

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

DISSERTATION

Alveolare Flüssigkeitsreabsorption bei akuter und
chronischer Hypertonie mit Linksherzinsuffizienz

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephanie Gembardt

aus Rottweil

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W.M. Kübler

2. Prof. Dr. E. Grünig

3. Prof. Dr. T. Walther

Datum der Promotion: 18. November 2011

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS	I
II. AUZÄHLUNG DER FÜR DIESE PUBLIKATIONSPROMOTION VERWENDETEN ORIGINALARBEITEN	III
III. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	IV
1. EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG	1
2. METHODIK	3
2.1. TIERE	3
2.2. SUPRAKORONARES AORTENBANDING	3
2.3. ISOLIERT-PERFUNDIERTE RATTEN- UND MAUSLUNGE	3
2.4. BESTIMMUNG DER ALVEOLO-KAPILLAREN FLÜSSIGKEITSREABSORPTION	4
2.5. PULMONALE ÖDEMBILDUNG	5
2.6. FLUORESZENZMIKROSKOPIE	5
2.7. MESSUNG DES PULMONAL-VASKULAREN FILTRATIONSKOEFFIZIENTEN (K_f)	6
2.8. PROTEINISOLIERUNG UND WESTERN BLOT	7
2.9. HYPEROXISCHE BEATMUNG	7
2.10. RAC1 TRANSLOKALISATION	7
3. ERGEBNISSE	8
3.1. ALVEOLARE FLÜSSIGKEITSREABSORPTION BEI AKUTER PULMONAL-VENÖSER HYPERTONIE	8
3.2. ENDOTHELIALE DYSFUNKTION BEI CHRONISCHER LINKSHERZINSUFFIZIENZ	9
3.3. VASKULARE PERMEABILITÄT	11
3.4. SIGNALWEG DER BILDUNG VON REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES BEI HYPEROXISCHER BEATMUNG	12
4. DISKUSSION	14
4.1. METHODISCHE LIMITATIONEN	14
4.2. ROLLE DER ENDOTHELIALEN NO-PRODUKTION BEI DER ENTSTEHUNG VON HYDROSTATISCHEN LUNGENÖDEMEN	15
4.3. KLINISCHE RELEVANZ	15
4.4. AUSBLICK	16
5. ZUSAMMENFASSUNG	18
5.1. ZUSAMMENFASSUNG	18
5.2. ABSTRACT	19
6. LITERATURVERZEICHNIS	21

7. ANHANG	23
7.1. ANTEILSERKLÄRUNG DER ARBEIT	23
7.2. DRUCKEXEMPLARE DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATIONEN	24
7.2.1. NITRIC OXIDE-DEPENDENT INHIBITION OF ALVEOLAR FLUID CLEARANCE IN HYDROSTATIC LUNG EDEMA	24
7.2.2. MECHANISM OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PULMONARY CAPILLARIES IN CONGESTIVE HEART FAILURE	25
7.2.3. NEGATIVE-FEEDBACK LOOP ATTENUATES HYDROSTATIC LUNG EDEMA VIA A CGMP-DEPENDENT REGULATION OF TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID 4	26
7.2.4. HYPEROXIA INDUCES REACTIVE OXYGEN SPECIES FORMATION IN PULMONARY CAPILLARY ENDOTHELIAL CELLS <i>IN SITU</i>	27
7.3. LEBENSLAUF	28
7.4. VERÖFFENTLICHUNGEN	29
7.4.1. ARTIKEL	29
7.4.2. BUCHBEITRÄGE	29
7.4.3. ABSTRACTS	30
IV. ERKLÄRUNG AN EIDES STATT	33
V. DANKSAGUNGEN	34

II. Aufzählung der für diese Publikationspromotion verwendeten Originalarbeiten

[1] S.M. Kaestle, C.A. Reich, N. Yin, H. Habazettl, J. Weimann, W.M. Kuebler: Nitric oxide-dependent inhibition of alveolar fluid clearance in hydrostatic lung edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L859-69.

Impact: 3,924

[2] A. Kerem*, J. Yin*, S.M. Kaestle, J. Hoffmann A.M. Schoene, B. Singh, H. Kuppe, M.M. Borst, W.M. Kuebler: Mechanism of endothelial dysfunction in pulmonary capillaries in congestive heart failure. *Circ Res* 2010; 106: 1103-1116, * both authors contributed equally.

Impact: 9,989

[3] J. Yin, J. Hoffmann, S.M. Kaestle, N. Neye, L. Wang, J. Baeurle, W. Liedke, S. Wu, H. Kuppe, A.R. Pries, W.M. Kuebler: Negative-feedback loop attenuates hydrostatic lung edema via a cGMP-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 4. *Circ Res* 2008; 102: 966-74.

Impact: 9,989

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

Impact: 4,477

III. Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

ACh	: Acetylcholin
AEBSF	: 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
AFI	: <i>alveolar fluid influx</i> , alveolarer Flüssigkeitseinstrom
AFR	: <i>alveolar fluid reabsorption</i> , alveolare Flüssigkeitsreabsorption
AFS	: <i>alveolar fluid shift</i> , alveolare Flüssigkeitsbewegung
AT I	: alveolare Epithelzelle Typ 1
AT II	: alveolare Epithelzelle Typ 2
BAPTA	: <i>1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> , 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraessigsäure
8-Br-cGMP	: <i>8-Bromoguanosine- 3', 5'- cyclic monophosphate</i> , 8-Bromoguanosin- 3', 5'-zyklisches Monophosphat, zell-permeables cGMP-Analogon
BSA	: <i>bovine serum albumine</i> , bovines Serumalbumin
[Ca ²⁺] _i	: intrazelluläre Ca ²⁺ Konzentration
CFTR	: <i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> , Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
CHF	: <i>congestive heart failure</i> , chronische Herzinsuffizienz
cmH ₂ O	: cm Wassersäule
Da	: Dalton
DAF-FM AM	: (4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoreszein) diazetat
DCF	: Dichlorofluoreszein
DIVT	: Doppelindikator-Verdünnungstechnik
DNA	: Desoxyribonukleinsäure
DPI	: Diphenyliodonium
cGMP	: <i>cyclic guanosine monophosphate</i> , zyklisches Guanosinmonophosphat
eNOS	: <i>endothelial nitric oxide synthase</i> ; endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ENaC	: <i>epithelial Na⁺-Channel</i> , epithelialer Natriumkanal
F	: Fluoreszenzintensität
F ₀	: Fluoreszenzintensität zum Anfangszeitpunkt 0 min
F _i O ₂	: <i>fraction of inspired oxygen</i> , inspirierte O ₂ -Fraktion
FLEC	: <i>fresly isolated lung endothelial cells</i> , frisch isolierte pulmonale Endothelzellen
Fura-2 AM	: Fura-2-acetoxymethylester

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

GSNO	: S-Nitrosoglutathion
GTP	: Guanosintriphosphat
H ₂ DCF-DA	: Dichlorodihydrofluoreszein diazetat
kDa	: Kilodalton
KG	: Körpergewicht
K _d	: Dissoziationskonstante
K _f	: Filtrationskoeffizient
K _{fc}	: kapillarer Filtrationskoeffizient
L-NAME	: N ^ω -nitro-L-arginin methyl ester
NAD(P)H:	: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaF	: Na ⁺ -Fluoreszein
NO	: <i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
NKCC	: Na ⁺ -K ⁺ -2Cl ⁻ -Cotransporter
ODQ	: 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on
P _{AP}	: <i>pulmonary arterial pressure</i> , pulmonal-arterieller Druck
P _{AW}	: <i>airway pressure</i> , Atemwegsdruck
4α-PDD	: 4α-Phorbol 12,13-didecanoat
PI3K	: Phosphoinositid-3-Kinase
PKG	: Protein Kinase G
P _{LA}	: <i>left atrial pressure</i> , linksatrialer Druck
P _c	: <i>pulmonary capillary pressure</i> , pulmonal-kapillarer Druck
papaNONOate:	(Z)-1-[N-(3-aminopropyl)-N-(n-propyl)amino]diazene-1,2-diolat
Rac1	: <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i> , Ras-verwandtes C3 Botulinum Toxin Substrat 1
ROS	: <i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rPE	: r-Phycoerythrin
SEM	: <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
sGC	: <i>soluble guanylatcyclase</i> , lösliche Guanylatcyclase
t	: <i>time</i> , Zeit
TRD	: Texas Red Dextran
TRP	: <i>transient receptor potential</i> , transient receptor potential
TRPV4	: <i>transient receptor potential vanilloid 4</i> , transient receptor potential vanilloid 4

1. Einleitung und Zielstellung

Die pulmonal-venöse Hypertonie, eine häufige Komplikation der Linksherzinsuffizienz, führt akut zu aktiven zellulären Reaktionen und chronisch zu strukturellen Adaptionsprozessen in der pulmonalen Mikrostrombahn. Während die akute Linksherzinsuffizienz und der daraus resultierende Anstieg des pulmonal-kapillaren Drucks die wichtigste Ursache für die Bildung eines hydrostatischen Lungenödems darstellen¹, verringert sich bei chronischer Linksherzinsuffizienz aufgrund bislang ungeklärter Ursachen das Risiko für die pulmonale Ödembildung².

Aufgrund der vielfältigen und komplexen Funktion von Stickstoffmonoxid (NO) könnte die veränderte Aktivität der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) eine entscheidende Rolle in der druck-induzierten Lungenpathologie spielen, und als „früher“ Indikator einer mikrovaskulären endothelialen Dysfunktion dienen³.

In pulmonal-kapillaren Endothelzellen ist in Reaktion auf vaskulären Stress die endotheliale NO-Produktion signifikant erhöht⁴.

Als potentieller Kandidat einer solchen interkompartimentellen Signaltransduktion zwischen pulmonalem Endothel und alveolarem Epithel könnte somit endothelial synthetisiertes Stickstoffmonoxid in Frage kommen, da es als frei-diffusibles Gas die alveolo-kapillare Barriere überwinden kann, und *in vitro* den Na⁺-Transport in Typ II Epithelzellen hemmt⁵.

