotheliale Dysfunktion bei chronischer
Linksherzinsuffizienz

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Kerem

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. M. Kübler
 2. Prof. Dr. E. Grünig
 3. Prof. Dr. H. Olschewski

Datum der Promotion: 18. November 2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Abstract	5
Einleitung	7
Methoden	9
Ergebnisse	12
Diskussion	18
Literaturverzeichnis	21
Erklärung über Anteil an Publikationen	23
Lebenslauf	24
Publikationsliste	26
Selbständigkeitserklärung	29
Danksagung	30

Abkürzungsverzeichnis

4 α PDD	4 α -phorbol-12,13-didecanoate
ACh	Acetylcholin
[Ca ²⁺] _i	intrazellulären endothelialen Ca ²⁺ -Konzentration
CHF	chronischen Herzinsuffizienz
cGMP	cyclischem Guanosinmonophosphat
eNOS	endothelialen NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
P _{LA}	links-atrialer Druck
P _{PA}	pulmonal-arterieller Druck
PVR	pulmonal-vaskulärer Widerstand
ROS	freie Radikale
SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamine
SNP	Natrium-Nitroprussid
TRPC-Kanal	transient receptor potential canonical-Kanal
TRPV-Kanal	transient receptor potential vanilloid-Kanal

Zusammenfassung

Über die Freisetzung vasoreaktiver Mediatoren übernehmen pulmonale Endothelzellen eine essentielle Rolle in der Regulation der vaskulären Homöostase in der Lunge. Ein Ungleichgewicht in der endothelialen Produktion vasorelaxierender und vasokonstringierender Substanzen führt als sogenannte endotheliale Dysfunktion zur Tonuserhöhung im Lungenkreislauf und induziert vaskuläre Umbauprozesse, die chronisch zur Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie führen. Während die Rolle der endothelialen Dysfunktion für das Krankheitsbild der pulmonal-arteriellen Hypertonie experimentell gut belegt ist, bestehen hingegen kaum Daten zu Ausmaß, Relevanz und zellulären Mechanismen einer möglichen endothelialen Dysfunktion bei pulmonaler Hypertonie infolge Linksherzerkrankung, einer Kategorie der pulmonalen Hypertonie, die die pulmonal-arterielle Hypertonie bzgl. Inzidenz um ca. den Faktor 1000 übertrifft. Ziel der vorliegenden Studie war es daher, die endotheliale Dysfunktion der Lunge an einem präklinischen Modell der chronischen Herzinsuffizienz zu untersuchen.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an Sprague-Dawley Ratten durchgeführt, bei denen durch ein suprakoronares Aortenbanding eine chronische Herzinsuffizienz induziert worden war. Mit Hilfe der in einer vorangestellten Studie etablierten Technik der sog. *real-time* Fluoreszenzmikroskopie zur direkten bildgebenden Quantifizierung der endothelialen NO-Produktion an der intakten Lunge sowie durch hämodynamische Messungen der Vasoreagibilität konnte das Vorliegen einer pulmonal-endothelialen Dysfunktion bei Ratten mit CHF nachgewiesen werden. Diese Dysfunktion war weder ursächlich auf eine verminderte Expression der endothelialen NO-Synthase, noch auf einen Substratmangel des Enzyms zurückzuführen. Hingegen konnten wir mittels Fura-2-Imagings der intrazellulären endothelialen Ca^{2+} -Konzentration in intakten Lungen eine fundamentale Störung der endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Homöostase und des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalings nachweisen, das durch ein völliges Fehlen physiologischer endothelialer $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen sowie fehlende oder abgeschwächte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Antworten auf mechanische oder pharmakologische Stimuli gekennzeichnet war. Die Rekonstitution eines endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signals durch Zugabe des Ca^{2+} -Ionophors A-23187 vermochte hingegen wieder die endotheliale NO-Produktion bei Tieren mit CHF zu stimulieren. Insofern kommt der Störung der endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Homöostase eine Schlüsselrolle bei der endothelialen Dysfunktion der Lunge bei CHF zu. Systematische Expressionsstudien an frisch aus den CHF-Lungen isolierten Endothelzellen zeigten aber, dass diese Störung des endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signalings nicht primär auf eine

verminderte Expression endothelialer Ca^{2+} -Kanäle zurückzuführen war. Stattdessen ergab die Untersuchung des endothelialen Aktin-Zytoskeletts mittels Phalloidin-Fluoreszenzfärbung und Western Blot-Analyse eine ca. um das 10-fache erhöhte endotheliale Aktin-Expression bei CHF-Tieren sowie eine zirkulär-/spiralförmige Anordnung der F-Aktin-Polymere. Die Spaltung von Aktinpolymeren durch Cytochalasin D führte zu einer Wiederherstellung der endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - und NO-Antwort in Lungen von CHF-Tieren, wodurch erstmals eine zentrale Rolle des zytoskelettalen Remodelings im Rahmen der endothelialen Dysfunktion nachgewiesen werden konnte.

Einleitung

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten internistischen Erkrankungen in den westlichen Industrieländern mit einer steigenden Morbidität und Mortalität. Die Inzidenz der Herzinsuffizienz steigt exponentiell mit dem Alter an und erreicht in den westlichen Industrienationen bei den über 65-Jährigen Werte von 10 Erkrankungen pro 1000 Einwohner [1]. Ein wichtiger Prädiktor der Mortalität bei chronischer Herzinsuffizienz ist das Auftreten einer sekundären pulmonal-venösen Hypertonie, welche aufgrund ansteigender linksventrikulärer Füllungsdrücke und nachgeschaltet ansteigender pulmonal-vaskulärer Drücke bei zunehmender linksventrikulärer Dysfunktion auftritt [2]. Diese chronische Rückstauung in die pulmonale Gefäßstrombahn mündet häufig in der Ausbildung einer reaktiven pulmonalen Vasokonstriktion, welche den Widerstand des pulmonalen Gefäßbetts erhöht und somit zu einer konsekutiven sekundären pulmonalen Hypertonie führen kann [3].

Den pulmonalen Endothelzellen wird ähnlich wie im systemischen Kreislauf eine essentielle Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus sowie der Regulation des vaskulären Gewebeumbaus in der Lungenstrombahn zugeschrieben [4]. Besonders das freie Radikal NO, welches u.a. durch die eNOS gebildet wird, übernimmt dabei wichtige regulatorische Funktionen, wie z.B. die Regulation des Gefäßtonus, der Angiogenese, der Leukozyten-Endothel Interaktion u.a. [5-7].

