
Der Effekt von Furosemid auf die Proliferation von Alveolarepithelzellen

Benjamin Walter Ackermann



2014

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. C. Klein

Der Effekt von Furosemid auf die Proliferation von Alveolarepithelzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Benjamin Walter Ackermann
aus Kempten
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:

PD Dr. Andreas W. Flemmer

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Andreas Holzinger

PD Dr. Annette Pohl-Koppe

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 17.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	xiii
1. Einleitung	1
1.1. NKCC1	2
1.1.1. Schleifendiuretika	2
1.1.2. Pharmakologie und Pharmakokinetik	3
1.1.3. NKCC1 versus NKCC2	7
1.1.4. Struktur und Regulation	8
1.1.5. Funktion	10
1.2. Proliferation	13
1.2.1. Zellvolumen	14
1.2.2. NKCC1 und Proliferation	15
1.3. BPD	16
1.3.1. Definition	16
1.3.2. physiologische Lungenentwicklung	18
1.3.3. Pathogenese	19
1.3.4. Therapie	21
2. Fragestellung	25
3. Material und Methoden	27
3.1. Zellkultur	27
3.1.1. Zelllinien	27
3.1.2. Zellkultur	28
3.1.3. Kulturbedingungen	28
3.2. SDS-Page	32
3.2.1. Zellyse	32
3.2.2. SDS-Page und Western-Blot	33
3.2.3. Immunchemie	33

3.2.4.	Detektion	34
3.3.	Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie	34
3.3.1.	Kultur der Zellen	34
3.3.2.	Behandlung und Färbung der nativen Präparate	35
3.3.3.	Fluoreszenzaufnahmen	36
3.3.4.	Konfokalaufnahmen	36
3.4.	Fluoreszenz Aktivierte Zellsortierung – Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	36
3.4.1.	DNA Färbung	36
3.4.2.	FACS- Messungen	37
3.4.3.	Auswertung	37
3.4.4.	Nicoletti–Apoptose	37
3.5.	Proliferationsuntersuchung	38
3.5.1.	Zählkammer	38
3.5.2.	CellScreen	39
3.6.	Statistische Analyse	40
3.6.1.	Verwendete Software	40
3.6.2.	Verwendete Tests	40
4.	Ergebnisse	41
4.1.	Proteinnachweis	41
4.1.1.	phosphorylierter NKCC1 (R5)	41
4.1.2.	nativer NKCC1 (T4)	41
4.2.	Immunhistologie	42
4.2.1.	Fluoreszenzmikroskopie	42
4.2.2.	Konfokalmikroskopie	46
4.3.	Fluoreszenz Aktivierte Zellsortierung – Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	48
4.3.1.	DNA Färbung	48
4.3.2.	Apoptosebestimmung (Nicoletti-Assay)	51
4.4.	Proliferationsuntersuchung	51
4.4.1.	Zellzählung	51
4.4.2.	CellScreen	54
5.	Diskussion	59
5.1.	Wertung der erhobenen Daten	59

5.1.1. Proteinexpression	59
5.1.2. Immunhistologie	61
5.1.3. FACS	62
5.1.4. Proliferation	63
5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse	65
5.3. Physiologische Bedeutung des NKCC1	65
5.4. Kritik an den Ergebnissen und Ausblick	66
5.5. Klinische Implikationen	68
A. Anhang	71
Literaturverzeichnis	77
Danksagung	89

Abbildungsverzeichnis

1.1. Furosemid	2
1.2. Furosemid Plasma-Clearance	5
1.3. Furosemid Plasma Halbwertszeit	6
1.4. Kyte-Doolittle Analyse	9
1.5. NKCC1-2D-Struktur	10
1.6. Ionenfluss in Alveolen	12
1.7. Ionenfluss in Alveolen unter Furosemid	12
1.8. Zellzyklus	14
1.9. Mechanismen der Zellvolumenregulation	15
3.1. Änderung des G ₂ /G ₁ Verhältnisses durch Furosemid in DMSO	30
3.2. Änderung des G ₂ /G ₁ Verhältnisses durch DMSO	31
3.3. Zellzyklusanalyse mittels FACS	38
3.4. Neubauer-Zählkammer	39
4.1. Immunoblot mit R5-AK	41
4.2. Immunoblot mit T4-AK	42
4.3. AK Intensität	43
4.4. P-NKCC (phosphorylierter NKCC1) Intensität unter steigenden Furose- midkonzentrationen	44
4.5. Immunhistologie mit T84-AK	45
4.6. Immunhistologie mit R5-AK	45
4.7. Immunhistologie mit TEF-S1 Antikörper	47
4.8. R5 Konfokal	47
4.9. T4 Konfokal	48
4.10. G2-FACS	49
4.11. FACS-Daten	50
4.12. Nicoletti	52
4.13. Zellproliferationsrate A549 vs. RLE-6TN	53

4.14. Zellproliferationsrate 0-1200 μ Mol Furosemid	55
4.15. Proliferationsrate über 5 Tage	56
4.16. Zellproliferationsrate 0 vs 20 μ Mol Furosemid	57
A.1. Proliferation RLE6TN-Zellen	71
A.2. Proliferation RLE6TN-Zellen	74
A.3. R5 Negativkontrollen	75
A.4. T4 Negativkontrollen	75

Tabellenverzeichnis

1.1. Definition der Bronchopulmonalen Dysplasie	18
1.2. Verwendung von Furosemid bei BPD	23
3.1. Primäre Antikörper Fluoreszenz-Mikroskopie	35
3.2. Sekundäre Antikörper Fluoreszenz-Mikroskopie	35
4.1. Varianzanalyse, Bonferroni korrigiert	58
A.1. Gele für Gelelektrophorese (SDS-PAGE).	72
A.2. Puffer für Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot.	73

Zusammenfassung

Die Lunge des Frühgeborenen ist vielen schädigenden Einflüssen unterworfen. Für das Überleben notwendige Maßnahmen wie mechanische Ventilation und Sauerstoffgabe, aber auch rezidivierende Infektionen sorgen neben der Unreife für das Entstehen einer chronischen Lungenerkrankung, der sogenannten Bronchopulmonalen Dysplasie (BPD). Diese Krankheit ist durch den Bedarf von supplementärem Sauerstoff, einer geringeren Gasaustauschfläche durch dysmorphe Alveolen und eine erhöhte pulmonale Infektanfälligkeit gekennzeichnet.

Die Therapie der BPD umfasst unter anderem die systemische und lokale Therapie mit Diuretika und insbesondere mit Furosemid. Furosemid reduziert die Proliferationsrate von parenchymatösen Zellen, eine Hochregulation des durch Furosemid hemmbaren Cotransporters NKCC1 führt zu einer verstärkten Proliferation und verstärkter DNA-Synthese.

In dieser Arbeit wurde die Proliferationsrate in Lungenepithelzellen Typ II unter Furosemid in 12 verschiedenen Dosierungen untersucht.

Zunächst konnte in Lungenepithelien die Expression (SDS-Page) und intrazelluläre Lokalisation (Konfokalmikroskopie) des durch Furosemid hemmbaren NKCC1- Cotransporters nachgewiesen werden. Wie für ein sekretorisches Epithel erwartet, wurde das Protein basolateral exprimiert und in Abhängigkeit von der Furosemiddosis phosphoryliert bzw. aktiviert.

Zellzyklusanalyse mittels Fluorescens Activated Cell Sorting (FACS) zeigte relevante Veränderungen im Verhältnis von Zellen in der G₁ zu G₂ Phase. Dies lässt einen Block im Übergang zur DNA-Synthese im Zellzyklus vermuten. Vermutlich wird dies über den Effekt von Furosemid auf das Zellvolumen vermittelt.

Schlussendlich konnte eine dosisabhängige Reduktion der Proliferationsrate in adhärenen Lungenepithelzellen nachgewiesen werden.

Eine Reduktion der Proliferationsrate und eine vermehrte Aktivierung des NKCC1 zeigte sich bereits bei systemisch angestrebten Plasmaspiegeln von Furosemid. Insbesondere die Veränderungen im Zellzyklus ließen sich schon für sehr geringe Konzentra-

tion nachweisen. Wurde die Dosis auf die lokal auftretenden Dosen nach Inhalation mit Furosemid erhöht, kam die Proliferation nahezu vollständig zum Erliegen.

Insgesamt lässt die vorgelegte Studie den Schluss zu, dass die Verwendung von Furosemid bei Kindern mit BPD (insbesondere zur Behandlung des Sauerstoffbedarfs bei BPD) zurückhaltend gehandhabt werden sollte um zusätzliche iatrogene Veränderungen auf Alveolarebene zu vermeiden.

1. Einleitung

„AGE + BUN = LASIX DOSE“¹

Die Beatmung des Früh- und Neugeborenen ist einer der aktivsten Forschungsbereiche der Neonatologie. Die Folge sind enorme Verbesserungen der Überlebensrate und der pulmonalen Morbidität dieser Patienten.²⁴ Neben der Mortalität in den ersten Lebensstagen und -wochen gewinnt die Diskussion über Langzeitmortalität und Morbidität zunehmend an Bedeutung.

Die klassische Folge von mechanischer Beatmung und Sauerstoffgabe einer unreifen Lunge ist die Bronchopulmonale Dysplasie (BPD). Das histologische und klinische Bild hat sich in den 40 Jahren seit der Erstbeschreibung⁶⁷ deutlich gewandelt, die heute typische Form ist die sogenannte neue BPD.⁴⁸ Klinisch ist diese Erkrankung durch Bedarf an supplementärem Sauerstoff am 28. Lebenstag oder im korrigierten Alter von 36 Schwangerschaftswochen (SSW) gekennzeichnet. Verdickte und rarifizierte Alveolarsepten bestimmen das histologische Bild, Fibrose und Inflammation sind nicht so ausgeprägt wie in der Zeit vor der Einführung der Surfactant-Therapie.⁴²

Die medikamentöse Therapie einer bestehenden BPD besteht in der Regel aus regulierter Sauerstoffgabe, der Inhalation von β -Sympathomimetika und der Gabe von systemisch wirksamen Diuretika. In besonderen Situationen werden Cortisonpräparate inhalativ oder systematisch angewandt. Als klassisches Medikament dient das Schleifen-diuretikum Furosemid, ein spezifischer Blocker des NKCC-Cotransporters.

Neben seiner bekannten diuretischen Wirkung hemmt Furosemid die Zellproliferation. Dies konnte in verschiedenen Zellreihen und Tierexperimenten demonstriert werden. Auch einige Subtypen des Magenkarzinoms scheinen auf die Gabe von Furosemid mit einer reduzierten Proliferationsrate zu reagieren.^{45,71,87}

Eine Proliferationshemmung im Alveolar- und Bronchialgewebe kann die histologisch beobachtbaren Veränderungen der neuen BPD verschlimmern. Die Lunge des Frühgeborenen ist vielen schädigenden Einflüssen ausgesetzt, mit negativen Folgen auf den Verzweigungsgrad der konduktiven Lungenanteile und die Septierung der Alveolen.

¹7th Law of the House of God, The House of God, Samuel Shem, 1978

1.1. NKCC1

1.1.1. Schleifendiuretika

Der Wirkstoff Furosemid² wurde 1959 gezielt als Weiterentwicklung der Thiazide konstruiert. Unerwartet war der bis dahin unbekannte Wirkmechanismus im aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife. Die Blockade der Rückresorption von Natrium sowie anderer Elektrolyte und die damit verbundene diuretische Wirkung machen Furosemid zu einem potenten Medikament. Seit 1962 wird das Medikament in der Humanmedizin eingesetzt.⁸¹ Wirkmechanismus und die intrazellulären Effekte wurden erst in den folgenden Jahrzehnten erforscht. 1980 bewiesen Geck und seine Mitarbeiter in Ehrlich Aszites Tumorzellen erstmals den durch Furosemid hemmbaren, elektroneutralen Cotransport von Natrium-, Kalium- und Chloridionen in der Stöchiometrie $1\text{Na}^+ : 1\text{K}^+ : 2\text{Cl}^-$.³²

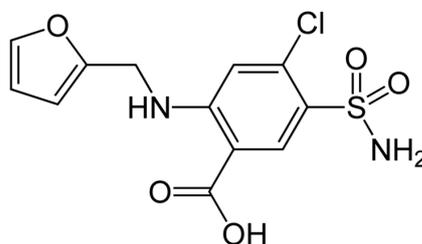


Abbildung 1.1.: Furosemid

Klassische Indikationen sind Herzinsuffizienz, arterieller Hypertonus und Ödeme, insbesondere das Lungenödem. In der Pädiatrie wird es neben der Therapie kardiologischer Probleme klassischerweise in der Behandlung der BPD eingesetzt.

Furosemid ist als organische Säure in neutralem oder saurem Milieu nur schlecht bis nicht löslich. Bei einem pH = 4,5 wird die Löslichkeit mit 151 ± 7 mg/l angegeben.⁹⁷ Das in dieser Studie in der Mehrzahl der Experimente verwendete i.v.-Produkt Furorese[®] (Hexal AG) hat bei einem basischen pH von 8,4 eine Wirkstoffkonzentration von 10mg/ml. Dies entspricht einer mindestens 66fach höheren Löslichkeit bei einem Unterschied von vier pH Einheiten. Auf das Problem der Löslichkeit wird unter Punkt 3.1.3 näher eingegangen. Das Medikament kann oral und parenteral verabreicht werden, nach i.v. Applikation kommt es zu raschem Wirkeintritt. Die orale Bioverfügbarkeit beträgt beim Erwachsenen ca. 0,6. Daher werden oral häufig höhere Dosen verabreicht.

²4-Chloro-N-(2-furylmethyl)-5-sulfa-moyl-o-anthranilsäure

Furosemid ist eines der am häufigsten verwendeten Arzneimittel weltweit. Auf Neugeborenenintensivstationen ist es unter den „Top Ten“ der eingesetzten Medikamente und mit Abstand das bedeutendste Diuretikum.¹⁶

Das Nebenwirkungsspektrum umfasst: Innenohrschwerhörigkeit, Verwirrtheit, Schläfrigkeit, Leberzirrhose, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörung, Apathie, Polyurie, Polydipsie, Reizbildung und Reizleitungsstörung, paralytischer Ileus, Koma, Tetanie, fieberhafte Zustände, Eosinophilie, Parästhesien, Paresen, intrahepatische Cholestase, Erhöhung der Transaminasen. Bei Frühgeborenen sind zudem eine Kalzifikation der Nieren und/oder Nephrolithiasis möglich, liegt bei Frühgeborenen ein Atemnotsyndrom vor, besteht zudem ein erhöhtes Risiko eines persistierenden Ductus Botalli.² Diese Nebenwirkungen lassen sich meist mit den durch Furosemid verursachten Elektrolytverschiebungen erklären. Die Nierenerkrankungen des Frühgeborenen unter Furosemid beruhen vermutlich zu einem Großteil auf der verstärkten Calciurese.

Die Beeinflussung der NKCC-Cotransporter durch Furosemid wird im Abschnitt über die Struktur des NKCC diskutiert.

1.1.2. Pharmakologie und Pharmakokinetik

Der Markenname Lasix[®] (Hoechst) wird im klinischen Alltag häufig als nahezu gleichbedeutend mit dem Wirkstoff Furosemid verwendet. Der Begriff „Lasix“ ist ein Akronym, in dem die durchschnittliche Wirkdauer angedeutet wird: „LASTS SIX (hours)“.

Pharmakologische Eckdaten des Furosemid bei gesunden Erwachsenen sind eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) von 0,75-1,53h, ein Verteilungsvolumen von 0,1-0,3 l/kg und die bereits erwähnte orale Bioverfügbarkeit von 0,6.^{30,78} Charakteristisch nach i.v. Applikation ist der rasche Anstieg der Konzentration im Plasma (Peakspiegel nach ca. 30min) und der rasche Wirkeintritt (typischerweise in weniger als 1h). Nach ca. 6h ist beim Erwachsenen die Diurese auf das Ausgangslevel gefallen, im Anschluss kommt es bei einmaliger Gabe zu einem Reboundeffekt mit verringerter Diurese (dieser dauert bis über 24h).³⁰

Typische i.v. Dosierungen bei Erwachsenen sind 20-40-80mg/ED (entsprechend 0,3-0,6-1,1mg/kg KG), diese Dosierung wird bei kritisch kranken Patienten jedoch häufig überschritten. Durch die kurze Wirkdauer wird Furosemid klassischerweise drei- bis viermal täglich appliziert. Die große Spannbreite der Halbwertszeiten und das Ausmaß des Effekts in Abhängigkeit der zugrunde liegenden Krankheit und der Nierenfunktion machen eine Dosisanpassung häufig nötig.⁷⁸

Die mittlere Peak-Plasmakonzentration beim Erwachsenen unter gängigen Dosierungen (20-80mg ED) beträgt 4-10 $\mu\text{mol/l}$.^{30,76,77} Diese Daten wurden in gesunden männlichen

Probanden erhoben. Verringerte Nierenfunktion, mehrfach Applikation von Furosemid und andere Begleiterkrankungen modifizieren die Pharmakokinetik, in der Regel sind die Plasmaspiegel höher als bei gesunden Probanden.

Diurese

Furosemid hemmt in seiner anionischen Form reversibel das $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ -Cotransportersystem im aufsteigenden Schenkel der Henle-Schleife. Damit werden die interstitielle Hypertonizität im Mark und die Fähigkeit der Niere zur Harnkonzentrierung reduziert. Die relative hohe Wirkstoffkonzentration im Tubuluslumen, die für diesen inhibitorischen Effekt notwendig ist (beim Erwachsenen 10-20fach höher als die Plasmakonzentration), wird einerseits durch tubuläre Sekretion erreicht, andererseits werden diese Diuretika im Tubuluslumen durch die Flüssigkeitsresorption konzentriert.³⁰

„Durch Hemmung des $\text{Na}^+ \text{K}^+ 2\text{Cl}^-$ -Cotransportersystems der Macula densa unterbrechen Schleifendiuretika den tubuloglomerulären Feedback. Der aufgrund der höheren Na^+ Konzentration an der Macula densa zu erwartende Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR) tritt nicht ein, im Gegensatz zu anderen Diuretika ist also die physiologische Bremse gegen Volumenverluste aufgehoben.“³⁰

Furosemid in der Pädiatrie

Furosemid zählt, wie bereits unter 1.1.1 erwähnt, zu den zehn in der neonatalen Intensivmedizin am häufigsten eingesetzten Medikamenten.¹⁶ Die empfohlene Dosierung ist vergleichbar des Therapieschemas in der Erwachsenenmedizin mit 0,5-1(-2)mg/kg KG pro Einzeldosis.¹⁰⁶ Klassische Therapieindikationen umfassen neben Lungenödem und Herzinsuffizienz: Bronchopulmonale Dysplasie, kongenitale Vitien, nephrotisches Syndrom und zystische Fibrose.⁷⁸

Die Datenlage zur Pharmakokinetik im Frühgeborenen ist dünn. Die Abbildungen 1.2 und 1.3 zeigen Halbwertszeit und Plasma-Clearance in zwei kleinen Studien. Es werden mindestens drei Effekte, die sich nicht klar voneinander abgrenzen lassen, als Ursache der starken Änderung der Wirkstoffelimination diskutiert.

1. Wirkstoffelimination in Abhängigkeit vom Gestationsalter. Mit zunehmender Reife nähert sich die renale Funktion der Niere eines reifen Neugeborenen.⁷⁴

2. Wirkstoffelimination in Abhängigkeit vom postnatalen Alter. Je älter das Frühgeborene ist, umso ähnlicher sind die Werte den pharmakologischen Daten eines Reifgeborenen. Die Mechanismen die diese beschleunigte renale Reifung postnatal auslösen, sind weitgehend unbekannt.
3. Zunächst (nahezu) rein renale Elimination des Wirkstoffs. Beim Erwachsenen wird ein Teil des Furosemid in 2-amino-4-chloro-5-sul- famoylanthranilic acid abgebaut/ glucuronyliert.³ Es wird diskutiert, dass dieser Prozess einen Teil der im Vergleich zur parenteralen Gabe geringeren oralen Bioverfügbarkeit verursacht. Diese Überlegung ist stimmig mit der im Frühgeborenen höheren Bioverfügbarkeit mit 0,6-1,0.^{65,76,77} Eine verstärkte Verstoffwechslung verkürzt die Plasmahalbwertszeit.³ Bei Neu- und Frühgeborenen sind im Vergleich zu Erwachsenen die Glucuronylierungsraten deutlich verringert.⁸

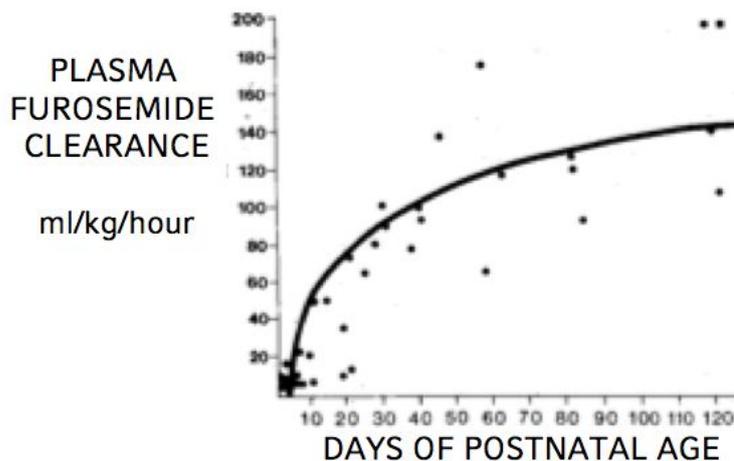


Abbildung 1.2.: Furosemid Plasma-Clearance in Abhängigkeit vom postnatalen Alter⁷⁴

Furosemid wirkt von extrazellulär auf den NKCC-Cotransporter. Es wird vermutet, dass die beim Erwachsenen ausgeprägte Sezernierung von Furosemid im frühdistalen Tubulus beim Frühgeborenen nicht oder nur deutlich geringer ausgeprägt ist.⁶⁵ Dies würde zu einer geringeren Konzentration von Furosemid im Harn im Vergleich zur Plasmakon-

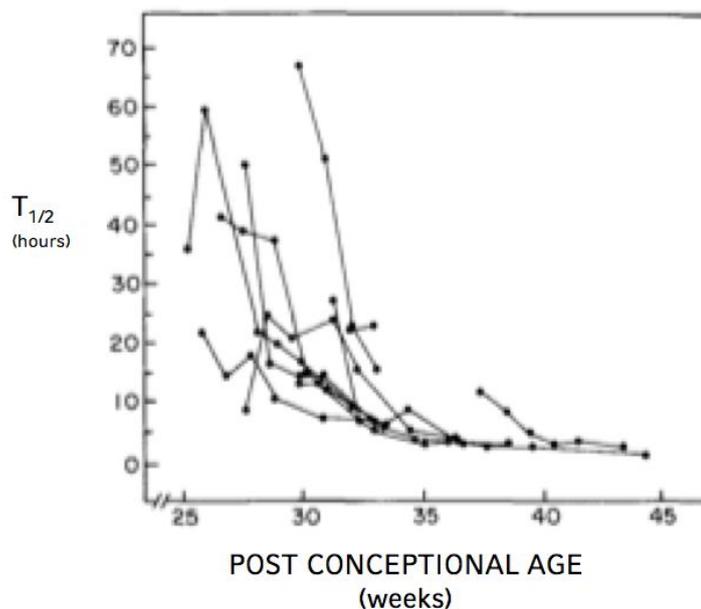


Abbildung 1.3.: Plasma-Halbwertszeit von Furosemid in Abhängigkeit vom korrigierten Gestationsalter⁶⁵

zentration führen. Damit verlängert sich die Plasmahalbwertszeit und das Risiko höherer Konzentrationen von Furosemid im Plasma steigt.

Der Grenzwert für die bekannte ototoxische Nebenwirkung des Furosemid wird mit 25mg/l bzw. $75\mu\text{mol/l}$ ⁷⁴ angegeben. Der Graphik 1.3 kann eine deutlich längere mittlere Halbwertszeit bei unreifen Frühgeborenen entnommen werden. Die maximale, in dieser kleinen Population gemessene, Plasmahalbwertszeit betrug 67.3h. Das empfohlene Dosierintervall für Reifgeborene beträgt 12h, für Frühgeborene 24h.¹⁰⁶ In der kleinen Studie von Mirochnik et al.⁶⁵ überschreitet die Dauer der Halbwertszeit das Dosierintervall in einem Gestationsalter von ≤ 32 SSW (Schwangerschaftswochen) in 4/6 Patienten zumindest einige Wochen postpartal. Dies führt zur Akkumulation des Wirkstoffs.

Entsprechend überschritt in 4/7 Fällen die maximale Furosemidkonzentration die ototoxische Schwelle. Frühgeborene zeigen eine erhöhte Inzidenz von Schwerhörigkeit und Taubheit. Furosemid konnte jedoch bislang nicht als alleiniger auslösender Faktor einer Innenohrschwerhörigkeit nachgewiesen werden.^{10,80}

Furosemid per inhalationem

Die inhalative Applikation von Furosemid wird vor allem zur Therapie des Asthma bronchiale,^{13,54,79} der transitorischen Tachypnoe des Neugeborenen („wet-lung-syndrom“)⁵⁵

und zur Behandlung schwerer Verlaufsformen der BPD (siehe 1.3.1) angewandt.^{11,12} Bei pädiatrischen Asthma-Patienten konnte eine Bronchodilatation bzw. eine attenuierte Bronchokonstriktion nachgewiesen werden. Inhalationen mit Furosemid führten bei BPD-Patienten zu verbesserter Lungencompliance und verringertem Sauerstoffbedarf. Neben diesen Kurzzeiteffekten ließ sich jedoch wie bei systemischer Gabe kein positiver Langzeiteffekt nachweisen. Auch zeigte sich keine ausgeprägte Korrelation zum diuretischen/natriuretischen Effekt, dies spricht für eine spezifische lokale Wirkung.

Nach Inhalation von 1-6mg/kg Furosemid zeigen sich in Versuchen an adulten Tieren vergleichbare pharmakokinetische Werte für Halbwertszeit und renale Clearance,⁸⁸ wie für die systematische Therapie. Die Peak-Plasma-Level werden sowohl nach intravenöser (i.v.)- wie auch nach intratrachealer (i.t.) -Gabe innerhalb von 10-20 Minuten erreicht. Wie auch nach oraler Gabe zeigt sich die Resorptionsrate für Furosemid i.t. auf 0,5-0,6 reduziert. Der nicht systemisch nachweisbare Anteil der applizierten Furosemiddosis verbleibt vermutlich zu einem relevanten Anteil in der bronchoalveolären Flüssigkeit. Dieser Anteil könnte bei Patienten mit chronischer Lungenkrankheit/BPD deutlich größer ausfallen: die Albuminkonzentration in den Alveolen ist bei Patienten mit BPD deutlich erhöht (Furosemid ist im Plasma zu $\geq 98\%$ an Albumin gebunden), die Alveolaroberfläche ist kleiner als bei Patienten ohne BPD.⁸⁸

Versuche an Ferkeln und Säuglingen zeigten maximale Furosemidkonzentrationen von bis zu $1200\mu\text{mol/L}$ im Trachealspirat.^{6,27} In diesen Publikationen wurden die alveoläre Furosemidkonzentration und die lokale Abbaugeschwindigkeit nicht untersucht. Daher wurde in der vorgelegten Arbeit ein Spektrum von 12 Furosemidkonzentrationen verwendet, um den Bereich von systemisch angestrebten bis hin zu topisch erreichbaren Wirkstoffkonzentrationen abzudecken.

1.1.3. NKCC1 versus NKCC2

Der NKCC- Cotransporter ist ein hochkonserviertes Transmembran-Protein, das sich sowohl in Säugetieren wie auch in primitiveren Lebensformen (z.B. Blaukrabbe, *Callinectes sapidus*, die Erstbeschreibung des NKCC1 erfolgte in Dornhaien) nachweisen lässt.³⁸

Im Laufe der Erforschung des durch Schleifendiuretika hemmbaren Ionen-transportes wurden zwei relevante Isoformen entdeckt. Mittels cDNA-Klonierung konnten die beiden Isoformen des NKCC zwischen 1985-1992 definiert werden. Das codierende Gen des ubiquitär vorkommenden NKCC1 befindet sich auf dem Chromosom 5q.23.3 (SLC12A2). Das Gen des NKCC2- Cotransporters wurde auf dem Gen des Chromosoms 15q15-q21

lokalisiert.

Funktionell zeigen sich bei beiden Proteinen im Hinblick auf Ionentransportkapazität und Hemmbarkeit durch Schleifendiuretika große Gemeinsamkeiten. Unterschiede gibt es jedoch in der intrazellulären Verteilung und dem Vorkommen im Organismus. Die Expression der NKCC2 Isoform (CCC2, BSC1) ist auf die apikale Membran der Zellen des aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife und in der Makula Densa beschränkt. NKCC2 dient der Resorption von Na^+ , K^+ und Cl^- vom Harn in die Zellen im aufsteigenden dicken Ast der Henleschen Schleife.

Die NKCC2-Isoform ist für die diuretische Wirkung des Furosemids entscheidend. Zudem führt eine non-funktionale Mutation auf dem für NKCC2 codierenden Gen zum Bartter Syndrom (hyperreninämischer Hypoaldosteronismus mit konsekutivem Aldosteronmangel).⁷

NKCC1 konnte in nahezu allen Geweben des Körpers nachgewiesen werden,³⁹ besonders sekretorische Epithelien weisen einen hohen Gehalt an NKCC1 auf. Man spricht daher von der „sekretorischen“ Form. Eine alternative Bezeichnung ist die der „housekeeping“-Form. Dieser Begriff weist auf die Regulation der intrazellulären Chloridkonzentration $[\text{Cl}]_i$ hin (daher wird diese Bezeichnung meist für die Beschreibung von Vorgängen in nicht sekretierenden Geweben verwendet).³⁹

Auf die Funktion und Bedeutung des renalen NKCC2 wird hier nicht weiter eingegangen. Die aktuellen Theorien der Aufgaben des NKCC1 in sekretorischen Epithelien, am Beispiel des Flüssigkeitshaushalts in Alveolen und die Steuerung der $[\text{Cl}]_i$ werden dafür unter 1.1.5 dargelegt.