In den Publikationen [1] und [3] wurden die akuten Effekte einer pulmonal-venösen Hypertonie hinsichtlich der Entwicklung eines hydrostatischen Lungenödems untersucht. Dieses wird traditionell ausschließlich einer Verschiebung des Starling'schen Gleichgewichts⁶ infolge eines erhöhten hydrostatischen oder eines verringerten onkotischen Gradienten in Richtung einer gesteigerten Flüssigkeitsfiltration zugeschrieben.

Grundlage der Publikation [1] war die Hypothese, dass neben einer gesteigerten Flüssigkeitsfiltration eine vermehrte Bildung von NO die Flüssigkeitsreabsorption aus dem alveolaren Kompartiment reduziert und letzterer Mechanismus eine wesentliche Rolle bei der Ausbildung des Druck-induzierten Lungenödems spielt. In der Publikation [3] wurde der Einfluss akuter endothelialer Reaktionen auf die Regulation der vaskulären Permeabilität bei einer akuten pulmonal-venösen Hypertonie untersucht.

Die chronisch pulmonal-venöse Hypertonie führt zu einer verminderten endothelialen NO-Produktion in den pulmonalen Mikrogefäßen⁷, wodurch die alveolare Flüssigkeitsreabsorption bei vaskulärem Stress erhalten bleibt⁸. In der Publikation [2] wurden die zellulären Mechanismen untersucht, die dieser endothelialen Dysfunktion zugrunde liegen.

Die pulmonal-kapillaren Endothelzellen spielen auch eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des hyperoxischen Lungenschadens. Hyperoxische Beatmung kann bei vielen Erkrankungen, die mit einer Störung der Sauerstoffaufnahme, des Sauerstofftransports oder der Sauerstoffutilisation einhergehen, die Sauerstoffversorgung des Gewebes verbessern, jedoch führt eine hyperoxische Beatmung über mehrere Stunden oder Tage zu schädlichen und bei entsprechender Expositionsdauer tödlichen Veränderungen der Lungenfunktion. Bekannt ist, dass pulmonal-kapillare Endothelzellen ein primäres Ziel von hyperoxischem Stress sind^{9,10}, und dass sich der hyperoxische Lungenschaden auf die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) zurückführen lässt¹¹. In Publikation [4] haben wir deshalb Mechanismen der endothelialen Bildung von ROS während hyperoxischer Ventilation untersucht.

2. Methodik

2.1. Tiere

Für Untersuchungen am Model der isoliert-perfundierten Lunge wurden männliche Sprague-Dawley (SD) Ratten (360 ± 20 g Körpergewicht, KG) und männliche C57BL/6- (Wildtyp), eNOS Knock-out- (eNOS^{-/-}) und transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) Knock-out- (TRPV4^{-/-}) Mäuse (Publikation [3]) mit identischem Hintergrund (25 ± 1 g KG) verwendet. Die TRPV4^{-/-}-Mäuse waren ein freundliches Geschenk von PD Dr. R. Köhler (Abteilung für Innere Medizin, Universität Marburg, Deutschland) in Kooperation mit W. Liedke (Center for Transnational Neuroscience Medicine, Division of Neurology, Duke Universität, North Carolina, USA). Alle anderen Tiere wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in einem 12:12 h Tag-Nacht Rhythmus in Käfigen mit Zugang zu Wasser und Trockenfutter *ad libitum* im Tierstall des Instituts für Physiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin–Campus Benjamin Franklin. Die der Promotion zugrunde liegenden Studien wurden von der zuständigen Landesbehörde (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin) genehmigt und sind unter den Nummern O0158/01, G0033/03 (Ratte), G0038/07 und T0236/02 (Maus) registriert.

2.2. Suprakoronares Aortenbanding

Die Induktion der chronischen Herzinsuffizienz erfolgte 9 Wochen vor dem Experiment durch suprakoronares Aortenbanding mittels eines Titanclips (Innendurchmesser: 0,8 mm)¹².

2.3. Isoliert-perfundierte Ratten- und Mauslunge

Die isoliert-perfundierten Lungen wurden, wie in den beigefügten Publikationen [1-3] *en detail* beschrieben, präpariert. Für das isoliert-perfundierte Rattenlungenmodell wurden SD Ratten anästhesiert, tracheotomiert und mechanisch beatmet. Herz und Lunge wurden *en bloc* exzidiert und an ein fluss-konstantes (14 ml/min) Perfusionssystem angeschlossen. Die Lungen wurden mit einem Gasmisch aus 21% O₂, 5% CO₂ und 74% N₂ bei einem Atemwegsdruck (P_{AW}) von 5 cmH₂O konstant insuffliert. Der pulmonal-arterielle Druck (P_{AP} = 10 ± 1 cmH₂O) und der linksatriale Druck (P_{LA}) wurden kontinuierlich überwacht (HSE, Type 705/1; Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland) und digital aufgezeichnet (DASYlab 32; Datalog GmbH, Mönchengladbach,

Deutschland). Eine akute pulmonal-venöse Hypertonie wurde mittels Erhöhung des P_{LA} von 5 cmH₂O auf bis zu 15 cmH₂O induziert.

Die Lungen anästhesierter Mäuse wurden exzidiert und in einer abgeschlossenen Perfusionskammer bei einem Atemwegsdruck von 5 cmH₂O konstant beatmet (21% O₂, 5% CO₂ und 74% N₂). Über jeweils einen pulmonal-arteriell und einen linksatrial platzierten Katheter wurden die Lungen kontinuierlich mit 1,25 ml/h BSA-Puffer perfundiert. Messungen unter Kontrollbedingungen erfolgten bei einem P_{LA} von 2 cmH₂O, hydrostatischer Stress im Sinne einer akuten pulmonal-venösen Hypertonie wurde durch Erhöhung des P_{LA} von 2 auf 6 cmH₂O induziert.

2.4. Bestimmung der alveolo-kapillaren Flüssigkeitsreabsorption

Da zur Bestimmung des alveolo-kapillaren Flüssigkeitstransports bei unterschiedlichen hydrostatischen Druckniveaus bislang noch kein geeignetes experimentelles Modell vorlag, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit eine neue Untersuchungsmethodik entwickelt.

Das Modell (Abb. 1) basiert auf einer zweikompartimentellen Doppelindikator-Verdünnungstechnik (DIVT). Dabei wird ein hochmolekularer Indikator, Texas Red Dextran (70 kDa), in den Alevolarraum instilliert, um die Netto-Flüssigkeitsbewegung ins alveolare Kompartiment zu bestimmen. Gleichzeitig wird der niedermolekulare Indikator Natriumfluorescein (360 Da), der mittels *solvent drag* vom vaskulären ins interstitielle/alveolare Kompartiment übertritt und daher als Indikator der Flüssigkeitsfiltration eingesetzt werden kann, dem Perfusat zugegeben. Indikatorfluoreszenzproben wurden zu Anfang und zum Ende des Versuches (Versuchsdauer 60 min) aus beiden Kompartimenten, dem alveolaren wie dem vaskulären, entnommen und in einem Fluoreszenzphotometer bestimmt.

In einem mathematischen Modell konnten anschließend aus den gemessenen Fluoreszenzwerten der alveolare Flüssigkeitseinstrom (AFI, passiv), die alveolare Flüssigkeitsreabsorption (AFR, aktiv) und die Netto-Flüssigkeitsbewegung quantitativ bestimmt werden. Die Doppelindikatormethode und das mathematische Modell sind detailliert im Daten-Supplement der beigelegten Publikation [1] beschrieben.

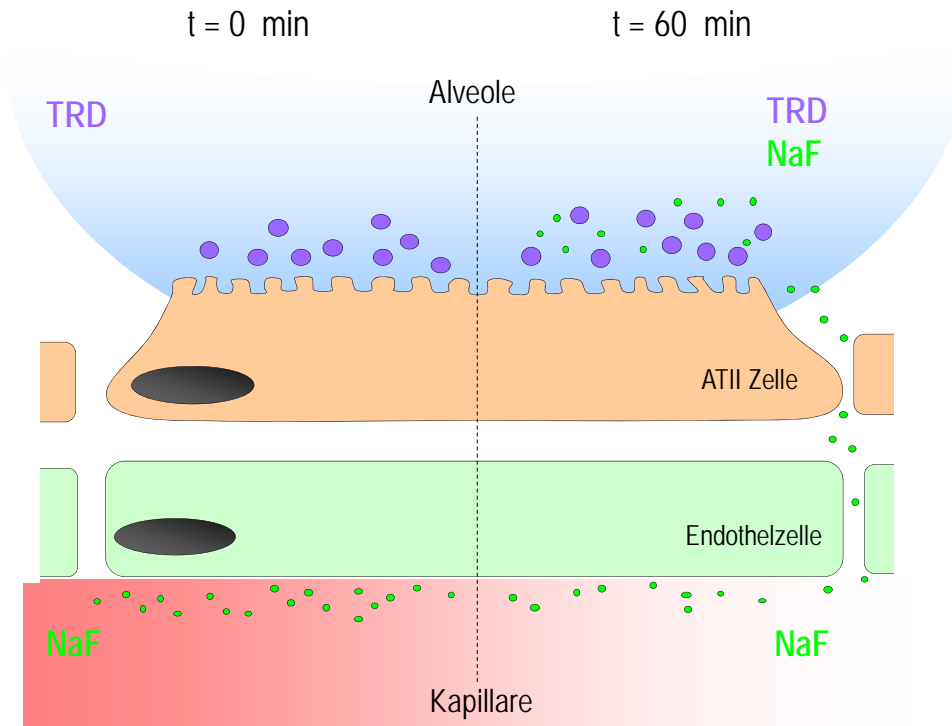


Abbildung 1: Schematische Illustration der Doppelindikator-Verdünnungstechnik. Links ($t = 0$ min) ist die Ausgangssituation des Experiments zum Zeitpunkt ($t = 0$ min) dargestellt, rechts ($t = 60$ min) ist die experimentelle Situation nach 60 min Versuchsdauer abgebildet. Der hochmolekulare Indikator Texas Red Dextran (TRD) bleibt im Alveolarraum während der niedermolekulare Indikator Na^+ -Fluoreszein (NaF) die alveolo-kapillare Barriere im Rahmen von Flüssigkeitsverschiebungen mittels *solvent drag* überwindet und somit als Indikator für die Flüssigkeitsfiltration dient. ATII-Zelle = Alveolarepithelzelle Typ II.