In mehreren präklinischen Studien an Ratten wurde gezeigt, dass die chronische Herzinsuffizienz mit einer deutlich eingeschränkten endothelabhängigen Relaxation pulmonaler Arterien sowie einer verminderten endothelialen Bildung von NO und cGMP einhergeht [9]. Aufgrund der Bedeutung von NO als vasodilatative Substanz könnte dieser endothelialen Dysfunktion daher eine wichtige Rolle für die Pathogenese der sekundären pulmonalen Hypertonie zukommen.

Zielstellung unserer Studien war es, die zellulären Mechanismen, die zu einer endothelialen Fehlfunktion bei chronischer Herzinsuffizienz führen, zu untersuchen. Diese Studien führten wir insbesondere mit der Methode der *real-time* Fluoreszenzmikroskopie durch, die uns eine direkte Messung der endothelialen NO-Produktion erlaubte.

In einer ersten Studie an hyperoxischen Lungen etablierten wir unsere Methoden zur Visualisierung und Messung von kurzlebigen ROS sowie endothelalem Kalzium mittels der fluoreszenzmikroskopischen *in situ*-Bildgebung an isoliert-perfundierten Rattenlungen.

In einer zweiten Studie untersuchten wir anschließend die endotheliale NO-Produktion und die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen in normalen Lungen. Hierfür entwickelten wir zwei Tiermodelle, in denen wir mit Hilfe der *in situ*-digitalen Fluoreszenzmikroskopie an intakten isoliert-perfundierten Lungen und mittels immunhistologischer Analysen die Auswirkungen akuter vaskulärer Dehnung auf die endotheliale NO-Produktion und ihrer Regulationsmechanismen darstellen konnten.

In einer weiteren Studie wurden schließlich die zellulären Mechanismen untersucht, die bei chronischer Herzinsuffizienz zu einer endothelialen Dysfunktion führen. Hierfür wurde Ratten zur Induktion einer chronischen Herzinsuffizienz suprakoronar ein Titanclip um die Aorta implantiert. Die Analyse der zugrundeliegenden zellulären Mechanismen sowie ihrer funktionellen Relevanz wurde durch zusätzliche physiologische Messungen, immunhistologische Untersuchungen sowie Western Blot Analysen ergänzt.

Methoden

Induktion der chronischen Herzinsuffizienz:

Diese wurde neun Wochen vor fluorezenzmikroskopischen Untersuchungen mittels eines suprakoronaren Aortenbandes induziert[14]. Juvenile Sprague-Dawley Ratten (91 ± 9 g Körpergewicht) wurden mit Ketamin und Xylazin betäubt. Zunächst wurde eine Hemithorakotomie durchgeführt und anschließend ein Titan-Clip mit einem Durchmesser von 0,8 mm suprakoronar um die Aorta implantiert. Die Wunden wurden mit entsprechenden Nähten verschlossen.

Messung der kardiopulmonalen Parameter:

Neun Wochen nach Einsetzen des Titan-Clips wurden die Herzen bei CHF-Ratten sowie Sham-operierten Kontrolltieren entnommen und rechter und linker Ventrikel gewogen. Hämodynamische Messungen der arteriellen sowie enddiastolischen linksventrikulären Drücke wurden bei mit Urethan und Ketamin anästhesierten Ratten mit Hilfe eines über die rechte Karotisarterie eingebrachten Millarkatheters gemessen. Der pulmonalvaskuläre Widerstand wurde bei isoliert-perfundierten Lungen über den Druckgradienten der Pulmonalarterie und dem linken Atrium gemessen. Die statische Lungencompliance wurde bei isolierten Lungen anhand linearer Regressionsanalysen der Druck-/Volumenbeziehung gemessen. Das Verhältnis zwischen Trocken/Feucht-Gewicht der Lunge als Maß des Lungenödems wurde mit der Technik des Mikrowellen-Trocknens gemessen.

Isoliert-perfundierte Rattenlunge:

Wir haben hier die Methode der *in situ*-digitalen Fluoreszenzmikroskopie an isoliert-perfundierten Lungen von Ratten verwendet. Hierfür wurden Herz und Lunge von anästhesierten Tieren entnommen und mit körpereigenem heparinisierten Blut kontinuierlich perfundiert. Die Lungen wurden mit einem konstanten Gasgemisch (21% O₂, 74% N₂ und 5% CO₂) bei konstantem positivem Beatmungsdruck von 5 cmH₂O insuffliert. Unter Ausgangsbedingungen betragen der linksatriale Druck (P_{LA}) 5 cmH₂O und der (P_{PA}) 10±1 cmH₂O.

Anschließend wurden die Lungen unter ein eigens konstruiertes Fluoreszenzmikroskop (Axiotechvario 100HD; Zeiss, Jena, Deutschland) positioniert. Mittels eines Mikrokatheters, welcher über das linke Atrium bis in die Lungenvenen vorgeschoben wurde, konnten anschließend die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe und Substanzen lokal injiziert werden (s.u.).

Um möglichst standardisierte Ergebnisse zu erhalten, wurden nur männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 350 ± 20 g untersucht.

Hydrostatische Druckerhöhung:

Eine akute vaskuläre Dehnung im pulmonalen Gefäßbett wurde durch Erhöhung des hydrostatischen Druckes in isoliert-perfundierten Lungen für 30 Minuten mittels Anhebung des P_{LA} von 5 cmH₂O auf 15 cmH₂O induziert. In einem Protokoll bei Tieren mit chronischer Herzinsuffizienz wurde der hydrostatische Druck von einem P_{LA} von 15 cmH₂O auf 25 cmH₂O erhöht.

NO-Produktion:

Zur Messung der endothelialen NO-Produktion wurde mittels Mikrokatheter der NO-sensitive Farbstoff DAF-FM (5 μ mol/L) infundiert. Anschließend wurde die NO-Synthese über die Änderung der Fluoreszenzintensität von DAF-FM über die Zeit im Verhältnis zu den Ausgangswerten errechnet. Zur fluoreszenzmikroskopischen Identifizierung von Endothelzellen *in situ* wurde der endotheliale Marker Alexa Fluor 488 AcLDL eingesetzt.

Kalzium-Konzentration:

Für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ bzw. die Messung der endosomalen $[Ca^{2+}]$ wurden die Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffe Fura-2 AM bzw. Fura-2FF (je 5 μ mol/L) injiziert [15]. Messungen des ($[Ca^{2+}]_i$) wurden nach Infusion mit Ca^{2+} -freier HEPES-Lösung bzw. nach Infusion mit Ca^{2+} -haltiger Lösung mit oder ohne dem Ca^{2+} -Ionophor 14-bromo A-23187 (5 μ mol/L) durchgeführt.