1.1.4. Struktur und Regulation

Die NKCC-Cotransporter sind Teil der Kationen/Chlorid-Cotransporter-(CCC)- Superfamilie. Die Schleifendiuretika Bumetanid, Benzmetamid, und Furosemid hemmen in therapeutischen Dosierungen selektiv die NKCC-Cotransporter.⁸⁵

Der transmembranale Ionen-Transporter NKCC1 ist ein hochkonserviertes Protein. Mit einer Genlänge von 5260 Basenpaaren und einem Molekulargewicht von 120kDa (glykosyliert ca. 185kDa)³⁹ entspricht die Größe des Monomers etwa dem des Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR). Die Analyse mit dem Kyte-Doolittle-Algorithmus lässt 12 Transmembrandomänen vermuten, an deren Enden sich große hydrophile N- und C- Termini befinden. Der Kyte-Doolittle-Algorithmus sagt die Proteinstruktur und das Einbetten in die Membran voraus, indem er hydrophobe und hydrophile Bereiche des Proteins berechnet und graphisch darstellt.⁸⁵ Im Falle des NKCC1

werden die 12 Transmembrandomänen durch 6 extrazelluläre und 5 zytoplasmatische Schleifen verbunden.

Der speziell zur Strukturanalyse von Membranproteinen entwickelte Eisenberg- Algorithmus ³ ergab insgesamt 15 α -Helices, davon befanden sich drei nahe am Carboxy- bzw. Aminoterminus. Strukturell ähneln diese Bereiche α -Helices bekannter plasmatischer Proteine und dienen damit vermutlich der Proteinkonfiguration und nicht der Einlagerung in die Zellmembran. Zwei Helices ließen sich klar der ersten und zwölften TM des Kyte-Doolittle Modells zuordnen. Die restlichen zehn Helices entsprechen den Transmembranbereichen 2-11.²²

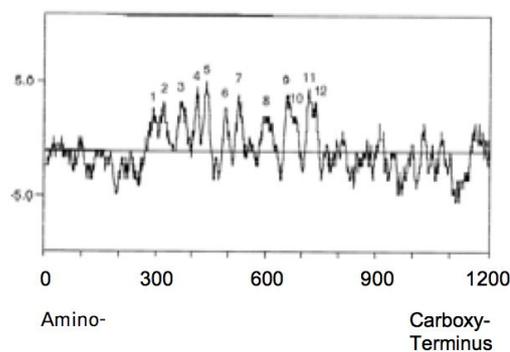
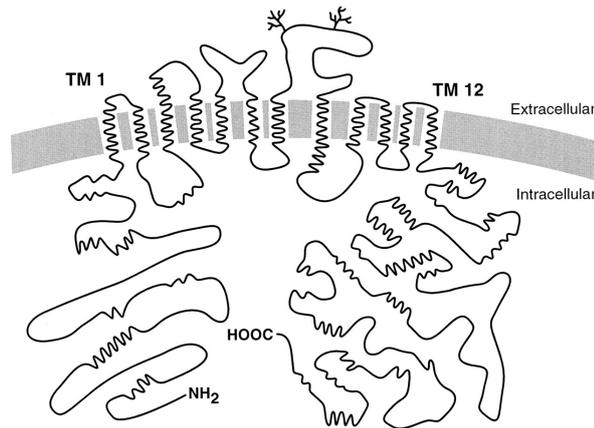


Abbildung 1.4.: Analyse der Gensequenz des NKCC1 mittels des Kyte-Doolittle Algorithmus¹⁰⁴

Durch weitere Strukturanalyse zeigten sich drei mögliche Glykolisierungsstellen,⁸³ sowie verschiedene Stellen für Phosphorylierung sowie für Casein Kinase II und die cAMP (Cyclic adenosine monophosphate)-abhängige Protein Kinase A (PKA).³⁴ Gerichtete Mutagenese zeigte dass die zweite Transmembrandomäne eine große Rolle für den Kationen-Transport spielt und die Membrandurchtritte vier und sieben für Anionentransport (mit einer entsprechenden Cl^- -Affinität). Interaktion von Bumetanid (bzw. Furosemid) mit dem Cotransporter ließ sich für die Transmembrandomänen zwei, sieben, elf und zwölf zeigen.^{43,44}

In einer gut konservierten Region des N-Terminus konnten drei potentielle Phosphorylierungsstellen identifiziert werden (die Threoninreste Thr 184, 189, 202). Die polaren Threoninreste können phosphoryliert werden und bewirken vermutlich eine Konformi-

³Bei diesem Algorithmus wird der hydrophobe Moment der α -Helices genutzt um eine Kurve zu erstellen, die Rückschlüsse auf Funktion und Lage der Proteinregionen gibt

Abbildung 1.5.: NKCC1-2D-Struktur³⁸

tätsänderung. Dieser Mechanismus ist ein häufig zu beobachtender Aktivitätsregulator zytoplasmatischer Proteine. Im Falle des NKCC1 wurde der Zusammenhang zwischen Aktivität, Phosphorylierungsstatus und niedrigem $[Cl]_i$ bzw. geringem Zellvolumen hergestellt.²⁹ Die in dieser Arbeit verwendeten „R5“-Antikörper wurden von unserer Arbeitsgruppe entwickelt und binden spezifisch an die phosphorylierte Thr-184-Thr189 Region.²⁸ Der Aminoterminus verfügt des Weiteren über eine Bindungsstelle für Protein Phosphatase 1 (PP1) welche ebenfalls in die Regulation involviert ist (PP1 kann sich an die Aminosäureseitenketten 107 anlagern²¹).

Es gibt Hinweise durch FRET-Untersuchungen, die nahelegen, dass ein funktionierender NKCC-Cotransporter ein funktionelles Dimer in der Zellmembran bildet.⁷³

1.1.5. Funktion

Da der NKCC1-Cotransporter in der Stöchiometrie $1Na^+ : 1K^+ : 2Cl^-$ Ionen über die Zellmembran transportiert, wird das Membranpotential nicht beeinflusst und ist somit ein elektroneutraler Transport (d.h. ohne direkten Einfluss auf das Ruhemembranpotential). Die bedeutendsten Stimuli für den Bumetanid-sensitiven Ionentransport stellen Absinken der $[Cl]_i$, eine Verringerung des Zellvolumens (z.B. durch Hypertonizität des Umgebungsmilieus) und Wachstumsfaktoren/Mitogene dar.^{40, 46, 49} Die Steuerung/Aktivierung erfolgt über Phosphorylierung.^{26, 28, 38-40, 59, 96} Die Triebkraft für den Ionentransfer über den NKCC1-Cotransporter ist der von der $Na^+ - K^+ - ATPase$ erzeugte Na^+ -Gradient, daher ist es ein sekundär aktiver Transport. Der Transport der Substrate über die Zellmembran erfolgt in die gleiche Richtung, daher wird NKCC auch als $Na^+ K^+ Cl^-$ -Symporter bezeichnet.

Der NKCC1 ist in seiner funktionellen Form in die Zellmembran integriert, die N/C-Termini liegen intrazellulär, die hydrophilen Loops zwischen den Transmembrandomänen 5/6 bzw. 7/8 mit den Glykosylierungsstellen liegen extrazellulär. Bisher konnte unter physiologischen Bedingungen entsprechend nur ein unidirektionaler Bumetanid-sensitiver Ionentransport von extra- nach intrazellulär beobachtet werden.^{39,85}

Die Hauptaufgabe des NKCC1 Cotransporters scheint die Regulierung des Chloridhaushalts der Zelle zu sein. Für die Kationen Na^+ und K^+ liegen diverse aktive und passive Regulationsmechanismen, Ionenkanäle und Transportmoleküle in somatischen Zellen vor. Bisher wurden aber nur wenige chloridspezifische Ionenkanäle dokumentiert (am bekanntesten sind die hier diskutierten NKCC-Cotransporter und das CFTR-Molekül). Die intrazelluläre Chloridkonzentration $[\text{Cl}]_i$ ist in der Regel höher als die extrazelluläre Konzentration $[\text{Cl}]_a$. Passive Ionenkanäle führen daher im geöffneten Zustand in der Regel zu einem nach außen gerichteten Ionenstrom. Der NKCC1 ist einer der wenigen dokumentierten Mechanismen über den $[\text{Cl}]_i$ gegenüber dem umliegenden Milieu erhöht werden kann und ist damit ein essentieller Gegenspieler der freien und gerichteten Chloriddiffusion.³⁸

Eine besondere Rolle spielt der NKCC1 in sekretorischen Epithelien. In diesen Zellen dient der zum Lumen hin stattfindende Strom von Kationen (insbesondere Cl^-) der sekundären Flüssigkeitssekretion. Ist dieser Vorgang behindert (z.B. durch Hemmung des NKCC1 durch Furosemid oder durch das Fehlen funktionierender apikaler Chloridkanäle wie bei der zystischen Fibrose) führt dies zu einer relevant geringeren Sekretion.³⁹ Im folgenden werden der Ionentransport in sekretorischen Epithelien und in parenchymatösen Zellen dargestellt. Als Beispiel eines sekretierenden Epithels wurde die Situation in Alveolen gewählt.

Ionentransport in Alveolen

In Abb.1.6 Teilabbildung A ist schematisch die Energie verbrauchende Na^+/K^+ -ATPase dargestellt. Durch diese wird insbesondere ein Natrium-Gradient über die Zellmembran aufgebaut ($[\text{Na}]_i$ zu $[\text{Na}]_a$ physiologisch etwa $10\text{-}15\text{mmol/l}$ zu 140mmol/l).

Im mittleren Bild (B) ist zusätzlich der NKCC1- Cotransporter dargestellt. Durch das in Abbildung A dargestellte Natriumgefälle können die Ionen K^+ und Cl^- entgegen ihres isolierten thermodynamischen Gleichgewichts über die Zellmembran transportiert werden. Dies führt zu einem Anstieg von $[\text{K}]_i$ und $[\text{Cl}]_i$.

In Teilabbildung C ist der resultierende Vektor-Ionenfluss über die Alveolarzellen dargestellt. Die relativ hohe intrazelluläre Chloridkonzentration wird über Chloridkanäle

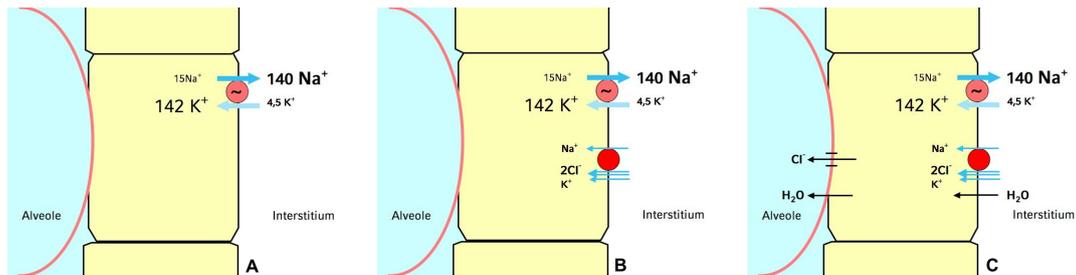


Abbildung 1.6.: Ionenfluss in Alveolen: Teil A zeigt den Aufbau des Natriumgradienten mittels Na-K-ATPase; in Teil B ist die Erhöhung von $[Cl^-]_i$ über den NKCC1 dargestellt; Teil C zeigt den resultierenden Nettoausstrom von Cl^- und Wasser über das Epithel

(z.B. CFTR) der apikalen Membran ins Lumen abgegeben. Dieser Anionenüberschuss führt zu sekundären Transportprozessen von Kationen, als dritter Schritt führt die erhöhte extrazelluläre Osmolarität zur Sekretion von Flüssigkeit.³⁹

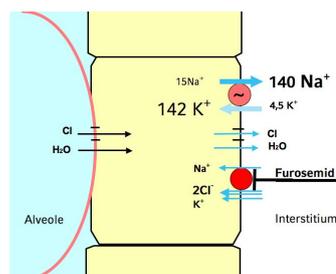


Abbildung 1.7.: Ionenfluss in Alveolen unter Furosemid

Kommt es beim Lungenödem zu einer vermehrten pulmonalen Flüssigkeitseinlagerung ins Interstitium und zu einer verstärkten Sekretion in die Alveolen, erschwert die verdickte Diffusionsbarriere den Gasaustausch. Furosemid verstärkt nicht nur die Diurese, sondern verringert auch lokal die Sekretion von Flüssigkeit ins Alveolarlumen. Beide Prozesse können die respiratorische Situation verbessern.

Der Transport von Chloridionen über die apikale Zellmembran in Alveolarepithelien ist nicht nur in der Embryonal- und Fetalphase entscheidend für die Lungenentwicklung. Dass Störungen in diesem System auch beim Erwachsenen zu großem Krankheitswert führen zeigt das Beispiel der zystischen Fibrose, bei der ein Mangel an Chlorid und damit auch Flüssigkeitstransport über das Alveolarepithel ins Lumen entscheidend für die pulmonale Symptomatik ist.^{82,102}

Ionentransport in parenchymatösen Zellen

In parenchymatösen Organen dienen die Ionenkanäle, Ionenpumpen und Ionen- Cotransporter in erster Linie der Homöostase. Auch in diesen Zellen wird die intrazelluläre Chloridionenkonzentration $[Cl]_i$ zu einem relevanten Anteil durch die Isoform NKCC1 des Natrium-Kalium-Dichlorid-Cotransporters aufrechterhalten. Schon zu Beginn der Erforschung des NKCC war die Beeinflussung durch Änderungen im Zellvolumen bzw. der Osmolarität der Umgebung bekannt.⁸⁵ Durch die unter 1.1.4 dargestellten Eigenschaften lässt sich bereits eine besondere Bedeutung des NKCC bei der Zunahme des Zellvolumens vermuten.

Zwar lässt sich der Ionentransport über den NKCC unter (unphysiologischen) Bedingungen umkehren. Physiologisch erfolgt der Ionentransport vom extra- in den intrazellulären Raum. Dadurch steigt die relative Osmolarität des Zellplasmas. Der folgende Wassereinstrom führt zur Volumenzunahme. Dieser Effekt konnte sowohl bei Zellen in hypertonen Medien⁸⁵ (mit konsekutivem primärem Volumenverlust) und bei Zellen mit pathologisch gesteigertem Volumen (z.B. im Rahmen eines Hirnödems) nachgewiesen werden.¹⁰³

1.2. Proliferation

Vor der Teilung einer Zelle wird die genetische Information dupliziert. In der Mitose erfolgt die Verteilung des doppelten genetischen Satzes auf die beiden entstehenden Tochterzellen. Während dieses Prozesses besitzen eukaryote Zellen komplexe Mechanismen, die sicherstellen, dass es nur selten zu relevanten Fehlern kommt. Bekannte Folgen einer Fehlsteuerung in diesem Bereich sind genetisch determinierte und bösartige Erkrankungen.

Im Zellzyklus sind die beiden Prozesse der DNA-Replikation und der DNA-Separierung durch sogenannte Gap-Phasen (G_1 und G_2) getrennt, in der G_2 -Phase findet z.B. das Proof-Reading statt (siehe Abbildung 1.8). In der Phase G_1 liegt der Chromosomensatz einfach vor, in der G_2 -Phase besitzen Zellen verdoppelte Erbinformation. In diesen Phasen finden Vorbereitungen zur Mitose statt. Während der G_1 -Phase werden verschiedene Kontrollpunkte durchlaufen. Bekannt ist z.B. der p53-Pathway der zu diesem Zeitpunkt bei Gefahr fehlerhaften Genmaterials die Apoptose induzieren kann. Vor der DNA-Synthese können viele Faktoren den Zeitpunkt des Beginns der DNA-Synthesephase beeinflussen. Neben klassischen exogenen Mitogenen zählen hierzu auch Hormone und Variablen im Zellstoffwechsel.

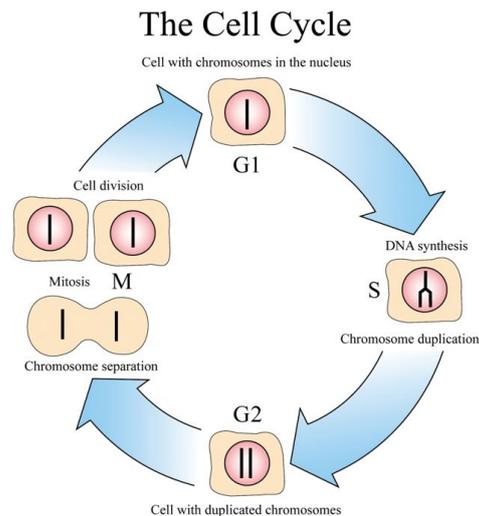


Abbildung 1.8.: Zellzyklus modifiziert nach¹

Zu diesen regulierenden Variablen des Zellstoffwechsels zählen neben Faktoren wie der Anzahl der Mitochondrien, Reserven an Energieträgern (ATP, Glykogen, Kreatinin-Phosphat etc.) insbesondere auch das Zellvolumen und der intrazelluläre osmotische Druck.⁵³

1.2.1. Zellvolumen

Die Regulation des Zellvolumens ist essentiell für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Homöostase. Der NKCC1 ist ein ubiquitär vorkommender Cotransporter der insbesondere die Chlorid-Homöostase in den Zellen gewährleistet. Sekretorische Epithelien besitzen zusätzlich die Fähigkeit, apikal Chloridionen über spezielle Chloridkanäle ausschleusen zu können. Der NKCC1 stellt über seinen elektroneutralen Transport von 2 Chlor-Ionen einen zellauswärts gerichteten Chlor- Gradienten sicher. In parenchymatösen Zellen korreliert das Zellvolumen mit der intrazellulären Chlorid-Menge. Es konnte in verschiedenen Spezies (Mensch, Ratte, Krallenfrosch, Maus, ...) und Geweben (Astrozyten, Erythrozyten, Azinuszellen, Dickdarmkryptenepithel, ...) eine große Bedeutung des NKCC1 für die Zellvolumenregulation nachgewiesen werden.^{38,39,85}

Eine Hemmung des NKCC1 führt zu einer relevanten Reduktion des intrazellulären Volumens.⁸⁵

Dabei führt die Hemmung des NKCC1-Cotransporters nicht zu einer direkten $[Cl]_i$ -Reduktion, sondern der nicht kompensierte Verlust von Chloridionen führt über diverse Ionen- Kanäle und -Pumpen zum Verlust von Kationen, intrazellulärem Wasser und

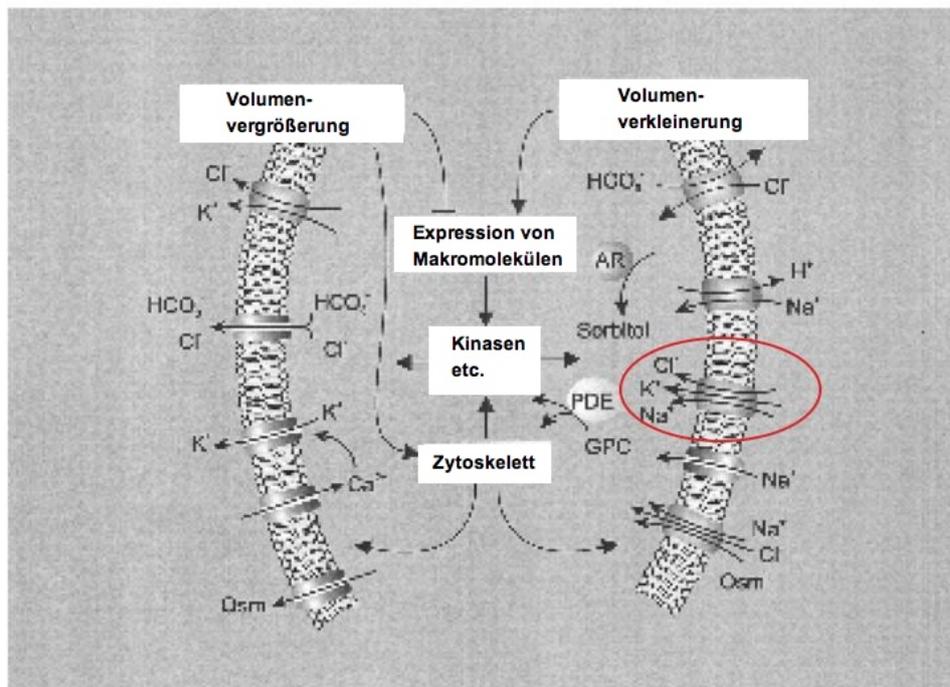


Abbildung 1.9.: Mechanismen der Zellvolumenregulation nach⁵²

damit Volumen. Ohne den Ionen-Cotransport über den NKCC1 fehlt den Zellen ein entscheidender Gegenregulationsmechanismus, in der Folge können die Zellen nur noch in geringerem Ausmaß auf veränderte Bedingungen und extrazelluläre Signale reagieren.

Bereits Mitte der 1970er Jahre wurde ein Zusammenhang zwischen Elektrolytverschiebungen (insbesondere Na^+), Zellvolumen und Proliferation hergestellt.^{68-72,98} Physiologisch wurde in verschiedenen Arbeiten⁵³ ein Zusammenhang zwischen extrazellulären Signalen und Botenstoffen/Mitogenen, intrazellulären sekundären Botenstoffen („second messengers“) und konsekutiver Zellvolumenvermehrung hergestellt.

1.2.2. NKCC1 und Proliferation

Die oben beschriebenen nachgewiesenen und vermuteten Zusammenhänge machten den NKCC1-Cotransport zu einem interessanten Kandidaten für die Beeinflussung des Zellvolumens im Rahmen der Zellproliferation. Die Arbeitsgruppe um Panet⁴ generierte einen Großteil der physiologischen Erkenntnisse, die dieser Arbeit zu Grunde liegen. Der Haupteffekt des Furosemid scheint in der Reduktion des Anteils der Zellen in

⁴Rivka Panet, Department of Medical Biophysics and Nuclear Medicine, Hadassah University Hospital, Jerusalem

der DNA-Synthesephase (S-Phase) zu liegen.⁶⁸ Insbesondere der Zeitbereich am Ende der G₁-Phase (etwa 0,5-2h vor Beginn der S-Phase) ist sensitiv für eine Furosemidhemmung. Entsprechend wurde in verschiedenen Zellreihen eine Proliferationshemmung durch Schleifendiuretika (Bumetanid⁵ bzw. Furosemid) nachgewiesen.^{46,70-72}

Es konnte zudem ein Einfluss von Schleifendiuretika auf den Effekt verschiedener Mitogene nachgewiesen werden.^{68,69} In den meisten in diesem Abschnitt angeführten Arbeiten wurden verhältnismäßig hohe Wirkstoffkonzentrationen verwendet (Bumetanid 10-100 $\mu\text{mol/l}$, Furosemid 300-1000 $\mu\text{mol/l}$). Diese Wirkstoffmengen liegen erheblich über den für einen diuretischen Effekt nötigen Spiegel, führen jedoch zu einer erheblichen Beeinflussung des Zellzyklus und sind damit geeignet die Qualität des untersuchten Effekts zu beurteilen.

Eine Transfektion mit NKCC1-cDNA führte in Fibroblasten zu einer gesteigerten Proliferationsrate.⁷⁰ Die DNA-Syntheserate (gemessen als ³H-Thymidin Einbau) zeigte sich weiterhin durch Wachstumsfaktoren (FGF und FCS) bzw. Schleifendiuretika (Bumetanid) modifizierbar. In einigen maligne entarteten Zellen konnte ein erhöhter NKCC1-Gehalt nachgewiesen werden.^{87,89}

Furosemid reduziert die Fähigkeit diverser Zellarten DNA zu duplizieren.⁷¹ Im Zellzyklus zeigte sich relativ enger Zeitbereich (0,5-2h) vor Beginn der Synthesephase sensibel für eine Hemmung des NKCC-Cotransporter Systems durch Schleifendiuretika (s.o.). Erfolgt z.B. bei synchronisierten Fibroblasten eine Hemmung durch Bumetanid 6h nach Zugabe von diversen Mitogenen zum Nährmedium, zeigt sich kaum ein Einfluss auf die Proliferation.^{70,72} Erfolgt die Zugabe der Schleifendiuretika zeitgleich mit den Mitogenen reduziert sich die proliferationsstimulierende Wirkung um ca. 50%. Dieser Befund wird mit einem potentiellen Kontrollmechanismus für das Zellvolumen vor dem Beginn der DNA-Synthese in Verbindung gebracht⁶⁸.

1.3. BPD

1.3.1. Definition

Die Erkrankung Bronchopulmonale Dysplasie wurde erstmals 1967 von Northway beschrieben.⁶⁷ Patienten mit klassischer BPD zeigten typischerweise initial schweres (I)RDS

⁵Zur Erforschung des NKCC wurde und wird von vielen Arbeitsgruppen das Schleifendiuretikum Bumetanid dem Furosemid vorgezogen. In dieser Arbeit wird der Effekt von Furosemid untersucht, da dieser Wirkstoff in der Humanmedizin erheblich öfter eingesetzt wird. Die Spezifität der beiden Medikamente in Bezug auf die Blockade des NKCC unterscheidet sich nicht relevant.^{4,38}

(Respiratory Distress Syndrom), häufig eine Langzeitbeatmung, hohe inspiratorische Spitzendrücke (PIP) und hohen Bedarf an supplementärem Sauerstoff. Die Klassifikation erfolgte zunächst radiologisch. Mit der steigenden Anzahl überlebender extrem unreifer Frühgeborener durch die Weiterentwicklung der medizinischen Versorgung und insbesondere der Beatmungsstrategien steigt auch die Anzahl der Patienten mit relevantem Risiko für das Entwickeln einer BPD.³⁵ Frühgeborene der Hochrisikogruppe (mit einem Geburtsgewicht von unter 1000 g oder mit einer Schwangerschaftsdauer von weniger als 28 vollendeten Schwangerschaftswochen SSW) entwickeln in 15-50% eine BPD (die schwankenden Zahlen werden mit u.a. mit den unterschiedlichen Beatmungsstrategien in verschiedenen Einrichtungen und Ländern begründet).^{35,36}

In den 1990er Jahren zeigte sich entsprechend eine zunehmende Anzahl von Patienten klinische Zeichen der BPD ohne die bis dahin typische respiratorische Anamnese zu haben. Häufig waren diese Patienten mit nur leichtem RDS zur Welt gekommen und entwickelten auch keinen exzessiven Bedarf an Druckunterstützung oder Sauerstoffbedarf. Meistens war jedoch eine mechanische Langzeitbeatmung auf Grund von Apnoen und unzureichender Spontanatmung, nosokomiale Infektionen (insbesondere Pneumonien) und ein persistierender Ductus Arteriosus (PDA) zu beobachten.³⁵ 1999 wurde für diese Patientengruppe von Jobe⁴⁸ der Begriff „neue BPD“ geprägt. In seiner Arbeit fasst er die Veränderung der Klinik und der veränderten Pathogenese zusammen. In der englischsprachigen Literatur wird auch häufig der Begriff CLD (Chronic Lung Disease) für die neue Form der BPD verwendet.³⁵

Der Schweregrad der Erkrankung wird frühestens mit dem Beginn der 37. SSW eingeteilt (siehe Tabelle 1.1). (Bei Kindern die zum Zeitpunkt der Geburt bereits die 33.SSW erreicht hatten, wird die Einteilung zwischen dem 28. und dem 56. LT vorgenommen). Patienten mit einer milden Form der BPD benötigen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung keine Atemhilfe ($FiO_2=0,21$; fraction of inspired oxygen). Die moderate Form ist durch einen FiO_2 von 0,22 bis 0,29 gekennzeichnet. Die Schwere Form besteht bei Patienten die einen kontinuierlichen positiven Atemwegsdruck (CPAP), mechanische Beatmung, oder einen FiO_2 von $\geq 0,3$ erhalten. In Tabelle 1.1 wird die Definition des NIH (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) zitiert.

Ein Großteil der Säuglinge, welche an BPD leiden werden mit einem IRDS (infant respiratory distress syndrome) geboren. RDS beschreibt allgemein eine Lungenfunktionsstörung. Im Fall eines Kindes das unreifer als in der 38.SSW geboren wurde, sind die Ursachen typischerweise ein relativer oder absoluter Surfactantmangel oder ein sog. „wet lung“-Syndrom (Synonym wird der Begriff der transitorischen Tachypnoe des Neugebo-

Gestationsalter	<32 SSW	≥ 32 SSW
Zeitpunkt der Beurteilung	Im Alter von 36 Wochen postmenstruellen Alters oder zum Entlassungszeitpunkt (zuerst eintretendes Ereignis)	ab dem 28. Lebenstag aber ≤ 56. Lebenstag oder Entlassungszeitpunkt (zuerst eintretendes Ereignis)
	Behandlung über mindestens 28 Tage mit ≥ 21% Plus:	
Milde BPD	Spontanatmend in Raumluft	Spontanatmend in Raumluft
Moderate BPD	21% < FiO ₂ < 30%	21% < FiO ₂ < 30%
Schwere BPD	FiO ₂ ≥ 30% und/oder CPAP/NIPPV ^a	FiO ₂ ≥ 30% und/oder CPAP/NIPPV

^aContinuous Positive Airway Pressure, CPAP; Non-invasive Positive Pressure Ventilation, NIPPV

Tabelle 1.1.: Definition der Bronchopulmonalen Dysplasie nach Jobe und Bancalari⁴⁷ modifiziert nach Greenough³⁵

renen verwendet).