2.5. Pulmonale Ödembildung

Die Quantifizierung des Lungenwassergehalts als Feucht/Trockengewichtsverhältnis erfolgte mittels Mikrowellentechnik¹³ und dient als Maß des Lungenödems.

2.6. Fluoreszenzmikroskopie

Die *in situ* Fluoreszenz-Imaging Experimente wurden durchgeführt wie in den zugehörigen Publikationen [2,3] detailliert beschrieben. Für die Beladung einzelner Kapillargebiete an der Lungenoberfläche mit Fluoreszenzfarbstoffen wurde ein Mikrokatheter in eine der Pulmonalvenen eingeführt („ge-wedged“). Die endotheliale Fluoreszenz wurde mit monochromatischem Licht (Polychrom IV; T.I.L.L. Photonics, Martinsried, Deutschland) angeregt und die Fluoreszenzemission wurde über ein Intravitalmikroskop (Axiotech^{Vario}, 100 HD, Zeiss, Jena, Deutschland; Objektiv: UAPO 40x, Olympus, Hamburg, Deutschland) mit einem dem jeweiligen Farbstoff (Tab. 1) entsprechendem Filtersatz von einer CCD Kamera gesammelt und an eine digitale Analysesoftware übertragen (TILLvisION 4.01; T.I.L.L. Photonics).

Farbstoff	Indikator für	Reaktion / Imaging
DAF-FM DA	Stickstoff-monoxid (NO)	<i>Prinzip:</i> Zell-permeables DAF-FM DA diffundiert in die Zelle und wird durch Esterasen zu zell-impermeablem DAF-FM hydrolysiert, dieses reagiert mit NO unter Einwirkung von O ₂ (N ₂ O ₃) zu stark fluoreszierenden Benzotriazol-Derivaten. <i>Fluoreszenzimaging:</i> Anregung bei 480 nm; die DAF-FM Fluoreszenzintensität (F) in Abhängigkeit zur individuellen Ausgangsfluoreszenz (F ₀) gemessen reflektiert die kumulative endotheliale NO-Produktion
Fura-2 AM	Intrazelluläre Calcium-Konzentration [Ca ²⁺] _i	<i>Prinzip:</i> Zell-permeables Fura-2 AM deesterifiziert intrazellulär zu membranundurchlässigem Fura-2. <i>Fluoreszenzimaging:</i> Anregung bei 340, 360 und 380 nm. Die [Ca ²⁺] _i wird aus der 340/380 Fluoreszenzratio bestimmt, basierend auf einem K _d von 224 nmol/L und den jeweiligen Kalibrierungsparametern.
H₂DCF-DA	freie Sauerstoffradikale (ROS)	<i>Prinzip:</i> Zell-permeables H ₂ DCF-DA diffundiert in die Zelle und wird durch Esterasen zu zell-impermeablem H ₂ DCF hydrolysiert, dieses wird in Anwesenheit von ROS zu fluoreszierendem DCF oxidiert.. <i>Fluoreszenzimaging:</i> Anregung bei 488 nm, durch kontinuierliche Diffusion von H ₂ DCF-DA ins Endothel und kontinuierliche <i>Leakage</i> von DCF aus dem Endothel entsteht ein dynamisches Gleichgewicht, infolge dessen die intrazelluläre ROS Konzentration durch die Fluoreszenzintensität in Nah-Echtzeit wiedergegeben wird.
Hydroethidin	freie Sauerstoffradikale (ROS)	<i>Prinzip:</i> Hydroethidin wird intrazellulär zu Ethidium (E ⁺) und Hydroxyethidium (2-OH- E ⁺) oxidiert, die an DNA binden. <i>Fluoreszenzimaging:</i> Zytoplasmisch lokalisiertes Hydroethidin wird bei 360 nm angeregt, nukleär an DNA gebundenes Ethidium/Hydroxyethidium wird in identischen Zellen durch Anregung bei 470 nm sichtbar gemacht.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und Erläuterung der Prinzipien, die der jeweiligen Farbstoffbeladung, Fluoreszenzreaktion und -bildgebung zugrunde liegen.

2.7. Messung des pulmonal-vaskulären Filtrationskoeffizienten (K_f)

Zur Bestimmung der pulmonal-endothelialen Permeabilität wurde der vaskuläre Filtrationskoeffizient (K_f) in isoliert-perfundierten Rattenlungen mittels einer gravimetrischen Technik bestimmt. Nachdem die Lunge für > 5 min unter isogravimetrischen Bedingungen perfundiert wurde, wurde der P_{LA} um 4 cmH₂O erhöht und der K_f wurde aus der Geschwindigkeit der Gewichtszunahme (ΔW/ΔT) zum Zeitpunkt t = 18-20 min bezogen auf

den Anstieg im pulmonal-kapillaren Druck (P_C), berechnet. Die Methode ist ausführlich im Daten-Supplement der Publikation [3] beschrieben.

2.8. Proteinisolierung und Western Blot

Die Proteingewinnung aus Lungenhomogenat und frisch isolierten pulmonalen Endothelzellen (FLECs) ist in den Publikationen [2,3] detailliert beschrieben.

Nach dem Western Blot wurden die Membranen wie in den jeweiligen Publikationen [2,3] beschrieben blockiert, mit primärem und sekundärem Antikörper inkubiert und mit dem *ECL Western blotting kit* (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) entwickelt. Die Bildanalyse erfolgte mit *Image J* Software (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

2.9. Hyperoxische Beatmung

Nach Aufnahme der Ausgangswerte wurden die Lungen, wie in Publikation [4] beschrieben, mit einer $F_{iO_2} = 0,21$ bei Normoxie bzw. mit einer $F_{iO_2} = 0,7$ bei Hyperoxie beatmet (5% CO_2 , Rest N_2).

2.10. Rac1 Translokalisierung

Der Rac1 Translokalisationsassay ist in Publikation [4] *en detail* beschrieben. In den isoliert perfundierten Lungen wurden unter den jeweilig zu untersuchenden Versuchsbedingungen die Gefäße mit Paraformaldehyd *in situ* fixiert und sodann permeabilisiert. Anschließend wurde Rac1 mit einem Rac1 Antikörper und einem sekundären r-Phycoerythrin (rPE) konjugierten Antikörper indirekt markiert. Durch anschließende Perfusion der angefärbten Gefäße wurden ungebundene Fluoreszenz-Antikörper sowie fluoreszenzmarkiertes, ungebundenes Rac1 ausgewaschen; die verbleibende Fluoreszenz ist ein spezifischer Marker des translozierten (gebundenen) Rac1. Endotheliale Zellkerne wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff HOECHST 33324 gegengefärbt.

3. Ergebnisse

3.1. Alveolare Flüssigkeitsreabsorption bei akuter pulmonal-venöser Hypertonie

Mittels der zweikompartimentellen Doppelindikator-Verdünnungstechnik gelang es, ein Modell zu entwickeln, bei dem die Netto-Flüssigkeitsbewegung bei unterschiedlichen Graden von hydrostatischem Stress bestimmt und zwischen aktiver alveolarer Flüssigkeitsreabsorption und passivem alveolarem Flüssigkeitseinstrom unterschieden werden kann.

Ein Anstieg des (P_{LA}) von 5 auf 15 cmH₂O führt zur Entwicklung eines akuten hydrostatischen Lungenödems. Die hier vorgelegten Untersuchungen zeigen erstmals, dass dabei die kontinuierliche Reduktion der alveolaren Flüssigkeitsreabsorption eine signifikant größere Rolle spielt als der Anstieg der Flüssigkeitsfiltration. Bei einem Druck von ~ 12 cmH₂O wird die AFR darüber hinaus negativ, was einer alveolaren Flüssigkeitssekretion (AFS) gleichkommt (Publikation [1], Abb. 1 B, C). Parallel dazu konnte am Modell der isoliert-perfundierten Mauslunge gezeigt werden, dass die Entwicklung des hydrostatischen Lungenödems durch endothelial gebildetes NO reguliert wird: Nach Inhibition der eNOS mit N^o-nitro-L-arginin methyl ester (L-NAME) bzw. in isolierten Lungen von eNOS^{-/-}-Mäusen war die Ödembildung als Reaktion auf hydrostatischen Stress im Vergleich zu Kontrolltieren deutlich reduziert, während das Feucht-/Trockengewichtsverhältnis bei physiologischem Druck in allen drei Gruppen vergleichbar war (Publikation [1], Abb. 2).

Weiterhin konnten wir zeigen, dass bei physiologischem P_{LA} = 5 cmH₂O die AFR nach Zugabe von exogenen NO-Donoren (S-Nitrosoglutathion (GSNO), (Z)-1-[N-(3-aminopropyl)-N-(n-propyl)amino]diazene-1-ium-1,2-diolat (papaNONOate)) stark vermindert ist, während bei erhöhtem P_{LA} und gleichzeitiger Inhibition der eNOS (L-NAME) die alveolare Flüssigkeitsreabsorption aufrecht erhalten werden konnte (Publikation [1], Abb. 3 C, D).

Eine Inhibition der endothelialen NO-Synthese (PI3K-Inhibitoren, Ca²⁺-freie Perfusion) oder des der eNOS nachgeschalteten sGC/PKG Signalweges (lösliche Guanylatcyclase (sGC), Protein Kinase G (PKG); (Abb. 2)) führt bei hydrostatischem Stress zur Aufrechterhaltung der AFR. Hingegen bewirkt eine Aktivierung des sGC/PKG Signalweges auch bei physiologischem P_{LA} eine Verminderung der AFR (Publikation [1], Abb. 4, 5).