Aktin-Zytoskelett:

Das F-Aktin-Zytoskelett wurde mit dem Farbstoff Alexa 568 Phalloidin (5 U/mL) fluoreszenzmarkiert, nachdem die Zellen *in situ* mit 3,7% Formaldehyd fixiert, mit Saponin permeabilisiert und anschließend mit einer Puffer-Lösung ausgewaschen wurden [16]. Die Aktin-Depolymerisation erfolgte mit Cytochalsin D (100 μ mol/L) 5 Minuten vor P_{LA} -Erhöhung bzw. Zugabe von Acetylcholin.

Pharmakologische Interventionen:

Je nach Protokoll wurden die pulmonalen Endothelzellen *in situ* mittels einer der folgenden pharmakologischen Substanzen stimuliert: Histamin (10-1000 μ mol/L), Acetylcholin (ACh; 10^{-9} - 10^{-4} Mol/L), der NO-Donor SNAP (10^{-5} - 10^{-3} Mol/L) oder der TRPV-Kanal Aktivator, 4 α PDD (10 μ mol/L), wurden dem Perfusat zugegeben. L-Arginin (250 μ mol/L), Atropin (10 μ mol/L) und (+)-Tubocurarin (100 μ mol/L) wurden 10 Minuten vor der Stimulation mit

Acetylcholin hinzugegeben. Thapsigargin (250 $\mu\text{mol/L}$) wurde in kalziumfreier HEPES-Lösung infundiert.

Western Blot Analyse: Die Proteinexpression wurde mittels Western Blot Analysen durchgeführt. Hierfür wurden mit flüssigem Stickstoff gefrorene Lungen von Mäusen pulverisiert, lysiert und homogenisiert. Gleiche Anteile von Proteinfractionen wurden in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit entsprechenden spezifischen Antikörpern inkubiert. Der Nachweis der spezifischen Banden erfolgte über Inkubation mit einem sekundären Antikörper und Detektion über Chemolumineszenz.

Statistik:

Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Für abhängige Variablen wurden die Werte mittels Wilcoxon und Friedman-Test verglichen, unabhängige Variablen mittels Kruskal-Wallis und Mann-Whitney U-Test. Das statistische Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt.

Eine detaillierte Darstellung der eingesetzten Methoden findet sich in den angeführten Originalpublikationen.

Ergebnisse

Endotheliales NO-Imaging in Kontrolllungen:

Zur Identifikation des Phänotyps der mit dem NO-sensitiven Farbstoff DAF-FM beladenen Zellen, wurden diese zusätzlich mit dem endothelialen Marker Alexa Fluor 488 AcLDL angefärbt. Es zeigte sich eine Co-Lokalisation beider Farbstoffe, so dass von einer endothelialen Beladung mit DAF-FM ausgegangen werden kann.

Bei Zugabe des eNOS-Substrates L-Arginin kam es zu einem deutlichen Anstieg der DAF-FM-Fluoreszenz, welcher bei zusätzlicher Gabe des eNOS-Inhibitors L-NAME vollständig unterbunden wurde. Dies impliziert, dass wir mit unserer Methode die eNOS-abhängige endotheliale NO-Produktion visualisieren können.

Am Ende eines jeden Versuchs wurde der exogene NO-Donor SNAP hinzugegeben. Dies führte unabhängig vom Versuchsprotokoll zu einem deutlichen Anstieg der DAF-FM-Fluoreszenz um das $4,6 \pm 0,2$ -fache, was beweisend ist für eine vergleichbare Beladung der Endothelzellen mit dem Farbstoff DAF-FM in jedem Versuch sowie der NO-abhängigen Fluoreszenz des DAF-FM.

Induktion der endothelialen NO-Produktion durch Anheben des hydrostatischen Drucks in Kontrolllungen

Unter Ausgangsbedingungen bei einem physiologischen P_{LA} von 5 cmH₂O lag die endotheliale NO-Produktion unter dem messbaren Bereich. Bei Anheben des P_{LA} von 5 cmH₂O auf 15 cmH₂O stieg der transmurale Druckgradient um 132% an und der Durchmesser der untersuchten venulären Kapillaren nahm von $17,2 \pm 2,1$ μ m auf $19,5 \pm 3,2$ μ m zu, was einer endothelialen Dehnung von etwa 10% entspricht. Unter einer 30-minütigen andauernden hydrostatischen Druckerhöhung kam es in allen aufgenommenen Endothelzellen zu einem kontinuierlichen und linearem Anstieg der endothelialen NO-Produktion, welche mit einer zeitlichen Verzögerung von ca. 5 Minuten nach Druckerhöhung einsetzte. Bei Rückkehr des P_{LA} auf 5 cmH₂O fiel die NO-Produktion innerhalb von 2 Minuten auf Ausgangsniveau ab.

Durch Zugabe von L-NAME konnte diese endotheliale NO-Antwort auf hydrostatischen Stress unterbunden werden, so dass eine NOS-Aktivierung ursächlich für den NO-Anstieg scheint.

Um auszuschließen, dass die Bindung von NO an das Hämoglobin roter Blutkörperchen die oben genannten Ergebnisse in qualitativer Weise beeinflusst, wurden diese Experimente mit Ca^{2+} -reicher HEPES-Lösung als zellfreies Perfusat repliziert, was keinen Einfluss auf die erzielten Resultate hatte.

Ebenfalls wurde die Minderung der Scherkräfte, die natürlicherweise als Folge des Anstiegs des Gefäßdurchmessers unter hydrostatischer Druckerhöhung auftritt, als Ursache für die o.g. Beobachtungen ausgeschlossen. Es zeigte sich, dass durch Anhebung der Durchflussrate während Druckerhöhung und der dadurch erzielten Konstanthaltung der vaskulären Scherkräfte, die NO-Produktion tendenziell eher noch weiter erhöht wurde.

Indem durch Zugabe der PI3Kinase-Inhibitoren Ly294002 und Wortmanin (20 $\mu\text{mol/L}$) die NO-Produktion bei hydrostatischem Stress aufgehoben werden konnte, wurde eine wesentliche Rolle der Aktivierung der PI3Kinase in dieser Signalkaskade identifiziert.