1.3.2. physiologische Lungenentwicklung

Surfactant ist eine Substanz aus Phospholipiden und verschiedenen Proteinen (u.a. Surfactant Protein A-D), welche von Lungenzellen Typ II gebildet wird. Es ist essentiell für die Entfaltung der Alveolen, da Surfactant die Oberflächenspannung von Flüssigkeit verringert und somit eine Entfaltung der Lunge/Alveolen ermöglicht.³⁵ Lamellarkörperchen sind etwa zum Beginn der 24. SSW nachweisbar, Surfactantanteile lassen sich jedoch erst etwa mit der 28. SSW in der Amnionflüssigkeit nachweisen. Die Produktion bzw. die alveoläre Surfactantkonzentration nähert sich asymptotisch den Werten gesunder Reifgeborener in Abhängigkeit zum Gestationsalter. Parallel verringert sich die klinische Notwendigkeit von Intubationen und Therapie mit exogenem Surfactant.³⁵

Ebenso entwickeln sich zwischen der 24. SSW und der 40. SSW die pulmonalen Strukturen. Zu Beginn dieser Phase vermehrt sich die Anzahl der konduktiven Lungenanteile kaum mehr. Die Hauptentwicklung findet mit der Alveolarisierung der Sacculi statt. D.h. aus einem Organ, das zum Großteil aus luftleitenden Bestandteilen mit einer dicken Barriere besteht, entwickelt sich innerhalb weniger Wochen ein Organ mit einer effektiven Gasaustauschfläche von ca. 3m². Dies geschieht in erster Linie durch das Entstehen weiterer Alveolen. Beim Erwachsenen mündet ein terminaler Bronchiolus in der

Regel in 4-5 Alveolen. Diese Differenzierung beginnt bereits präpartal und ist etwa zum Ende des zweiten Lebensjahrs abgeschlossen. Durch diese Verfeinerung der luftleitenden und für den Gasaustausch verantwortlichen Lungengewebe verschmälert sich die Diffusionsbarriere.³⁵

1.3.3. Pathogenese

Wie bereits in den vorangehenden Abschnitten angedeutet wurde, ist das Entstehen einer klassifizierbaren BPD multifaktoriell bedingt. Bisher konnten folgende Bedingungen mit dem Risiko einer BPD korreliert werden.

- **Unreife:** Je leichter und je unreifer das Kind ist, um so größer ist das Risiko für BPD. Kinder die ≥ 32 SSW geboren werden, entwickeln heutzutage in Industrieländern nahezu nie eine BPD ohne weitere zugrunde liegende Lungenerkrankung. Die Prävalenz der BPD in mechanisch beatmeten Patienten ist negativ korreliert mit Gestationsalter und Geburtsgewicht. Dies hängt vermutlich mit der pulmonalen Entwicklung zusammen. Der Schaden und die Umbauprozesse, die eine mechanische Beatmung an einer Lunge im canaliculären Stadium verursacht ist relevanter, als eine Ventilation einer Lunge im sacculären Stadium (ca. ab der 30.SSW).
- **Beatmung:** In der historischen Definition der BPD war die mechanische Beatmung als Voraussetzung zur Diagnosestellung enthalten. Auch bei Patienten mit der Diagnose „neue BPD“ zeigt sich der Zusammenhang zwischen Dauer der mechanischen Beatmung und Risiko bzw. Ausprägungsgrad der Erkrankung. In den letzten Jahren wurden verschiedene Beatmungsformen und Strategien entwickelt um den iatrogenen Schaden zu minimieren. Dabei kristallisierte sich eine Tendenz zu vermehrt nicht-invasiver Atemunterstützung, Volumenkontrollierter Beatmung,⁶⁴ permissiver Hyperkapnie und synergistischen/getriggerten Beatmungsformen heraus. Die respiratorische Unterstützung ist jedoch weiterhin essentiell für das Überleben der Patienten und gleichzeitig einer der relevantesten Risikofaktoren für das Entstehen einer BPD.³⁶
- **Sauerstoff:** Das Frühgeborene wird direkt postpartal einer erheblich höheren Sauerstoffspannung im Vergleich zur intrauterinen Situation ausgesetzt ⁶(selbst bei einem $\text{FiO}_2 = 0,21$). Die Versorgung des Feten mit Sauerstoff gelingt über die

⁶In der Nabelvene liegt ein pO_2 von ca. 55mmHg vor,⁹⁰ bereits kurze Zeit post partum ist der arterielle pO_2 mit ca. 110mmHg im Normbereich gesunder Erwachsener.^{91,93,94}

erhöhte Sauerstoffaffinität von HbF ($\alpha_2\gamma_2$) im Vergleich zum mütterlichen Blut (HbA₁; $\alpha_2\beta_2$; HbA₂; $\alpha_2\delta_2$). Die Sauerstoffspannung in den fetalen Geweben liegt dennoch präpartal stets erheblich unter den postpartal erreichten Werten.

Die prämatüre Lunge hat kein ausreichend entwickeltes Abbausystem für Sauerstoffradikale.³¹ Die akute Sauerstofftoxizität äußert sich in Atelektasen, Lungenödem, alveolaren Einblutungen, lokaler Inflammation, Fibrinablagerungen und Verdickung der Alveolarmembranen. Neben diesen recht unspezifischen Folgen zeigt sich ein Wachstums- und Entwicklungsstopp auf Alveolarebene.^{18,35}

- Infektionen

- Chorioamnionitis: Weitere Risikofaktoren für das Entwickeln einer BPD sind erhöhte Werte im Nabelschnurblut oder Amnionflüssigkeit für IgM und proinflammatorische Zytokine. Passend zu diesen Beobachtungen spricht die erhöhte Rate von BPD bei Patienten bei klinisch evidenter Chorioamnionitis oder peripartaler CMV-Infektion.^{19,86,101,105}
- nosokomiale Infektionen: Postpartal auftretende Infektionen sind ebenfalls positiv mit BPD assoziiert. Insbesondere erhöhte Werte für WBC, IL-6, IL-8, TNF- α im Trachealsekret, also Marker für eine Pneumonie, scheinen das Risiko zu erhöhen.⁸⁴
- Zusätzlich verstärken sich die Hinweise, dass auch nicht-infektiöse Inflammationsreaktionen, z.B. getriggert durch mechanische Beatmung, PDA und freie Sauerstoffradikale (s.o.) das Entstehen einer BPD begünstigen. Der positive Einfluss von Steroiden auf die bronchopulmonale Dysplasie unterstützen diese These.⁷⁵

- Lungenödem und persistierender Ductus Arteriosus (PDA): Je unreifer ein Kind bei Geburt ist, umso geringer ist die Wahrscheinlichkeit für den Spontanverschluss des Ductus Botalli. Durch den PDA kommt es zu einer Volumenbelastung des linken Ventrikels, erhöhtem pulmonalem Blutfluss und damit zu einer Verschlechterung der pulmonalen Compliance und verstärktem Flüssigkeitsaustritt ins Interstitium (Lungenödem). Der erhöhte Druck im Lungenkreislauf ist die Ursache für eine Mediahyperplasie und damit einer verdickten Diffusionsbarriere. Als weitere Ursachen des Lungenödems des Frühgeborenen werden niedriger onkotischer Druck (durch relative Mangelernährung), verschlechterte Lymphdrainage und erhöhte Kapillarpermeabilität diskutiert.^{20,84}

1.3.4. Therapie

Neben der bereits unter 1.3.1 angesprochenen Problemen bei der Definition der BPD gibt es weitere Diskussionen über die Therapie und Therapieindikation. Bereits in der Definition der Erkrankung ist die Dauer der Zufuhr supplementären Sauerstoffs enthalten. Der Schweregrad der Erkrankung wird über die Art der Atemhilfe und den benötigten FiO_2 im korrigierten Alter von 36 SSW bestimmt.

Die Sauerstoffzufuhr wird über die peripher gemessene Sauerstoffsättigung und den kapillären pO_2 geregelt. Es ist jedoch noch umstritten welche Sauerstoffsättigung in welchem Gestationsalter angestrebt werden soll. Durch niedrig- normale Sättigungsgrenzen könnten Beatmungsintensität und der pulmonale Sauerstoffpartialdruck reduziert werden. Dies könnte positive Effekte auf die Entwicklung einer BPD haben.

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung BPD hat ein bedeutender Anteil der Patienten jedoch eine Retinopathia praematorum. Ein entscheidender Faktor in der Therapie der Retinopathie des Frühgeborenen ist das Vermeiden rezidivierender Hypoxien. Die weitere Zunahme pathologischer Gefäßproliferationen im Netzhautbereich wird durch Hypoxien und die konsekutive Ausschüttung von endothelialen Wachstumsfaktoren gefördert. Daher werden Patienten auf einigen Neugeborenenintensivstationen (Neonatal Intensive Care Unit; NICU) aggressiver mit Sauerstoff versorgt um eine weitere Gefäßproliferation zu unterbinden.⁹² Wird eine Sauerstoffsättigung mit einem (SpO_2) von $>94\%$ angestrebt, muss mehr supplementärer Sauerstoff zugeführt werden, als wenn die Zielsättigung bei einem SpO_2 von $90\text{-}94\%$ liegt.^{5,17,92}

Durch die besseren Überlebenschance stieg die Inzidenz der BPD sukzessive an. In der Folge wurden verschiedene Therapien entwickelt. Neben der sehr entscheidenden Prävention der BPD, diese beinhaltet insbesondere die pränatale RDS-Prophylaxe mit Steroiden, volumenkontrollierter Beatmungsformen und verbesserter Therapie von pulmonaler Hypertonie und persistierendem Ductus Arteriosus (PDA) wurden Therapieoptionen bei bereits bestehender BPD entwickelt.

- Sauerstoffsupplementierung: In zwei großen randomisierten Studien (Randomized Controlled Trials, RCT) (Boost^{5,17} und STOP-ROP⁹²) die BPD Faktoren wie klinische Aufenthaltsdauer, Sauerstoffbedarf und Einsatz von Diuretika als sekundäre Variablen untersuchten, konnte übereinstimmend die Tendenz eines ungünstigen Effekts einer höheren Sauerstoffsättigung gesehen werden. Es gibt keine verlässlichen Daten, die eine aggressive Sauerstofftherapie im Rahmen der BPD unterstützen. Dennoch wird Sauerstoffzufuhr insbesondere bei SpO_2 -Werten $<85\%$ als

essentieller Bestandteil der Patientenversorgung betrachtet.

- Steroide: In großen Meta-Analysen bestätigen sich die pathophysiologisch zu erwartenden Effekte und Nebeneffekte. Es lässt sich eine geringe Reduktion der Inzidenz von gescheiterten Extubationen, der kombinierten Endpunkte BPD oder Tod und Bedarf an Sauerstoffsupplementierung nach der Entlassung beobachten. Es zeigen sich die zu erwartenden Nebenwirkungen mit einer Tendenz zu erhöhter Infektanfälligkeit, infantiler Cerebralparese oder auffälliger neurologischer Entwicklung. Ein aktueller Review⁹⁵ kommt zu dem Schluss, dass Steroide bei hohem BPD-Erkrankungsrisiko in niedriger Dosierung und über kurze Zeit erwogen werden sollen.
- inhalative Steroide: Im Vergleich zu systemischer Steroidtherapie zeigen sich keine Vorteile hinsichtlich BPD-Risiko und kurzfristigen Nebenwirkungen. Zu langfristigen Nebenwirkungen bestehen keine Daten. Eine Therapie bei bestehender BPD mit inhalativen Steroiden wird daher aktuell nicht empfohlen.⁹⁵
- Sildenafil: Es liegen keine klinischen Daten zur Therapie bei BPD vor. Tierexperimente legen einen positiven Effekt auf Zellproliferation und pulmonalen Hypertonus nahe. Aktuell werden vor allem Patienten mit schwerwiegenden Oxygenationsproblemen und echokardiographisch gesichertem pulmonalen Hypertonus behandelt.^{50,100}
- Ernährung: Auch hierzu liegen keine aussagekräftigen Daten vor. Generell wird von einer positiven Wirkung einer hochkalorischen Ernährung auf die BPD, Wachstum und neurologische Entwicklung ausgegangen.
- Diuretika: Therapeutisch werden in der klinischen Praxis Hydrochlorothiazid, meist in der Kombination mit Spironolacton oder Furosemid eingesetzt. Diese Diuretika werden oral, parenteral oder inhalativ verabreicht. Eine Umfrage in großen deutschen neonatologischen Einheiten von Teig⁷ aus dem Jahr 2003 zeigt, dass inhaliertes Furosemid zur Therapie und Prophylaxe der BPD von 2% der deutschen Neonatologen eingesetzt wird. Bis zu zwei Drittel therapieren mit systemischen Diuretika, 30% benutzen Furosemid als Firstline-Diuretikum zur Behandlung der BPD (siehe Tabelle 1.2).

⁷persönliche Korrespondenz mit Dr. Norbert Teig, Abteilungsleiter Neonatologie an den Kliniken der Ruhr-Universität Bochum, St. Josef- und St. Elisabeth-Hospital

	invasiv beatmet	CPAP	Spontanatmend mit O ₂ -Bedarf
Systemische Diuretika	62%	66%	58%
Inhalatives Furosemid	2%	2%	0%

Tabelle 1.2.: Umfrage bei 48 deutschen Zentren zum Einsatz von Diuretika bei Patienten mit etablierter BPD

Die vermutlich sicherste und daher am häufigsten verwendete Therapie ist die Kombination aus Hydrochlorothiazid und dem kaliumsparenden Spironolacton. Hierbei kommt es in einem signifikanten Anteil der therapierten Patienten zu relevantem renalen Calciumverlust und folgender Entmineralisierung. Früh- und Mangelgeborene neigen zu Osteopenie, eine diuretische Therapie mit forcierter Calciurese scheint daher fragwürdig. Die erhöhte Calciumkonzentration im Urin erhöht das Risiko einer Nephrocalcinose.

In mehreren RCTs und Metaanalysen konnte ein positiver Effekt von Furosemid auf Oxygenierung und pulmonale Compliance nachgewiesen werden. Ausser diesen physiologischen Kurzzeiteffekten konnten jedoch keine klinisch relevanten Vorteile (untersucht wurden u.a. Effekte auf die Mortalität, Länge des Beatmungsbedarfs, Bedarf an Sauerstoffsupplementierung und Dauer des Klinikaufenthalts) nachgewiesen werden.^{11,12,14}

Ein aktuelles Review kommt zu dem Schluss: „Of all the adjunctive therapies used in preterm infants with BPD, diuretic therapy is one of the most abused without evidence of substantive benefit“.⁹⁵

2. Fragestellung

In der Einleitung konnte die Bedeutung des NKCC für die Kontrolle des Zellvolumens und der Zellproliferation verdeutlicht werden. Furosemid hemmt in therapeutisch relevanten Konzentrationen die Zellteilung bzw. die DNA-Synthese in verschiedenen Zellarten und Geweben. Dieser Effekt hat unter bestimmten Voraussetzungen sogar positive therapeutische Auswirkungen neben der diuretischen Wirkung.

Beim Neugeborenen und insbesondere beim Frühgeborenen liegt eine noch sehr unreife Lunge vor. Die aktuelle Grenze der Lebensfähigkeit wird etwa auf den Beginn der 23. Schwangerschaftswoche gelegt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Lunge noch im canaliculären bzw. pseudoglandulären Stadium, d.h. Teilungsgeneration 18-19 mit hauptsächlich konduktiven Anteilen. Die endogene Surfactant-Produktion beginnt etwa mit der 24. Schwangerschaftswoche.

An der Grenze der Lebensfähigkeit sind insbesondere die Atemregulation und die Fähigkeit zum Gasaustausch über die Alveolen unzureichend um ein selbständiges Überleben zu ermöglichen. Die Umwelteinflüsse auf das sich entwickelnde Lungengewebe führen im Regelfall zu massiven Schäden. Kinder und junge Erwachsene, die als extrem unreife Frühgeborene zur Welt kamen, leiden in der Folge an gehäuften pulmonalen Infektionen und besitzen eine deutlich reduzierte Gasaustauschfläche.

Wir vermuteten einen proliferationshemmenden Effekt von Furosemid auf Alveolarzellen. Auf die unreife Lunge des Frühgeborenen wirken bereits nach der Geburt viele toxische und möglicherweise proliferationshemmende Einflüsse. Bekannte Risikofaktoren für die Entstehung einer bronchopulmonalen Dysplasie sind insbesondere Volu- bzw. Barotrauma durch maschinelle Beatmung, toxischen Effekte hohen Sauerstoffpartialdrucks, Flüssigkeitsverlust durch maschinelle Beatmung und rezidivierende Pneumonien. Noch weitgehend unbekannt sind die Auswirkungen der verschiedenen in der Neonatologie eingesetzten Medikamente auf Lungenentwicklung und langfristige Mortalität und Morbidität.

Ich beantworte in dieser Arbeit die Frage ob Furosemid einen proliferationshemmenden Effekt auf Alveolare Typ II Zellen in vitro besitzt. Methodisch wurden Konfokal-

mikroskopie und SDS-Page zum Expressionsnachweis von NKCC1 verwendet, zur Zellzyklusanalyse wurden FACS-Analysen angewandt und als Nachweismethoden für die Proliferationshemmung standen manuelle und automatisierte Zellzählungen zur Verfügung.

Eine Proliferationshemmung in der unreifen Lunge des Frühgeborenen könnte deutliche Auswirkungen auf das langfristige Outcome, insbesondere auf die Morbidität dieser Patienten haben.

3. Material und Methoden

Wenn nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München verwendet. Ich beherrsche die im folgenden dargestellten Methoden. Alle Ergebnisse wurden von mir selbst erhoben, Personen die mir bei der Methodenauswahl geholfen haben, oder mich in die entsprechenden Labortechniken eingewiesen haben sind in der Danksagung aufgeführt.

3.1. Zellkultur

3.1.1. Zelllinien

Es wurden folgende Zellreihen verwendet:

- A549-Zellen (ATCC Nummer CCL-185) als stabile Zelllinie aus einem humanen Alveolarzellkarzinom.^{33,58} Das Medium bestand aus Ham's F12 Medium (Invitrogen, Gibco, Karlsruhe) mit 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Die Antibiotische Abdeckung erfolgte in den ersten Versuchen mit Penicillin G, Streptomycin und Amphotericin B, 1x Antibiotic / Antimycotic (Invitrogen, Gibco, Karlsruhe). Nach einem Wechsel der Zellkultureinheit (2007) mit ausschließlich stabilen Langzeitkulturen wurde auf die Prophylaxe mit Antibiotika verzichtet. Dies geschah, um mögliche Artefakte durch latente Infektionen/Besiedlungen und evtl. damit einhergehenden Veränderungen des lokalen Interleukinmusters zu vermeiden.⁵⁶
- RLE-6TN (ATCC Nummer CRL-2300) eine mit SV-40 immortalisierte Zelllinie aus Ratten-Lungenepithel.²⁵ Das Ham's F12 Medium als Basismedium für diese Zellen wurde neben 10%FBS mit 1x Antibiotic / Antimycotic, 2 mmol/L L-Glutamin, 0.005 mg/ml Insulin, 2.5 ng/ml Insulin-like Growth Factor (IGF), 0.025mg/ml Transferrin, 2.5 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) supplementiert. Diese Zellreihe wurde in erster Linie für die Evaluierung der verschiedenen Methoden verwendet. Da diese Zellreihe als S2 gelistet ist, verwendeten wir diese Zellreihe nur sporadisch.⁵⁷

Soweit nicht anders angegeben sind die demonstrierten Ergebnisse in A549-Zellen ohne antimikrobielle Substanzen erhoben worden.

3.1.2. Zellkultur

Die Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sterilarbeitsbank mit Laminar Air Flow.⁴¹ Es wurden nur streng sterile, pyrogenfreie Materialien verwendet. Zellen wurden, soweit nicht anders beschrieben, in 5% CO₂, 95% O₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Inkubation mit 2 ml Trypsin-EDTA für circa 5-10 min bei 37°C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 8 ml Nährmedium gestoppt. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen aus einer dicht bewachsenen 75 cm²-Kulturflasche abzentrifugiert (300 g, 5 min), in 7 ml „Recovery Cell Culture Freezing Medium“ (GibcoTM, Invitrogen, Darmstadt) resuspendiert und bei -80°C (bis zu 6 Monate) bzw. -196°C (\geq 6 Monate) eingefroren.

Für die Versuche wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA Lösung in Suspension gebracht und im Verhältnis 1:3 bis 1:5 gesplittet. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer wurde die übrige Zellsuspension auf 6-Well Platten (das Aussähen für CellScreen-Experimente wird unter 3.5.2 exakt beschrieben) oder auf Objektträger/ Deckgläschen ausgesät. Falls die Zellen nach 96h konfluent und vital waren, wurden die Zellen für Experimente verwendet.

3.1.3. Kulturbedingungen

Um die Effekte von Furosemid auf die Zellproliferation und Änderungen im Zellzyklus zu analysieren, wurden 500.000 Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät. Es wurden in den im folgenden beschriebenen Experimenten in der Regel zwei Furosemidreihen verwendet:

- Die volle Reihe mit insgesamt zwölf verschiedene Furosemid- Konzentrationen (0, 20, 50, 100, 150, 200, 300, 450, 600, 750, 900, 1200 $\mu\text{mol/L}$).
- Eine reduzierte Reihe mit sechs Konzentrationen (0, 50, 300, 600, 900, 1200) $\mu\text{mol/L}$.

In dieser Arbeit wurde Furosemid in bis zu zwölf verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Gründe wurden unter 1.1.2 dargestellt. Der Bereich zwischen 0-20 $\mu\text{mol/L}$ entspricht den therapeutisch gewollten systemischen Peak-Plasmaspiegeln. Der Konzentrationsbereich der von 50 bzw. 100 $\mu\text{mol/L}$ abgedeckt wird, entspricht dem Grenzbereich

ab dem von einer ototoxischen Wirkung ausgegangen wird, diese Werte können unter den aktuell empfohlenen Dosierschemata bei Frühgeborenen erreicht werden.⁶⁵ Als Maximalwert der Reihe wurde 1200 $\mu\text{mol/L}$ gewählt, um Effekte einer topischen Therapie (z.B. nach Inhalation) zu evaluieren. Zusätzlich konnte durch die weite Spanne an Konzentrationen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erstellt werden.

Furosemid wurde in drei verschiedenen Stammlösungen verwendet. Erstens als 20 mmol/L -Lösung in Dimethylsulfoxid (DMSO), zweitens als 100 mmol/L -Lösung in DMSO und als 30 mmol/L -Lösung in wässriger alkalischer Lösung Furorese[®] (Hexal AG; Holzkirchen, Deutschland). Nach 48h wurde das Medium erneuert, die Furosemid-Konzentrationen entsprachen der oberen Reihe. Die Zellen wurden 96h nach Aussaat und damit Inkubation mit Furosemid untersucht.

Auswirkung von DMSO auf die Zellproliferation

In den ersten Experimenten zeigte sich ein diskontinuierlicher Verlauf in den gemessenen Parametern, exemplarisch ist in Abbildung 3.1 das Verhältnis der Zellen in der G₂-Phase zur Anzahl der Zellen in der G₁/G₀-Phase der FACS Analyse gezeigt. Der Sprung bei 450 $\mu\text{mol/L}$ ging einher mit einem Konzentrationswechsel von DMSO (s.o.) im Kulturmedium. Die Verwendung unterschiedlicher Furosemidpräparationen hatte folgende Hintergedanken: In niedrigen Furosemid-Dosierungsbereichen sollten exakte Konzentrationen durch eine etwas stärkere Verdünnung der Stammlösung erreicht werden. (Die minimal hinzugefügte Menge betrug 20 $\mu\text{mol/L}$). Im Bereich der höheren Konzentrationen hätte der Anteil der Furosemidlösung am Gesamtvolumen im Well bis zu 7,5% betragen, daher wurde eine höher konzentrierte Lösung angefertigt und bei Furosemid-Konzentrationen über 300 $\mu\text{mol/L}$ verwendet. Diese Präparationen wurden bereits seit längerem in unserem Labor für weitere Versuche verwendet.

Die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel für Furosemid ist gängige Praxis in den meisten Laboratorien die mit Schleifendiuretika erforschen. Auch in Untersuchungen zu Furosemid und Proliferation ist der Einsatz von DMSO als Trägersubstanz angegeben.⁸⁷

Der diskontinuierliche Verlauf passt sehr gut zur bekannten proliferationshemmenden Wirkung von DMSO.⁹ Eine proliferationshemmende Wirkung wurde bereits bei Konzentrationen zwischen 0,2%-1% nachgewiesen. In unserem ersten Versuchsaufbau wurden diese Konzentrationen ab einer Furosemidkonzentration von 50 $\mu\text{mol/L}$ erreicht.

In der Folge verwendeten wir ausschließlich die für Patienten zugelassene i.v.-Zubereitung (Furorese[®]), diese enthält außer dem Wirkstoff NaCl, NaHCO₃ und H₂O. Als einziger

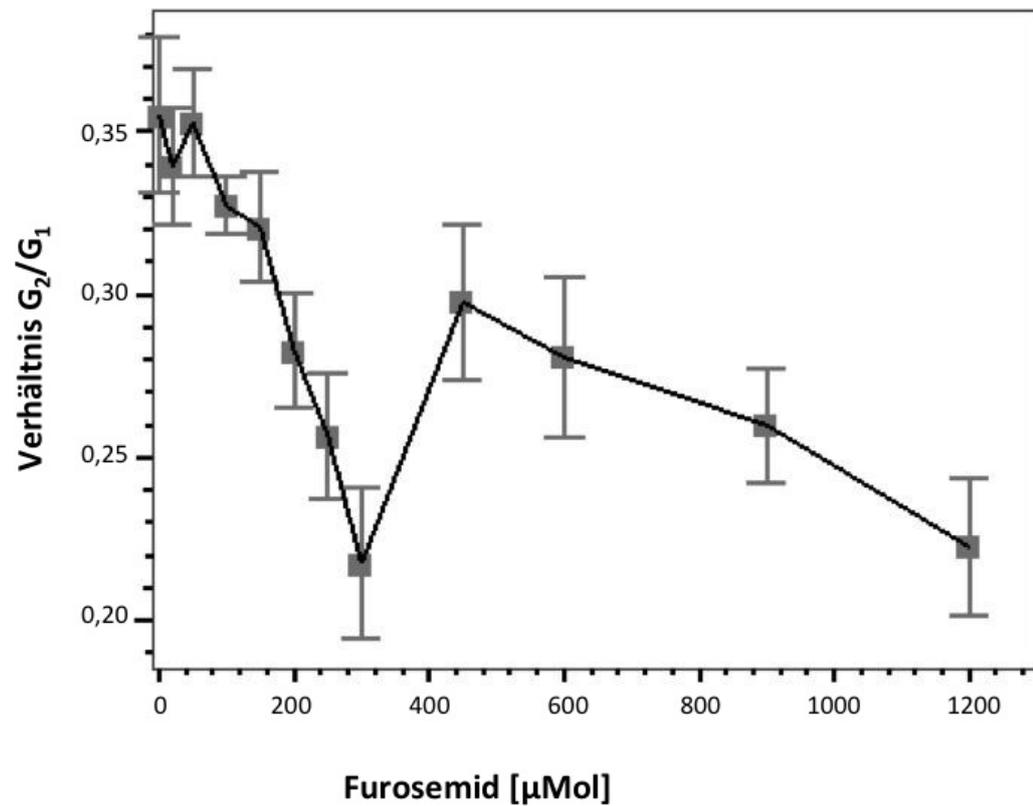


Abbildung 3.1.: Änderung des G_2/G_1 Verhältnisses durch Furosemid in DMSO

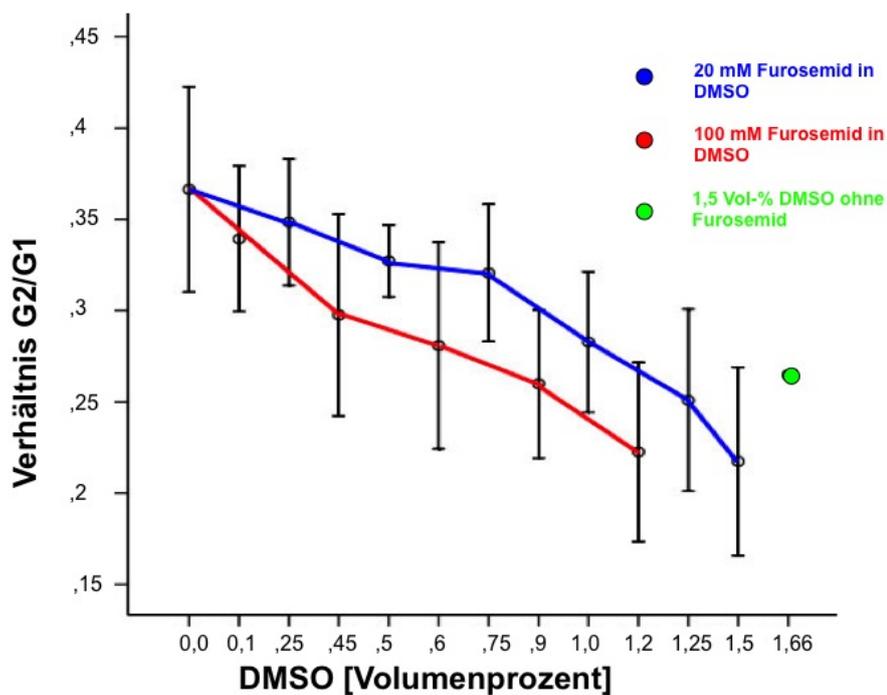


Abbildung 3.2.: Änderung des G_2/G_1 Verhältnisses durch DMSO. Die Fehlerbalken entsprechen einem 95%-Konfidenzintervall um den Mittelwert. Der Effekt durch 1,5 Volumenprozent DMSO in der Nährlösung ist eine Einzelmessung.

möglicherweise relevanter verbleibender Faktor wurde der pH der Lösung erachtet. Insgesamt 5 Proben wurden untersucht, alle Proben zeigten einen pH zwischen 8,2 und 8,5, drei Proben zeigten Werte von 8,4. Um weitere methodische Fehler auszuschließen verwendeten wir daher als Kontrolle (Furosemid = 0 μ mol-Bedingung) eine auf einen pH von 8,4 eingestellte NaHCO₃ Lösung. Die eingebrachte Menge entsprach der größten im jeweiligen Versuch verwendeten Furoresemenge (in nahezu allen Fällen 1,2% des Gesamtvolumens: 12 μ l pro 1ml). Orientierende Messungen zeigten keine relevante Änderung des pH des Nährmediums durch Zugabe von Furorese[®] oder der Bikarbonatlösung.