3. ERGEBNISSE

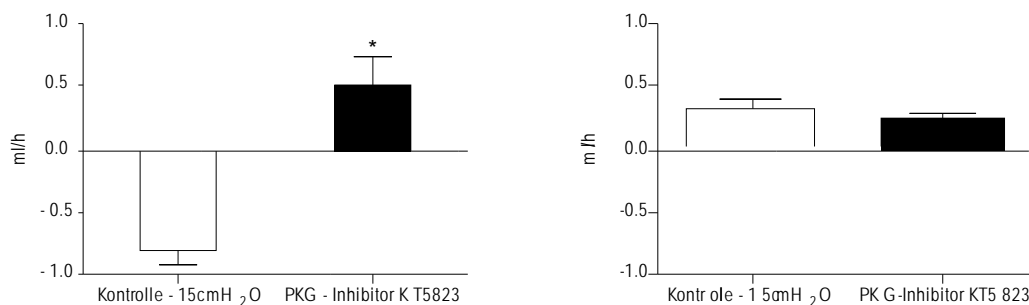


Abbildung 2: Inhibition der Protein Kinase G durch den PKG-Inhibitor KT5823 führt zur Wiederherstellung der alveolaren Flüssigkeitsreabsorption (links) bei erhöhtem hydrostatischem Druck (P_{LA}) von 15 cmH₂O, während der alveolare Flüssigkeitsinflux (rechts) durch KT5823 nicht verändert wird; n = 7, * $p < 0.05$ vs. Kontrolle.

Die treibende Kraft der alveolaren Flüssigkeitsreabsorption ist der epitheliale Na^+ -Transport über den apikalen Na^+ -Kanal (ENaC) und die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase. Da eine Inhibition des ENaC mit Amilorid die alveolare Flüssigkeitsreabsorption bei physiologischem P_{LA} hemmt, bei erhöhtem P_{LA} jedoch keine additive Wirkung auf die AFR hat, kann darauf geschlossen werden, dass das endothelial gebildete NO die AFR über den ENaC hemmt. Eine zusätzliche Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase durch Ouabain reduziert die AFR bei erhöhtem P_{LA} auf ~ 0 ml/h und verhindert somit die aktive alveolare Flüssigkeitssekretion (Publikation [1], Abb. 6 C, D). Das Modell der alveolaren Flüssigkeitsreabsorption ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.

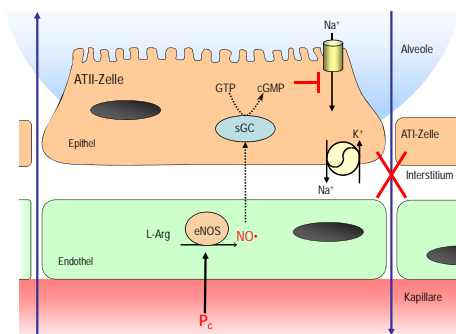


Abbildung 3: Modell der alveolaren Flüssigkeitsreabsorption. NO fungiert als interkompartimenteller Signalmediator zwischen dem vaskularen Endothel und dem alveolaren Epithel und inhibiert die alveolare Flüssigkeitsreabsorption über den sGC/cGMP-Signalweg durch Hemmung des epithelialen Na^+ -Kanals ENaC. ATI-Zelle = Alveolarepithelzelle Typ I, ATII-Zelle = Alveolarepithelzelle Typ II, NO = Stickstoffmonoxid, GTP = Guanosintriphosphat, cGMP = zyklisches Guanosinmonophosphat, sGC = lösliche Guanylatcylase., P_c = pulmonal-kapillarer Druck.

3.2. Endotheliale Dysfunktion bei chronischer Linksherzinsuffizienz

In klinischen Studien¹⁴ wurde bereits beschrieben, dass Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (CHF) seltener und weniger schwere Lungenödeme entwickeln als Patienten mit akuter Linksherzinsuffizienz. Im Einklang mit diesen klinischen Befunden konnten wir zeigen, dass die AFR in Lungen von Ratten mit CHF auch bei erhöhtem P_{LA} erhalten bleibt (Publikation [1], Abb. 7) Azzam *et al.*¹⁵ haben die Aufrechterhaltung der AFR bei CHF mit

einer erhöhten Verfügbarkeit und Aktivität der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase erklärt. Darüber hinaus gelang es uns in den vorliegenden Untersuchungen, zu zeigen, dass die durch die CHF verursachte endotheliale Dysfunktion maßgeblich zum Erhalt der AFR beiträgt. In Publikation [2] wurden die dieser gestörten endothelialen NO-Synthese bei CHF zugrunde liegenden Ursachen untersucht. In *in situ* Fluoreszenz-Imaging Experimenten konnte von uns gezeigt werden, dass die Endothelzellen der pulmonalen Mikrogefäße von Ratten mit CHF weder auf pharmakologische (Acetylcholin, ACh) noch auf mechanische Stimuli mit einem Anstieg der endothelialen NO-Produktion reagieren. Grund für die fehlende Reaktion ist jedoch nicht eine verminderte Expression der eNOS, wie in Western Blots und immunhistochemischen Untersuchungen gezeigt werden konnte, sondern eine Störung der eNOS-Regulation auf posttranskriptionaler Ebene durch Ca^{2+} /Calmodulin. Das intrazelluläre Ca^{2+} -Profil in mikrovaskularen Endothelzellen von Tieren mit CHF unterscheidet sich sowohl unter Ausgangsbedingungen als auch bei erhöhtem hydrostatischem Druck oder nach pharmakologischer Stimulation maßgeblich von dem in Kontrolltieren. Die mittlere endotheliale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist in Lungen von Ratten mit CHF um ca. 15% reduziert, und die charakteristischen endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen normaler Kontrolllungen fehlen fast vollständig¹⁶. Mechanische Stimulation oder pharmakologische Stimulation mit Histamin oder Acetylcholin erhöhen das mittlere endotheliale Ca^{2+} und die Amplitude der Ca^{2+} -Oszillation in Kontrolltieren signifikant, haben jedoch keinen Einfluss auf das intrazelluläre Ca^{2+} Signaling in pulmonalen Endothelzellen von Ratten mit CHF. Perfusion mit dem Ca^{2+} -Ionophor 4-Bromo-A23187 konnte hingegen die endotheliale NO-Produktion sowohl in Kontroll- als auch in CHF Tieren gleichermaßen induzieren, was zeigt, dass die endotheliale NO-Synthese durch die Induktionen eines endothelialen Ca^{2+} Signals in CHF-Lungen wiederhergestellt werden kann. Als Ursache dieser fundamentalen Störung der endothelialen Ca^{2+} Homöostase und des Ca^{2+} Signalings wurde ein ~10-fach erhöhter F-Aktin Gehalt der pulmonalen mikrovaskularen Endothelzellen identifiziert. Während F-Aktin bei Kontrolltieren spezifisch an den Bifurkationen polymerisiert wird, sind die F-Aktin Mikrofilamente bei den CHF Tieren spiralförmig entlang des kompletten Gefäßes angeordnet. Zerstörung des F-Aktin Zytoskeletts mit Cytochalasin D führte sowohl zur Wiederherstellung des endothelialen Ca^{2+} Signalings als auch der endothelialen NO-Produktion in Reaktion auf mechanische oder pharmakologische Stimuli [2].

3.3. Vaskuläre Permeabilität

In Reaktion auf einen Anstieg des P_{LA} von 5 auf 15 cmH₂O steigt der pulmonale K_f als Ausdruck einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität signifikant an. Inhibition des endothelialen Ca^{2+} -Einstroms mit Gd^{3+} mildert den Anstieg des K_f gleichermaßen verringert der exogene NO-Donor GSNO den K_f -Anstieg bei erhöhtem hydrostatischem Druck, während Inhibition der eNOS mit L-NAME zu einer Steigerung des K_f führt. Diese Befunde zeigen, dass endotheliales NO eine zentrale Rolle für die Regulation der pulmonalen mikrovaskulären Permeabilität spielt. Perfusion der isolierten Lunge mit L-NAME bei erhöhtem P_{LA} führt zu einem verstärkten Anstieg des endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ während GSNO den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg vermindert. Perfusion der Lunge mit dem Hemmer der sGC, [1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on (ODQ), verstärkt den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg ebenfalls, während Aktivierung des sGC/zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) Signalweges mittels des sGC-Aktivators Bay 41-2272 oder des cGMP-Analogons 8-Br-cGMP den $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg entsprechend vermindert. Die Hemmung der sGC mit ODQ erhöht auch den K_f , während Bay 41-2272 und 8-Br-cGMP den K_f in vergleichbarem Ausmaß wie Gd^{3+} reduzieren und somit zu einer verringerten Ödembildung führen. Ein Schema des NO/cGMP-Signalwegs ist in Abb. 4 dargestellt.

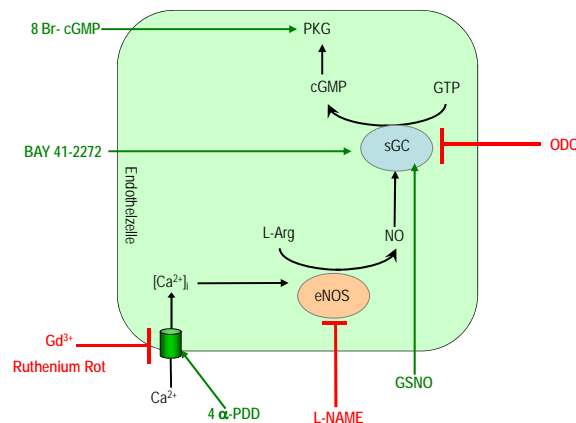


Abbildung 4: Schema des NO/cGMP-Signalwegs und mögliche Ansatzpunkte für pharmakologische Interventionen. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) wurde in den Versuchen vom NO-Synthase Inhibitor N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) gehemmt. Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) kann von dem exogenen NO-Donor S-Nitrosoglutathione (GSNO) oder dem NO unabhängigen sGC-Aktivator BAY 41-2272 aktiviert oder von dem sGC Inhibitor 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on (ODQ) blockiert werden. Die Protein Kinase G (PKG) kann durch das cGMP Analogon 8-Br-cGMP aktiviert werden. Der endotheliale Ca²⁺- transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) Kanal kann durch TRPV4-Agonisten 4 α -Phorbol 12,13-didecanoat (4 α -PDD) aktiviert oder durch den Ca²⁺-Kanal Inhibitor Gd^{3+} und den TRPV4-Inhibitor Ruthenium Rot blockiert werden.

Zusammengenommen weisen diese Daten darauf hin, dass das in vaskulären Endothelzellen gebildete NO den Anstieg des K_f in Reaktion auf hydrostatischen Stress über einen „negativen Rückkopplungsmechanismus“ (Abb. 5) abschwächt. Das durch Aktivierung der sGC katalysierte cGMP inhibiert den endothelialen Ca^{2+} -Einstrom und senkt somit den K_f .