Charakterisierung der chronischen Herzinsuffizienz

Neun Wochen nach Implantation des Titan-Aortenclips hatten die Ratten eine biventrikuläre kardiale Hypertrophie entwickelt, was durch ein erhöhtes Verhältnis von Herz-zu-Körpergewicht charakterisiert war. Der systemisch-arterielle Druck änderte sich nicht, während der linksventrikuläre enddiastolische Druck sowie das Feucht-/Trockengewichtsverhältnis der Lunge als charakteristische Zeichen einer diastolischen Linksherzinsuffizienz zunahmen. Im Rahmen der strukturellen und/oder funktionellen Adaption der Lunge nahm der pulmonal-vaskuläre Widerstand ebenfalls deutlich zu, die statische Lungencompliance hingegen ab.

Pulmonal-endotheliale Dysfunktion bei chronischer Herzinsuffizienz

Während eine pharmakologische Stimulation mit ACh zu einem dosisabhängigen Anstieg der DAF-FM-Fluoreszenz in isoliert-perfundierten Lungen von Kontrolltieren führte, fehlte diese NO-Antwort bei Tieren mit CHF, sowohl in Endothelzellen venulärer Kapillaren als auch in solchen kleiner Arteriolen, vollständig. Eine verminderte Expression des M_3 -Acetylcholinrezeptors, welcher die Acetylcholin-stimulierte endothelabhängige Vasodilatation vermittelt, konnte mittels Western Blot Analyse als Ursache dieser fehlenden Stimulierbarkeit ausgeschlossen werden.

Unter physiologischen Bedingungen sind pulmonale Kapillaren und Venolen maximal dilatiert. Für die funktionelle Bestimmung der Endothelfunktion als hämodynamisch messbare Minderung des Perfusionsdrucks nach Zugabe von ACh wurden daher die pulmonalen Gefäße isoliert-perfundierter Lungen von Kontroll- als auch CHF-Tieren mit dem Thromboxananalog U46619 vorkonstringiert. Dabei zeigte sich bei Kontroll-Tieren eine deutliche dosisabhängige Reduktion des pulmonalarteriellen Druckes auf ACh, wohingegen bei CHF-Tieren nach Zugabe von ACh keine Änderung des Perfusionsdrucks als Ausdruck einer fehlenden endothelabhängigen Vasodilatation auftrat. Die Zugabe von SNP, einem endothelunabhängigem Vasodilatator, führte hingegen sowohl in Kontroll- als auch in CHF-Lungen zu einer Vasodilatation, wodurch nachgewiesen wurde, dass die fehlende ACh-Antwort in CHF-Lungen in der Tat Ausdruck einer endothelialen Dysfunktion war.

Die funktionelle Relevanz dieser endothelialen Dysfunktion konnte in nachfolgenden hämodynamischen Messungen *in vivo* nachgewiesen werden: Während in Kontrolltieren das pulmonale Gefäßbett maximal dilatiert ist, so dass Inhalation von NO keine zusätzliche Vasodilatation zu induzieren vermag, konnten wir bei CHF-Tieren durch Inhalation von NO eine dosisabhängige Reduktion des pulmonalen Perfusionsdrucks hervorrufen. Dies weist auf eine deutliche Erhöhung des pulmonalen vaskulären Gefäßtonus in CHF-Tieren in Folge der endothelialen Dysfunktion hin.

Auch eine pharmakologische Stimulation mit Histamin sowie mechanische Stimulation der Endothelzellen mittels hydrostatischen Druckanstiegs führt im Gegensatz zu Kontrolltieren bei CHF-Ratten zu keiner Stimulation der endothelialen NO-Produktion. Eine verminderte Dehnung der Endothelzellen durch hydrostatischen Stress konnte als Ursache hierfür ausgeschlossen werden, da sich nach hydrostatischer Druckerhöhung vergleichbare Ausdehnungen der Gefäße in Kontroll- sowie CHF-Tieren unter dem Mikroskop zeigten. Desgleichen konnte eine Minderanreicherung des DAF-Farbstoffs in CHF-Lungen ausgeschlossen werden, da die Zugabe des exogenen NO-Donors SNAP am Versuchsende zu vergleichbaren Fluoreszenzanstiegen in Kontroll- und CHF-Tieren führte. Zusammenfassend ergaben diese Befunde, dass CHF zu einer massiven endothelialen Dysfunktion in der Lungenstrombahn führt, die funktionell relevant und unabhängig von der Art der Endothelzellstimulation mittels pharmakologischer oder mechanischer Stimulation ist.

eNOS-Expression und Substrat-Zugabe

In immunhistologischen Untersuchungen und Western Blot Analysen an frisch-isolierten Endothelzellen aus Kontroll- und CHF-Lungen konnten wir zeigen, dass das Fehlen der NO-Antwort bei chronischer Herzinsuffizienz nicht Folge einer verminderten Expression der eNOS war. Tendenziell war diese in CHF-Tieren sogar erhöht, jedoch war dieser Anstieg nicht statistisch signifikant. Die iNOS war weder in Kontroll- noch in CHF-Tieren exprimiert und scheidet somit als Quelle der endothelialen NO-Produktion in den hier untersuchten Szenarien aus. Auch das Fehlen des NO-Synthase Substrates L-Arginin konnte als potentielle Ursache der fehlenden NO-Produktion ausgeschlossen werden, da eine Zugabe von exogenem L-Arginin keinen Effekt auf die endotheliale NO-Produktion in CHF-Tieren hatte.

Pulmonal-endotheliales Ca^{2+} -Signaling bei chronischer Herzinsuffizienz

Nachdem wir eine verminderte eNOS-Expression als Ursache der endothelialen Dysfunktion bei CHF-Tieren ausgeschlossen hatten, untersuchten wir die posttranslationale Regulation des Enzyms durch Änderungen der endothelialen $[Ca^{2+}]_i$.

Unsere Arbeitsgruppe konnte in früheren Untersuchungen zeigen, dass das endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ -Profil bei Kontrolltieren unter Ausgangsbedingungen charakteristische spontane $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen aufweist, welche durch spezifische endotheliale Schrittmacherzellen generiert und über Gap Junctions und benachbarte Endothelzellen als interendotheliale $[Ca^{2+}]_i$ -Welle fortgeleitet werden[20]. Erstaunlicherweise waren diese spontanen $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen bei CHF-Tieren fast vollständig aufgehoben, zudem war die mittlere endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration um ca. 15% niedriger als jene bei Kontrolltieren.