3.2. SDS-Page

Als Versuchsprotokoll verwendeten wir ein modernisiertes Protokoll des ursprünglichen Verfahrens nach Laemmli.⁵¹

3.2.1. Zellyse

Die Zellen wurden ca. 96h nach Aussaat per Durchlichtmikroskopie auf Vitalität und Konfluenz untersucht (vgl.3.1.3). Zur Zellyse wurde Ripa-Puffer verwendet (**R**adio-**I**mmuno-**p**recipitation **A**ssay): 50^{mmol}/L Tris-HCl, (pH 8,0); 150^{mmol}/L NaCl; 1,0% Igepal Ca-630; 0,5% Natrium Deoxycholat; 0,1% Natrium Dodecylsulfat. Zu diesem Basispuffer wurden direkt vor der Zellyse 100^{nmol}/L Calyculin A (ein Serin/Threonin-Phosphataseinhibitor) und ein Proteinaseinhibitoren Cocktail (AEBSF; Aprotinin; Bestatin hydrochloride; E-64; Leupeptin hemisulfate; Pepstatin A) hinzugefügt. Dieser Puffer zeigte eine relativ hohe und konstante Proteinausbeute und eine relativ geringe Beeinflussung der Bestimmung der Gesamtproteinmenge.

In 6-Well Platten wurden wie unter 3.1.2 beschrieben A549 Zellen eingebracht und mit sechs verschiedenen Furosemidkonzentrationen für 96h kultiviert. Das Medium wurde vor der Zellyse abgesaugt, die Wells mit eiskaltem PBS gespült. Die Zellen wurden mit 0,5ml eiskaltem Zellyse-Puffer überschichtet und für 30 Minuten auf Eis belassen. Die Zellen wurden mechanisch mit einem sterilen Schaber abgelöst und durch mehrmaliges Aufziehen durch eine 25G Nadel (BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) lysiert.

Die Zellysate wurden bei 4°C und 13000 rpm (3770 x g) zentrifugiert. Die Überstände wurden auf ihren Proteingehalt mit BCA-Assay (Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn) hin analysiert. Von jeder Probe wurden an den Proteingehalt adaptierte Mengen für SDS-Page verwendet, die Reste eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2. SDS-Page und Western-Blot

Wir verwendeten ein Mini-PROTEAN 3 System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München), mit 6% bzw. 8% Gelen. Die Proben wurden mit Probenpuffer inklusive 5% β -Mercaptoethanol vermischt und in die Taschen der Gele eingebracht (Protokolle und Puffer sind im Anhang in Tabelle A.2 aufgeführt). Um die Größe der Proteine zu bestimmen verwendeten wir einen rekombinanten Blotting Marker mit Peroxidaseaktivität (ECLTM DualVue Western Blotting Markers, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg).

Das Elektrophorese System wurde mit eiskaltem Laufpuffer verwendet, die Kammern mit Eis umgeben. Sowohl Elektrophorese als auch Transfer wurde bei konstant 120Volt und einer Leistung von ca. 16kW durchgeführt. Die Elektrophorese wurde bis zu einer guten Auftrennung der großen Proteine über einen Zeitraum von ca. 90min durchgeführt (bis die Bromophenol-Blau Bande den Rand des Gels erreicht hatte).

Die Gele wurden auf PVDF Membranen (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg) geblottet. Diese wurden vor dem Transfer mit 100% Methanol für fünf Minuten und mit Transferpuffer für 15min vorbereitet. Nach dem Transfer wurden die Gele mit Coomassie-Blue für ca. zwei Minuten gefärbt, anschließend mit Destain-Lösung (50% Methanol, 10% Essigsäure, Merck KgaA, Darmstadt) entfärbt um einen ausreichenden Transfer der Proteine mit einem Molekulargewicht von über 150kDa sicherzustellen.

3.2.3. Immunchemie

Die Membranen wurden für 60min bei Raumtemperatur mit PBS-Tween Milch(0,1% Tween Bio-Rad Laboratories GmbH, München; 5% Magermilchpulver Merck KgaA, Darmstadt) geblockt. Es wurden folgende Primärantikörper verwendet:

- Der für die phosphorylierte Form des NKCC1 spezifische primäre Antikörper R5 wurde in einer Verdünnung von 1:500 verwendet (siehe Abschnitt 1.1.4).
- Der an den Carboxy-Terminus- des NKCC1 unabhängig vom Status der Phosphorylierung bindende T4 Antikörper⁶² wurde in einer Konzentration von 1:500 verwendet.

Die Membranen wurden für mindestens 12h bei 4°C auf einem Rollator inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mehrmals (mindestens fünfmal) mit PBS-Tween-Milch gewaschen. Die mit Meerrettichperoxidase konjugierten sekundären Antikörper (Anti-Rabbit IgG, bzw. Anti-Goat IgG) wurden in einer Verdünnung von 1:10000 in

PBS-Tween-Milch für 2h (oder ebenfalls für mindestens 12h bei 4°C) aufgetragen. Die Membranen wurden abschließend mehrmals mit PBS-Tween gewaschen.

3.2.4. Detektion

Zur Detektion verwendeten wir ein sensitives Substrat (SuperSignal West Femto, Pierce, Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn), das in einem dünnen Flüssigkeitsfilm auf die Membranen aufgebracht wurde. Zur Aufnahme des Signals verwendeten wir eine digitale gekühlte CCD-Kamera (Diana III, raytest GmbH, Straubenhardt). Die Rohdaten wurden mit dem zugehörigen Programm Diana III (raytest GmbH, Straubenhardt) gespeichert und mit AIDA ver. 4.04.032 (raytest GmbH, Straubenhardt) analysiert.

Das Hintergrundsignal wurde von den gemessenen Werten subtrahiert, es wurden gleichgroße Bereiche der Membran für die relativen Werte analysiert. Daten wurden in arbiträren Intensitätseinheiten und daraus abgeleiteten Veränderungen bezogen auf die Ausgangsbedingung (in Prozent) angegeben. Als Kontrolle wurden Röntgenfilme einiger Blots angefertigt.

3.3. Immunfluoreszenz und Konfokalmikroskopie

3.3.1. Kultur der Zellen

Zellen wurden wie unter 3.1.2 beschrieben kultiviert. Zunächst wurden 8-Well CultureSlides (BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) verwendet, in diese wurden 200.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Zellen wurden als homogene Zellschicht ca. 48h nach dem Aussähen untersucht. Alternativ wurden sterilisierte Deckgläschen (20x20mm, Menzel-Gläser, Braunschweig) in die Vertiefungen einer 6-Well Platte gelegt und in diesen Zellen ebenfalls wie unter 3.1.2 bis zur Konfluenz vermehrt.

Vorteile der zweiten Methode sind:

- Geringerer Bedarf an Chemikalien und I°-Antikörper. Die Deckgläser wurden „kopf-über“ auf Parafilm gestürzt und für die Einwirkdauer der Antikörper belassen, als Volumen genügten ca. 5µL.
- Größere bewachsene Fläche und damit auswertbare Bereiche.
- In einigen Präparaten konnte eine Kreuzfärbung verschiedener Antikörper in angrenzenden Wells der 8-Well Culture Slides beobachtet werden.

3.3.2. Behandlung und Färbung der nativen Präparate

Die Wells/Deckgläser wurden dreifach mit eiskaltem PBS gespült, anschließend die Zellen mit Fixationslösungen (95% Methanol, 5% Essigsäure oder alternativ mit 4% Paraform) für 60min bei Raumtemperatur fixiert. Die Rehydrierung erfolgte mit PBS, das Blockieren unspezifischer Bindungen mit 30% Goat Serum, 0,6% Triton-X, in PBS mit 1mmol/L MgCl_2 , $0,1\text{mmol/L CaCl}_2$.

Diese Blocklösung wurde auch als Trägerlösung für die verschiedenen Antikörper verwendet. Die Tabellen 3.1 und 3.2 enthalten Auflistungen zu den verwendeten Antikörpern und Farbstoffen.

Antikörper	Verdünnung
Anti-P-NKCC (R5) ^a	1:100
Anti-NKCC (T4)	1:100
Anti-NKCC (T84)	1:500
Anti-NKCC (TEF-S1)	1:500
DAPI	1,5 ^{mg} /L

^asiehe 1.1.4;²⁸

Tabelle 3.1.: Primär-Antikörper für Fluoreszenz-Mikroskopie

Antikörper	Wellenlänge	Verdünnung
Alexa [®] Fluor Chicken Anti-Rabbit	488	1:100
Alexa [®] Fluor Goat Anti-Mouse	594	1:100

Tabelle 3.2.: Sekundäre-Antikörper für Fluoreszenz-Mikroskopie

Um die Signalintensität und Spezifität zu steigern wurden die Zellen nach dem ersten Blockierschritt mit 0,1% bis 1% SDS behandelt. Die Konzentration und Einwirkdauer wurde abhängig von Zelldichte und der Passage abhängigen Adhäsionskraft variiert. Die Farbstoffe und Antikörper wirkten jeweils für 2h bei Raumtemperatur in strenger Dunkelheit ein. Zwischen der Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper wurden die Wells ausführlich mit Blockierlösung gespült. Für die Antikörper R5 verwendeten wir FITC-konjugierten Anti-Rabbit Sekundär-Antikörper, für T4 Anti-Mouse-TRITC.

Es wurden zu jedem Farbstoff und zu jeder Antikörperkombination Negativkontrollen angefertigt und der unspezifische Hintergrund bewertet. Es zeigte sich eine Durchweg

hohe Spezifität und nur sehr geringe Kreuzfärbung bei eng beieinander liegenden Wellenlängen. Entsprechende Negativkontrollen sind im Anhang abgebildet.

3.3.3. Fluoreszenzaufnahmen

Ein Fluoreszenzmikroskop-System mit peltier-gekühlter Kamera (Axiovert, Zeiss) wurde für die konventionellen Fluoreszenzaufnahmen verwendet. Die Aufnahmen waren reine Intensitätsaufnahmen, d.h. die Bilddaten lagen im Schwarz/Weiß Format vor. Die Bilder wurden mit Adobe® Photoshop® (Adobe®, Unterschleißheim, Deutschland) bearbeitet. Die Bildinformation wurde in Farben der entsprechenden Wellenlänge transformiert.

3.3.4. Konfokalaufnahmen

Die Präparate wurden wie unter 3.3.2 angefertigt. Die Objektträger wurden mittels Konfokalmikroskopie an einer TCS SP2-Einheit (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH; Wetzlar; Deutschland) untersucht. Die gesamte Zellschicht wurde in ca. 0,1µm dicke „optische Querschnitte“ unterteilt. Es erfolgte eine Analyse der Bilder im Hinblick auf die Lokalisation des spezifischen Signals in Abhängigkeit von der Schnitthöhe, vereinfachend wurden die Zellen in die Bereiche basal, lateral und apikal eingeteilt.

Die Bilder wurden mit Adobe® Photoshop® geringfügig bearbeitet. In allen in dieser Arbeit abgebildeten Aufnahmen wurde die Gesamthelligkeit um 40% reduziert und der Kontrastwert um 30% erhöht. Dies geschah um auf Papierausdrucken eine adäquate Qualität erreichen zu können.

3.4. Fluoreszenz Aktivierte Zellsortierung – Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

3.4.1. DNA Färbung

Zellen wurden wie unter 3.1.2 beschrieben inkubiert. Die Wells der 6-Well Platten wurden zweimal mit autoklaviertem, eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,5% Trypsin in 1mM EDTA abgelöst und in sterile Eppendorf-Gefäße überführt. Die Zellen wurden zweimal gespült. Hierzu wurden die Zellsuspensionen bei 4000rpm (=1160g) zentrifugiert und erneut mit PBS resuspendiert. Nach dem dritten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen mit eiskaltem 95%-Ethanol fixiert.

Die Zellsuspension wurden zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Pellet wurde mit PBS resuspendiert und mit RNase ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) für 30min inkubiert. Die Samples wurden anschließend mit 1% Propidium Iodid (Endkonzentration $0,5 \text{ mg}/\text{mL}$) gefärbt, und auf Eis gelagert.

3.4.2. FACS- Messungen

Wir verwendeten ein Durchflußzytometer der Firma BD (BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg). Es wurden von jeder Probe 3000 Zellen analysiert, durch den Zellproliferation inhibierenden Effekt von Furosemid und DMSO variierten die jeweiligen Aufnahmezeiten. Die Zellen wurden auf ihre Seit- und Vorwärtsstreuung bei verschiedenen Wellenlängen untersucht.

3.4.3. Auswertung

Bei der Analyse der erhobenen Daten legten wir für jeden Versuchstag ein Fenster vor, das durch Zellgröße und Granularität definiert wurde (Bild A). Zellen innerhalb dieses Fensters wurden auf ihre Signalstärke hin im Propidium-Iodid-Kanal (ca. 610nm) analysiert. In Teilabbildung B ist exemplarisch die Anzahl der Ereignisse gegen Intensität aufgetragen. D.h. die Zellen im ersten Peak G_1 fluoreszieren schwächer, d.h. haben einen geringeren DNA-Gehalt als Zellen im zweiten Peak G_2 . Die Skala der x-Achse ist logarithmisch. Passend zur Grundannahme, dass im zweiten Gipfel Zellen mit verdoppeltem Chromosomensatz vorliegen zeigt sich der Gipfel G_2 etwa mit einer doppelt so starken Fluoreszenz-Intensität (die maximale Anzahl an Ereignissen lag bei 750 vs. 350 einer arbiträren Fluoreszenz-Einheit).

Die Analyse zeigte typischerweise zwei klar abgegrenzte Peaks, die Anzahl der Ereignisse in diesen Peaks wurde durch Integration berechnet. Die Veränderung der Gesamtanzahl der Ereignisse innerhalb der Gipfel und das Verhältnis der Gipfel zueinander wurde als Veränderung des Zellzyklus interpretiert.

3.4.4. Nicoletti–Apoptose

Unter den oben beschriebenen Kulturbedingungen wurde ein Nicoletti-Apoptose Test durchgeführt.⁶⁶ Als Positivkontrolle diente Vincristin ($300 \mu\text{g}/\text{L}$) mit einer Einwirkdauer von 60min. Es konnte kein statistisch aussagekräftiger Zusammenhang zwischen Apoptoserate und Furosemidkonzentration gefunden werden.

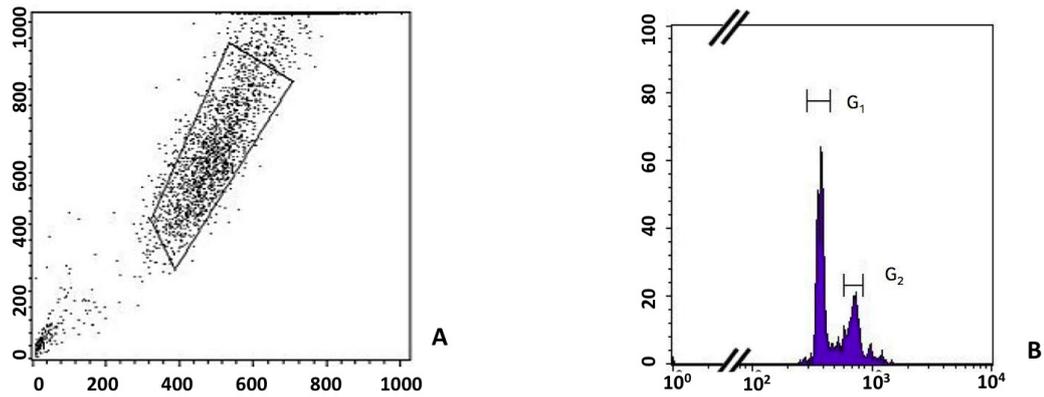


Abbildung 3.3.: Zellzyklusanalyse mittels FACS. In Bild A ist die Verteilung aller fluoreszierender Zellen (in Abhängigkeit von Zellgröße und Granularität) dargestellt. In Bild B ist eine typische Verteilung von nicht mit Furosemid behandelten A549 Zellen wiedergegeben.

3.5. Proliferationsuntersuchung

3.5.1. Zählkammer

A549-Zellen wurden unter sechs verschiedenen Furosemidkonzentrationen kultiviert. Nach gründlichem Spülen der Wells mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA (Trypsin 0,05%; 0,02%EDTA) von der Oberfläche gelöst und durch vorsichtiges Pipettieren separiert. Bei Versuchen diese Methode zu optimieren zeigte sich bei höheren Konzentrationen an Trypsin/EDTA oder Einwirkzeiten von ≥ 30 min eine größere Anzahl dysmorpher/avitaler Zellen. Die Zellsuspensionen wurden in eine Neubauerkammer eingebracht und dort gezählt. Für jeden zur Auswertung verwendeten Rohwert wurden 2x4 Großquadrate ausgezählt. Als Proliferationsrate wurde der Quotient aus der Zellzahl nach 72 Stunden und der initialen Zellzahl angegeben. Insgesamt wurde dieses Verfahren in vier Einzelversuchen mit je sechs Furosemidkonzentrationen an beiden verwendeten Zellarten durchgeführt.

Die hohe Fehlerquote durch die Bildung von Zellkonglomeraten (unter 4.4.1 ausführlicher diskutiert) führten zur Erweiterung der Methodik um die bewiesenermaßen deutlich exaktere Cellscreen-Methode.

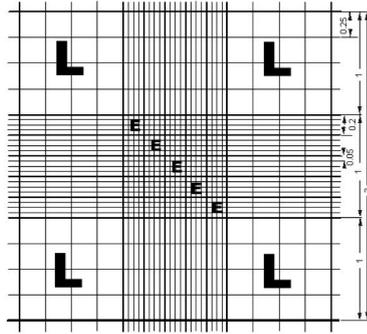


Abbildung 3.4.: Raster einer Neubauer Zählkammer

3.5.2. CellScreen

Das Cellscreen-System⁹⁹ (Innovatis, Bielefeld, Deutschland) arbeitet berührungslos ohne Färbung und Probenentnahme. Bestimmt wird der Bedeckungsgrad des Wellbodens bei adhärent wachsenden Zellen. Bei diesem System können einzelne Mikrotiterplatten und ähnliche kleinvolumige Kulturgefäße mithilfe eines beweglichen Motorkreuztisches präzise angesteuert werden. Zur Bildgewinnung tastet eine autofokussierende inverse Mikroskopoptik das Untersuchungsobjekt ab. Die Bilddaten der Zellkultur werden automatisch erfasst und analysiert. Jedes von einer Digitalkamera aufgenommene Bild wird in einer Datenbank abgelegt. Artefakte, wie Zellfragmente, Schmutz oder Luftblasen werden von der Software aussortiert. In den validen Messungen wird zusammen mit einer Zeitmarke die bewachsene Fläche berechnet. Da die Zellkultur nicht berührt wird, kann sie wiederholt gemessen sowie für weitere Experimente verwendet werden.

A549 Zellen wurden in 96-Well Platten kultiviert (Ausgangsdichte: 300 Zellen/Well). Die äußeren Wells wurden nicht bestückt, um zusätzliche Brechungseffekte am Rand zu vermeiden, diese Effekte wurden durch das Einbringen von PBS in die Randwells weiter verringert. Nach 12h erfolgte die erste Messung, optisch wurde die Adhärenz der Zellen vor Beginn der Messung überprüft. Die weiteren Messungen wurden im Abstand von je 24h über einen Gesamtzeitraum von 132h (120h nach der Ausgangsmessung) durchgeführt.

Für jedes Well wurden eigene Zeitverlaufskurven erstellt, es wurden zwölf verschiedene Furosemidkonzentrationen verwendet (s.o.). Zu jedem Messzeitpunkt wurde neben der berechneten bewachsenen Fläche eine Bilddatei des Mikroskopausschnitts gespeichert. Diese wurden qualitativ bewertet.

3.6. Statistische Analyse

3.6.1. Verwendete Software

Die Daten aus allen Experimenten wurden in Excel-Tabellen (Microsoft Excel, ver. 9.0.3821) gespeichert, einfache Berechnungen wie Proteingehalt der Zellysate und Bestimmung des Hintergrundrauschens wurden direkt berechnet. Statistische Tests und die Erstellung von Grafiken erfolgte mit SPSS (SPSS inc., München, Deutschland, Versionen SPSS für Windows 12.0.1, 15.0.1; PASW Statistics für Mac V.18.0.0). Alle Ergebnisse sind wenn nicht anders bezeichnet als Mittelwerte \pm 1SE angegeben.

3.6.2. Verwendete Tests

Wir verwendeten bivariate Korrelationen für einfache Bestimmungen wie die Standardreihe bei Proteinbestimmungen und manuelle Zellzählungen. Für komplexere Analysen wurden einfaktorielle Anova mit Bonferronikorrektur für multiples Messen angewendet. Eine Signifikanz wurde auf dem 5%-Level angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Proteinnachweis

4.1.1. phosphorylierter NKCC1 (R5)

Abbildung 4.1 zeigt einen typischen R5-Antikörper markierten Immunoblot unter 6 ansteigenden Furosemidkonzentrationen. Wie in Graphik 4.3 dargestellt zeigt sich bei diesem Antikörper ein Anstieg des Signals mit steigender Furosemidkonzentration. Die Veränderung unter $1200\mu\text{mol/L}$ betrug $248,06 \pm 207,63\%$ im Vergleich zum Ausgangswert.

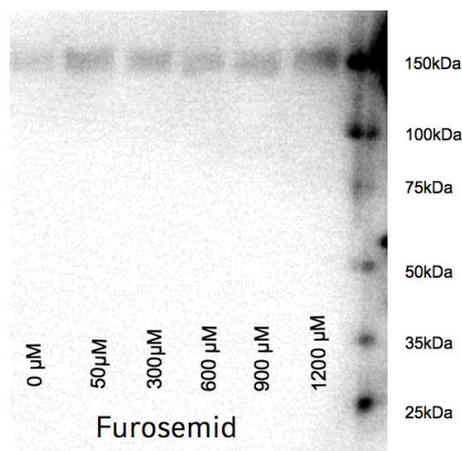


Abbildung 4.1.: Immunoblot mit R5 als Primär-Antikörper. Als Proben dienten Zelllysate von A549-Zellen nach 96 Stunden Proliferation unter unterschiedlichen Furosemidkonzentrationen im Kulturmedium.

4.1.2. nativer NKCC1 (T4)

Ein exemplarischer Immunoblot mit T4-Antikörpern (spezifische Maus-Antikörper gegen den C-Terminus des NKCC1⁶¹) als primären Markern ist in Abbildung 4.2 dargestellt. In

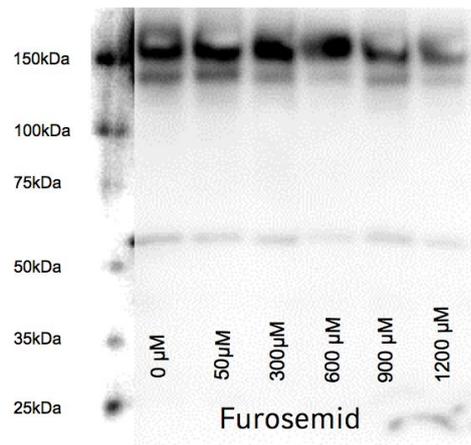


Abbildung 4.2.: Immunoblot mit T4-Antikörper. Der HRP-konjugierte Proteinstandard zeigte ca. 10% der Intensität der T4-Signale und wurde daher in Adobe Photoshop nachbearbeitet. Es zeigt sich tendentiell eine geringere Intensität mit steigenden Furosemidkonzentrationen

allen Blots zeigte sich eine Tendenz zur geringeren Intensität mit steigender Furosemidkonzentration. Unter unseren Laborbedingungen schwankten die Rohwerte der Intensität der NKCC1-Banden um bis zu 100% (14,3 vs. 28,3 [arbiträre Intensitätseinheit])¹.

In Abb. 4.4 ist der Anteil des phosphorylierten NKCC bezogen auf den mit T4 detektierten Gesamt-NKCC dargestellt.

4.2. Immunhistologie

4.2.1. Fluoreszenzmikroskopie

Wie in den Abbildungen 4.5 und 4.6 exemplarisch dargestellt ist, führt die Markierung mit Anti-NKCC1 Antikörpern zu wabenartiger Anfärbung. Diesen Effekt konnten wir nur bei polarisierten Zellen nachweisen. Polarisiert bedeutet im Falle eines sekretorischen Epithels eine Differenzierung in einen apikalen und einen basolateralen Membranabschnitt. Wie bereits in der Einleitung dargelegt wurde, ist diese Unterteilung notwendig für einen geordneten Elektrolyt- und Flüssigkeitsfluss über eine Epithelschicht.

Zellen, die (noch) keinen Bezug zu den umgebenden Zellen hatten, zeigten eine diffuse Färbung über die gesamte Zelloberfläche. Dies spricht für eine Translation des NKCC1-

¹Diese Schwankungen ließen sich zum Teil auf schwankende Gesamtproteinkonzentrationen in den Zelllysaten zurückführen. Bedeutsamer war die variable Aufnahmedauer der Chemilumineszenzbilder (softwarebasierte Berechnung der idealen Belichtungszeit)

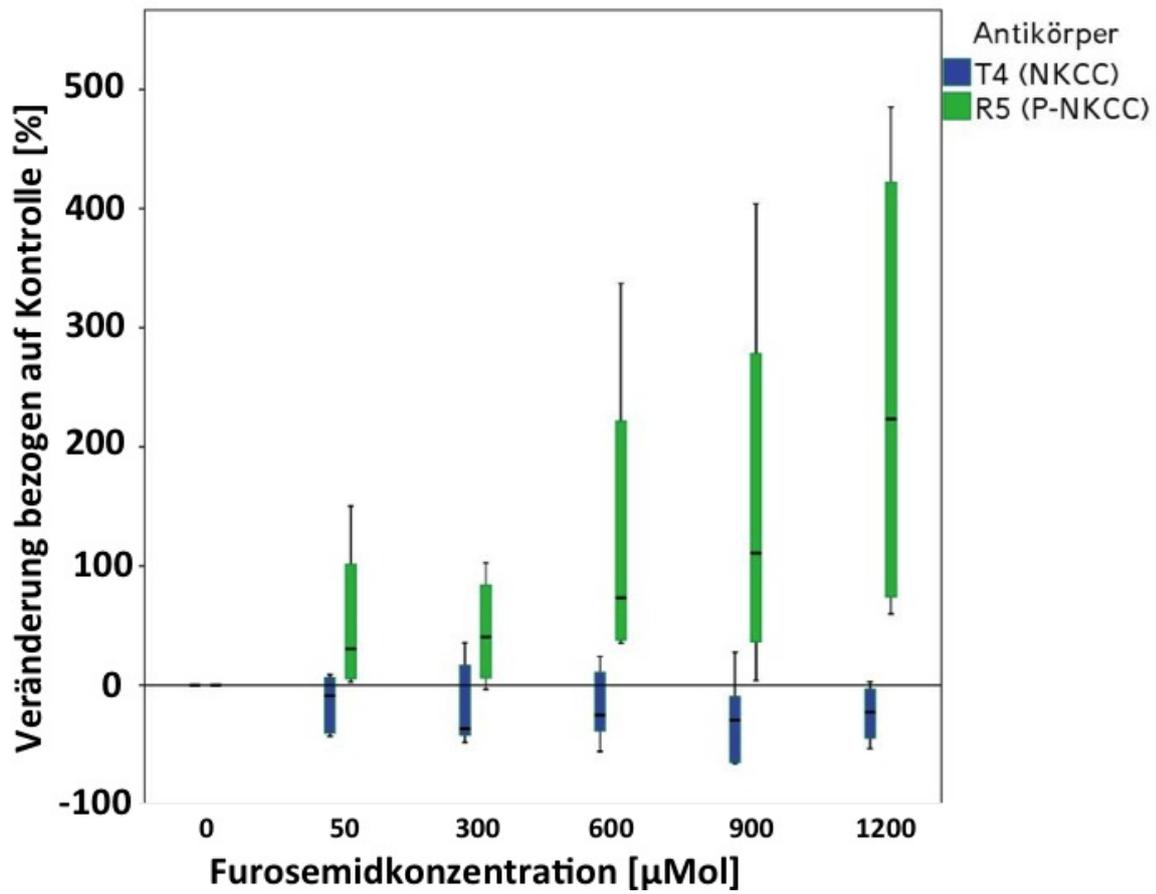


Abbildung 4.3.: R5- bzw. T4-Intensitätssignale gegen ansteigende Furosemidkonzentrationen aufgetragen

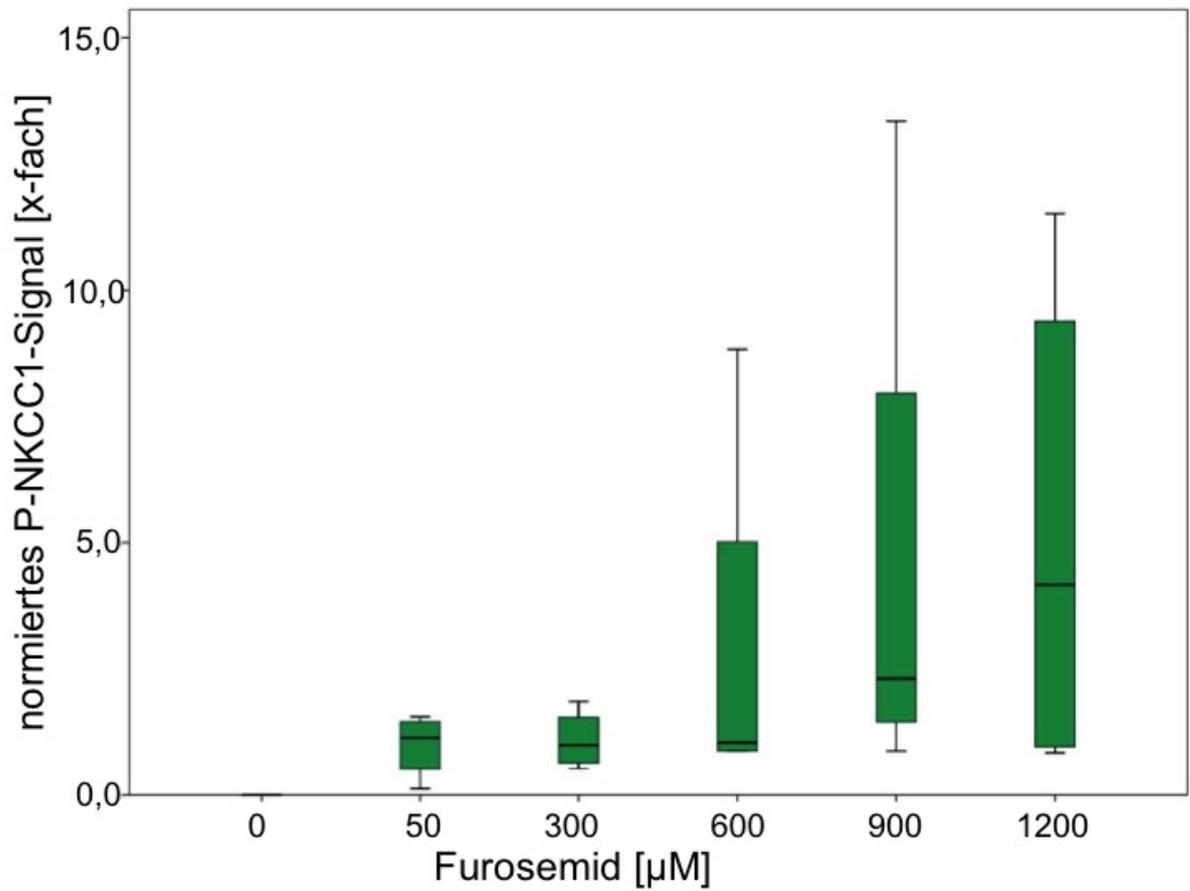


Abbildung 4.4.: P-NKCC (phosphorylierter NKCC1) Intensität unter steigenden Furosemidkonzentrationen. Die Intensitätswerte für R5-AK wurden auf die Veränderungen der Intensität im T4/NKCC-Signal normiert.