Zusätzlich wird, durch den verminderten $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg auch die endotheliale NO-Produktion selbst inhibiert. TRPV4 konnte von uns als der Ca^{2+} -Kanal identifiziert werden, der den endothelialen Ca^{2+} -Einstrom in Reaktion auf hydrostatischen Stress vermittelt und der durch cGMP inhibiert wird. TRPV4 ist ein mechanosensitiver Ca^{2+} -Kanal, der, wie wir¹⁷ und andere¹⁸ mittels Western Blots und immunohistologischen Untersuchungen zeigen konnten, in pulmonalen mikrovaskularen Endothelzellen exprimiert wird. Perfusion mit dem TRPV4-Inhibitor Ruthenium Rot senkt den K_f im selbem Ausmaß wie Gd^{3+} . Aktivierung des Ca^{2+} -Kanals mit dem TRPV4-Agonisten 4- α -Phorbol-12,13-didecanoat (4 α -PDD) erhöht den K_f bei physiologischem P_{LA} , führt jedoch bei erhöhtem P_{LA} nicht zu einem weiteren Anstieg des K_f , was darauf hindeutet, dass der Ca^{2+} -Kanal bereits aktiviert ist. In TRPV4^{-/-}-Mäusen steigt im Gegensatz zu Kontrolltieren bei erhöhtem hydrostatischem Druck weder die endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ noch die endotheliale NO-Synthese an, was zu einer signifikanten Reduktion der hydrostatischen Ödembildung der Lunge führt.

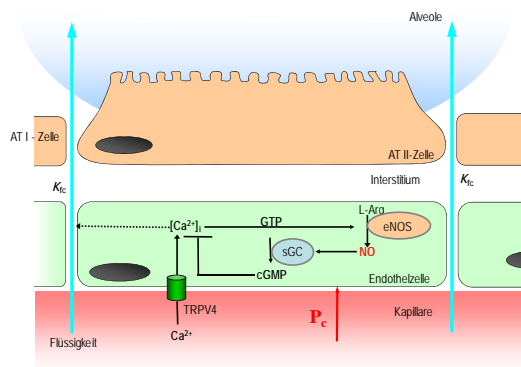


Abbildung 5: Schema des negativen Rückkopplungsmechanismus. In pulmonaren Mikrogefäßen wird in Antwort auf hydrostatischen Stress der NO/cGMP Signalweg aktiviert, infolgedessen wird die endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ Antwort abgeschwächt und somit der Anstieg des pulmonalen K_f und die endotheliale NO-Produktion limitiert. ATI-Zelle = Alveolarepithelzelle Typ I, ATII-Zelle = Alveolarepithelzelle Typ II, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase, GTP = Guanosintriphosphat, cGMP = zyklische Guanosylphosphatase, L-Arg = L-Arginin, NO=Stickstoffmonoxid, TRPV4 = transient receptor potential vanilloid 4, $[Ca^{2+}]_i$ = intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, K_{fc} = kapillarer Filtrationskoeffizient, P_c = pulmonal-kapillarer Druck.

3.4. Signalweg der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies bei hyperoxischer

Beatmung

Mittels Fluoreszenz-Imaging reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) konnten wir zeigen, dass hyperoxische Beatmung zu einer kontinuierlichen Bildung von ROS in pulmonal-kapillaren Endothelzellen führt. Zur Charakterisierung des der ROS-Bildung bei Hyperoxie zugrunde liegenden Signalwegs (Abb. 6) wurde (i) der Elektronentransport am mitochondriale Komplex I mittels Rotenon, (ii) die Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat- (NAD(P)H) Oxidase durch Diphenyliodonium (DPI) und (iii) der Zusammenbau des NAD(P)H-Oxidase Komplexes durch den Serinproteinase-Inhibitor 4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid

(AEBSF) inhibiert. Während eine Inhibition des mitochondrialen Komplexes mit Rotenon sowohl die ROS-Bildung bei hyperoxischer Beatmung hemmt als auch bei normoxischen Ausgangsbedingungen zu einer verminderten ROS-Bildung führt, hat eine Blockierung der NAD(P)H-Oxidase nur die Inhibierung der progressiven ROS-Bildung bei hyperoxischer Beatmung zur Folge. Die Rac1 Translokalisierung sowie der durch DPI und AEBSF inhibierbare Anteil der ROS-Bildung konnte mittels des Atmungskette Inhibitors Rotenon komplett blockiert werden, was darauf hindeutet, dass die NAD(P)H Aktivierung dem mitochondrialen Komplex nachgeschaltet ist. Zusätzlich konnte die Rac1 Translokalisierung und in der Folge auch die progressive ROS-Bildung mit dem intrazellulären Calciumchelator 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA) inhibiert werden. BAPTA inhibiert sowohl den hyperoxisch bedingten Anstieg der endothelialen $[Ca^{2+}]_i$ als auch die Amplitude der $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen und führte zur Hemmung der progressiven ROS-Bildung nach 30 min Hyperoxie, hatte jedoch wie auch DPI und AEBSF keinen Einfluss auf die initiale ROS Bildung in der ersten halben Stunde hyperoxischer Beatmung, was darauf hindeutet, dass die endotheliale $[Ca^{2+}]_i$ die NAD(P)H-abhängige ROS-Bildung reguliert.

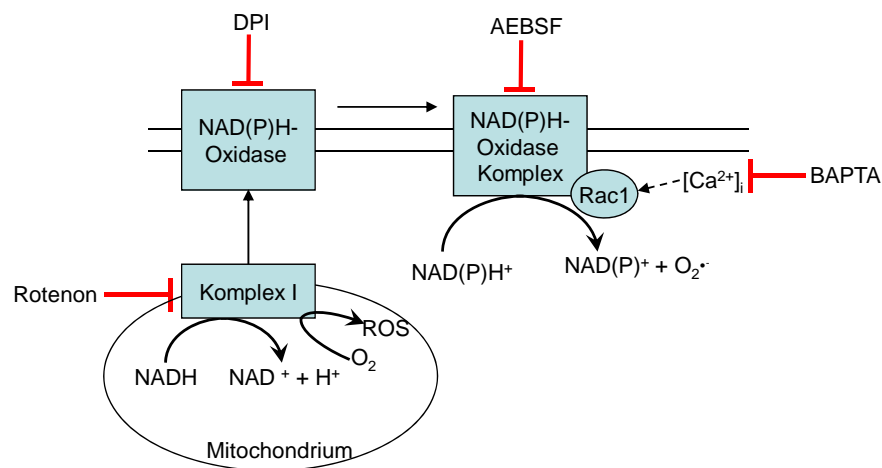


Abbildung 6: Schematische Übersicht über den Signalweg der ROS-Bildung bei hyperoxischer Beatmung. Hemmung des mitochondrialen Komplex I durch Rotenon führt sowohl bei normoxischer als auch bei hyperoxischer Beatmung zu einer Verminderung der ROS-Bildung. Der hyperoxische Anteil der ROS-Bildung konnte durch Inhibition der NAD(P)H-Oxygenase durch Diphenyliodonium (DPI) oder des NAD(P)H-Komplexes durch 4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid (AEBSF) blockiert werden. Der Ca²⁺-Chelator 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraessigsäure (BAPTA) inhibiert die Rac Translokalisierung und führt im Folgenden ebenfalls zur Hemmung der hyperoxischen ROS-Bildung.

4. Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wurde ein neuer Mechanismus in der Pathogenese des akuten hydrostatischen Lungenödems identifiziert. Endothelial gebildetes NO konnte als interkompartimentelles Signalmolekül identifiziert werden, welches die alveolare Flüssigkeitsreabsorption durch Inhibition des epithelialen Na^+ -Kanals blockiert. Bei Ratten mit chronischer Linksherzinsuffizienz fehlt die endotheliale NO-Antwort auf hydrostatischen Stress, somit bleibt die alveolare Flüssigkeitsreabsorption erhalten, und die Lungen werden trotz chronischer Druckerhöhung vor einem exzessiven Lungenödem geschützt (Abb. 7).

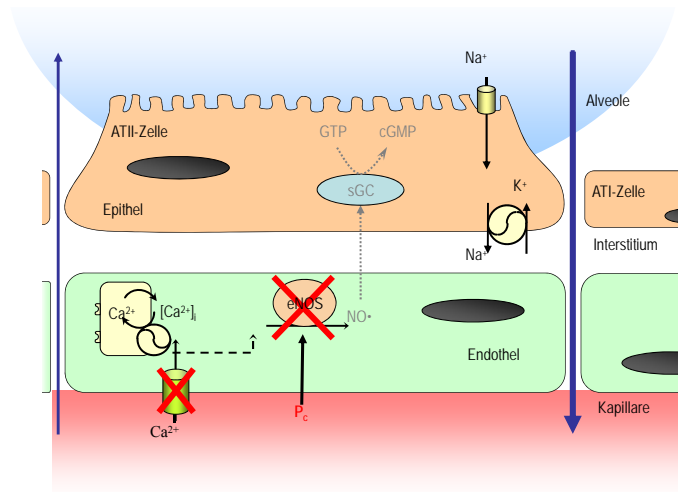


Abbildung 7: Modell der alveolaren Flüssigkeitsreabsorption bei chronischer Herzinsuffizienz. Die druck-induzierte endotheliale NO-Synthese ist in den pulmonalen Kapillaren von Tieren mit CHF aufgrund des gestörten endothelialen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Signalings gehemmt. Infolgedessen bleibt die alveolare Flüssigkeitsreabsorption erhalten, da die endotheliale NO-Antwort blockiert ist und somit der ENaC aktiv bleibt. ATI-Zelle = Alveolarepithelzelle Typ I, ATII-Zelle = Alveolarepithelzelle Typ II, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase, GTP = Guanosintriphosphat, cGMP = zyklische Guanosylphosphatase, L-Arg = L-Arginin, NO-Stickstoffmonoxid, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ = intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, P_c = pulmonal-kapillarer Druck.

Neben diesem „negativen“ epithelialen NO-Effekt konnten wir auch die positive Wirkung der gesteigerten endothelialen NO-Produktion bei akutem hydrostatischem Stress identifizieren. Die vaskuläre Permeabilität wird bei erhöhtem hydrostatischem Druck über einen NO-abhängigen negativen Rückkopplungsmechanismus reguliert, als dessen Folge die Entstehung eines Lungenödems in Abhängigkeit von NO vermindert wird.