Mechanische Stimulation durch Anhebung des P_{LA} von 5 auf 15 cmH₂O bewirkte bei Kontrolllungen einen Anstieg des mittleren endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ sowie einen Anstieg der Amplituden der $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen. In CHF-Lungen hatte diese mechanische Stimulation keinerlei Effekt auf das endotheliale $[Ca^{2+}]_i$. Auch eine mechanische Stimulation von einem erhöhten Ausgangs- P_{LA} auf P_{LA} -Werte von 25 cmH₂O sowie pharmakologische Stimulation mit Histamin, welche bei Kontrolltieren zu einem charakteristischen biphasischen $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg führt, vermochten in CHF-Tieren keinerlei endotheliales $[Ca^{2+}]_i$ -Signaling zu induzieren. Eine Downregulation der Histamin-H₁-Rezeptoren konnte dabei mittels Western Blot Analysen frisch-isolierter Endothelzellen ausgeschlossen werden. Auch der charakteristische Anstieg des endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ in Kontrolllungen auf Stimulation mit ACh

war in CHF-Lungen nicht zu beobachten. Diese Befunde weisen auf eine fundamentale und bislang in diesem Ausmaß nach unserer Kenntnis einmalige Störung der endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ -Homöostase und des endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ -Signalings hin.

Kürzlich konnte von unserer und anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der endotheliale Ca^{2+} -Einstrom nach mechanischer Stimulation durch den mechanosensitiven TRPV4-Kanal vermittelt wird [28,29]. Eine pharmakologische Stimulation des TRPV4-Kanals mit 4 α PDD, die in Kontrolllungen zu einem endothelialen Ca^{2+} -Einstrom führt, konnte in CHF-Lungen keinen Effekt auslösen. Wir konnten zudem anhand von Western Blot Analysen zeigen, dass mechanosensitive TRPV2- und TRPV4-Kanäle in CHF-Lungen im Vergleich zu Kontrolllungen vermindert exprimiert werden. TRPC-Kanäle hingegen, die an der ligandenvermittelten endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort auf Histamin, Thrombin oder Acetylcholin beteiligt sind [30,31], waren in frisch isolierten pulmonalen Endothelzellen von CHF-Tieren nicht vermindert exprimiert. Dies weist darauf hin, dass die verminderte Expression von Ca^{2+} -Einstromkanälen eventuell an der Störung des endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ -Signalings beteiligt sein könnte, jedoch nicht deren vordringliche Ursache bildet.

Die Zugabe von Thapsigargin, eines Alkaloids das die endosomalen Ca^{2+} -Speicher entleert, führte bei CHF-Tieren zu einer ähnlichen Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Speicher wie bei Kontrolltieren. Dadurch kann eine Depletion der endosomalen Ca^{2+} -Speicher als Ursache des gestörten $[Ca^{2+}]_i$ -Signalings in CHF-Tieren ausgeschlossen werden.

Rekonstitution der NO-Synthese durch Induktion eines endothelialen Ca^{2+} -Einstrom

In einem nächsten Schritt untersuchten wir, ob das gestörte $[Ca^{2+}]_i$ -Signaling ursächlich der fehlenden endotheliale NO-Produktion in CHF-Lungen zugrunde liegt. Hierfür induzierten wir einen endothelialen Ca^{2+} -Einstrom durch Zugabe eines Ca^{2+} -Ionophors bei gleichzeitiger Perfusion mit einer 0 bzw. 200 nMol/L Ca^{2+} enthaltenden Puffer-Lösung, welches zu einem endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ von 0-20 nMol/L bzw. 180-200nMol/L führte. In letzterem Fall, d.h. bei Induktion eines $[Ca^{2+}]_i$ -Signals durch Perfusion mit 200 nMol/L Ca^{2+} in Anwesenheit von Thapsigargin, konnte eine vergleichbare NO-Produktion in CHF-Lungen wie in Kontrolllungen wiederhergestellt werden. Somit konnte die Störung des endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ -Signalings als zentrale Ursache der endothelialen Dysfunktion bei CHF identifiziert werden.

Reorganisation des endothelialen Zytoskeletts

In einer Reihe zum Teil sehr hochkarätig publizierter Arbeiten wurde verschiedentlich postuliert, dass Aktin-Mikrofilamente eine wichtige Rolle in der Regulation des intrazellulären Ca^{2+} -Haushalts spielen könnten [21, 32]. Wir untersuchten daher, ob eine Reorganisation der F-Aktin-Mikrofilamente in pulmonalen Endothelzellen von CHF-Ratten zu einem gestörten endothelialen Ca^{2+} -Haushalt und damit allgemein zu einer endothelialen Dysfunktion führen könnte. Mit Phalloidin angefärbte Endothelzellen von Kontrolllungen wiesen eine zirkuläre F-Aktin-Struktur auf, welche besonders an Gefäßbifurkationen ausgeprägt war. Die Anfärbung mit Phalloidin erreichte in CHF-Lungen einen etwa 10x höheren Wert; hier zeigte sich auch im Gegensatz zu Kontrolllungen eine spiralförmige Ausbreitung des F-Aktins über die gesamte Länge der endothelialen Gefäßwand. Zudem war der F-Aktin-Gehalt sowohl in Kontroll- als auch in CHF-Tieren in kleinen pulmonalen Arteriolen deutlich höher als in den pulmonalen venösen Kapillaren. Wir konnten außerdem zeigen, dass das Phalloidin spezifisch Aktin anfärbte, da bei Zugabe von Cytochalasin D, einem F-Aktin-Polymerisations-Inhibitor, die Fluoreszenz-Intensität um zwei Zehnerpotenzen abnahm. Eine Beteiligung von α -Aktin glatter Muskelzellen am Phalloidin-Fluoreszenzsignal konnte durch eine Reihe geeigneter Kontrollexperimente, die in der angefügten Originalarbeit im Detail wiedergegeben sind, ausgeschlossen werden. Zusätzlich bestätigten Western Blot Analysen frisch-isolierter pulmonaler Endothelzellen, dass β -Aktin in CHF-Lungen ca. 13x stärker exprimiert war als in Kontrolllungen.

Schließlich untersuchten wir, ob diese fundamentale Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts in CHF-Lungen ursächlich dem gestörten endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signaling und damit der endothelialen Dysfunktion zugrunde liegt. Hierfür wurde das endotheliale Aktin-Zytoskelett mittels Cytochalasin D zerstört. Diese Intervention führte zu einer Wiederherstellung des endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiegs sowie der NO-Produktion in CHF-Lungen auf mechanische Stimulation mit hydrostatischem Stress oder pharmakologische Stimulation durch ACh oder Histamin, hatte aber keinen Einfluss auf die verminderten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen. In Kontrolllungen hatte Cytochalasin D hingegen keinen Einfluss auf das endotheliale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Signaling und die NO-Produktion. Diese Befunde weisen erstmals auf eine massive Reorganisation des endothelialen Zytoskeletts als pathophysiologische Ursache kardiovaskulärer Erkrankungen hin.