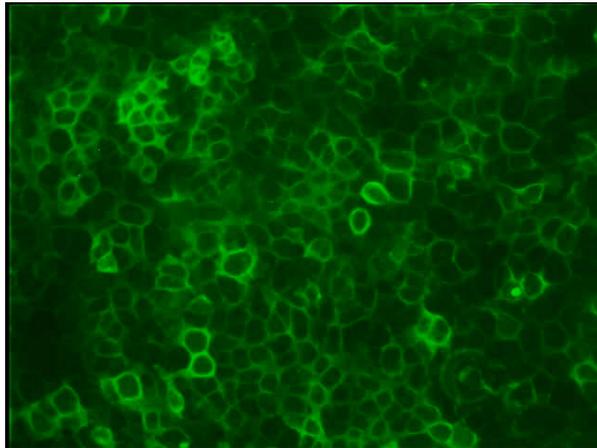


Abbildung 4.5.: Konfluente A549 Zellen mit T84 markiert. Die wabenartige Anfärbung weist bei einem isoprismatischen Epithel auf eine (baso-)laterale Expression hin

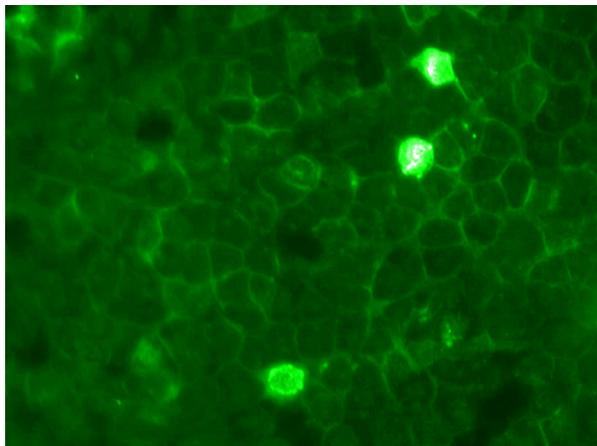


Abbildung 4.6.: Konfluente A549 Zellen mit R5-Antikörper markiert. Auch mit diesem Antikörper lässt sich die wabenartige Struktur nachweisen. Die deutlich stärker fluoreszierenden Zellen zeigen sich im Durchlicht in unterschiedlichen Mitosestadien

Cotransporters in die Zellmembran auch bei nicht polarisierten Zellen, und eine intrazelluläre Umverteilung nach Ausbilden einer dichten tight-junction-Zone.

Die Qualität der Färbungen schwankte stark mit der effektiven Behandlung mit SDS. Dennoch zeigte sich ein relevanter Unterschied zwischen den verwendeten Antikörpern. Die Antikörper T84 und TEF-S1 zeigten die ausgeprägteste Spezifität für den membranständigen NKCC1. Färbungen mit R5-Antikörper z.B. zeigte zwar immer noch eine Präferenz für die Zellmembran, färbte jedoch auch intrazelluläre Strukturen an.

Der R5-Antikörper zeigte eine weitere Besonderheit: Zellen die sich in der Mitose befanden (definiert über die Veränderungen der Zellkernmorphologie) zeigten ein sehr intensives Signalmuster.

4.2.2. Konfokalmikroskopie

Durch Konfokalmikroskopie konnte ein genauerer Aufschluss zur intrazellulären Verteilung des NKCC1 gewonnen werden. Im Bereich der basolateralen Membran, d.h. der Kontaktfläche mit den Objektträgern zeigte sich mit allen Antikörpern ein interdigitierendes Anfärbemuster mit vielen Banden. Ca. 1,5-2 μ m „höher“ konnte ein bevorzugt membranständiges Signal nachgewiesen werden. Im apikalen Bereich der Zellen ließ sich je nach generellem Anfärbemuster des jeweiligen Antikörpers kaum oder ein zumindest unspezifisches Signal darstellen. Vgl. Abb. 4.7; 4.8; 4.9; es sind jeweils repräsentative Schnitte durch die basale, die basolaterale und die apikale Zellregion abgebildet.

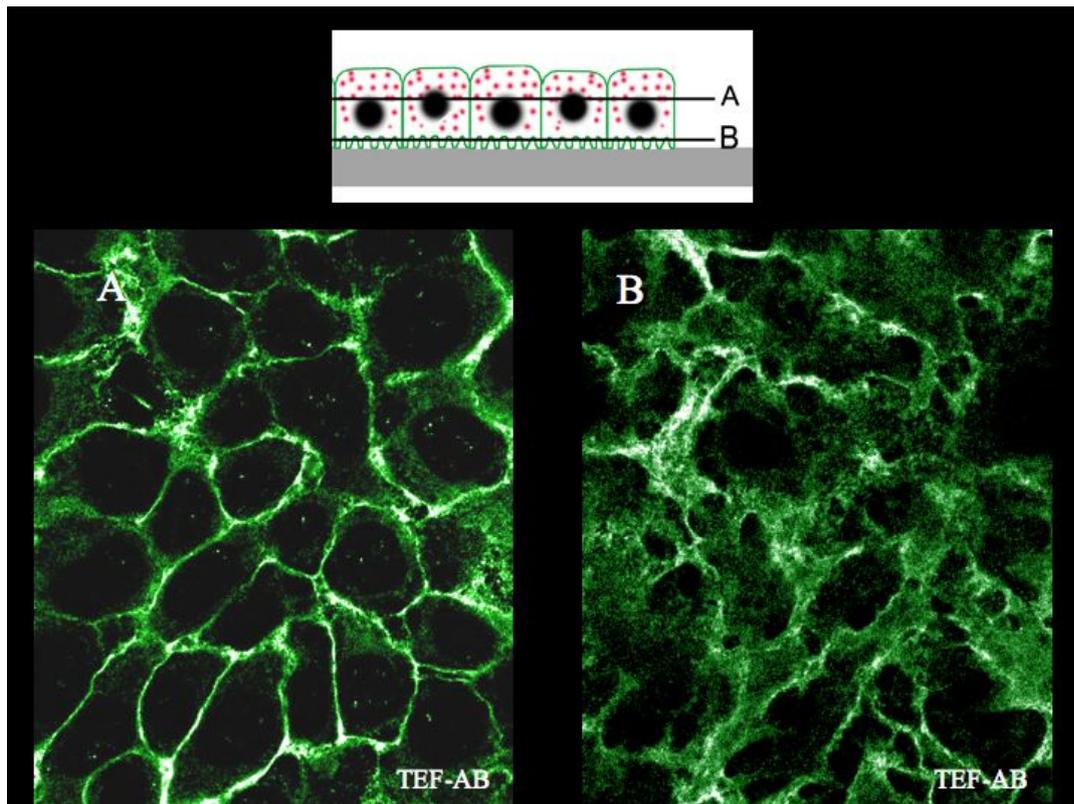


Abbildung 4.7.: Konfluente A549 Zellen mit TEF-S1 Antikörper⁶² markiert. In den beiden Teilabbildungen A/B sind jeweils repräsentative Schnitte für eine basolaterale (A) bzw. laterale (B) Färbung dargestellt.

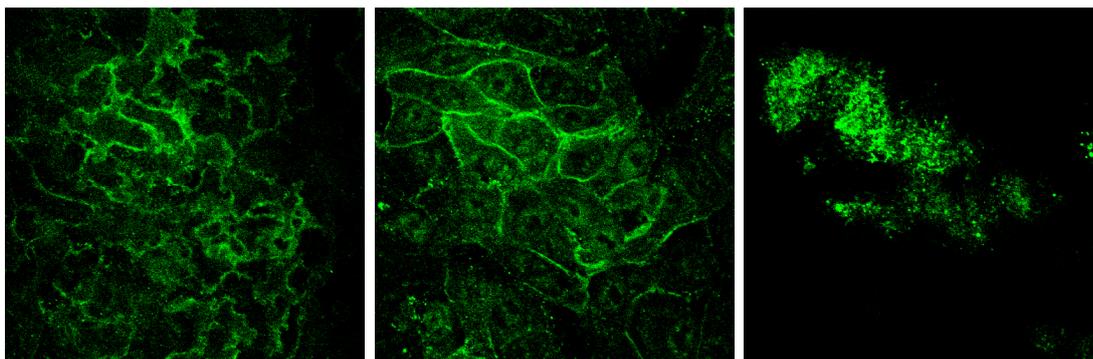


Abbildung 4.8.: Konfokalmikroskopische Aufnahmen nach Markierung mit R5-I°-Antikörpern. Das linke Bild zeigt einen Schnitt im basolateralen Bereich, das mittlere Bild einen lateralen Schnitt und das rechte Bild eine unspezifische Anfärbung im apikalen Bereich.

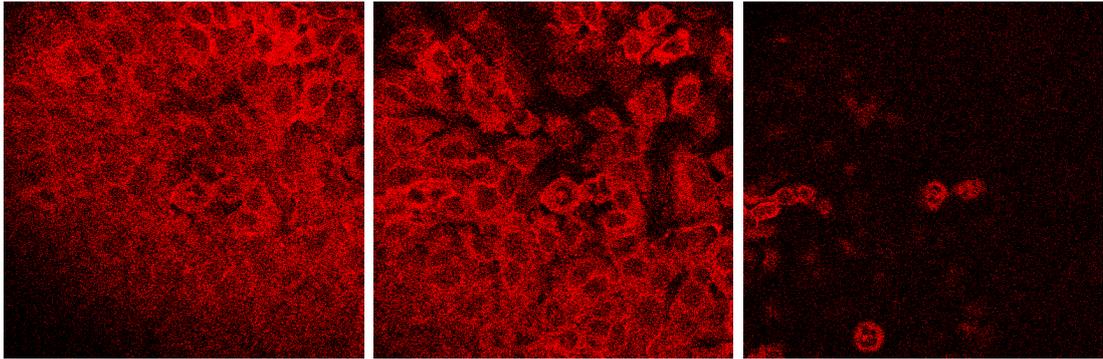


Abbildung 4.9.: Konfokalmikroskopische Aufnahmen nach Markierung mit T4-I°-Antikörpern. Das linke Bild zeigt einen Schnitt im basolateralen Bereich, das mittlere Bild einen lateralen Schnitt und das rechte Bild eine unspezifische Anfärbung im apikalen Bereich.

4.3. Fluoreszenz Aktivierte Zellsortierung – Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

4.3.1. DNA Färbung

Insbesondere die Arbeitsgruppe um Panet konnte in verschiedenen Arbeiten eine Verschiebung des Zellzyklus von Fibroblasten unter Furosemid demonstrieren.^{68,70,72} Den dort beschriebenen Effekt konnten wir bei den von uns verwendeten Alveolarepithelzellen bestätigen. In Ruhe befanden sich 20-31% der A549 Zellen in der G₂-Phase. Dieser hohe Prozentsatz passt zur Proliferationsrate dieser immortalen Zelllinie. Unter hohen Furosemidkonzentrationen verringerte sich dieser Anteil um bis zu 20,4±12,3% (p=0,045) im Vergleich zum Ausgangswert, graphisch dargestellt in Abbildung 4.10. Wir demonstrieren erstmalig einen konzentrationsabhängigen Effekt von Furosemid auf den Zellzyklus. Auffallend ist der verhältnismäßig stark ausgeprägte Effekt unter niedrigen Furosemidkonzentrationen.

Durch die Wahl des Auswertefensters mit ausschließlich intakten, einzelnen Zellen (vgl. Abbildung 3.3) entsprach die Summe von Zellen mit einfachem bzw. doppeltem Chromosomensatz annähernd 100% der untersuchten Zellen. In den Graphiken wird vereinfacht von G₁ vs. G₂ gesprochen. Der G₂-Anteil enthält aber stets auch die Zellen mit doppeltem Chromosomensatz in der Mitosephase, eine weitere Unterscheidung wurde in unserem vereinfachten Setting mit nur einem Farbstoff (Propidiumiodid) nicht durchgeführt. Das Gleiche gilt auch für die Zellen die unter dem Begriff G₁ zusammengefasst wurden, ob sich in dieser Gruppe auch Zellen in der Ruhephase bzw. G₀-Phase befinden

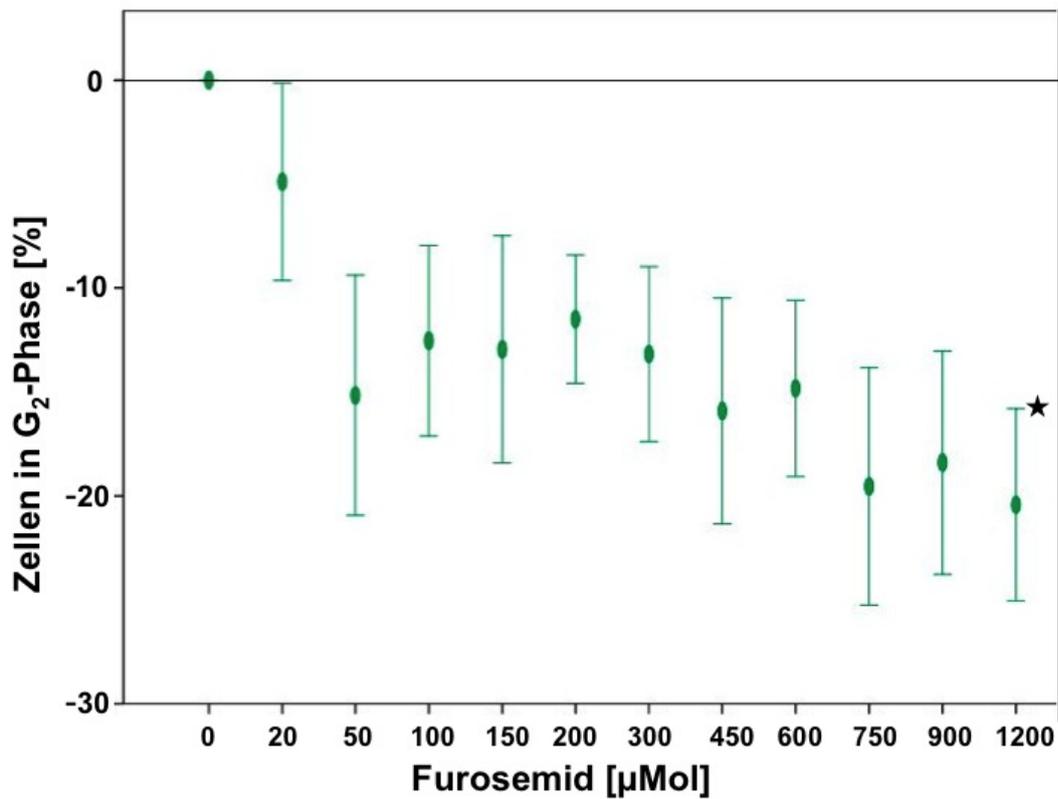


Abbildung 4.10.: Veränderung des G₂Anteils durch Furosemid. Dargestellt ist der Mittelwert der prozentualen Änderung $\pm 1SE$ ($p=0,045$).

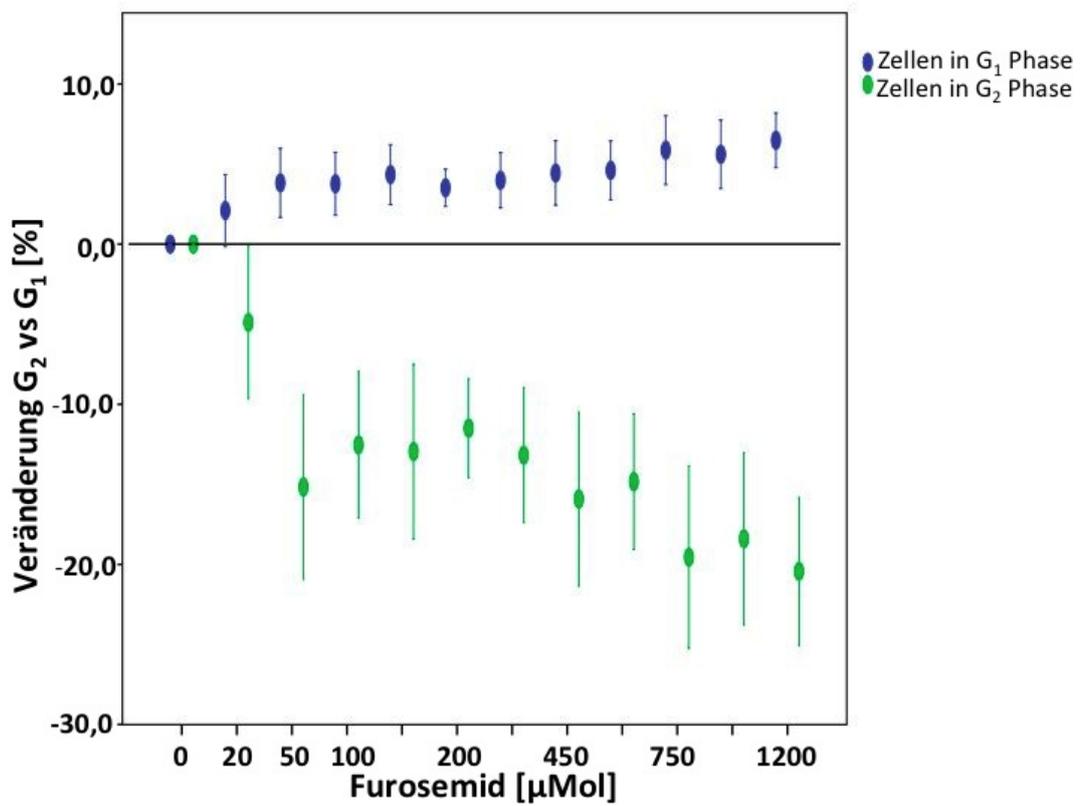


Abbildung 4.11.: prozentuale Änderung der Zellen in der G₁- bzw. G₂-Phase unter Furosemid. Dargestellt ist die prozentuale Änderung ± 1 SE.

scheint auf Grund der hohen Proliferationsrate zwar unwahrscheinlich, eine Aussage ist mit unseren Daten jedoch nicht möglich.

Der gegenläufige Verlauf der Anteile der Zellzyklusphasen zeigt sich auch im in 4.11 dargestellten Verhältnis der beiden Bedingungen. Auffällig ist in allen FACS-Untersuchungen der bereits bei geringeren Furosemidkonzentrationen eintretende Effekt.

Der vermutete proliferationshemmende Effekt von Furosemid erschwerte die Bewertung der FACS-Daten. Die FACS-Analyse wurde über einen fest definierten Zeitraum durchgeführt (zu jedem Einzelversuch wurde softwarebasiert eine Analysedauer empfohlen). Durch die geringere Zelldichte bei höheren Furosemidkonzentrationen wurde die absolute Anzahl an detektierten Ereignissen geringer.

Zur Auswertung wurde daher auch nicht die integrierte Anzahl der Ereignisse in den definierten Detektionsbereichen (Gates) verwendet, sondern der Prozentsatz an der Gesamtzahl der Ereignisse. Die Messung an $n=7$ Versuchsreihen mit einer Gesamtzahl von 82 verwertbaren Messwerten (wir verwendeten keine Messungen mit weniger als 1000 Einzelereignissen) zeigte keine signifikanten Ergebnisse ($p=0,11$) in der einfaktoriellen Anova-Analyse (Bonferroni-Korrektur). Eine Korrelation der Mittelwerte nach Pearson zeigte jedoch eine Signifikanz mit $p<0,01$ und einem Korrelationskoeffizienten von $-0,347$.

Alle Daten der FACS-Analyse wurden an Zellen erhoben, deren Nährmedium Antibiotika zugesetzt wurden.

4.3.2. Apoptosebestimmung (Nicoletti-Assay)

Als orientierende Untersuchung ob der in den folgenden Abschnitten dargestellte proliferationshemmende Effekt auf eine verstärkte Apoptose zurückzuführen ist, wurde ein Nicoletti-Assay durchgeführt (als Positivkontrolle wurde Vincristin verwendet). Es zeigt sich jedoch keine relevante Tendenz die für eine verstärkte Apoptose selbst bei sehr hohen Furosemidkonzentrationen sprechen würde (siehe Abb. 4.12).

4.4. Proliferationsuntersuchung

4.4.1. Zellzählung

Als Vorversuche wurde die Proliferationsrate manuell bestimmt. Diese Methode ist bei adhärennten Zellen methodisch zweifelhaft (s.u.) und zeitaufwändig. Unsere Experimente zeigten jedoch bereits bei einer kleinen Zahl von Wiederholungen ($n=3-4$) eine deutliche Tendenz. Mikroskopisch zeigten sich trotz einer langen Einwirkzeit von Trypsin-EDTA

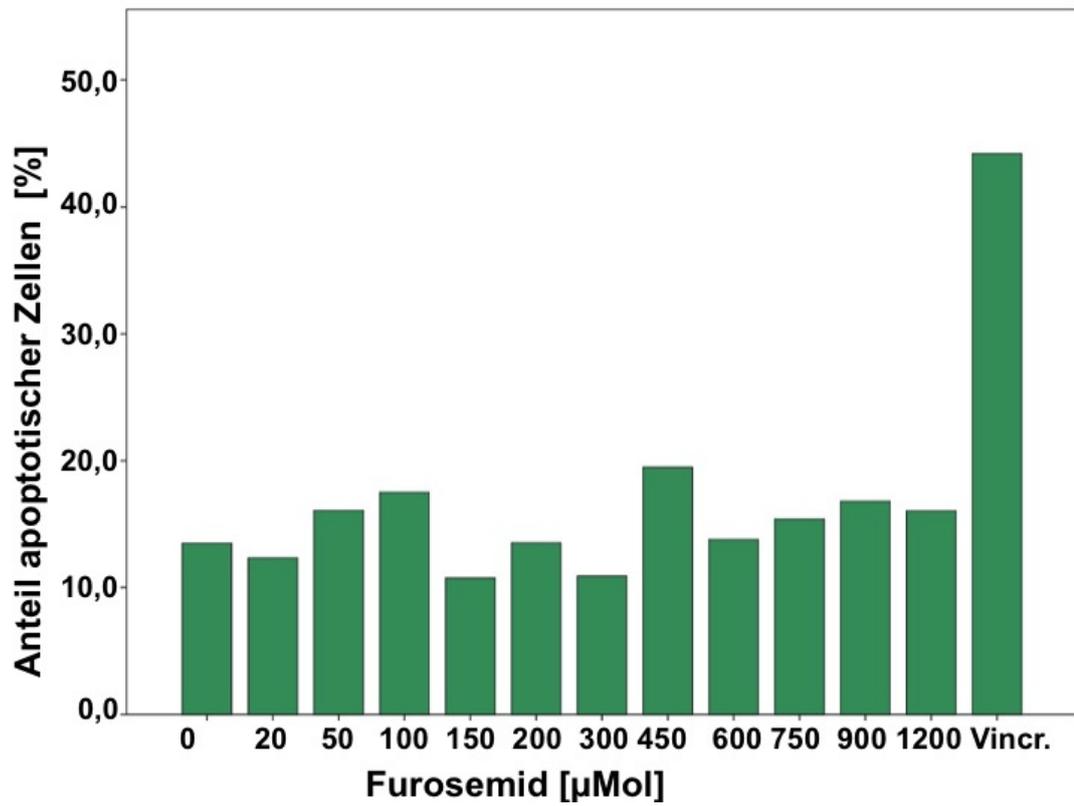


Abbildung 4.12.: Nicoletti-Apoptose-Assay. (Positiv-Kontrolle mittels Vincristin). Dargestellt wird der Anteil apoptotischer Zellen an der Gesamtpopulation.

weiterhin stets Zellkonglomerate. Diese Beobachtung erklärt zwei Phänomene, die mit dieser Methode beobachtet wurden.

- Im Vergleich mit den Werten aus der CellScreen Analyse zeigte sich eine um etwa 25% geringere Proliferationsrate über 72h (siehe Abbildung 4.13). Die Bildung von Konglomeraten (die in etwa 25% der Gesamtzellzahl gebunden hätten) erklärt evtl. diesen Effekt bei sonst sehr ähnlichen Versuchsbedingungen.
- Das vereinzelte Auflösen dieser Konglomerate durch das Pipettieren auf die Neubauer-Zählkammer kann (zumindest teilweise) die stark schwankende Amplitude der Standardabweichungen erklären.

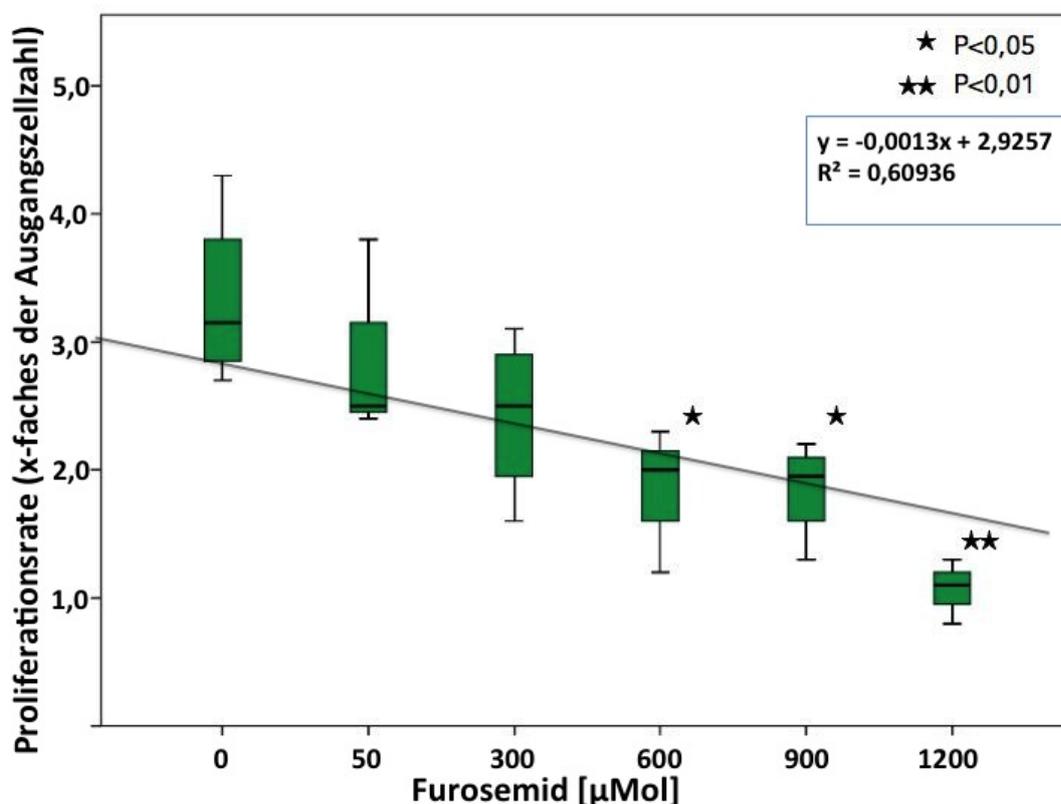


Abbildung 4.13.: Zellproliferationsrate von A549- Zellen nach 72h unter sechs ansteigenden Dosen Furosemid, n=3-4; manuelle Zählung in der Neubauerkammer; Im Nährmedium wurden Antibiotika verwendet.