4.1. Methodische Limitationen

Bei intakter Lymphdrainage fällt die herabgesetzte Flüssigkeitsreabsorption sicherlich weniger ins Gewicht als in unserem isoliert-perfundierten Lungenmodell.

Gleichzeitig reagieren die Lungen von größeren Säugetieren und Menschen weniger sensitiv auf Druckveränderungen als die Lungen der von uns verwendeten Nagetiere⁸.

Bei der DIVT erfolgt die Berechnung der Flüssigkeitsbewegung einzig über die Veränderung der Farbstoffkonzentrationen im alveolaren Kompartiment. Somit ist diese Methode nicht geeignet, um Informationen über die Entstehung eines interstitiellen Lungenödems oder die Route des Flüssigkeits-/Farbstoffaustausches über die alveolo-kapillare Membran zu gewinnen. Die Berechnung von alveolarem Flüssigkeitsinflux und Flüssigkeitsreabsorption ist unabhängig von diesen Variablen, passive Diffusion über die alveolo-kapillare Membran kann mit der DIVT jedoch nicht berechnet werden. Eine detaillierte Erörterung der DIVT findet sich in der Online-Beilage von Publikation [1]. Die Methode zur Messung des K_f und ihre potentiellen Limitationen sind in Publikation [3] ausführlich diskutiert. Details und Limitationen der angewendeten Tiermodelle und der verwendeten Imaging-Techniken wurden bereits detailliert diskutiert ([1], [3], ¹⁹)

4.2. Rolle der endothelialen NO-Produktion bei der Entstehung von hydrostatischen Lungenödemen

Bislang wurde die Entstehung eines hydrostatischen Lungenödems in erster Linie einer verschobenen Flüssigkeitsbalance im Sinne einer vermehrten Flüssigkeitsfiltration in Richtung des Alveolarraums zugeschrieben⁶. In der vorliegenden Arbeit konnten wir in Ratten- und Mauslungenmodellen hingegen erstmals zeigen, dass bei mäßig erhöhtem pulmonal-kapillarem Druck 70% der Netto-Flüssigkeitsbewegung in den Alveolarraum einer verminderten Flüssigkeitsreabsorption zuzuschreiben sind. Bei erhöhtem pulmonal-kapillarem Druck konnten wir endothelial gebildetes NO als Signalmediator zwischen dem pulmonalen Endothel und dem angrenzenden alveolaren Epithel identifizieren. Entsprechend konnte durch Inhibition der eNOS als auch in eNOS^{-/-}-defizienten Mäusen die Flüssigkeitsreabsorption bei erhöhtem pulmonal-kapillarem Druck wiederhergestellt werden. Hingegen führte die Aktivierung des eNOS-Signalweges durch das cGMP-Analogen 8-Br-cGMP auch bei normalen P_{LA} -Werten gesunder Ratten zu einer Verminderung der alveolaren Flüssigkeitsreabsorption, während die Hemmung des sGC/cGMP-Signalweges diese auch bei erhöhtem hydrostatischem Druck wiederherstellt.

4.3. Klinische Relevanz

Die endotheliale Dysfunktion, welche bei chronischer Herzinsuffizienz die alveolare Reabsorption aufrechterhält, stellt einen Schutzmechanismus zur Prävention des hydrostatischen Lungenödems dar. Die Charakterisierung dieses neuen pathophysiologischen Mechanismus ist von direkter klinischer Bedeutung, da sie die Entwicklung neuer

mechanistischer Therapiekonzepte in der Behandlung des akuten und chronischen Lungenödems ermöglicht.

Dies wird durch zwei vorangegangenen Forschungsergebnissen unterstrichen, zum einen konnte in einer früheren Studie bei 2/3 der Patienten mit massiven hydrostatischen Lungenödem eine ganz oder teilweise verminderte Flüssigkeitsreabsorption festgestellt werden²⁰. Zum zweiten ist bei CHF Patienten die Inhalation von NO kontraindiziert, da sie zur Bildung von Lungenödem führen kann²¹.

4.4. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass bei gemäßigt hydrostatischem Stress der dominierende Faktor für die Entstehung des hydrostatischen Lungenödems eine Hemmung der alveolaren Flüssigkeitsreabsorption und nicht eine erhöhte Flüssigkeitsfiltration ist. Die detektierte negative alveolare Flüssigkeitsreabsorption ist dabei einer aktiven Flüssigkeitssekretion gleichzusetzen.

In nachfolgenden Arbeiten gelang es uns, zu zeigen, dass diese aktive Flüssigkeitssekretion durch Inhibierung der Na^+/K^+ -ATPase, des *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) und des $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ -Cotransporters (NKCC) gehemmt werden kann. Dies könnte bedeuten, dass nach Inhibition des ENaC durch NO die Na^+/K^+ -ATPase einen elektrischen und/oder – durch den Co-Transport mit Na^+ über den NKCC – chemischen Gradienten für den Cl^- -Einstrom in die alveolaren Epithelzellen bildet und nach apikaler Cl^- -Sekretion über den CFTR infolge sekundärer Flüssigkeitsverschiebungen zur alveolaren Flüssigkeitssekretion führt (Abb. 8). Dabei könnte der identifizierte Effekt einer Inhibierung des NKCC auf die alveolare Flüssigkeitssekretion die therapeutische Rolle von NKCC-Inhibitoren wie z.B. Furosemid zur Behandlung des hydrostatischen Lungenödems auf Ebene der alveolaren Flüssigkeitsreabsorption neu definieren.

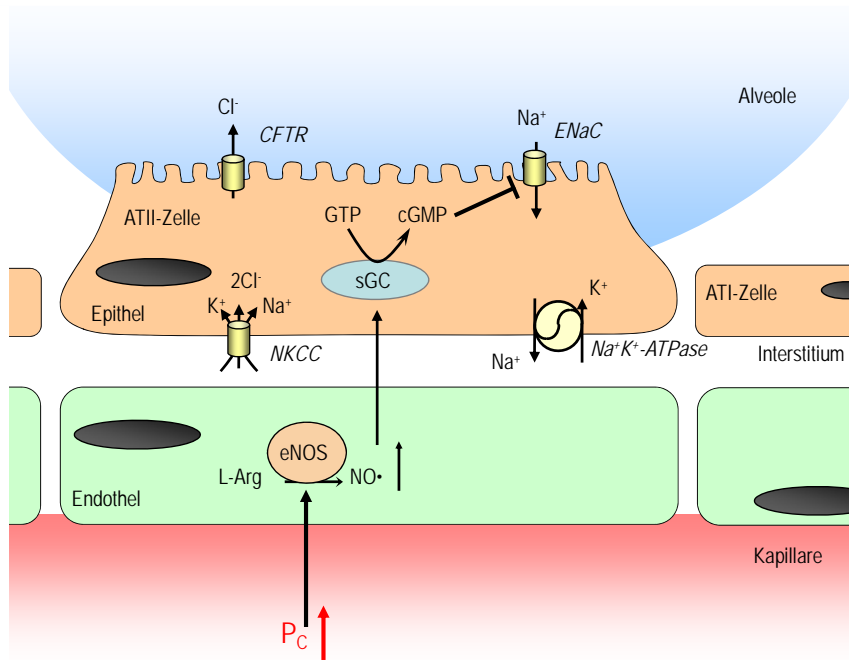


Abbildung 8: Model der alveolären Flüssigkeitssekretion. Nach Inhibition des ENaC durch NO bleibt die Na^+/K^+ -ATPase aktiv. Dadurch kommt es zur Bildung eines Gradienten für den Cl^- -Einstrom in die alveolaren Epithelzellen, wodurch es zur alveolaren Flüssigkeitssekretion kommt. ATI-Zelle = Alveolarepithelzelle Typ I, ATII-Zelle = Alveolarepithelzelle Typ II, L-Arg = L-Arginin, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, GTP = Guanosintri-phosphat, cGMP = zyklische Guanosylphosphatase, NO = Stickstoffmonoxid, NKCC = $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter, ENaC = Epithelialer Natriumkanal, CFTR = Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator, P_c = pulmonal-kapillarer Druck.

5. Zusammenfassung

5.1. Zusammenfassung

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse gewähren wesentliche Einblicke in die Pathophysiologie des hydrostatischen Lungenödems und zeigen mögliche neue Behandlungsansätze zu dessen Therapie auf.

Traditionell wurde die Bildung des hydrostatischen Lungenödems ausschließlich einer gesteigerten kapillaren Flüssigkeitsfiltration zugeschrieben. Jüngste Forschungsergebnisse zeigen jedoch, dass neben der verstärkten Flüssigkeitsfiltration eine zusätzlich gestörte alveolare Flüssigkeitsreabsorption in die Pathogenese des Druck-induzierten hydrostatischen Lungenödems involviert ist.

Die alveolare Flüssigkeitsreabsorption folgt passiv dem aktiven Na^+ -Transport über die alveolaren Epithelzellen. Der Signalweg, über den das kapillare Endothel dem alveolaren Epithel den gestiegenen pulmonal-kapillaren Druck kommuniziert, war bislang unklar. Ein potentieller Kandidat für die interkompartimentelle Signaltransduktion ist das endothelial gebildete Stickstoffmonoxid (NO), da NO vom Endothel in Reaktion auf erhöhten hydrostatischen Druck rasch gebildet wird, als frei-diffusibles Gas die alveolo-kapillare Barriere überwinden kann und *in vitro* den Na^+ -Transport in alveolaren Typ II Epithelzellen hemmt.

In unseren Untersuchungen haben wir eine interkompartimentelle Doppelindikator-Verdünnungstechnik zur Messung der alveolaren Flüssigkeitsreabsorption, des alveolaren Flüssigkeitseinstroms (AFI) und der Netto-Flüssigkeitsbewegung in der isoliert-perfundierten Rattenlunge verwendet und mit optischen Bildgebungsverfahren zur Messung der endothelialen NO-Bildung und der endothelialen Ca^{2+} -Konzentration kombiniert.