Diskussion

Die endotheliale Dysfunktion bei CHF führt zu einer verminderten Perfusion im systemischen sowie koronaren Kreislauf und ist somit maßgeblich für eine erhöhte Morbidität und Mortalität bei dieser Erkrankung verantwortlich [7]. Ähnlich wie im systemischen Kreislauf wird postuliert, dass CHF auch in der Lungenstrombahn zu einer endothelialen Dysfunktion mit konsekutiv reaktivem Anstieg des pulmonal-vaskulären Widerstandes führt, was in der Konsequenz einen pulmonalen Hochdruck und eine Rechtsherzinsuffizienz zur Folge hat. Wir konnten in dieser Studie erstmals mit Hilfe der von uns etablierten *real-time in situ* Fluoreszenzmikroskopie an intakten isoliert-perfundierten Lungen die gestörte endotheliale NO-Produktion in pulmonalen Kapillaren und Arteriolen bei Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz nachweisen, ihre funktionelle Relevanz aufzeigen, sowie die ihr zugrundeliegenden Ursachen auf Ebene der endothelialen Signaltransduktion identifizieren.

Anders als bei der pulmonal-arteriellen Hypertonie, die eine verminderte Expression des eNOS-Enzyms zur Folge hat [8,9], konnten wir in unserer Studie eine verminderte Expression oder einen Substratmangel dieses Enzyms als Ursache für die verminderte endotheliale NO-Produktion bei der pulmonal-venösen Hypertonie ausschließen.

Wir untersuchten daher als nächstes, ob eine gestörte posttranslationale Regulation der eNOS durch das endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ -Signaling ursächlich für die gestörte endotheliale NO-Produktion war. Mittels Fura-2-Imagings pulmonaler Endothelzellen in intakten Lungen konnten wir zeigen, dass sowohl die natürlicherweise durch Schrittmacherzellen generierten endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen als auch die mittlere endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ -Konzentration bei CHF-Tieren deutlich vermindert waren. Des Weiteren führte eine pharmakologische Stimulation durch Histamin oder Acetylcholin sowie mechanische Stimulation durch hydrostatische Druckerhöhung im Gegensatz zu Kontrolltieren zu keiner $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort bei CHF-Tieren. In Western Blot Analysen konnten wir nachweisen, dass die mechanosensitiven TRPV2- und TRPV4-Kanäle, welche bei Kontrolltieren für die Ca^{2+} -Antwort unter hydrostatischer Stimulation mitverantwortlich sind [10,11], bei CHF-Tieren vermindert exprimiert waren. In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass diese reduzierte Expression von TRPV Kanälen der verminderten endothelialen Reagibilität auf hydrostatischen Stress zugrunde liegen könnte, vermochte die direkte Stimulation dieser Kanäle mit 4 α PDD keine

endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort bei CHF-Tieren mehr zu induzieren. Da jedoch gleichzeitig die endotheliale Expression von TRPC Kanälen, die funktionell die $[Ca^{2+}]_i$ -Antwort auf Histamin und ACh vermitteln, unvermindert war, konnte die reduzierte Expression von TRP Kanälen als alleinige Ursache der endothelialen Dysfunktion ausgeschlossen werden. Diese Schlussfolgerung wird zudem durch den Befund gestützt, dass beide Komponenten der typischerweise biphasischen Ca^{2+} -Antwort auf Histamin in CHF-Tieren fehlen. Somit findet schon auf Ebene der endoplasmatischen Ca^{2+} -Ausschüttung eine Störung statt, die allein durch einen verminderten Ca^{2+} -Einstrom über vermindert exprimierte Ionenkanäle nicht zu erklären wäre. Auch die ligandenvermittelten sowie spontanen Ca^{2+} -Oszillationen, welche unabhängig von extrazellulärem Ca^{2+} -Einstrom entstehen, fehlten bei CHF-Tieren vollständig. Schließlich induzierte die Zugabe von Thapsigargin eine vergleichbare Ca^{2+} -Ausschüttung aus den endoplasmatischen Speichern wie bei Kontrolltieren, während der begleitende Anstieg des zytosolischen $[Ca^{2+}]_i$ ausblieb, was auf eine verstärkte Pufferung oder eine rasche Elimination des zytosolischen $[Ca^{2+}]_i$ rückschließen lässt.

Bei Zugabe des Ca^{2+} -Ionophors A-23187, welches gleichermaßen bei Kontroll- und CHF-Tieren zu einem Anstieg des endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ führt, konnten wir die NO-Produktion bei CHF-Tieren wiederherstellen. Insofern kommt dem gestörten $[Ca^{2+}]_i$ -Haushalt eine Schlüsselrolle bei der endothelialen Dysfunktion zu. Zudem bietet diese von uns mit der Methode der *in situ*-Bildgebung durchgeführten Studie erstmals eine Erklärung für die Beobachtung von Ontkean und Mitarbeitern, dass Acetylcholin zwar kaum einen Relaxations-Effekt auf die Pulmonalarterien in CHF-Tieren hat, mit A-23187 allerdings weiterhin eine starke Vasodilatation bei diesen Tieren induziert werden kann [12].

Wir untersuchten als nächsten Schritt, inwiefern eine Adaptation des endothelialen Aktin-Zytoskeletts bei CHF-Tieren möglicherweise als Ursache der endothelialen Dysfunktion und des gestörten $[Ca^{2+}]_i$ -Signalings in Frage kommt. Diese Hypothese resultierte aus den Erwägungen, dass:

- 1) F-Aktin-Polymer das einzige Protein darstellt, das größere Mengen von Ca^{2+} -Ionen mit einer Dissoziationskonstanten im Bereich des physiologischen zytosolischen $[Ca^{2+}]_i$ zu speichern vermag [13,14]
- 2) ein verstärktes kortikales Aktin-Zytoskelett den Ca^{2+} -Einstrom über TRCP3-Kanäle und speicherabhängige Kanäle zu verhindern vermag [15]

- 3) Änderungen der mechanischen Kräfte, wie sie u.a. bei CHF auf die pulmonale Gefäßwand einwirken, in Endothelzellen zu einer Änderung der Aktin-Expression führen [16].