Dennoch zeigen die erhobenen Daten eine Tendenz mit einer negativen Korrelation zur verwendeten Furosemiddosis mit r^2 -Werten von 0,609 für A549-Zellen (Die Korrelation

zwischen Furosemid und Zellproliferation entsprach unter unseren Versuchsbedingungen $y = -0,0013x + 2,9257$). Bei Furosemidkonzentrationen $\geq 600 \mu\text{mol/L}$ zeigt sich keine Proliferation mehr, mit minimal 1,08 bei einer ungehemmten Grund-Proliferationsrate von ca. 3,3 in 72h. Auf Grund dieser Vorversuche erweiterten wir unsere Methodik um das CellScreen verfahren, das auch für adhärenzte Zellen validiert ist.

Vergleichbare Ergebnisse mit einer etwas breiteren Schwankung der individuellen Werte konnte auch an RLE-6TN Zellen gezeigt werden.

4.4.2. CellScreen

In Abbildung 4.14 sind die Mittelwerte $\pm 2\text{SE}$ der CellScreen-Analyse dargestellt. Es zeigt sich die erwartete Abnahme der Proliferationsrate².

Abbildung 4.15 zeigt die Proliferationsrate bezogen auf die initial bewachsene Fläche nach 24h, 48h, 72h 96h und 120h. Angedeutet zeigt sich die zu erwartende sigmoidale Wachstumskurve. Zwischen 72h und 96h ist die Steigung der Graphen am größten, daher wurden für die statistische Analyse die Proliferationsraten nach 96h und nicht nach 120h herangezogen, um die Beeinflussung der Messung durch weitere Variablen (z.B. Wachstumsinhibition durch Zellkontakt und Übergang in ein isoprismatisches Epithel) zu vermeiden.

Um den Effekt von Furosemid in systemisch wirksamen Plasmakonzentrationen zu erfassen wurden zusätzliche Versuche durchgeführt. Als Furosemidkonzentration wurde $20 \mu\text{mol/L}$ gewählt. Dies entspricht der Größenordnung der Peak-Plasmakonzentration beim Erwachsenen. Die Graphik 4.16 zeigt den Effekt von Furosemid auf die Proliferationsrate nach 24h bzw. 48h. Die Proliferationsrate/24h zeigte eine Reduktion von $1,83 \pm 0,50$ auf $1,62 \pm 0,43$. Durch die große Anzahl von Einzelmessungen ($n=120$) zeigte sich dieser Unterschied von 11,5% bereits nach 48h hochsignifikant, so dass auf eine Versuchsfortführung über die geplanten 120h verzichtet wurde.

²CellScreen-Daten lassen eine Aussage über die bewachsene Fläche im untersuchten Well zu. Da bei den gewählten Versuchsbedingungen die Zellen über 5d/120h nicht konfluent wuchsen, d.h. keine isoprismatische Epithelschicht ausbildeten und die Ausgangsmessungen an adhärenzten Zellen durchgeführt wurden, gehen wir von einer starken Beziehung von bewachsener Fläche zur Proliferationsrate aus.

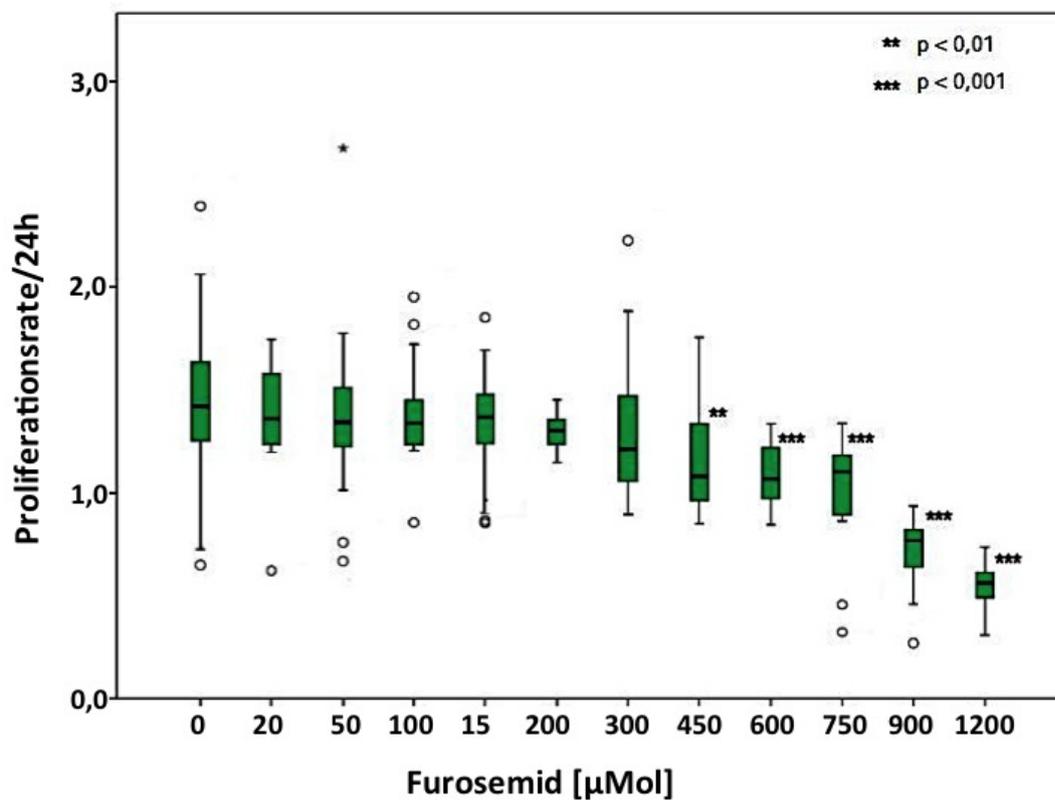


Abbildung 4.14.: Proliferationsrate bestimmt mittels CellScreen nach 96h unter 12 sukzessive ansteigenden Dosen Furosemid, n=32. Dargestellt ist die mittlere Proliferationsrate /24 Stunden nach einer Wachstumsdauer der Zellen von 96 Stunden

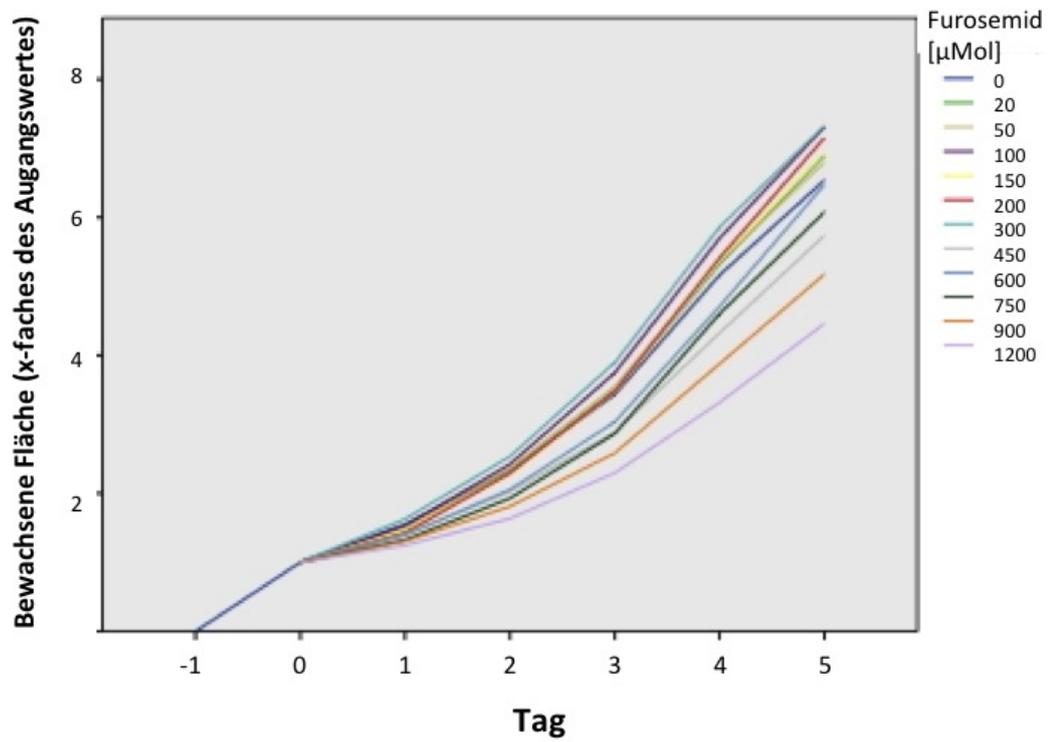


Abbildung 4.15.: Proliferationsraten über fünf Tage in Abhängigkeit von der verwendeten Furosemidkonzentration

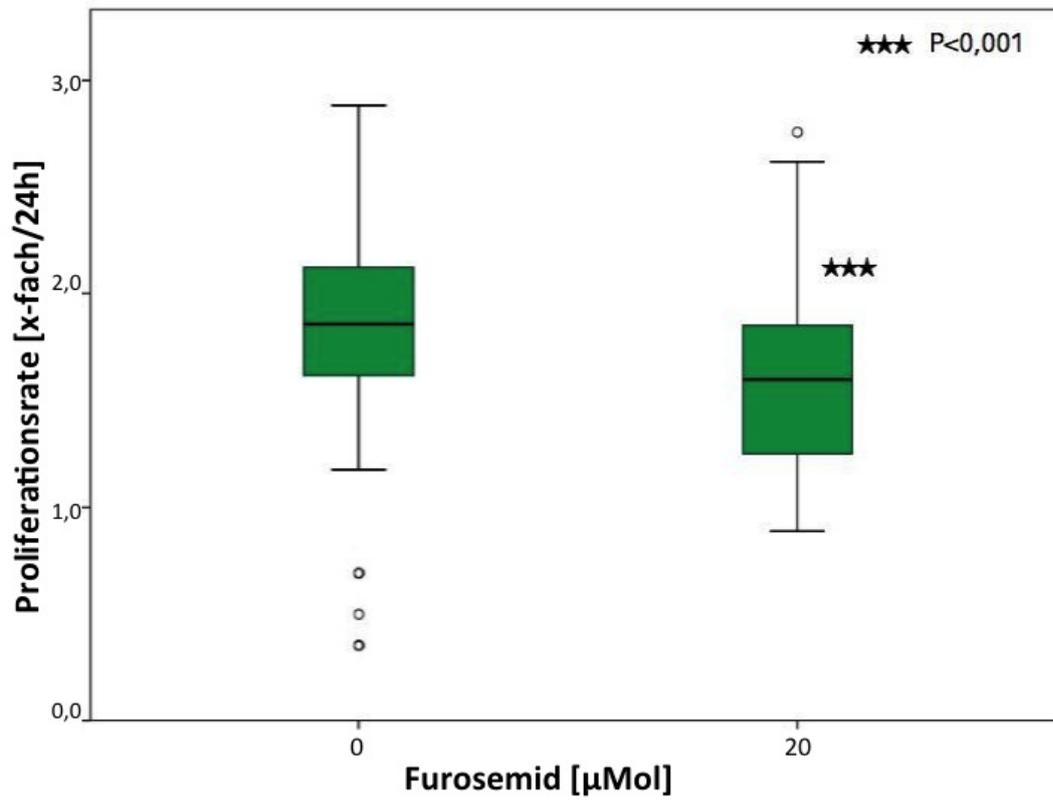


Abbildung 4.16.: Proliferationsratenänderung durch 20 $\mu\text{mol/L}$ Furosemid. Um den Effekt nachweisen zu können, wurden insgesamt 240 Messungen ($n=120$) nach 48h durchgeführt.

Furosemid	Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
				Untergrenze	Obergrenze
20	0,045	0,061	1,000	-0,16	0,25
50	0,51	0,061	1,000	-0,16	0,26
100	0,53	0,061	1,000	-0,16	0,26
150	0,99	0,061	1,000	-0,11	0,31
200	0,191	0,061	0,138	-0,02	0,40
300	0,124	0,061	1,000	-0,08	0,33
450	0,245	0,061	0,006	0,04	0,45
600	0,340	0,061	0,000	0,13	0,55
750	0,413	0,061	0,000	0,20	0,62
900	0,707	0,061	0,000	0,50	0,92
1200	0,875	0,061	0,000	0,67	1,08

Tabelle 4.1.: Bonferroni korrigierter Untergruppenvergleich der Proliferationsraten unter 11 ansteigenden Furosemidkonzentrationen verglichen mit der Kontrollbedingung Furosemid = 0^{mmol}/L. Signifikant sind Intervalle die die 0 nicht einschließen.

5. Diskussion

5.1. Wertung der erhobenen Daten

5.1.1. Proteinexpression

Wir konnten in Zelllysaten von Lungeneithelien (A549- und RLE6TN-Zellen) die Expression des NKCC1-Cotransporters nachweisen (siehe z.B. Abbildung 4.2). Zudem konnten wir eine zunehmende Phosphorylierung des NKCC1 unter steigenden Furosemidkonzentrationen beobachten (Abb. 4.3). Dies spricht für eine Gegenregulation durch zunehmend stärkere Phosphorylierung des NKCC1- Cotransporters unter zunehmender Blockade durch Furosemid.

Im Abschnitt 1.1.4 wurden Regulationsmechanismen des NKCC-Cotransporters dargestellt, die spezifische Phosphorylierung im C-Terminus des Moleküls ist besonders bedeutsam. Die Phosphorylierung des NKCC1 (P-NKCC1) korreliert direkt mit der Aktivität des Cotransporters und seiner Ionentransportkapazität.^{29,40} Wir gingen in der aktuellen Untersuchung von einem direkten Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und Aktivitätszustand aus. Eine indirekte Messung der Cotransporteraktivität über die Messung der Ionenkonzentrationen wurde von uns nicht durchgeführt. Die von uns beobachteten steigenden Werte für P-NKCC1 (mittels R5-Antikörper) unter steigenden Furosemidkonzentrationen könnten auf drei Mechanismen beruhen.

- Eine vermehrte Expression von NKCC1 bei unverändertem Anteil an phosphoryliertem Cotransporter und unveränderter Zellzahl kann zu erhöhten absoluten Werten von P-NKCC1 führen.
- Eine theoretische verstärkte Zellproliferation durch Furosemid könnte durch eine Erhöhung der Gesamtzellzahl und damit an exprimierten NKCC1-Molekülen ebenfalls zu erhöhten absoluten P-NKCC1-Werten in unserem Setting führen.
- Eine Steigerung der intrazellulären Phosphorylierung des NKCC1 und damit ein wachsender relativer Anteil aktiver Cotransporter.

Auf Grund unserer Ergebnisse scheinen die ersten Erklärungsansätze wenig wahrscheinlich. Die ebenfalls in Abbildung 4.3 aufgetragenen Werte für Immunoblots mit dem Antikörper T4¹ zeigen für steigende Furosemidkonzentrationen eine tendenziell geringere Expression des Gesamt-NKCC1. Dieser Effekt lässt sich zumindest teilweise durch die in den folgenden Teilversuchen nachgewiesene Proliferationshemmung begründen. Ein zusätzlich spezifischer Effekt auf die Expression des Cotransporters durch Furosemid lässt sich jedoch nicht ausschließen.

In anderen Zellsystemen führt die Blockade des NKCC1 durch Schleifendiuretika zu Veränderungen im Nettoionenstrom über die Zellmembran, insbesondere verringert sich die intrazelluläre Chloridkonzentration $[Cl]_i$.⁴⁰ Wir gehen daher davon aus, dass sich auch bei Lungenepithelien unter unseren Versuchsbedingungen $[Cl]_i$ verringert².

Die Messungen wurden stets 96h nach primärer Aussaat von 500000 Zellen pro Well durchgeführt. Eine Zunahme des P-NKCC1 Signals ohne Zunahme des T4-Signals in Anbetracht der nachfolgend beschriebenen verminderten Zellproliferation lässt demnach lediglich den Schluss zu, dass A549 Zellen unter Blockade des NKCC1 versuchen die verringerte intrazelluläre Chloridkonzentration durch vermehrte Aktivierung des Transporters zu kompensieren. Verringerte intrazelluläre Chloridkonzentration führt in sekretorischen Epithelien unabhängig von der Ursache zu einer vermehrten Phosphorylierung und Aktivierung des NKCC1.^{39,40,60} Eine Messung der Gesamtproteinkonzentration in den untersuchten Proben bzw. eine Normierung auf ein Housekeeping Protein gelang nicht in ausreichend vielen Proben. Die mögliche Erklärung einer Verminderung der Zellkonzentration durch Furosemid bis zum Zeitpunkt der Lysierung konnte daher nicht endgültig bestätigt werden.

Die bisher bekannten Daten und unsere Ergebnisse aus Abschnitt 4.4.2 weisen auf eine deutliche Proliferationsinhibition hin. Daher ist für uns eine tatsächlich gesteigerte Phosphorylierung der NKCC1-Cotransporter die wahrscheinlichste Erklärung.

normierte Phosphorylierung

Um die Veränderungen in der Phosphorylierung besser bewerten zu können setzten wir die Immunfluoreszenzsignale der beiden Antikörper (R5/T4) ins Verhältnis. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurden stets aus jeder Probe zeitgleich zwei Gelelektrophoresen mit anschließendem Immunoblotting durchgeführt. Einzig die primären und

¹Der T4-Antikörper bindet spezifisch an NKCC1 Cotransporter unabhängig vom Phosphorylierungsstatus des Moleküls

² $[Cl]_i$ wird nicht nur durch die Aktivität des NKCC1-Cotransporters bestimmt, andere Mechanismen können in erster Näherung jedoch vernachlässigt werden

korrespondierenden sekundären Antikörper unterschieden sich.

In unseren Versuchen steigt die R5-Antikörperbindung mit steigenden Furosemidkonzentrationen im Nährmedium. Die Bindung von R5-Antikörpern ist spezifisch für die aktivierte Form des NKCC1,²⁸ eine artifizielle Dephosphorylierung wurde nach Möglichkeit durch konsequentes arbeiten auf Eis und die Zugabe von Calyculin A zum Lysepuffer verhindert. Der von uns beobachtete Anstieg des Anteils des phosphorylierten NKCC1 ist konsistent mit den bisher publizierten Daten zur NKCC1-Phosphorylierung in sekretorischen Epithelien.^{28,37,39,60}

Die unter Abbildung 4.4 dargestellten Veränderungen sprechen daher für eine gegenregulatorisch verstärkte Phosphorylierung und damit Aktivierung des NKCC1 unter steigenden Furosemiddosierungen bei A549 Zellen. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang konnte auf Grund der technisch bedingten großen Streuung bei geringen Versuchszahl (n=4) nicht hergestellt werden. Die Werte zeigten insbesondere unter hohen Furosemiddosen eine relativ starke Streuung $5,17 \pm 5,17$ (0,83-11,52)-fache Intensität unter $1200 \mu\text{mol/l}$ im Vergleich mit der Kontrollbedingung.

5.1.2. Immunhistologie

Durch Fluoreszenz- und Konfokal-Mikroskopie konnten wir NKCC1 in den untersuchten Zellen nachweisen und die Verteilung des Cotransporters innerhalb der Zellkompartimente bestimmen. Wie erwartet und in anderen Geweben bereits nachgewiesen, ist die bevorzugte Lokalisation im Bereich der basolateralen Zellmembran bei polarisierten Zellen. In den Randbereichen der Präparate konnten einige Einzelzellen untersucht werden. Da diese Zellen noch keine Polarisierung in apikale und basolaterale Membranbereiche entwickelt haben, zeigte sich hier auch nur ein relativ unspezifisches Verteilungsmuster mit Membranbetonung.

In Abbildung 4.6 ist im Präparat und schematisch die klassische Ring- / Wabenform in mittlerer Höhe der kubischen Zellen dargestellt. Die basalen Schnitte zeigen eine starke Färbung mit vielen aneinanderliegenden Bändern. Dies beruht vermutlich auf der stark interdigitierenden Wachstumsweise in den basalen Abschnitten epithelialer Zellen. Apikal ist die Signalintensität in der Regel gering und lässt sich nicht eindeutig bestimmten Zellstrukturen zuordnen.

Wir beobachteten deutliche Schwankungen in der Qualität der Präparate in Abhängigkeit vom verwendeten primären Antikörper. Die eindeutigsten Bilder konnten mit den Antikörpern TEF-S1 und T84 gemacht werden. Der Antikörper R5 zeigte ebenfalls noch ein basolaterales Expressionsmuster, allerdings fand sich hier eine stärkere unspezifische

Anfärbung der intrazellulären Bereiche. Deutlich weniger geeignet für die Immunhistologie zeigte sich der Antikörper T4.

Auffallend waren zudem in den mit R5 markierten Präparaten zufällig verteilte Zellen mit einer speziellen Morphologie, die ein erheblich stärkeres Signal zeigten. Im Phasenkontrastbild zeigten sich bei diesen Zellen die typischen Zeichen der Mitose: Abkuglung der Zellmembran und eine Fragmentation des Zellkern in einzelne Chromosomen. Die verstärkte Signalintensität zeigte sich in nahezu allen Mitosephasen. In der Konfokalmikroskopie war insbesondere der Bereich der Kernmembran signalintensiv. Dieser Effekt beruht vermutlich auf einer Kreuzfärbung mit einem oder mehreren anderen Proteinen, die eventuell während der Mitose strukturelle Ähnlichkeiten mit dem phosphorylierten NKCC1 aufweisen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ergibt sich durch die Beobachtungen von Maglova et al,⁶³ in dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang von zellzyklusmodifizierenden Ereignissen wie z.B. einer CMV-Infektion und einer verstärkten perinukleären NKCC1-Lokalisation gefunden werden.

Es könnte demnach sein, dass wir mittels der R5-Markierung der Kernmembran erstmals den Nachweis einer Zell-zyklus-spezifischen Aktivierung des NKCC an der Kernmembran erbracht haben. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich.

5.1.3. FACS

Unter Furosemid zeigten sich in der FACS-Analyse wie in Abschnitt 4.3.1 dargestellt, die erwarteten Verschiebungen im Anteil der Zellen die sich in der G₁- bzw. in der G₂-Phase befanden. Panet postulierte, dass der Furosemideffekt insbesondere vor dem Übergang in die DNA-Synthesephase stattfindet. So zeigte sich z.B. bei synchronisierten Fibroblasten mit einer G₁-Phasendauer von ca. 8h ein Furosemideffekt nur bis zu 6h nach Zugabe der Mitogene.⁶⁸ Unter der Vorstellung, dass in natürlichen Geweben keine stark synchronisierte Proliferation vorliegt, untersuchten wir die Auswirkungen von Furosemid auf eine willkürlich verteilte Population von A549-Zellen. Im Gegensatz zu den von Panet publizierten Versuchen verzichteten wir in unserem Versuchsaufbau daher auf die Synchronisation der Zellen und verlängerten stattdessen die Untersuchungsdauer.

Unsere Hypothese, dass auch in Lungenepithelien unter Furosemid ein geringerer Anteil der Zellen in die G₂-Phase mit verdoppelter DNA-Menge übergeht, konnte bestätigt werden (vgl. Abb. 4.11). Entsprechend stieg der Anteil der Zellen die sich in der Ruhephase G₀- oder in der G₁-Phase befand. Dieser Effekt zeigte sich bereits bei geringen Furosemidkonzentrationen., einen signifikanten Unterschied konnten wir allerdings für keine Wirkstoffkonzentration nachweisen. Dies beruht auf der großen Streuung der Mess-

werte. Da unter allen 11 Messbedingungen ein gleichgerichteter Effekt zu beobachten ist (Geringerer Anteil an Zellen in G_2 mit entsprechend höherem Anteil von Zellen in G_1) und eine Zunahme dieses Effekts mit steigenden Konzentrationen zu beobachten war, werten wir unsere Ergebnisse als Bestätigung der Verschiebungen des Zellzyklus unter Furosemid.^{68,72}

5.1.4. Proliferation

Wir verwendeten zwei Methoden um die Proliferationsrate unter verschiedenen Furosemidkonzentrationen zu bestimmen. Als erste Untersuchungsmethode wählten wir die direkte Zellzählung in der Neubauer Zählkammer. Aufgrund der unter 4.4.1 und im Anhang unter A.1 und A.2 dargestellten Schwächen der Methode wählten wir die technisch aufwändigere, ebenfalls zeitintensive aber exaktere Messung mittels CellScreen⁹⁹ für unsere adhärent wachsenden Zellen.

Bereits in der einfachen Messvariante in der Neubauer-Zählkammer zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt von Furosemid auf die Proliferation der von uns verwendeten Zellreihen (Sowohl A549- als auch RLE6TN- Zellen wurden mit dieser Methode untersucht, die Daten zur Zellreihe RLE6TN sind im Anhang unter A.1 dargestellt). Bereits bei 50 mmol/L bzw. 300 mmol/L zeigte sich eine geringere Proliferationsrate der A549-Zellen als unter der Kontrollbedingung. Ab 600 mmol/L sank die Proliferationsrate signifikant, die lokal erreichbare maximale Konzentration von 1200 mmol/L ⁶²⁷ führte zu einer Veränderung auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$.

Die manuelle Zählung von Epithelzellen mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop bietet verschiedene Schwierigkeiten (vgl. 4.4.1). Adhärent wachsende Epithelzellen lassen sich nur schwer separieren, selbst bei exakt eingehaltenen Versuchsbedingungen sind die mikroskopischen Messungen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer artefaktanfällig. Zum einen konnten wir häufig Zellkonglomerate beobachten, eine Zählung der einzelnen Zellen unterschätzte damit die tatsächlich vorhandene Zellzahl. Zum anderen beobachteten wir in einzelnen Messreihen lysierte/ apoptische Zellen insbesondere bei höheren EDTA-Konzentrationen und nach intensivem Vortexen. In diesen Messreihen wurde die tatsächliche Zellzahl ebenfalls unterschätzt. In mehreren Arbeiten wurde eine Interaktion des NKCC1 mit dem Zytoskelett^{38,39} beschrieben, eine Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens der Zellen durch Furosemid und damit der Proliferationszahlen scheint daher zumindest möglich.

Die CellScreen-Methode hat bei den von uns verwendeten Lungenepithelzellen unterschiedliche Vorteile. Die beschriebenen Probleme der Zellseparierung entfallen komplett,

da die Zellen nicht invasiv in intakten Zellrasen untersucht werden. Zudem ist die Messung nahezu vollständig automatisiert, eine Beeinflussung durch den Untersucher ist damit nahezu vollständig ausgeschlossen. Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit die Versuchsanzahl deutlich zu erhöhen. Die Ergebnisse der direkten Zellzählung in der Neubauerkammer wurde an 4-6 Versuchsreihen mit fünf verschiedenen Furosemidkonzentrationen durchgeführt. Mit der CellScreen-Methode konnten wir die Versuchsanzahl auf $n=32$ und die Anzahl der untersuchten Furosemidkonzentrationen auf 11 erhöhen.

Wir führten insgesamt Messungen zu fünf Zeitpunkten durch, eine Ausgangsmessung 24h nach Aussaat der Zellen und vier Messungen im Abstand von je 24h. Hierdurch konnte eine Wachstumskurve über einen Zeitraum von 120h erstellt werden. Die hier dargestellten Messergebnisse wurden im exponentiellen Bereich der Wachstumskurve erstellt. Nach einem Zeitraum von mehr als 120 Stunden wurde wiederholt eine Reduktion der Proliferationsrate auf Grund von Konfluenz der Zellrasen beobachtet.

Ein Problem der CellScreen-Methode besteht in der Morphologie der Zellen. Einzelne Zellen beider Zellreihen belegen eine große Bodenfläche (ähnlich einem Spiegelei), Zellen in einem Zellrasen zeigen wie z.B. in Abbildung 4.6 kubische/ zylindrische Form. Dies führt zu einer höheren Zellzahl und geringerer Berührungsfläche der einzelnen Zelle mit dem Boden. Durch diesen Effekt wird die tatsächliche Proliferationsrate eher unterschätzt.

Die Ergebnisse der CellScreen-Methode fielen noch deutlicher aus als in den Versuchen mit manueller Zellzählung. Es zeigt sich beim Vergleich von 12 verschiedenen Versuchsbedingungen in der statistischen Analyse mit Bonferoni-Korrektur ein signifikanter Effekt ab $450^{\text{mmol/L}}$, ab $600^{\text{mmol/L}}$ sogar auf einem Niveau von $p<0,001$. Damit konnten wir einen dosisabhängigen proliferationshemmenden Effekt von Furosemid auf Lungenepithelien nachweisen.

Trotz der exakt eingehaltenen Versuchsbedingungen mussten wir eine große Streuung der Messwerte beobachten (vgl. Abb. 4.14). Dies beruhte unter anderem erneut auf der Neigung der Zellen Konglomerate zu bilden. So wurden in einzelnen Wells der 96-well Platten Zellhaufen beobachtet. Diese verließen erheblich früher den exponentiellen Wachstumsbereich, in diesen wurden dann gehäuft (falsch) niedrige Proliferationsraten gemessen. Dennoch konnten wir unter keiner Furosemidkonzentration eine höhere mittlere Proliferationsrate als in der Kontrollgruppe beobachten. Mit Ausnahme der Furosemidkonzentrationen von 150 und $750^{\text{mmol/L}}$ zeigte sich auch stets die mittlere Proliferationsrate geringer als unter der vorhergehenden niedrigeren Furosemidkonzentration. Daher vermuteten wir eine Wirkung des Furosemid bereits bei niedrigeren Konzentrationen.

nen, insbesondere im Konzentrationsbereich der auch durch die systemische Applikation von Furosemid erreicht werden kann.

Im Vergleich von nur zwei Versuchsbedingungen (20^{mmol}/L Furosemid vs. Kontrolle (pH-Wert korrigiert)) zeigte sich bei insgesamt 240 Messungen (je 120 Messungen pro Bedingung) ein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 4.16) auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$. Dieser proliferationshemmende Effekt im angestrebten Plasmaspiegelsbereich (bei systemischer Therapie), führt zu Implikationen für die klinische Anwendung des Medikaments.