Unsere Untersuchungen identifizieren endothelial gebildetes NO als interkompartimentelles Signalmolekül, welches die alveolo-kapillare Barriere überwindet und über einen löslichen Guanylatzyklase/zyklisches Guanosinmonophosphat/Proteinkinase G (sGC/cGMP/PKG)-abhängigen Signalweg die alveolare Flüssigkeitsreabsorption durch Inhibierung des epithelialen Na^+ -Kanals hemmt. Wir konnten des Weiteren zeigen, dass die Hemmung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) oder des nachgeschalteten sGC/cGMP/PKG Signalweges die alveolare Flüssigkeitsreabsorption bei erhöhtem hydrostatischem Druck wieder herstellt. Entsprechend ist in $\text{eNOS}^{-/-}$ -Mäusen das Feucht/Trockengewichtsverhältnis als Indikator des Lungenödems bei hydrostatischem Stress deutlich weniger erhöht als in Lungen der

entsprechenden Kontrolltiere.

Vor Beginn unserer Untersuchungen war zudem bekannt, dass sich bei chronischer Linksherzinsuffizienz aufgrund bis *dato* ungeklärter Ursachen das Risiko für die pulmonale Ödembildung vermindert². Hier identifizierten unsere Untersuchungen eine fehlende endotheliale NO-Antwort auf mechanische oder pharmakologische Stimulation und infolge dessen die Aufrechterhaltung einer intakten alveolaren Flüssigkeitsreabsorption als endogenen Schutzmechanismus gegen die Entwicklung massiver Lungenödeme bei chronischer Linksherzinsuffizienz.

5.2. Abstract

The results of this work provide novel insights into the pathophysiology of hydrostatic pulmonary edema and thus, open new avenues for its treatment by innovative therapeutic strategies.

Traditionally, the formation of hydrostatic lung edema has been exclusively attributed to an increase in capillary fluid filtration. Yet, recent investigations suggested an additional impact of impaired alveolar fluid reabsorption on the pathogenesis of pressure-induced hydrostatic lung edema.

Alveolar fluid reabsorption is driven by an active sodium transport across alveolar epithelial cells. The transmission of the hydrostatic stress signal from the capillary endothelium to the alveolar epithelium was unknown as of yet, but would require an intercompartmental signal mediator. A potential candidate is endothelial-derived nitric oxide (NO), since NO is rapidly formed by endothelial cells in response to hydrostatic stress, it can rapidly diffuse across the alveolo-capillary barrier to adjoining epithelial cells, and is known to inhibit active Na⁺ transport in alveolar type II cells *in vitro*.

Here, we used a newly-developed double indicator dilution technique for the determination of alveolar fluid reabsorption, alveolar fluid influx and net fluid shift and combined this approach with real time fluorescence imaging for measurement of endothelial NO formation and [Ca²⁺]_i signaling.

We identified endothelial-derived NO as an intercompartmental signaling mediator, which transcends across the alveolo-capillary barrier and inhibits alveolar fluid reabsorption by inhibition of the epithelial sodium channel (ENaC) via a soluble guanylat cyclase/cyclic guanosine monophosphate/protein kinase G (sGC/cGMP/PKG) dependent pathway. Furthermore we were able to show that alveolar fluid reabsorption is restored after inhibition of endothelial NO synthase or the subsequent cGMP/PKG pathway. In line with this notion,

we demonstrated that the increase in lung wet/dry weight ratio as a marker for hydrostatic edema formation is attenuated in eNOS^{-/-} mice as compared to wild-type mice. These results substantiate our findings that NO is a key molecule in the formation of hydrostatic lung edema.

Prior to these investigations it was already known that the risk for hydrostatic lung edema is attenuated in patients with chronic left heart failure. In this scenario, our studies revealed a lack of endothelial NO formation in response to mechanical and pharmacological stimulation resulting in preservation of alveolar fluid reabsorption as an endogenous protection mechanism against the development of overt lung edema and alveolar flooding in chronic left heart failure.

6. Literaturverzeichnis

1. Guyton AC and Lindsey AW. Effect of elevated left atrial pressure and decreased plasma protein concentration on the development of pulmonary edema. *Circ Res* 1959; **7**: 649-657
2. Huang W, Kingsbury MP, Turner MA, Donnelly JL, Flores NA and Sheridan DJ. Capillary filtration is reduced in lungs adapted to chronic heart failure: morphological and haemodynamic correlates. *Cardiovasc Res* 2001; **49**: 207-217
3. Kuebler WM and Kuppe H. Capillary pressure-induced lung injury: fact or fiction? *Curr Opin Anaesthesiol* 2002; **15**: 57-64
4. Kuebler WM, Uhlig U, Goldmann T, Schael G, Kerem A, Exner K, Martin C, Vollmer E and Uhlig S. Stretch activates nitric oxide production in pulmonary vascular endothelial cells in situ. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; **168**: 1391-1398
5. Jain L, Chen XJ, Brown LA and Eaton DC. Nitric oxide inhibits lung sodium transport through a cGMP-mediated inhibition of epithelial cation channels. *Am J Physiol* 1998; **274**: L475-484
6. Starling EH. On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J Physiol* 1896; **19**: 312-326
7. Moraes DL, Colucci WS and Givertz MM. Secondary pulmonary hypertension in chronic heart failure: the role of the endothelium in pathophysiology and management. *Circulation* 2000; **102**: 1718-1723
8. Kaestle SM, Reich CA, Yin N, Habazettl H, Weimann J and Kuebler WM. Nitric oxide-dependent inhibition of alveolar fluid clearance in hydrostatic lung edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; **293**: L859-869
9. Crapo JD, Barry BE, Foscue HA and Shelburne J. Structural and biochemical changes in rat lungs occurring during exposures to lethal and adaptive doses of oxygen. *Am Rev Respir Dis* 1980; **122**: 123-143
10. Stuhr LE, Gjerde EA, Thorsen E and Reed RK. Effects of normobaric hyperoxia on water content in different organs in rats. *Acta Physiol Scand* 2002; **176**: 13-16
11. Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* 1998; **201**: 1203-1209
12. Yin N, Kaestle S, Yin J, Hentschel T, Pries AR, Kuppe H and Kuebler WM. Inhaled nitric oxide versus aerosolized iloprost for the treatment of pulmonary hypertension with left heart disease. *Crit Care Med* 2009; **37**: 980-986
13. Peterson BT, Brooks JA and Zack AG. Use of microwave oven for determination of postmortem water volume of lungs. *J Appl Physiol* 1982; **52**: 1661-1663

14. Davies SW, Bailey J, Keegan J, Balcon R, Rudd RM and Lipkin DP. Reduced pulmonary microvascular permeability in severe chronic left heart failure. *Am Heart J* 1992; **124**: 137-142
15. Azzam ZS, Adir Y, Welch L, Chen J, Winaver J, Factor P, Krivoy N, Hoffman A, Sznajder JI and Abassi Z. Alveolar fluid reabsorption is increased in rats with compensated heart failure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; **291**: L1094-1100
16. Kuebler WM, Ying X and Bhattacharya J. Pressure-induced endothelial Ca(2+) oscillations in lung capillaries. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; **282**: L917-923
17. Yin J, Hoffmann J, Kaestle SM, Neye N, Wang L, Baeurle J, Liedtke W, Wu S, Kuppe H, Pries AR and 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
18. Alvarez DF, King JA, Weber D, Addison E, Liedtke W and Townsley MI. Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury. *Circ Res* 2006; **99**: 988-995
19. Kuebler WM, Parthasarathi K, Lindert J and Bhattacharya J. Real-time lung microscopy. *J Appl Physiol* 2007; **102**: 1255-1264
20. Verghese GM, Ware LB, Matthay BA and Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport and the resolution of clinically severe hydrostatic pulmonary edema. *J Appl Physiol* 1999; **87**: 1301-1312
21. Bocchi EA, Bacal F, Auler Junior JO, Carmone MJ, Bellotti G and Pileggi F. Inhaled nitric oxide leading to pulmonary edema in stable severe heart failure. *Am J Cardiol* 1994; **74**: 70-72

7. Anhang

7.1. Anteilserklärung der Arbeit

Stephanie Gembardt geb. Kästle hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

1. Kaestle SM, Reich CA, Yin N, Habazettl H, Weimann J and Kuebler WM. Nitric oxide-dependent inhibition of alveolar fluid clearance in hydrostatic lung edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; **293**: L859-869.
Eigenanteil: 85%
Verantwortlich für die Planung (Entwicklung der Doppelindikatorverdünnungstechnik), Versuchsdurchführung (Messung der alveolaren Flüssigkeitsbewegungen in der isoliert-perfundierten Rattenlunge, Aortenbanding, NO-Fluoreszenzimaging, NO-Assays), Auswertung der Daten und Erstellung des Manuskriptes.
2. Brueckl C, **Kaestle S**, Kerem A, Habazettl H, Krombach F, Kuppe H, Kuebler WM. Hyperoxia induces reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells *in situ*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2006; **34**: 453-463.
Eigenanteil: 40%
Durchführung der Fluoreszenz-Imaging Versuche an der isoliert-perfundierten Rattenlunge mit Hydroethidin; Anteil an der Revision des Manuskriptes.
3. Yin J, Hoffmann J, **Kaestle SM**, Neye N, Wang L, Baeurle J, Liedke 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.
Eigenanteil: 20%
Durchführung der Endothelzellisolierung, Proteinisolierung und der Western Blots.
4. Kerem A*, Yin J*, **Kaestle SM**, Hoffmann J, Schoene AM, Singh B, Kuppe H, Borst MM, Kuebler WM. Mechanism of endothelial dysfunction in pulmonary capillaries in congestive heart failure. *Circ Res.* 2010; **106**: 1103-1116. *both authors contributed equally.
Eigenanteil: 30%
Verantwortlich für die Endothelzellisolierung, Proteinisolierung und Durchführung der Western Blots, maßgebliche Anteile an der Erstellung des Manuskriptes.

7.2. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

7.2.1. Nitric oxide-dependent inhibition of alveolar fluid clearance in hydrostatic lung edema

S.M. Kaestle, C.A. Reich, N. Yin, H. Habazettl, J. Weimann, W.M. Kuebler

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2007; **293**: L859-69.

Publikation [1]

7.2.2 Mechanism of endothelial dysfunction in pulmonary capillaries in congestive heart failure

A. Kerem*, J. Yin*, **S.M. Kaestle**, J. Hoffmann A.M. Schoene, B. Singh, H. Kuppe, M.M.

Borst, W.M. Kuebler

*both authors contributed equally

Circ Res. 2010; **106**: 1103-1116.