Die von uns mit Phalloidin angefärbten pulmonal-kapillären Endothelzellen zeigten eine deutlich erhöhte Aktin-Expression bei CHF-Tieren sowie eine zirkulär-/spiralförmige Anordnung der F-Aktin-Polymere. Diese spezifische Anordnung gewährleistet eine strukturelle Stabilität und Elastizität dieses Gefäßsystems in einem Umfeld, das eine ständige oszillierende mechanische Beanspruchung durch die rhythmischen Atembewegungen erfährt. Die Spaltung von Aktinpolymeren durch Cytochalasin D führte zu einer Wiederherstellung der $[Ca^{2+}]_i$ - und NO-Antwort in CHF-Tieren, wodurch eine zentrale Rolle des zytoskelettalen Remodelings im Rahmen der endothelialen Dysfunktion nachgewiesen werden konnte.

Obwohl die exakten zellulären Mechanismen, die diesem Effekt zugrunde liegen, bislang noch nicht geklärt sind, erscheinen folgende mechanistische Erklärungen denkbar:

- Zum einen könnten F-Aktin-Polymere als endothelialer Ca^{2+} -Speicher und somit als Puffer für den extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom und die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum fungieren.
- Zum anderen könnte die kürzlich entdeckte Interaktion zwischen den Molekülen Stim/Orai[19], die für den speicherabhängigen zellulären Ca^{2+} -Einstrom verantwortlich sind, durch eine dichte kortikale Aktinschicht gestört werden.

In den hier vorliegenden Untersuchungen gelang es uns,

- erstmals das Ausmaß und die funktionelle Relevanz der endothelialen Dysfunktion bei CHF zu charakterisieren,
- einen neuen Mechanismus der endothelialen Dysfunktion in Form einer fundamentalen Störung des endothelialen Ca^{2+} -Signalings zu beschreiben, und
- strukturelle Adaptationsvorgänge des endothelialen Zytoskeletts als grundlegende Mechanismen zu identifizieren, denen im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen wesentliche pathophysiologische Bedeutung und potenzielle therapeutische Relevanz zukommen könnte.

Literaturverzeichnis

1. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wilson M, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics - 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2008;117:e25-e146.
2. Ghio S, Gavazzi A, Campana C, Inserra C, Klersy C, Sebastiani R, Arbustini E, Recusani F, Tavazzi L. Independent and additive prognostic value of right ventricular systolic function and pulmonary artery pressure in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:183–188.
3. Driss AB, Devaux C, Henrion D, Duriez M, Thuillez C, Levy BI, Michel JB. Hemodynamic stresses induce endothelial dysfunction and remodeling of pulmonary artery in experimental compensated heart failure. *Circulation*. 2000;101:2764–2770.
4. Moncada S, Higgs EA. Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006;(176 Pt):213-54.
5. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med*. 2000 Aug 1;109(2):150-8.
6. Ontkian M, Gay R, Greenberg B. Diminished endothelium-derived relaxing factor activity in an experimental model of chronic heart failure. *Circ Res*. 1991;69:1088–1096.
7. Bauersachs J, Widder JD. Endothelial dysfunction in heart failure. *Pharmacol Rep*. 2008;60:119–126.
8. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1995;333:214–221.
9. Xu W, Kaneko FT, Zheng S, Comhair SA, Janocha AJ, Goggans T, Thunnissen FB, Farver C, Hazen SL, Jennings C, Dweik RA, Arroliga AC, Erzurum SC. Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension. *FASEBJ*. 2004;18:1746–1748.
10. Yin J, Hoffmann J, Kaestle SM, Neye N, Wang L, Baeurle J, Liedtke W, Wu S, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM. Negative-feedback loop attenuates hydrostatic lung edema via a cGMP-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 4. *Circ Res*. 2008;102:966–974.
11. Jian MY, King JA, Al-Mehdi AB, Liedtke W, Townsley MI. High vascular pressure-induced lung injury requires P450 epoxygenase-dependent activation of TRPV4. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008;38:386–392.

- 12.** Ontkean M, Gay R, Greenberg B. Diminished endothelium-derived relaxing factor activity in an experimental model of chronic heart failure. *Circ Res.* 1991;69:1088–1096.
- 13.** Lange K, Brandt U. Calcium storage and release properties of F-actin: evidence for the involvement of F-actin in cellular calcium signaling. *FEBS Lett.* 1996;395:137–142.
- 14.** Lange K, Gartzke J. F-actin-based Ca signaling - a critical comparison with the current concept of Ca signaling. *J Cell Physiol.* 2006;209: 270–287.
- 15.** Ma HT, Patterson RL, van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL. Requirement of the inositol trisphosphate receptor for activation of store-operated Ca₂ channels. *Science.* 2000;287:1647–1651.
- 16.** Carlsson SI, Bertilaccio MT, Ballabio E, Maier JA. Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1642:173–179.

Erklärung über Anteil an Publikationen

Kerem A, Yin J, Kaestle SM, Hoffmann J, Schoene AM, Singh B, Kuppe H, Borst MM, Kuebler WM. Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca²⁺ signaling and cytoskeletal reorganization. *Circ Res*. 2010 Apr 2;106(6):1103-16.

Eigenanteil:

50%

Verantwortlich für die Planung und Durchführung der Versuche, die Auswertung und statistische Analyse der Daten, die Erstellung der Graphen und Mitarbeit an der Manuskripterstellung.

Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, Habazettl H, Krombach F, Kuppe H, Kuebler WM. Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006 Apr;34(4):453-63:

Eigenanteil: 25%

Durchführung der *real-time imaging* Versuche zur Messung reaktiver Sauerstoffspezies im pulmonalen Endothel.

Kuebler WM, Uhlig U, Goldmann T, Schael G, Kerem A, Exner K, Martin C, Vollmer E, Uhlig S. Stretch activates nitric oxide production in pulmonary vascular endothelial cells in situ. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Dec 1;168(11):1391-8.

Eigenanteil: 25%

Durchführung der *real-time imaging* Versuche zur Messung der endothelialn NO Produktion unter hydrostatischem Streß.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Originalarbeiten:

1. Kerem A, Yin J, Kaestle SM, Hoffmann J, Schoene AM, Singh B, Kuppe H, Borst MM, Kuebler WM. Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca²⁺ signaling and cytoskeletal reorganization. *Circ Res.* 2010 Apr 2;106(6):1103-16.
2. Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, Habazettl H, Krombach F, Kuppe H, Kuebler WM. Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006 Apr;34(4):453-63.
3. Kuebler WM, Uhlig U, Goldmann T, Schael G, Kerem A, Exner K, Martin C, Vollmer E, Uhlig S. Stretch activates nitric oxide production in pulmonary vascular endothelial cells in situ. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Dec 1;168(11):1391-8.
4. Kraff O, Theysohn JM, Maderwald S, Kokulinsky PC, Dogan Z, Kerem A, Kruszona S, Ladd ME, Gizewski ER, Ladd SC. High-resolution MRI of the human parotid gland and duct at 7 Tesla. *Invest Radiol.* 2009 Sep;44(9):518-24.