5.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Western-Blot gelang uns der Nachweis von NKCC1 mit Antikörpern gegen den C-Terminalen und den N-Terminalen Bereich des Cotransporters. Zusätzlich waren wir in der Lage mittels des R5-Antikörpers die Phosphorylierungsraten unter den unterschiedlichen Furosemidkonzentration zu messen. Eine Hemmung des NKCC1 durch Furosemid führte zu dosisabhängiger Steigerung des Phosphorylierungsgrades, vermutlich im Rahmen eines Gegenregulationsmechanismus.

Das Fluorescences Activated CellSorting (FACS) zeigte eine Verschiebung des G₁/G₂ Verhältnisses im Sinne einer Sperrung der Zellen in der G₁-Phase und einer Reduktion der Zellen mit doppeltem DNA Material.

Die entscheidenden Messungen wurden mit dem CellScreen-System erhoben. Hier zeigte sich unter steigenden Furosemidkonzentrationen eine dosisabhängige Reduktion der bewachsenen Fläche im Sinne einer Proliferationshemmung. Schlussendlich konnten wir auch bei geringeren Furosemidkonzentrationen (entsprechend therapeutisch angestrebten Plasmaspiegeln) einen hochsignifikanten Effekt von Furosemid auf die Zellproliferation nachweisen.

5.3. Physiologische Bedeutung des NKCC1

In dieser Arbeit wird erstmals der Einfluss von Furosemid auf die Zellproliferation von Alveolarepithelien nachgewiesen. In allen Experimenten konnten die physiologisch zu erwartenden Resultate bestätigt werden:

- Der NKCC1-Cotransporter wird in sekretorischen Alveolarepithelzellen basolateral exprimiert.

- NKCC1 wird im Sinne einer Gegenregulation in Gegenwart von Furosemid stärker phosphoryliert.
- Der Anteil von Zellen in S- oder G₂-Phase sinkt mit steigender Furosemiddosis.
- Die Proliferationsrate sinkt in Abhängigkeit zur verwendeten Furosemidmenge

Die Frage über welchen intrazellulären Mechanismus Furosemid die DNA-Synthese und damit indirekt die Proliferationsrate senkt, ist weiterhin weitgehend unbeantwortet. Die Beeinflussung des Zellzyklus durch das Zellvolumen ist bereits ausführlich dokumentiert worden.^{23,53} Verschiedene Mechanismen wurden dafür bisher verantwortlich gemacht. Die Bedeutung des NKCC1 für die Zellvolumenregulation über eine Veränderung des $[Cl]_i$ ist ebenfalls ausführlich beschrieben worden.¹⁵ Die logische Verknüpfung der beiden Prozesse ist naheliegend und wurde primär von der Arbeitsgruppe um Panet beschrieben. Der NKCC1-Cotransporter als entscheidender Regulator für die intrazelluläre Chloridkonzentration beeinflusst über diesen Stellwert zusammen mit weiteren Mechanismen das Zellvolumen. Für die erfolgreiche Einleitung einer Zellproliferation sind viele Faktoren notwendig, hormonelle Stimulation oder Inhibition, intrazelluläre Energievorräte und eben auch das Zellvolumen.

Noch muss man folgenden Zusammenhang als Hypothese formulieren:

Wird durch Furosemid die Funktion des Cotransporters eingeschränkt, führt dies zu einer verringerten intrazellulären Chloridkonzentration, dies führt zu geringerem Zellvolumen oder zumindest zu einer verringerten Fähigkeit der Einzelzelle das eigene Volumen zu vermehren. Damit ist auf zellulärer Ebene ein geringeres Proliferationspotential vorhanden, dies führt zu den in unserer Arbeit beschriebenen Effekten.

5.4. Kritik an den Ergebnissen und Ausblick

Einige der hier dargestellten Ergebnisse würden sich ebenfalls durch eine erhöhte Apoptoserate unter Furosemid erklären lassen. Ein spezifischer Apoptosetest (Nicolleti-Assay) zeigte keine relevanten Veränderungen in der Apoptoseneigung, für eine statistisch signifikante Aussage müsste jedoch eine erheblich größere Anzahl an Experimenten durchgeführt werden. In verschiedenen publizierten Untersuchungen konnte keine gesteigerte Apoptoserate, selbst unter hohen Furosemidkonzentrationen, nachgewiesen werden.^{45,63} Die verwendeten A549-Zellen zeigten auch bei hohen Furosemidkonzentrationen in den hier demonstrierten Versuchen keine mikroskopischen Anzeichen einer gesteigerten Apoptoserate.

In unseren Ergebnissen konnten wir einen ausgeprägten Effekt von Furosemid auf die Zellproliferation in Lungenepithelzellen demonstrieren. Dieser Effekt wurde bereits von mehreren anderen Arbeitsgruppen in anderen Geweben gezeigt, allerdings beruhten deren Schlussfolgerungen allein auf indirekten Zeichen der Zellvermehrung oder der Zählung von in Suspension gebrachten Zellen. Wir konnten als Erste direkt die proliferationshemmende Wirkung an adhärent wachsenden Epithelzellen nachweisen. Auch der Nachweis einer veränderten Phosphorylierung im Sinne einer variablen Cotransporter Aktivierung gelang uns. Damit lassen sich die beobachteten Effekte direkt mit einer relevanten und vermutlich ebenfalls unter physiologischen Bedingungen vorliegenden Bedeutung des NKCC für den Zellzyklus in Verbindung bringen.

Die Effekte, die wir bei der Verwendung des Lösungsmittels DMSO (siehe Abschnitt 3.1.3) beobachteten, betonen die Wichtigkeit detaillierten wissenschaftlichen Arbeitens. Ohne die Verwendung zweier unterschiedlicher Konzentrationen und des Lösungsmittels als Kontrolle hätten wir einen erheblich ausgeprägteren Effekt beobachtet und diesen dem Furosemid zugeordnet. Im Rückblick scheint es wünschenswert wenn auch in Publikationen die Bezeichnung „control“ klar definiert würde. Der einzige weitere Bestandteil der von uns verwendeten Furosemidlösung ist NaHCO_3 , unseren Kontrollen wurde daher stets mit Medium kultiviert, dessen pH-Wert durch NaHCO_3 korrigiert wurde.

Unsere Arbeit ist eine reine in-vitro-Untersuchung. Die standardisierte Untersuchung ermöglichte neue Erkenntnisse, jedoch bedingt dies auch den aus unserer Sicht wichtigsten Kritikpunkt an unserer Arbeit. Ob die von uns dargestellten Effekte auch in vivo auftreten muss durch weitere Experimente bestätigt werden. Ein weiterer Kritikpunkt ist die Verwendung einer immortalen Zellreihe aus einer Lungencarcinommetastase eines Erwachsenen. Fetale Lungenepithelzellen werden möglicherweise ein unterschiedliches Proliferationsverhalten zeigen, insbesondere werden Punkte wie Maturität, hormonelle Einflüsse und Stoffwechsellage von unserem idealisierten Modell abweichen.

In unseren Versuchen wurden die Zellen stets mit einer konstanten Furosemidkonzentration in der Umgebung untersucht. In Patienten werden sich die Plasmakonzentrationen über die Zeit ändern, jedoch ist zu vermuten dass auf Grund der verlängerten Halbwertszeit in Abhängigkeit von Gestationsalter und postnatalem Alter die Schwankungen geringer sind als bei adulten Patienten.^{3,78}

Ob die an den von uns verwendeten Zellarten nachgewiesenen Effekte in vergleichbarer Weise beim Frühgeborenen auftreten ist somit unklar. Der nächste offensichtliche Schritt ist nun, fetale und neonatale Alveolarepithelien eines Tiermodells zu untersuchen. Können unsere Ergebnisse auch dort bestätigt werden ist es aus unserer Sicht fragwürdig

ob weitere Versuche an neonatologischen Patienten mit Furosemid durchgeführt werden können.

Der Nachweis eines negativen Effekts auf das Wachstum scheint durch die Untersuchung von Wachstumsparametern bei pädiatrischen Patienten unter dauerhafter Diuretikatherapie möglich.

5.5. Klinische Implikationen

Uns war es bei Planung und Durchführung dieser Arbeit wichtig eine Frage mit klinischer Relevanz zu beantworten. Schleifendiuretika gehören zu den gängigen Medikamenten der modernen Medizin, sowohl in der Behandlung chronischer (z.B. Herzinsuffizienz), als auch akuter Erkrankungen (z.B. Lungenödem) sind sie eine Säule der Therapie. Auch in der Behandlung des kranken Neu- und Frühgeborenen gehört Furosemid zu den am häufigsten eingesetzten Medikamenten.¹⁶

In der Asthmatherapie werden Inhalationen mit Furosemid therapeutisch eingesetzt. Es werden zwei Wirkungen beschrieben, zum einen die rasche aber nur kurzanhaltende Verbesserung der Lungenfunktion durch den geringeren Wassergehalt des Lungenparenchyms und der verringerten Diffusionsbarriere. Der zweite und relevantere Effekt ist die Reduzierung der Häufigkeit bronchokonstriktiver Episoden. Neben der Beeinflussung der lokalen Cytokinausschüttung durch Furosemid ist eine gehemmte Proliferation glatter Muskelzellen ein Erklärungsansatz zur beobachteten Wirkung.⁷⁹

Ein biologisches Charakteristikum des menschlichen Neu- und Frühgeborenen ist das hohe physiologische Wachstumspotential im Sinne einer hohen Zellproliferationsrate. Frühgeborene sind durch die notwendigen intensivmedizinischen Maßnahmen vielen Stressfaktoren ausgesetzt. Hierzu gehören mechanische Beatmung, höhere Sauerstoffspannung in den Geweben, enterale und parenterale Ernährung und sensorische Stimulation. Viele dieser Faktoren beeinflussen auch das Wachstum und die Zellproliferation. Der Einsatz proliferationshemmender Medikamente wie z.B. Furosemid kann zu schlechterem Gedeihen und Dysfunktion einzelner Organsysteme führen.

Insbesondere die Lunge des kranken Neonaten ist empfindlich gegenüber den eben beschriebenen Faktoren (siehe Abschnitt 1.3). Bis zur Einführung der Surfactant-Therapie war in der Regel die pulmonale Dysmaturität der limitierende Faktor in der Neonatologie. Durch Surfactant und zunehmend schonendere Ventilationsverfahren konnte die pulmonal bedingte Mortalität relevant gesenkt werden. Sowohl die invasive als auch die nicht-invasive Beatmung extrem unreif geborener Frühgeborener führt jedoch weiterhin

zu Umbau und Reparationsprozessen im Lungenparenchym. Die überlebenden extrem unreif geborenen Frühgeborenen haben häufig pulmonale Erkrankungen, die relevanteste hierunter ist die Bronchopulmonale Dysplasie.⁸⁴

Die Prävention und Therapie der Bronchopulmonalen Dysplasie ist eine der großen Herausforderungen der Neonatologie und Pädiatrie. In den kommenden Jahrzehnten wird diese Erkrankung auch in vermehrtem Maß die Innere Medizin und andere Bereiche beschäftigen. Unter den unter 1.3 genannten Therapiemöglichkeiten wird insbesondere der Einsatz von Diuretika widersprüchlich diskutiert. Durch die Gabe von Schleifendiuretika, z.B. von Furosemid konnten (kurzfristige) Erfolge erreicht werden. Insbesondere die inhalative Therapie mit Furosemid zeigt erstaunlich positive Auswirkungen auf die Atemmechanik und den Sauerstoffbedarf.^{6,11-14} Positive Effekte auf langfristig auftretende Mortalität und Morbidität konnten bisher nicht nachgewiesen werden.^{11,55}

Wir untersuchten in unseren Experimenten die Auswirkungen von Furosemid in Konzentrationen, die bis zu den maximalen in der Bronchoalveolärenlavage gefunden Werten von ca. $1200\mu\text{mol/L}$ reichten.⁶ Da der inhalative Einsatz von Furosemid nicht zur regulären Therapie der BPD gehört sind insbesondere unsere Ergebnisse im Bereich bis 50mmol/L von Bedeutung für die klinische Praxis. Da wir in allen Experimenten die zu erwartende Tendenz und im entscheidenden Experiment zur Zellproliferation einen statistisch signifikanten Effekt beobachten konnten, können wir auf eine bisher wenig beachtete Nebenwirkung von Furosemid hinweisen.

Unsere Ergebnisse legen in rasch proliferierenden Lungenparenchymzellen einen relevanten proliferationshemmenden Effekt durch Furosemid nahe. Unsere Vermutung ist nun, dass der Einsatz von Furosemid bei Frühgeborenen mit relevanter Bronchopulmonaler Dysplasie zu langfristigen Nebenwirkungen führen kann, die bisher nicht in ausreichendem Maß beachtet wurden. Lungengewebe maturiert und entwickelt sich zumindest bis zum Ende des 2. Lebensjahres. Kommt es in dieser Phase zu einer Proliferationshemmung, kann dies langfristig zur Reduktion der pulmonalen Gasaustauschfläche und damit einer Verringerung der pulmonalen Leistungsfähigkeit führen.

Furosemid kommt in der Therapie des unreifen Frühgeborenen insbesondere zu zwei Zeitpunkten in Frage. Zum einen bei bereits bestehender BPD mit prolongiertem Sauerstoffbedarf jenseits der 36. korrigierten Gestationswoche. Hier konnten in den bereits zitierten Cochrane-Analysen keine langfristigen positiven Effekte beobachtet werden. Aus unserer Sicht kann es durch den Einsatz von Furosemid sogar zu weiterer Schädigung der Lunge kommen. Jedoch ist dieser Effekt vermutlich klein, so dass ein Nachweis in klinischen Studien schwierig ist. Zum anderen wird Furosemid häufig in den ersten post-

partalen Tagen im Rahmen akuter Probleme (insbesondere oligurisches Nierenversagen) eingesetzt. Die Bewertung wird durch verschiedene Faktoren erschwert: Das individuelle Risiko für das Entstehen einer relevanten BPD, die verlängerte Plasmahalbwertszeit insbesondere kurz nach der Geburt, hoher Sauerstoffbedarf, etc. Hier scheint die Abwägung der erwünschten Wirkungen (Diurese, Verbesserung der Atemmechanik) gegenüber den potentiellen Nebenwirkungen (Nephrokalzinose, Proliferationshemmung) schwierig. Ein zurückhaltender Einsatz von Schleifendiuretika bei Patienten mit gesicherter Indikation muss überdacht werden und nach Möglichkeit in klinischen Studien untersucht werden.

Mit den Effekten die wir bei niedrigen Dosierungen nachweisen konnten, muss man in letzter Konsequenz auch die chronische Furosemidtherapie bei anderen Erkrankungen neu überdenken. Insbesondere Patienten mit angeborenen Herzfehlern die evtl. durch chronische Hypoxie und reduzierte Gewebsperfusion eine geringere Wachstumstendenz haben, können durch eine evtl. additiv wirkende proliferationshemmende Nebenwirkung des Furosemid noch stärker in ihrer Entwicklung gehemmt werden. Auch in diesem Bereich sind weitere experimentelle und klinische Studien notwendig.

A. Anhang

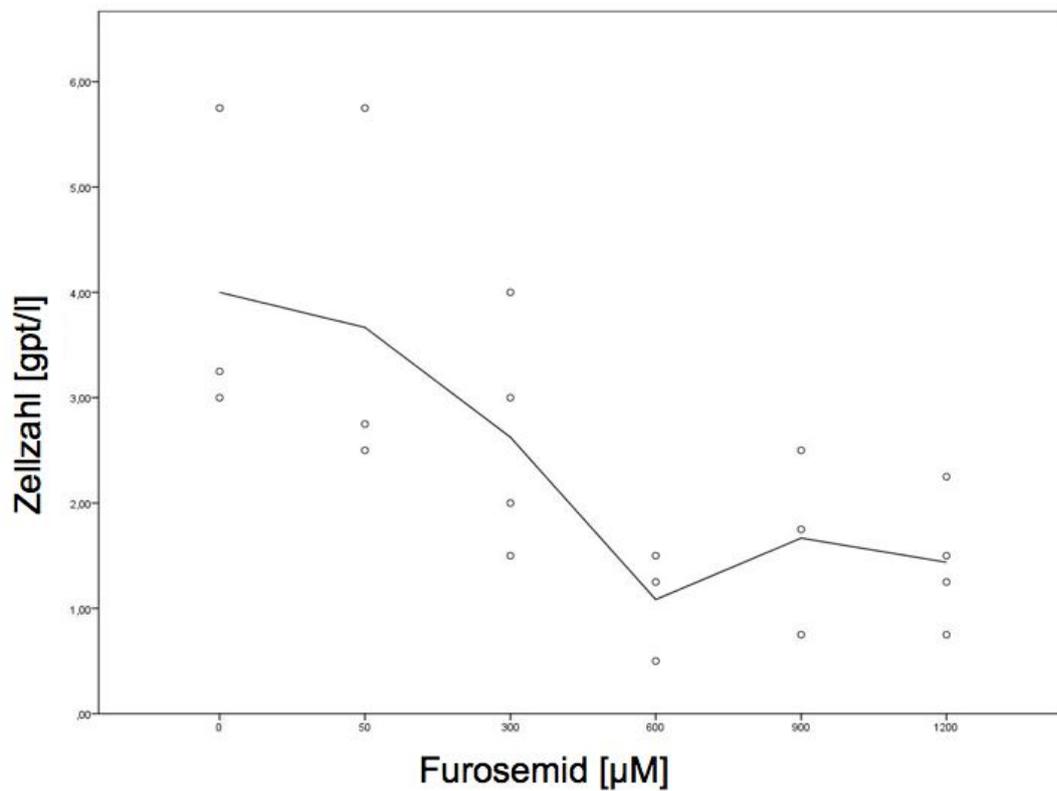


Abbildung A.1.: Proliferationsrate von RLE6TN Zellen über 72h. n= 3-4 nach Elimination von Extremwerten.

Gel	Menge	Substanz
6%-iges Lauf-Gel	1,0ml	30% Poly-Acrylamid
	2,6ml	ddH ₂ O
	1,25ml	Puffer A ^a
	50μl	SDS (20%)
	50μl	APS (10%)
	4μl	TEMED
8%-iges Lauf-Gel	1,3ml	30% Poly-Acrylamid
	2,3ml	ddH ₂ O
	1,25ml	Puffer A
	50μl	SDS (20%)
	50μl	APS (10%)
	3μl	TEMED
10%-iges Lauf-Gel	1,7ml	30% Poly-Acrylamid
	1,9ml	ddH ₂ O
	1,25ml	Puffer
	50μl	SDS (20%)
	50μl	APS (10%)
	2μl	TEMED
Sammel-Gel	0,67ml	30% Poly-Acrylamid
	2,7ml	ddH ₂ O
	0,5ml	Puffer B ^b
	40μl	SDS (20%)
	40μl	APS (10%)
	4μl	TEMED

Tabelle A.1.: Gele für Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

^asiehe Tabelle A.2^bsiehe Tabelle A.2

Puffer	Konzentration	Substanz	pH
Puffer A	3 ^{mol} /L ca. 48ml bis 100ml mit	TRIS HCl 1 ^{mol} /L ddH ₂ O auffüllen	8,9
Puffer B	0,47 ^{mol} /L 25,6ml bis 100ml mit	TRIS H ₃ PO ₄ 1 ^{mol} /L ddH ₂ O auffüllen	6,7
Elektrophoresepuffer (10x)	250 ^{mmol} /L 1,92 ^{mmol} /L 0,02	TRIS Glycin SDS	8,6
Running Buffer	70ml bis 700ml mit	Elektrophoresepuffer (10x) ddH ₂ O auffüllen	
Transferpuffer	100ml 200ml 700ml	Elektrophoresepuffer (10x) Methanol ddH ₂ O	
TBS-Tween (TBS-T)	20 ^{mmol} /L 150 ^{mmol} /L 0,05%	TRIS-HCl NaCl Tween 20	7,5
PBS-Tween (PBS-T)	1l 0,5ml	PBS Tween 20	
TBST + Milchpul- ver	5%	Trockenmilchpulver	in TBS-T
Probenpuffer (4x)	5,1ml 0,8g 0,5ml 4mg 4ml bis 10ml mit	Puffer B für SDS-PAGE SDS (20%) β-Mercaptoethanol Bromophenol-Blau Glycerin ddH ₂ O auffüllen	

Tabelle A.2.: Puffer für Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot.

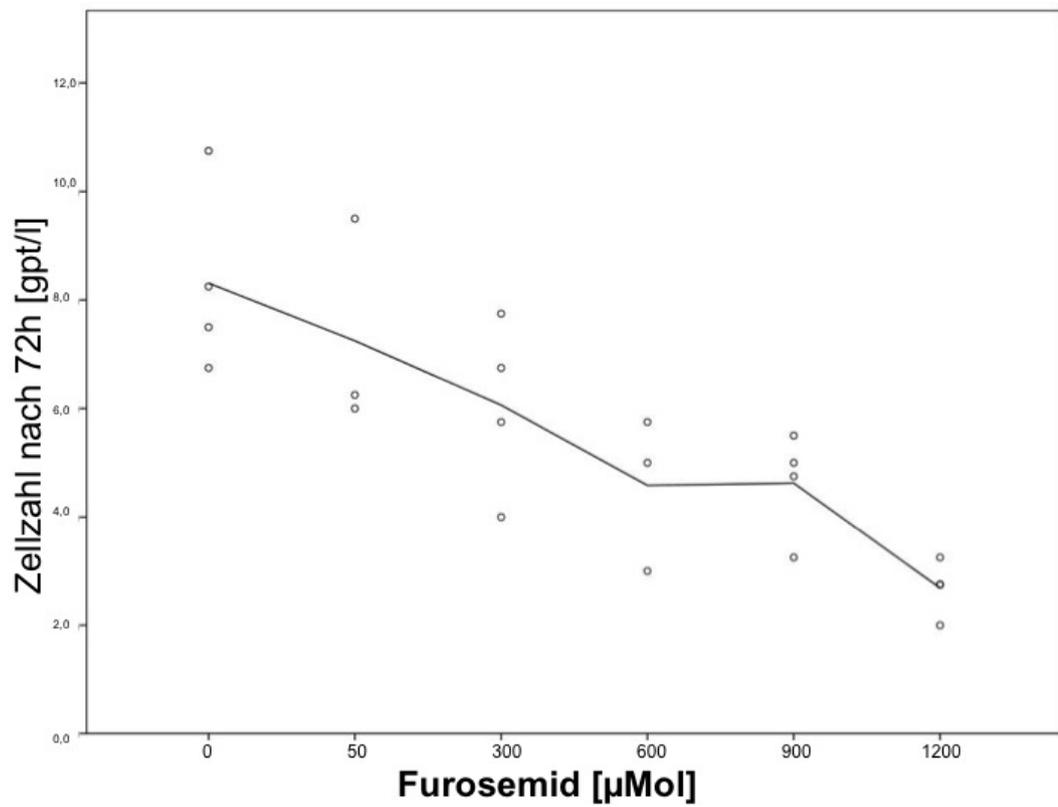


Abbildung A.2.: Proliferationsrate von A549 Zellen über 72h. n= 3-4 nach Elimination von Extremwerten.

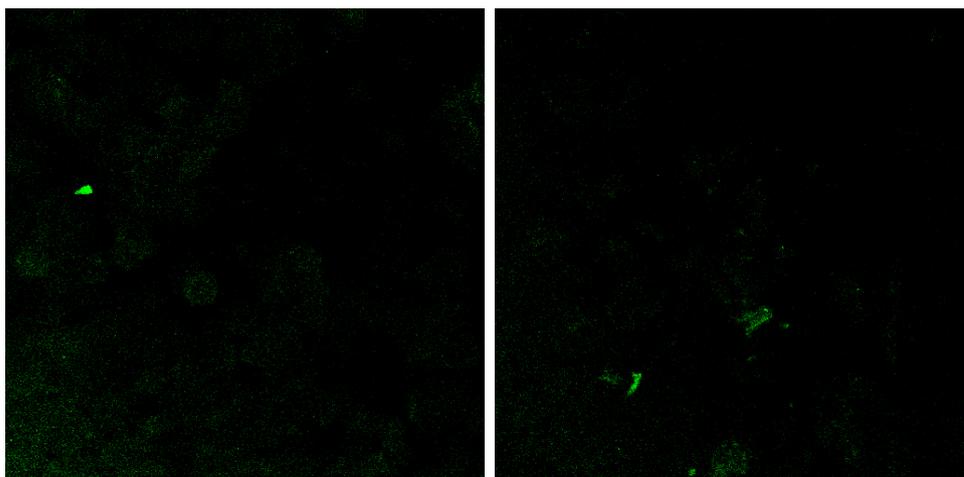


Abbildung A.3.: Negativkontrolle eines Immunhistologischen Präparats. Im linken Bild wurden A549 Zellen, ohne die vorherige Verwendung eines Primärantikörpers, mit Alexa-Fluor Anti-Rabbit Antikörpern markiert. Im rechten Bild wurde nach Inkubation mit R5-Antikörpern kein entsprechender sekundärer Antikörper verwendet. Das Präparat wurde unter meiner Anleitung von Frau Geraldine Jowett im Rahmen ihrer Facharbeit angefertigt.

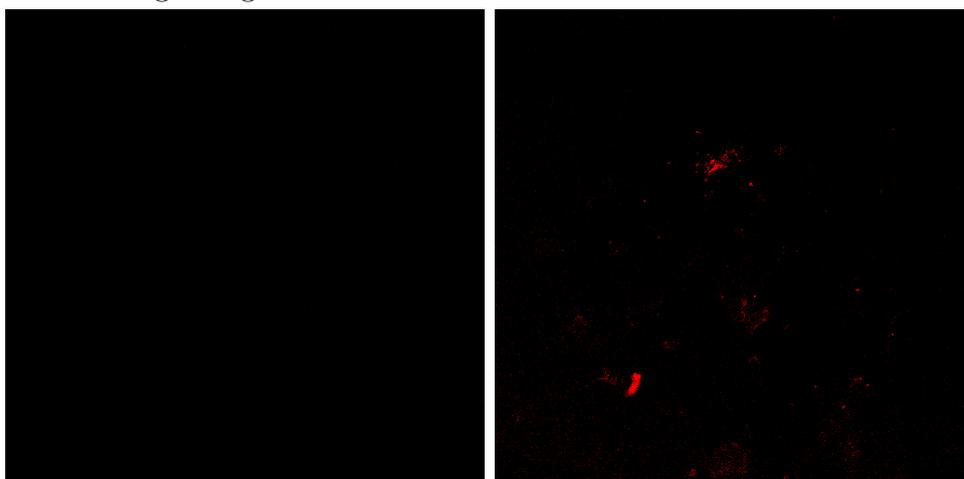


Abbildung A.4.: Negativkontrolle eines Immunhistologischen Präparats. Im linken Bild wurden A549 Zellen, ohne die vorherige Verwendung eines Primärantikörpers, mit Alexa-Fluor Anti-Mouse Antikörpern markiert. Im rechten Bild wurde nach Inkubation mit T4-Antikörpern kein entsprechender sekundärer Antikörper verwendet. Das Präparat wurde unter meiner Anleitung von Frau Geraldine Jowett im Rahmen ihrer Facharbeit angefertigt.