Publikation [2]

7.2.3 Negative-feedback loop attenuates hydrostatic lung edema via a cGMP-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 4

J. Yin, J. Hoffmann, **S.M. Kaestle**, N. Neye, L. Wang, J. Baeurle, W. Liedke, S. Wu, H.

Kuppe, A.R. Pries, W.M. Kuebler

Circ Res. 2008; **102**: 966-74.

Publikation [3]

7.2.4 Hyperoxia induces reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells *in situ*

C. Brueckl, **S. Kaestle**, A. Kerem, H. Habazettl, F. Krombach, H. Kuppe, W.M. Kuebler

Am J Respir Cell Mol Biol. 2006; **34**: 453-63.

Publikation [4]

7.3. Lebenslauf

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

7.4. Veröffentlichungen

7.4.1 Artikel

Kaestle SM, Reich CA, Yin N, Habazettl H, Weimann J, Kuebler WM. Nitric oxide-dependent inhibition of alveolar fluid clearance in hydrostatic lung edema. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 293(4):L859-69.

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; 34(4):453-63.

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, 25;102(8):966-74

Yin N*, **Kaestle SM***, Hentschel T, Pries AR, Kuppe H, Kuebler WM. Inhaled NO versus aerosolized iloprost for the treatment of pulmonary hypertension with left heart disease. *Crit Care Med.* 2009; 37(3):980-6, *both authors contributed equally.

Kerem A*, Yin J*, **Kaestle SM**, Hoffmann J, Schoene AM, Singh B, Kuppe H, Borst MM, Kuebler WM. Mechanism of endothelial dysfunction in pulmonary capillaries in congestive heart failure. *Circ Res* 2010; 106: 1103-1116, *both authors contributed equally.

Kaestle SM*, Solymosi E*, Neye N, Reich C, Wang L, Schulz H, Matthay M, Kuebler WM. Epithelial chloride transport mediates alveolar fluid secretion in hydrostatic lung edema. In preparation. *both authors contributed equally.

7.4.2 Buchbeiträge

Kaestle, SM, Kuppe, H and Kuebler, WM. (2004) Compartmentalisation of the inflammatory response, in *Anaesthesia, Pain, Intensive Care and Emergency Medicine* (ed. A. Gullo), Springer-Verlag Italia, Milano, pp. 639-654.

7.4.3 Abstracts

1. Kerem A, Schael G, **Kaestle S**, Habazettl H, Pries AR, Kuebler WM.: Impaired Ca²⁺ signaling to deficient lung endothelial NO production in congestive heart failure. *J Vasc Res* 41: 109, 2004.
2. **Kaestle SM**, Kerem A, Schael G, Habazettl H, Pries AR, and Kuebler WM.: Mechanism of pulmonary endothelial dysfunction in congestive heart failure. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 447 Suppl 1: S69, 2004.
3. Kuebler W.M., Kerem A, **Kaestle S**, Schael G, Habazettl H, Pries A.R., Kuppe H.: Mechanism of pulmonary endothelial dysfunction in congestive heart failure. *FASEB J* 18: A714, 2004.
4. **Kaestle SM**, Schael G, Habazettl H, Pries AR, Kuebler WM. Endothelial-derived nitric oxide is an intercompartmental signaling molecule at the alveolo-capillary membrane. *J Vasc Res* 41: 461, 2004.
5. Kerem A, **Kaestle SM**, Habazettl H, Pries AR, Kuebler WM. Increased endothelial β -actin content impairs pulmonary endothelial Ca²⁺-signaling in congestive heart failure. *J Vasc Res* 41: 457, 2004.
6. **Kaestle SM**, Schael G, Habazettl H, Pries A.R, Kuebler WM. Endothelial-derived nitric oxide inhibits alveolar fluid absorption at increased capillary pressure. *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 449 Suppl 1: S128, 2005.
7. Kuebler WM, Kerem A, **Kaestle SM**, Habazettl H, Kuppe H, Pries AR. Cytoskeletal rearrangement causes pulmonary endothelial dysfunction in congestive heart failure. *FASEB J* 19: A1236, 2005.
8. **Kaestle SM**, Schael G, Habazettl H, Pries AR, Kuebler WM. Endothelial-derived nitric oxide inhibits alveolar fluid absorption at increased capillary pressure. *FASEB J* 19: A174, 2005.
9. Kuebler WM, Schael G, Habazettl H, Pries AR, Kuppe H and **Kaestle SM**. Endothelial-derived nitric oxide inhibits alveolar fluid absorption at increased capillary pressure. *Proc Am Thorac Soc* 2: A247, 2005.
10. **Kaestle SM**, Reich C, Weimann J, Kuebler WM. eNOS deficiency protects mice from hydrostatic lung edema. *Acta Physiologica* 186 Suppl. 1: 69, 2006.
11. Brueckl C, **Kaestle S**, Habazettl H, Kuebler WM. Sequential formation of reactive oxygen species by mitochondria and NAD(P)H oxidase in lung endothelial cells during hyperoxia. *FASEB J* 20: A725-A726, 2006.

12. **Kaestle SM**, Kerem A, Kuebler WM. Impaired Ca^{2+} -signaling protects lungs from development of severe hydrostatic lung edema in congestive heart failure (CHF). *FASEB J* 20: A746-A747, 2006.
13. **Kaestle SM**, Reich CA, Weimann J, Kuebler WM. Endothelial NO production contributes to hydrostatic lung edema. *J Vasc Res* 43 S1: 61, 2006.
14. **Kaestle SM**, Kuebler WM: Endothelial- derived NO inhibits amiloride sensitive Na^{+} -transport in pulmonary epithelial cells. *J Vasc Res* 43(6): 555, 2006.
15. **Kaestle SM**, Reich CA, Weimann J, Kuebler WM. Endothelial-derived nitric oxide inhibits alveolar fluid reabsorption. *The Physiologist*; 49(6): C2-15, 2006.
16. Yin J, **Kaestle SM**, Kuppe H, Kuebler WM. NO-regulated feedback loop protects lung microvascular barrier in hydrostatic stress. *The Physiologist*; 49(6): C2-15, 2006
17. Hoffmann J, Kerem A, **Kaestle SM**, Kuebler WM. Actin rearrangement causes lung endothelial dysfunction in congestive heart failure. *The Physiologist*; 49(6): C2-15, 2006.
18. Hoffmann J, **Kaestle SM** and Kuebler WM. Effect of pulmonary venous hypertension on gene expression in the lung. Berlin 2007. 2nd International Conference on “Exploring the Future of Vascular and Inflammatory Mediators”:17, P34 (2007)
19. Scheffler C, **Kaestle SM**, Reppien E, Lindner K, Uhlig S, Kuebler WM. Acid sphingomyelinase regulates endothelial albumin transcytosis in intact rat lungs *Pflügers Arch - Eur J Physiol* 449 Suppl 1: S128, 2007.
20. **Kaestle SM**, Kuebler WM. Amiloride-sensitive Na^{+} -channels are blocked by endothelial derived NO in hydrostatic stress. *FASEB J* 21(6): A608.1 , 2007
21. Hoffmann J, Yin J, **Kaestle SM**, Kuebler WM. Lung endothelial TRPV channels are downregulated in heart failure *FASEB J* 21(6): A745.7, 2007
22. **Kaestle SM**, Kuebler WM. Endothelial-derived NO impairs alveolar fluid clearance *in situ* by inhibition of amiloride sensitive Na^{+} -channels. *Proc Am Thorac Soc* 4:, 2007
23. **Kaestle S**, Wang L, Schulz H, Kuebler W. Epithelial chloride transport mediates alveolar fluid secretion in hydrostatic lung edema, *Acta Physiologica* 192 Suppl. 663:88, 2008.
24. Yin J, Hoffmann J, **Kaestle SM**, Kuppe H, Kuebler WM. cGMP regulates mechanosensitive TRPV4 channels in lung endothelial cells *FASEB J* 22 1213.8, (2008)
25. Yin N, **Kaestle SM**, Kuppe H, Hetzer R, Kuebler WM.: Kitajew reflex protects lungs from hydrostatic edema in heart failure. *Acta Physiologica* 192 Suppl. 663:143, 2008.

26. **Kaestle SM**, Wang L, Kuebler WM. Alveolar fluid secretion in hydrostatic lung edema is mediated via epithelial chloride transport. *Am J Resp Crit Care Med*, Vol 177: A801, 2008

IV. Erklärung an Eides Statt

„Ich, Stephanie Gembardt (geb. Kästle), erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Alveolare Flüssigkeitsreabsorption bei akuter und chronischer Hypertonie mit 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.“

V. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Personen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass die Dissertation in der vorliegenden Form möglich wurde. Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kübler danke ich für die Bereitstellung des Themas, die stetige Diskussionsbereitschaft mit vielen wichtigen Anregungen sowie für die Motivation und Unterstützung in allen Phasen des Projekts.

Herrn Prof. Dr. Axel Pries danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Physiologie. Herrn Prof. Dr. Helmut Habazettl danke ich für die stets prompte Hilfe bei allen Fragen zu technischen Problemen des Versuchsaufbaus.

Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kübler und des Instituts für Physiologie, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit für eine stets angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten.

Insbesondere danke ich Frau Ursel Hilse für die experimentelle Unterstützung, sowie Julia Hoffmann, Esther Solymosi, Nadine Klein, Michael Mertens, Nils Neye, Arata Tabuchi, Liming Wang, Ning Yin, Jun Yin, Renate Noske-Reimers, Isabelle Bünsch, Katarzyna Fiedorowicz und Beata Styp-Rekowska.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Dem Graduiertenkolleg 865 danke ich für die wissenschaftliche Betreuung und Förderung.

Katharina, Nikolai und Florian Gembardt danke ich für viel Geduld während der Fertigstellung der Arbeit.

Geschwistern und Freunden für ihre motivierende Unterstützung, besonders in schwierigen Phasen.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern meinen größten Dank aussprechen für ihre stete und großzügige Unterstützung, ohne die mein Studium so nicht möglich gewesen wäre. Ihnen widme ich diese Arbeit.