Abstracts:

Stretch activates PI3K-dependent NO production in pulmonary vascular endothelial cells in situ

W.M. Kuebler, U. Uhlig, T. Goldmann, G. Schael, A. Kerem, K. Exner, E. Vollmer, C. Martin, H. Kuppe, S. Uhlig *Am J Respir Crit Care Med* 167: A121, 2003

Endothelial Ca²⁺ signaling in lung capillaries is impaired in congestive heart failure

A. Kerem, G. Schael, A.M. Schoene, H. Habazettl, M.M. Borst, A.R. Pries, W.M.Kuebler *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 445 Suppl. 1, S83, 2003

Increased vascular pressure activates PI3K-dependent NO production in pulmonary vascular endothelial cells *in situ*

G. Schael, A. Kerem, H. Habazettl, H. Kuppe, A. Pries, W.M. Kuebler *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 445 Suppl. 1, S84, 2003

Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation by NADPH oxidase in lung capillary endothelial cells *in situ*

C. Brueckl, A. Kerem, F. Krombach, K. Messmer, W. Kuebler *J Vasc Res* 41: 100, 2004

Impaired Ca^{2+} signaling contributes to deficient lung endothelial NO production in congestive heart failure

A. Kerem, G. Schael, S. Kaestle, H. Habazetl, A.R. Pries, W.M. Kuebler
J Vasc Res 41: 109, 2004

Mechanism of pulmonary endothelial dysfunction in congestive heart failure

W.M. Kuebler, A. Kerem, S. Kaestle, G. Schael, H. Habazetl, A.R. Pries, H. Kuppe
FASEB J 18: A714, 2004

Mechanism of pulmonary endothelial dysfunction in congestive heart failure

S.M. Kaestle, A. Kerem, H. Habazetl, H. Kuppe, A.R. Pries, W.M. Kuebler
Pflügers Arch - Eur J Physiol 447 Suppl 1: S69, 2004

Increased endothelial β -actin content impairs pulmonary endothelial Ca^{2+} -signaling in congestive heart failure

A Kerem, S.M. Kaestle, H. Habazetl, A.R. Pries, W.M. Kuebler
J Vasc Res 41: 457, 2004

Impaired Ca^{2+} -signaling protects lungs from development of severe hydrostatic lung edema in congestive heart failure (CHF)

S.M. Kaestle, A. Kerem, W.M. Kuebler
FASEB J in press 2006

Cytoskeletal rearrangement causes pulmonary endothelial dysfunction in congestive heart failure

W.M. Kuebler, A Kerem, S.M. Kaestle, H. Habazetl, H. Kuppe, A.R. Pries
FASEB J 19: A1236, 2005

Posterpräsentationen:

Endothelial Ca^{2+} signaling in lung capillaries is impaired in congestive heart failure

A. Kerem, G. Schael, A.M. Schoene, H. Habazetl, M.M. Borst, A.R. Pries, W.M. Kuebler

82. Congress of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Bochum, Germany, 2003

Impaired Ca^{2+} -signaling contributes to deficient lung endothelial NO production in congestive heart failure

A. Kerem, S. Kaestle, G. Schael, H. Habazetl, A.R. Pries, W.M.

Kuebler
83. Congress of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, München,
Germany, 2004

Increased endothelial β -actin content impairs pulmonary endothelial
 Ca^{2+} signaling in congestive heart failure

A. Kerem, S.M. Kaestle, H. Habazettl, A.R. Pries, W.M. Kuebler
84. Congress of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Berlin, Germany, 2004

Preis:

Posterpreis der Deutschen Physiologischen Gesellschaft mit dem
Thema:
Impaired Ca^{2+} -signaling contributes to deficient lung endothelial NO
production in congestive heart failure

A. Kerem, S. Kaestle, G. Schael, H. Habazettl, A.R. Pries, W.M.
Kuebler
83. Congress of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, München, Germany, 2004

Erklärung

„Ich, Alexander Kerem, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Pulmonal-endotheliale Dysfunktion bei chronischer Linksherzinsuffizienz“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

Danksagung

Nach Abschluss meiner Dissertation möchte ich allen herzlich danken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Ich danke allen Mitgliedern des Instituts für Physiologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin herzlichst für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit während der Erarbeitung meiner Dissertation. Besonders danken möchte ich dem Leiter des Instituts, Herrn Prof. Dr. Axel Pries, für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis die Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen. Prof. Dr. Helmut Habazettl, Frau Sylvia Plog und Frau Renate Noske-Reimers für die Einarbeitung und Unterstützung bei der Labortätigkeit und den vielen gemeinsamen Stunden im Labor, und natürlich all den anderen namentlich hier nicht aufgeführten Mitarbeitern.

Allen Menschen, die mich wissenschaftlich unterstützt haben und somit wesentlich zu den dieser Promotion zugrundeliegenden Publikationen beigetragen haben, möchte ich danken, namentlich Stephanie M. Kaestle, Axel M. Schoene, Baljit Singh, Hermann Kuppe, Mathias M. Borst, Jun Yin, Corinna Brueckl, Ulrike Uhlig, Gregor Schael.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kübler, der durch seine stets gewährte, uneigennützig Unterstützung, durch wertvolle Anregungen und Diskussionen und durch die gelegentlich im Labor notwendige helfende Hand, diese Arbeit förderte. Ich will mich insbesondere für die oft notwendig gewesene Geduld bedanken, die man als Doktorvater wahrscheinlich mitbringen muss, wenn man einen Medizinstudenten als Promovenden betreut. Ich verbinde unsere gemeinsame Zeit nicht nur als akademische Gemeinschaft, ich denke an viele gemeinsame Stunden außerhalb des Laboralltags, u.a. in Wolfgangs Büro bei einem Kännchen und den stets sehr anregenden Unterhaltungen, vielen Dank dir dafür.

Zuletzt möchte ich den mir wichtigsten Menschen in meinem Leben danken, meiner Familie. Ich danke euch für das in mich gesetzte Vertrauen. Nur mit eurer Geduld, Fürsorge, Unterstützung und unendlichen Liebe konnte ich das Erreichte schaffen. Dafür vielen, vielen Dank liebe Eltern, Maria und Arkadi. Auch meinem Bruder Daniel danke ich für alles, was er für mich getan hat.