Literaturverzeichnis

- [1] http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2001/press-sv.html
- [2] *Rote Liste*. Rote Liste® Service GmbH, 2010
- [3] ARANDA, J V. ; TURMEN, T ; SASYNIUK, B I.: Pharmacokinetics of diuretics and methylxanthines in the neonate. In: *Eur J Clin Pharmacol* 18 (1980), Jul, Nr. 1, S. 55–63
- [4] ASBURY, M J. ; GATENBY, P B. ; O’SULLIVAN, S ; BOURKE, E: Bumetanide: potent new "loop"diuretic. In: *Br Med J* 1 (1972), Jan, Nr. 5794, S. 211–3
- [5] ASKIE, Lisa M. ; HENDERSON-SMART, David J. ; IRWIG, Les ; SIMPSON, Judy M.: Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants. In: *N Engl J Med* 349 (2003), Sep, Nr. 10, S. 959–67. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa023080>. – DOI 10.1056/NEJMoa023080
- [6] AUFRICHT, C ; VOTAVA, F ; MARX, M ; FRENZEL, K ; SIMBRUNER, G: Intratracheal furosemide in infants after cardiac surgery: its effects on lung mechanics and urinary output, and its levels in plasma and tracheal aspirate. In: *Intensive Care Med* 23 (1997), Sep, Nr. 9, S. 992–7
- [7] BARTTER, F C. ; PRONOVE, P ; GILL, J R. Jr ; MACCARDLE, R C.: Hyperplasia of the juxtaglomerular complex with hyperaldosteronism and hypokalemic alkalosis. A new syndrome. In: *Am J Med* 33 (1962), Dec, S. 811–28
- [8] BEATH, S V.: Hepatic function and physiology in the newborn. In: *Semin Neonatol* 8 (2003), Oct, Nr. 5, S. 337–46. [http://dx.doi.org/10.1016/S1084-2756\(03\)00066-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1084-2756(03)00066-6). – DOI 10.1016/S1084-2756(03)00066-6
- [9] BERLINER, D L. ; RUHMANN, A G.: The influence of dimethyl sulfoxide on fibroblastic proliferation. In: *Ann N Y Acad Sci* 141 (1967), Mar, Nr. 1, S. 159–64

- [10] BORRADORI, C ; FAWER, C L. ; BUCLIN, T ; CALAME, A: Risk factors of sensorineural hearing loss in preterm infants. In: *Biol Neonate* 71 (1997), Nr. 1, S. 1–10
- [11] BRION, L P. ; PRIMHAK, R A.: Intravenous or enteral loop diuretics for preterm infants with (or developing) chronic lung disease. In: *Cochrane Database Syst Rev* (2002), Nr. 1, S. CD001453. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD001453>. – DOI 10.1002/14651858.CD001453
- [12] BRION, L P. ; PRIMHAK, R A. ; AMBROSIO-PEREZ, I: Diuretics acting on the distal renal tubule for preterm infants with (or developing) chronic lung disease. In: *Cochrane Database Syst Rev* (2002), Nr. 1, S. CD001817. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD001817>. – DOI 10.1002/14651858.CD001817
- [13] BRION, L P. ; PRIMHAK, R A. ; YONG, W: Aerosolized diuretics for preterm infants with (or developing) chronic lung disease. In: *Cochrane Database Syst Rev* 3 (2006), S. CD001694. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD001694.pub2>. – DOI 10.1002/14651858.CD001694.pub2
- [14] BRION, L P. ; SOLL, R F.: Diuretics for respiratory distress syndrome in preterm infants. In: *Cochrane Database Syst Rev* (2008), Nr. 1, S. CD001454. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD001454.pub2>. – DOI 10.1002/14651858.CD001454.pub2
- [15] CANESSA, M ; SALAZAR, G ; WERNER, E ; VALLEGA, G ; GONZALEZ, A: Cell growth and Na-K-Cl cotransport responses of vascular smooth muscle cells of Milan rats. In: *Hypertension* 23 (1994), Jun, Nr. 6 Pt 2, S. 1022–6
- [16] CLARK, Reese H. ; BLOOM, Barry T. ; SPITZER, Alan R. ; GERSTMANN, Dale R.: Reported medication use in the neonatal intensive care unit: data from a large national data set. In: *Pediatrics* 117 (2006), Jun, Nr. 6, S. 1979–87. <http://dx.doi.org/10.1542/peds.2005-1707>. – DOI 10.1542/peds.2005-1707
- [17] CLYMAN, Ronald: Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants. In: *J Pediatr* 144 (2004), Mar, Nr. 3, S. 408
- [18] COALSON, J J. ; BLAND, R D. (Hrsg.) ; COALSON, J J. (Hrsg.): *Chronic Lung Disease in Early Infancy*. Informa Healthcar, 2000

- [19] COUROUCLI, X I. ; WELTY, S E. ; RAMSAY, P L. ; WEARDEN, M E. ; FUENTES-GARCIA, F J. ; NI, J ; JACOBS, T N. ; TOWBIN, J A. ; BOWLES, N E.: Detection of microorganisms in the tracheal aspirates of preterm infants by polymerase chain reaction: association of adenovirus infection with bronchopulmonary dysplasia. In: *Pediatr Res* 47 (2000), Feb, Nr. 2, S. 225–32
- [20] D'ANGIO, Carl T. ; MANISCALCO, William M.: Bronchopulmonary dysplasia in preterm infants: pathophysiology and management strategies. In: *Paediatr Drugs* 6 (2004), Nr. 5, S. 303–30
- [21] DARMAN, R B. ; FLEMMER, A ; FORBUSH, B: Modulation of ion transport by direct targeting of protein phosphatase type 1 to the Na-K-Cl cotransporter. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Sep, Nr. 37, S. 34359–62. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.C100368200>. – DOI 10.1074/jbc.C100368200
- [22] DELPIRE, E ; RAUCHMAN, M I. ; BEIER, D R. ; HEBERT, S C. ; GULLANS, S R.: Molecular cloning and chromosome localization of a putative basolateral Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter from mouse inner medullary collecting duct (mIMCD-3) cells. In: *J Biol Chem* 269 (1994), Oct, Nr. 41, S. 25677–83
- [23] DOROSHENKO, P ; SABANOV, V ; DOROSHENKO, N: Cell cycle-related changes in regulatory volume decrease and volume-sensitive chloride conductance in mouse fibroblasts. In: *J Cell Physiol* 187 (2001), Apr, Nr. 1, S. 65–72. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-4652\(200104\)187:1<65::AID-JCP1052>3.0.CO;2-A](http://dx.doi.org/10.1002/1097-4652(200104)187:1<65::AID-JCP1052>3.0.CO;2-A). – DOI 10.1002/1097-4652(200104)187:1<65::AID-JCP1052>3.0.CO;2-A
- [24] DOYLE, Lex W.: Evaluation of neonatal intensive care for extremely-low-birth-weight infants. In: *Semin Fetal Neonatal Med* 11 (2006), Apr, Nr. 2, S. 139–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2005.11.009>. – DOI 10.1016/j.siny.2005.11.009
- [25] DRISCOLL, K E. ; CARTER, J M. ; IYPE, P T. ; KUMARI, H L. ; CROSBY, L L. ; AARDEMA, M J. ; ISFORT, R J. ; CODY, D ; CHESTNUT, M H. ; BURNS, J L.: Establishment of immortalized alveolar type II epithelial cell lines from adult rats. In: *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31 (1995), Nr. 7, S. 516–27
- [26] FLATMAN, Peter W.: Regulation of Na-K-2Cl cotransport by phosphorylation and protein-protein interactions. In: *Biochim Biophys Acta* 1566 (2002), Nov, Nr. 1-2, S. 140–51

- [27] FLEMMER, A ; SIMBRUNER, G ; MUENZER, S ; PROQUITTÉ, H ; HABERL, C ; NICOLAI, T ; LEIDERER, R: Effect of lung water content, manipulated by intratracheal furosemide, surfactant, or a mixture of both, on compliance and viscoelastic tissue forces in lung-lavaged newborn piglets. In: *Crit Care Med* 28 (2000), Jun, Nr. 6, S. 1911–7
- [28] FLEMMER, Andreas W. ; GIMENEZ, Ignacio ; DOWD, Brian F X. ; DARMAN, Rachel B. ; FORBUSH, Biff: Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Oct, Nr. 40, S. 37551–8. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M206294200>. – DOI 10.1074/jbc.M206294200
- [29] FLEMMER, Andreas W. ; MONETTE, Michelle Y. ; DJURISIC, Maja ; DOWD, Brian ; DARMAN, Rachel ; GIMENEZ, Ignacio ; FORBUSH, Biff: Phosphorylation state of the Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporter (NKCC1) in the gills of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) during acclimation to water of varying salinity. In: *J Exp Biol* 213 (2010), May, Nr. Pt 9, S. 1558–66. <http://dx.doi.org/10.1242/jeb.039644>. – DOI 10.1242/jeb.039644
- [30] FORTH, W. ; HENSCHLER, D. ; RUMMEL, W. ; FÖRSTERMANN, U. ; STARKE, K: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 8. Urban & Fischer, 2001
- [31] FRANK, L ; SOSENKO, I R.: Development of lung antioxidant enzyme system in late gestation: possible implications for the prematurely born infant. In: *J Pediatr* 110 (1987), Jan, Nr. 1, S. 9–14
- [32] GECK, P ; PIETRZYK, C ; BURCKHARDT, B C. ; PFEIFFER, B ; HEINZ, E: Electrically silent cotransport on Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in Ehrlich cells. In: *Biochim Biophys Acta* 600 (1980), Aug, Nr. 2, S. 432–47
- [33] GIARD, D J. ; AARONSON, S A. ; TODARO, G J. ; ARNSTEIN, P ; KERSEY, J H. ; DOSIK, H ; PARKS, W P.: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. In: *J Natl Cancer Inst* 51 (1973), Nov, Nr. 5, S. 1417–23
- [34] GIMÉNEZ, Ignacio: Molecular mechanisms and regulation of furosemide-sensitive Na-K-Cl cotransporters. In: *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15 (2006), Sep, Nr. 5,

- S. 517–23. <http://dx.doi.org/10.1097/01.mnh.0000242178.44576.b0>. – DOI 10.1097/01.mnh.0000242178.44576.b0
- [35] GREENOUGH, Anne (Hrsg.) ; MILNER, Anthony D. (Hrsg.): *Neonatal Respiratory Disorders*. 2. Arnold, 2003
- [36] GREENOUGH, Anne ; PREMKUMAR, Muralidhar ; PATEL, Deena: Ventilatory strategies for the extremely premature infant. In: *Paediatr Anaesth* 18 (2008), May, Nr. 5, S. 371–7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9592.2008.02436.x>. – DOI 10.1111/j.1460-9592.2008.02436.x
- [37] GRUBB, B R. ; PACE, A J. ; LEE, E ; KOLLER, B H. ; BOUCHER, R C.: Alterations in airway ion transport in NKCC1-deficient mice. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 281 (2001), Aug, Nr. 2, S. C615–23
- [38] HAAS, M ; FORBUSH, B 3rd: The Na-K-Cl cotransporters. In: *J Bioenerg Biomembr* 30 (1998), Apr, Nr. 2, S. 161–72
- [39] HAAS, M ; FORBUSH, B 3rd: The Na-K-Cl cotransporter of secretory epithelia. In: *Annu Rev Physiol* 62 (2000), S. 515–34. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.515>. – DOI 10.1146/annurev.physiol.62.1.515
- [40] HAAS, M ; MCBRAYER, D ; LYTLE, C: [Cl⁻]_i-dependent phosphorylation of the Na-K-Cl cotransport protein of dog tracheal epithelial cells. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Dec, Nr. 48, S. 28955–61
- [41] HARTUNG, Thomas ; BALLS, Michael ; BARDOUILLE, Claudia ; BLANCK, Olivier ; COECKE, Sandra ; GSTRANTHALER, Gerhard ; LEWIS, David ; ECVAM GOOD CELL CULTURE PRACTICE TASK FORCE: Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. In: *Altern Lab Anim* 30 (2002), Nr. 4, S. 407–14
- [42] HUSAIN, A N. ; SIDDIQUI, N H. ; STOCKER, J T.: Pathology of arrested acinar development in postsurfactant bronchopulmonary dysplasia. In: *Hum Pathol* 29 (1998), Jul, Nr. 7, S. 710–7
- [43] ISENRING, P ; JACOBY, S C. ; CHANG, J ; FORBUSH, B: Mutagenic mapping of the Na-K-Cl cotransporter for domains involved in ion transport and bumetanide binding. In: *J Gen Physiol* 112 (1998), Nov, Nr. 5, S. 549–58

- [44] ISENRING, P ; JACOBY, S C. ; FORBUSH, B 3rd: The role of transmembrane domain 2 in cation transport by the Na-K-Cl cotransporter. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Jun, Nr. 12, S. 7179–84
- [45] IWAMOTO, Lynn M. ; FUJIWARA, Naomi ; NAKAMURA, Kenneth T. ; WADA, Randal K.: Na-K-2Cl cotransporter inhibition impairs human lung cellular proliferation. In: *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287 (2004), Sep, Nr. 3, S. L510–4. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00021.2004>. – DOI 10.1152/ajplung.00021.2004
- [46] JIANG, G ; KLEIN, J D. ; O'NEILL, W C.: Growth factors stimulate the Na-K-2Cl cotransporter NKCC1 through a novel Cl(-)-dependent mechanism. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 281 (2001), Dec, Nr. 6, S. C1948–53
- [47] JOBE, A H. ; BANCALARI, E: Bronchopulmonary dysplasia. In: *Am J Respir Crit Care Med* 163 (2001), Jun, Nr. 7, S. 1723–9
- [48] JOBE, A J.: The new BPD: an arrest of lung development. In: *Pediatr Res* 46 (1999), Dec, Nr. 6, S. 641–3
- [49] KLEIN, J D. ; O'NEILL, W C.: Volume-sensitive myosin phosphorylation in vascular endothelial cells: correlation with Na-K-2Cl cotransport. In: *Am J Physiol* 269 (1995), Dec, Nr. 6 Pt 1, S. C1524–31
- [50] LADHA, Faruqa ; BONNET, Sebastien ; EATON, Farah ; HASHIMOTO, Kyoko ; KORBUTT, Greg ; THÉBAUD, Bernard: Sildenafil improves alveolar growth and pulmonary hypertension in hyperoxia-induced lung injury. In: *Am J Respir Crit Care Med* 172 (2005), Sep, Nr. 6, S. 750–6. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.200503-5100C>. – DOI 10.1164/rccm.200503-5100C
- [51] LAEMMLI, U K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Aug, Nr. 5259, S. 680–5
- [52] LANG: *Mechanisms and Significance of Cell Volume Regulation*. 2007
- [53] LANG, F ; RITTER, M ; GAMPER, N ; HUBER, S ; FILLON, S ; TANNEUR, V ; LEPPLE-WIENHUES, A ; SZABO, I ; GULBINS, E: Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death. In: *Cell Physiol Biochem* 10 (2000), Nr. 5-6, S. 417–28

- [54] LARRAMENDI, C H. ; CHINER, E ; CALPE, J L. ; PUIGSERVER, M T.: Comparative study of inhaled amiloride and inhaled furosemide in exercise-induced asthma. In: *Allergol Immunopathol (Madr)* 25 (1997), Nr. 2, S. 85–90
- [55] LEWIS, V ; WHITELAW, A: Furosemide for transient tachypnea of the newborn. In: *Cochrane Database Syst Rev* (2002), Nr. 1, S. CD003064. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD003064>. – DOI 10.1002/14651858.CD003064
- [56] <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CCL-185&Template=cellBiology>
- [57] <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=CRL-2300&Template=cellBiology>
- [58] LIEBER, M ; SMITH, B ; SZAKAL, A ; NELSON-REES, W ; TODARO, G: A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. In: *Int J Cancer* 17 (1976), Jan, Nr. 1, S. 62–70
- [59] LYTLE, C ; FORBUSH, B 3rd: The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. II. Regulation by direct phosphorylation. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Dec, Nr. 35, S. 25438–43
- [60] LYTLE, C ; FORBUSH, B 3rd: Regulatory phosphorylation of the secretory Na-K-Cl cotransporter: modulation by cytoplasmic Cl. In: *Am J Physiol* 270 (1996), Feb, Nr. 2 Pt 1, S. C437–48
- [61] LYTLE, C ; XU, J C. ; BIEMESDERFER, D ; FORBUSH, B 3rd: Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. In: *Am J Physiol* 269 (1995), Dec, Nr. 6 Pt 1, S. C1496–505
- [62] LYTLE, C ; XU, J C. ; BIEMESDERFER, D ; HAAS, M ; FORBUSH, B 3rd: The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. I. Development of monoclonal antibodies, immunoaffinity purification, and partial biochemical characterization. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Dec, Nr. 35, S. 25428–37
- [63] MAGLOVA, Lilia M. ; CROWE, William E. ; RUSSELL, John M.: Perinuclear localization of Na-K-Cl-cotransporter protein after human cytomegalovirus

- infection. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 286 (2004), Jun, Nr. 6, S. C1324–34. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00404.2003>. – DOI 10.1152/ajpcell.00404.2003
- [64] MCCALLION, N ; DAVIS, P G. ; MORLEY, C J.: Volume-targeted versus pressure-limited ventilation in the neonate. In: *Cochrane Database Syst Rev* (2005), Nr. 3, S. CD003666. <http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD003666.pub2>. – DOI 10.1002/14651858.CD003666.pub2
- [65] MIROCHNICK, M H. ; MICELI, J J. ; KRAMER, P A. ; CHAPRON, D J. ; RAYE, J R.: Furosemide pharmacokinetics in very low birth weight infants. In: *J Pediatr* 112 (1988), Apr, Nr. 4, S. 653–7
- [66] NICOLETTI, I ; MIGLIORATI, G ; PAGLIACCI, M C. ; GRIGNANI, F ; RICCARDI, C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. In: *J Immunol Methods* 139 (1991), Jun, Nr. 2, S. 271–9
- [67] NORTHWAY, W H. Jr ; ROSAN, R C. ; PORTER, D Y.: Pulmonary disease following respirator therapy of hyaline-membrane disease. Bronchopulmonary dysplasia. In: *N Engl J Med* 276 (1967), Feb, Nr. 7, S. 357–68
- [68] PANET, R ; ATLAN, H: Stimulation of bumetanide-sensitive Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransport by different mitogens in synchronized human skin fibroblasts is essential for cell proliferation. In: *J Cell Biol* 114 (1991), Jul, Nr. 2, S. 337–42
- [69] PANET, R ; FROMER, I ; ATLAN, H: Differentiation between serum stimulation of ouabain-resistant and sensitive Rb influx in quiescent NIH 3T3 cells. In: *J Membr Biol* 70 (1982), Nr. 2, S. 165–9
- [70] PANET, R ; MARCUS, M ; ATLAN, H: Overexpression of the Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾/Cl⁽⁻⁾ cotransporter gene induces cell proliferation and phenotypic transformation in mouse fibroblasts. In: *J Cell Physiol* 182 (2000), Jan, Nr. 1, S. 109–18. [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200001\)182:1<109::AID-JCP12>3.0.CO;2-A](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200001)182:1<109::AID-JCP12>3.0.CO;2-A). – DOI 10.1002/(SICI)1097-4652(200001)182:1<109::AID-JCP12>3.0.CO;2-A
- [71] PANET, R ; MARKUS, M ; ATLAN, H: Bumetanide and furosemide inhibited vascular endothelial cell proliferation. In: *J Cell Physiol* 158 (1994), Jan, Nr. 1, S. 121–7. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1041580115>. – DOI 10.1002/jcp.1041580115

- [72] PANET, R ; SNYDER, D ; ATLAN, H: Amiloride added together with bumetanide completely blocks mouse 3T3-cell exit from G0/G1-phase and entry into S-phase. In: *Biochem J* 239 (1986), Nov, Nr. 3, S. 745–50
- [73] PEDERSEN, Meike ; CARMOSINO, Monica ; FORBUSH, Biff: Intramolecular and intermolecular fluorescence resonance energy transfer in fluorescent protein-tagged Na-K-Cl cotransporter (NKCC1): sensitivity to regulatory conformational change and cell volume. In: *J Biol Chem* 283 (2008), Feb, Nr. 5, S. 2663–74. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M708194200>. – DOI 10.1074/jbc.M708194200
- [74] PETERSON, R G. ; SIMMONS, M A. ; RUMACK, B H. ; LEVINE, R L. ; BROOKS, J G.: Pharmacology of furosemide in the premature newborn infant. In: *J Pediatr* 97 (1980), Jul, Nr. 1, S. 139–43
- [75] PIERCE, M R. ; BANCALARI, E: The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. In: *Pediatr Pulmonol* 19 (1995), Jun, Nr. 6, S. 371–8
- [76] PONTO, L L. ; SCHOENWALD, R D.: Furosemide (frusemide). A pharmacokinetic/pharmacodynamic review (Part I). In: *Clin Pharmacokinet* 18 (1990), May, Nr. 5, S. 381–408
- [77] PONTO, L L. ; SCHOENWALD, R D.: Furosemide (frusemide). A pharmacokinetic/pharmacodynamic review (Part II). In: *Clin Pharmacokinet* 18 (1990), Jun, Nr. 6, S. 460–71
- [78] PRANDOTA, J: Clinical pharmacology of furosemide in children: a supplement. In: *Am J Ther* 8 (2001), Nr. 4, S. 275–89
- [79] PRANDOTA, Joseph: Furosemide: progress in understanding its diuretic, anti-inflammatory, and bronchodilating mechanism of action, and use in the treatment of respiratory tract diseases. In: *Am J Ther* 9 (2002), Nr. 4, S. 317–28
- [80] RAIS-BAHRAMI, K ; MAJD, Massoud ; VESZELOVSZKY, Edina ; SHORT, Billie L.: Use of furosemide and hearing loss in neonatal intensive care survivors. In: *Am J Perinatol* 21 (2004), Aug, Nr. 6, S. 329–32. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2004-831887>. – DOI 10.1055/s-2004-831887
- [81] RAU, S: Die Geschichte der Diuretika: Vom Coffein zum Furosemid. In: *Pharmazie in unserer Zeit* 35 (2006), Jun, Nr. 4, S. 286 – 292

- [82] REINHARDT, D: *Cystische Fibrose*. Springer Berlin Heidelberg; Auflage 1, 2001
- [83] RESHKIN, S J. ; LEE, S I. ; GEORGE, J N. ; TURNER, R J.: Identification, characterization and purification of a 160 kD bumetanide-binding glycoprotein from the rabbit parotid. In: *J Membr Biol* 136 (1993), Nov, Nr. 2, S. 243–51
- [84] ROJAS, M A. ; GONZALEZ, A ; BANCALARI, E ; CLAURE, N ; POOLE, C ; SILVANELO, G: Changing trends in the epidemiology and pathogenesis of neonatal chronic lung disease. In: *J Pediatr* 126 (1995), Apr, Nr. 4, S. 605–10
- [85] RUSSELL, J M.: Sodium-potassium-chloride cotransport. In: *Physiol Rev* 80 (2000), Jan, Nr. 1, S. 211–76
- [86] SAWYER, M H. ; EDWARDS, D K. ; SPECTOR, S A.: Cytomegalovirus infection and bronchopulmonary dysplasia in premature infants. In: *Am J Dis Child* 141 (1987), Mar, Nr. 3, S. 303–5
- [87] SHIOZAKI, Atsushi ; MIYAZAKI, Hiroaki ; NIISATO, Naomi ; NAKAHARI, Takashi ; IWASAKI, Yoshinobu ; ITOI, Hirosumi ; UEDA, Yuji ; YAMAGISHI, Hisakazu ; MARUNAKA, Yoshinori: Furosemide, a blocker of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransporter, diminishes proliferation of poorly differentiated human gastric cancer cells by affecting G0/G1 state. In: *J Physiol Sci* 56 (2006), Dec, Nr. 6, S. 401–6. <http://dx.doi.org/10.2170/physiolsci.RP010806>. – DOI 10.2170/physiolsci.RP010806
- [88] SMITH, S A. ; PILLERS, D A. ; GILHOOLY, J T. ; WALL, M A. ; OLSEN, G D.: Furosemide pharmacokinetics following intratracheal instillation in the guinea pig. In: *Biol Neonate* 68 (1995), Nr. 3, S. 191–9
- [89] SONTHEIMER, Harald: An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis. In: *Exp Biol Med (Maywood)* 233 (2008), Jul, Nr. 7, S. 779–91. <http://dx.doi.org/10.3181/0711-MR-308>. – DOI 10.3181/0711-MR-308
- [90] SOOTHILL, P W. ; NICOLAIDES, K H. ; RODECK, C H. ; GAMSU, H: Blood gases and acid-base status of the human second-trimester fetus. In: *Obstet Gynecol* 68 (1986), Aug, Nr. 2, S. 173–6
- [91] STEFAN, L ; LESCHIN, A ; GRAY, K: Capillary Po_2 in neonates. In: *Pediatrics* 43 (1969), Apr, Nr. 4, S. 637

- [92] THE STOP-ROP MULTICENTER STUDY GROUP: Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold Retinopathy Of Prematurity (STOP-ROP), a randomized, controlled trial. I: primary outcomes. In: *Pediatrics* 105 (2000), Feb, Nr. 2, S. 295–310
- [93] THIBEAULT, D W. ; POBLETE, E ; AULD, P A.: Alveolar-arterial oxygen difference in premature infants breathing 100 per cent oxygen. In: *J Pediatr* 71 (1967), Dec, Nr. 6, S. 814–24
- [94] THIBEAULT, D W. ; POBLETE, E ; AULD, P A.: Alveolar-arterial O₂ and CO₂ differences and their relation to lung volume in the newborn. In: *Pediatrics* 41 (1968), Mar, Nr. 3, S. 574–87
- [95] TIN, Win ; WISWELL, Thomas E.: Drug therapies in bronchopulmonary dysplasia: debunking the myths. In: *Semin Fetal Neonatal Med* 14 (2009), Dec, Nr. 6, S. 383–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2009.08.003>. – DOI 10.1016/j.siny.2009.08.003
- [96] TORCHIA, J ; LYTLE, C ; PON, D J. ; FORBUSH, B 3rd ; SEN, A K.: The Na-K-Cl cotransporter of avian salt gland. Phosphorylation in response to cAMP-dependent and calcium-dependent secretagogues. In: *J Biol Chem* 267 (1992), Dec, Nr. 35, S. 25444–50
- [97] TSINMAN, Konstantin ; AVDEEF, Alex ; TSINMAN, Oksana ; VOLOBOY, Dmytro: Powder dissolution method for estimating rotating disk intrinsic dissolution rates of low solubility drugs. In: *Pharm Res* 26 (2009), Sep, Nr. 9, S. 2093–100. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-009-9921-3>. – DOI 10.1007/s11095-009-9921-3
- [98] TUPPER, J T. ; ZORNIOTTI, F ; MILLS, B: Potassium transport and content during G1 and S phase following serum stimulation of 3T3 cells. In: *J Cell Physiol* 91 (1977), Jun, Nr. 3, S. 429–40. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.1040910313>. – DOI 10.1002/jcp.1040910313
- [99] VIEBAHN, Cornelia S. ; TIRNITZ-PARKER, Janina E E. ; OLYNYK, John K. ; YEOH, George C T.: Evaluation of the "Cellscreen" system for proliferation studies on liver progenitor cells. In: *Eur J Cell Biol* 85 (2006), Dec, Nr. 12, S. 1265–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.08.006>. – DOI 10.1016/j.ejcb.2006.08.006

- [100] VISSER, Yvonne P. ; WALTHER, Frans J. ; LAGHMANI, El H. ; BOERSMA, Hester ; LAARSE, Arnoud van d. ; WAGENAAR, Gerry T.: Sildenafil attenuates pulmonary inflammation and fibrin deposition, mortality and right ventricular hypertrophy in neonatal hyperoxic lung injury. In: *Respir Res* 10 (2009), S. 30. <http://dx.doi.org/10.1186/1465-9921-10-30>. – DOI 10.1186/1465-9921-10-30
- [101] WATTERBERG, K L. ; DEMERS, L M. ; SCOTT, S M. ; MURPHY, S: Chorioamnionitis and early lung inflammation in infants in whom bronchopulmonary dysplasia develops. In: *Pediatrics* 97 (1996), Feb, Nr. 2, S. 210–5
- [102] WINE, J J. ; SOLC, C K.: Chloride channels in cystic fibrosis patients. In: *Science* 247 (1990), Jan, Nr. 4939, S. 222
- [103] YAN, Yiping ; DEMPSEY, Robert J. ; FLEMMER, Andreas ; FORBUSH, Biff ; SUN, Dandan: Inhibition of Na(+)-K(+)-Cl(-) cotransporter during focal cerebral ischemia decreases edema and neuronal damage. In: *Brain Res* 961 (2003), Jan, Nr. 1, S. 22–31
- [104] YERBY, T R. ; VIBAT, C R. ; SUN, D ; PAYNE, J A. ; O'DONNELL, M E.: Molecular characterization of the Na-K-Cl cotransporter of bovine aortic endothelial cells. In: *Am J Physiol* 273 (1997), Jul, Nr. 1 Pt 1, S. C188–97
- [105] YOON, B H. ; ROMERO, R ; JUN, J K. ; PARK, K H. ; PARK, J D. ; GHEZZI, F ; KIM, B I.: Amniotic fluid cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-8) and the risk for the development of bronchopulmonary dysplasia. In: *Am J Obstet Gynecol* 177 (1997), Oct, Nr. 4, S. 825–30
- [106] YOUNG, Thomas ; MANGUM, Barry.: *Arzneimittelhandbuch für die Neonatologie*. 3. Hummler, Helmut and Maier, Ludwig, 2006

Danksagung

So Long, and Thanks for All the Fish¹

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. A.W. Flemmer. Er war mir in den vergangenen Jahren ein exzellenter Oberarzt und Lehrer. Durch die Freiheiten, die er mir in seiner Arbeitsgruppe eingeräumt hat, hatte ich die Möglichkeit mir ein breites Spektrum an Labortechniken anzueignen, eigene Fragestellungen zu entwickeln und diese zu beantworten.

Dennis André Ballwieser ist mir seit dem Beginn meines Studiums ein Freund und geistiger Sparringspartner. Ohne ihn wären viele meiner Fragen und Antworten nicht entstanden.

Maria Stöppler half mir bei der sprachlichen Korrektur dieser Arbeit. Durch ihre Fragen, Anregungen und Kommentare zu wissenschaftlichen Fragestellungen und klinischen Problemen hielt sie mich immer wieder wach.

Prof. F.X. Beck (Zelluläre Physiologie der Universität München) hat mir in seinen phänomenalen Seminaren das kritische Lesen und Bewerten medizinischer Fachartikel beigebracht.

Dr. J. Glöckner-Pagel hat mir wichtige Tips zu Verfahren der Zellkultur, SDS-Page und weiterer molekularbiologischer Arbeitsweisen gegeben.

Sybille Gündisch und Dr. H. Ehrhardt haben mir die Möglichkeit verschafft am HelmholtzZentrum münchen Zellproliferationsmessungen mit der CellScreen Methode durchzuführen und konfokalmikroskopische Bilder anzufertigen.

Dr. D. Hartl erarbeitete mit mir das in dieser Arbeit verwendete Setting zur FACS-Analyse von A549 Zellen.

Geraldine Jowett und Patrick Tanribil durfte ich bei der Anfertigung ihrer Facharbeiten im Leistungskurs Biologie des Maria-Theresia-Gymnasiums München betreuen. Frau Jowett fertigte in dieser Arbeit unter meiner Anleitung Präparate für die Konfokalmikroskopie an. Herr Tanribil führte mit mir zusammen Immunoblots aus. Beide sind bei einigen Teilen dieser Arbeit als Co-Experimentatoren angegeben.

¹Douglas Adams, fourth book of the Hitchhiker's Guide to the Galaxy series, 1984

Chris Lytle Ph.D. (Duke University) und Biff Forbush Ph.D (Yale University) unterstützten diese Arbeit durch NKCC1 spezifische Antikörper.

Ich grüße meine Mama, meinen Papa und ganz besonders meine Eltern.²

²Mario Basler

Eidesstattliche Versicherung

Benjamin Ackermann

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Der Effekt von Furosemid auf die Proliferation von Alveolarepithelzellen

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum, Unterschrift